



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES de la Vie et de la Santé

Par Nicolas, ARRAUD

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Biochimie

**Etude cinétique de la liaison élémentaire
entre Annexine-A5 et membranes
et mise au point d'un test de quantification des microparticules
plasmatiques pro-coagulantes, par cytométrie en flux**

Directeur de recherche : Pr. Alain BRISSON

Soutenue le : 19 Décembre 2011

Devant la commission d'examen formée de :

Mme DIGNAT-GEORGE, Françoise	Professeur. Université Aix-Marseille 2	Rapporteur
M. AYALA-SANMARTIN, Jésus	Chargé de recherche. CNRS UMR 7203	Rapporteur
M.NURDEN, Alan	Directeur de recherche Université Bordeaux Segalen	Président
M.BRISSON, Alain	Professeur. Université Bordeaux 1	Directeur de thèse

Mots-clef: Annexine A5, cinétique de liaison, cytométrie en flux, bicouche lipidique supportée, microsphères de silice, phosphatidylsérine, microparticules plasmatiques, quantification.

English title: Kinetics of Annexin-A5 binding to model membranes studied by Flow Cytometry and development of a new method for quantifying Plasmatic Microparticles

Keywords: Annexin A5, binding kinetics, flow cytometry, supported lipid bilayer, silica microspheres, phosphatidylserine, plasmatic microparticles, quantification.

Résumé

L'Annexine A5 (AnxA5) est une protéine soluble se liant aux membranes contenant de la phosphatidylsérine (PS) en présence de calcium (Ca^{2+}). Le rôle central joué par l'AnxA5 dans les processus de réparation membranaire a été récemment mis en évidence. L'AnxA5 possède une très forte affinité pour les membranes biologiques contenant de la PS, cependant son mode de liaison aux membranes n'est pas encore élucidé.

La première partie de mon travail de thèse a concerné le développement d'une approche originale d'étude de la liaison de l'AnxA5 à des microsphères de silice fonctionnalisées par une bicouche lipidique ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ pour supported lipid bilayer), par cytométrie en flux (FCM). Cette approche m'a permis d'étudier la liaison à l'équilibre et en cinétique à très faible concentration en AnxA5, de l'ordre du picomolaire. Cette approche représente une des méthodes les plus sensibles d'étude de liaison à l'équilibre et la première permettant d'accéder aux constantes cinétiques d'interaction pour l'AnxA5. Cette étude m'a également permis de mettre au point une stratégie de dosage indirect de liposomes contenant de la PS avec une sensibilité de l'ordre du nanogramme de lipides par millilitre.

La seconde partie de ma thèse a concerné l'étude de microparticules (MP), fragments de membranes cellulaires présents dans les fluides biologiques. Dans le plasma sanguin la majorité des MP sont d'origine plaquettaire et exposent de la PS. Il existe une corrélation entre la concentration en MP plasmatiques exposant de la PS et le développement de pathologies thrombotiques. La FCM est la méthode de référence dans l'étude des MP cependant leur détection est rendue difficile par leur petite taille. J'ai appliqué aux MP plasmatiques le test de dosage développé pour les liposomes. Les résultats obtenus sont prometteurs et permettent d'envisager le développement d'un test de dosage de l'ensemble des MP exposant de la PS.

Abstract

Annexin-A5 (AnxA5) is a soluble membrane binding protein that binds to phosphatidylserine (PS) containing membranes in a calcium dependent manner and plays a central role in cell membrane repair processes. AnxA5 has a remarkably high affinity for PS containing membranes, but its binding mechanism remains unclear.

The first part of my PhD work was to develop a new method for studying AnxA5 binding using supported lipid bilayer functionalized silica microspheres ($\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$) and Flow Cytometry (FCM). This approach allowed me to describe in details both equilibrium and kinetics of AnxA5 binding at picomolar concentrations in AnxA5. This study is one of the most sensitive for equilibrium binding studies and the first allowing to measure binding kinetics constants for AnxA5. This study also led to the development of a new strategy for determination of liposome concentration with sensitivity in the range of one nanogram of lipid per milliliter.

The second part of my work focused on microparticles (MP) that are cell membrane fragments found in biological fluids. In plasma, the vast majority of MP originates from platelets and expresses PS at their surface. There is a correlation between MP concentration in plasma and thrombotic risk. FCM is the “golden standard” of hæmatologic analysis but the majority of MPs are too small to be detected. I have applied the test developed with liposomes for the quantification of MP. The results are promising and allow foreseeing the development of a test able to give the absolute quantity of PS exposing MPs in plasma samples.

“- C’EST DU CARBONE ORDINAIRE QUI
A SUBI UNE CHALEUR ET UNE
PRESSION ÉNORMES, RIEN D’AUTRE.

- Dans tout boulet de charbon, il y a
un diamant qui sommeille, c’est ça ?
- OUI, MADEMOISELLE TROTTEMENU. »

Extrait de « Le faucheur », 9^{ème} volume des
Annales du Disque-Monde par Terry PRATCHETT

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Madame Françoise Dignat-George et Messieurs Jésus Ayala-Sanmartin et Alan Nurden, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci pour vos corrections et vos conseils.

Je remercie plus particulièrement Alain Brisson pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse et d'enseigner la biochimie. J'ai rencontré Alain alors que j'étais étudiant en licence, et je dirais qu'il a cru en moi, en ce que je pouvais faire, en ce que je pouvais devenir. J'ai donc embrassé la voie de la biochimie et même si ça n'a pas été simple, même si ça m'a demandé beaucoup d'effort, je ne regrette pas mon choix. Merci Alain, pour tout ce que vous m'avez appris, sur la science et pas uniquement sur la science. Je m'efforcerai de ne pas oublier le γνῶθι σεαυτόν.

J'ai effectué mon travail de thèse au sein de l'UMR-CNRS 5248 CBMN, je remercie donc son directeur Erick Dufourc pour son accueil. Durant ma thèse j'ai enseigné en tant que moniteur affecté à l'UFR des sciences biologiques de l'Université Bordeaux 1, je remercie donc son directeur Jean-Pierre Renaudin pour cette opportunité qui m'a permis de confirmer que je souhaite devenir enseignant-chercheur.

Un grand merci à tous les membres passés ou présents du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Nano-Bio-Technologie.

Céline Gounou pour la production et la purification de toutes les Annexines A5 fluorescentes que j'ai utilisées, pour les expériences de cytométrie en flux que tu as faites pour m'aider, pour l'aide que tu m'as apportée lors de la préparation des travaux pratiques, pour la correction de mes fautes de français et surtout pour ta disponibilité et ton énergie au quotidien.

Sisareuth Tan pour toutes les expériences de cryo-microscopie électronique en transmission que tu as effectuées sur les plaquettes et les microparticules.

Anthony Bouter ton expertise en fluorescence, pour ta bonne humeur et pour m'avoir appris des rudiments de bricolage.

Durant mon cursus universitaire j'ai effectué deux stages au LIMNT durant lesquels j'ai été encadré par Rémi Berat et par Stéphane Mornet.

Rémi, merci de m'avoir appris le QCM-D et surtout merci pour ta grande disponibilité et ta joie de vivre.

Stéphane, merci de m'avoir « déniaisé » sur la chimie des solides, ça m'aura beaucoup servi durant ma thèse.

Je remercie pêle-mêle Joséphine Lai-Kee-Him, Anne Simon, Boris Garnier, Yali Wan, Emilie Bled, Sophia Ziane, Fabrice Casenave, Benoît Faurie et Olivia N'Doye pour tous les bons moments passés au, et hors du laboratoire.

Je remercie également les membres du laboratoire Architecture des Complexes Membranaires et Processus Cellulaires avec lesquels nous avons cohabité pendant plusieurs années au bâtiment B8. Je remercie donc Olivier Lambert, Jean-Christophe Taveau et Pierre Bonnafous. Je remercie tout spécialement Sylvain Trepout pour les rigolades en « benchant », et Olivier Le Bihan pour toutes les soirées et leurs lendemains de bordée.

Pour l'IECB, je tiens à remercier Stéphanie Durrieu-Gaillard qui m'a initié à la cytométrie en flux et Sabrina Rousseau pour son aide avec le FACS Aria de l'institut.

Je remercie enfin ma famille et mes amis pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de ces années.

Table des matières

Chapitre 1	11
Introduction.....	11
1.1 Les Annexines	11
1.1.1 L'Annexine A5 (AnxA5).....	15
1.1.2 Liaison de l'AnxA5 aux membranes	17
1.2 La cytométrie en flux	23
1.2.1 Comment détecter une cellule en FCM ?	25
1.2.1.1 La méthode Coulter.....	25
1.2.1.2 Diffusion de la lumière	27
1.2.2 La fluorescence en FCM	29
1.2.3 Intérêt de la FCM à l'étude des interactions moléculaires.....	32
1.3 Les microparticules plasmatiques	38
1.3.1 Les microparticules plasmatiques sont procoagulantes.....	41
1.3.2 Mesurer la concentration en microparticules dans un échantillon de plasma	43
1.3.2.1 Les méthodes indirectes	43
1.3.2.2 Les méthodes directes	44
Chapitre 2	52
Matériels et Méthodes.....	52
2.1 Liste des produits utilisés	52
2.2 Tampons	53
2.3 Microscopies.....	53
2.4 Spectrofluorimétrie	54
2.5 Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)	54
2.6 Cytométrie en flux (FCM)	56
2.7 Préparation et mise en forme de liposomes	61
2.8 Production de microsphères de silice recouvertes d'une bicouche lipidique supportée ($\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$)	64
2.9 Production d'AnxA5 fluorescentes	64
2.10 Préparation de plaquettes et de microparticules plasmatiques.....	70

Chapitre 3	72
Résultats	72
3.1 Production de microsphères de silice recouvertes d'une bicouche lipidique supportée	72
3.1.1 Formation d'une bicouche lipidique supportée sur les microsphères de silice.	74
3.1.2 Caractérisation de la formation d'une SLB sur les microsphères de silice.	78
3.1.2.1 Différents modes d'association des SUV sur les μPSiO_2	79
3.1.2.1.1 Cas d'une SVL	79
3.1.2.1.2 Cas d'une SLB	81
3.1.2.2 Formation de SLB suivie par fluorescence	82
3.1.2.3 Dosage des phospholipides par dosage du phosphate.....	87
3.2 Liaison de l'AnxA5 à des μPSiO_2 @SLB mesurée par FCM	90
3.2.1 Mise en évidence de l'interaction entre l'AnxA5 et les μPSiO_2 @SLB par SDS-PAGE	91
3.2.2 Mise en évidence de l'interaction entre l'AnxA5 et les μPSiO_2 @SLB par FCM.	92
3.2.3 Comparaison de la liaison de l'AnxA5 et de l'AnxA5-Fluorescéine à des μPSiO_2 @SLB	96
3.2.4 Liaison à l'équilibre.	98
3.2.4.1 Limite de détection	102
3.2.4.2 Détermination du K_d	104
3.2.5 Cinétique de liaison.....	111
3.2.5.1 Méthode des vitesses initiales	116
3.2.5.2 Evolution exponentielle de la fluorescence en fonction du temps.	119
3.2.5.3 Constante cinétique de dissociation (k_{off})	128
3.3 Compétition de liaison de l'AnxA5 entre des μPSiO_2 @SLB et des membranes synthétiques (liposomes)	133
3.3.1 Compétition de liaison à l'équilibre.....	133
3.3.2 Compétition de liaison en cinétique	140
3.4 Liaison de l'AnxA5 aux plaquettes et aux microparticules plasmatiques, déterminée par FCM.....	150
3.4.1 Liaison de l'AnxA5 aux plaquettes non activées et activées	150
3.4.2 Liaison de l'AnxA5 aux microparticules plasmatiques.....	157
3.5 Caractérisation structurale des Microparticules Plasmatiques Pro-coagulantes	170

Chapitre 4	172
Conclusions et perspectives	172
Bibliographie	178
Annexe.....	189

Liste des abréviations

Δf : Variation de fréquence de résonance

μPSiO_2 : Microsphères de silice

$\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$: Microsphères de silice fonctionnalisées par des SLB

AnxA5 : Annexine A5

AnxA5_B : Mutant (T163C ; C314S) de l'AnxA5

Ca^{2+} : Ion Calcium

Di : Lipide fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EGTA : Acide éthylène-glycol-tétraacétique

FCM : Cytométrie en flux

FS : Diffusion axiale de la lumière

K_d : Constante thermodynamique de dissociation

k_{coll} : Constante collisionnelle

k_{off} : Constante cinétique de dissociation

k_{on} : Constante cinétique d'association

LIMNT : Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanoBioTechnologies

LUV : Liposomes unilamellaires de grande taille (200-800nm)

MET : Microscopie électronique en transmission

MLV : Liposomes multi lamellaires

NBD : Fluorophore 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl

NHS : Ester de N-Hydroxysuccinimide

MP : Microparticules

PC : Phosphatidylcholine

PPACK : Peptide Phénilalanyl-Prolyl-Arginyl Chlorométhylcétone

PPP : Plasma pauvre en plaquettes

PRP : Plasma riche en plaquettes

PS : Phosphatidylsérine

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

SLB : Bicouche lipidique supportée

SS : Diffusion orthogonale de la lumière

SUV : Liposomes unilamellaires de petite taille (30-50nm)

SVL : Monocouche de vésicule adsorbée et non éclatée

TRAP : Thrombin Related Agonist Peptide

QCM-D : Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation

Glossaire de cytométrie en flux

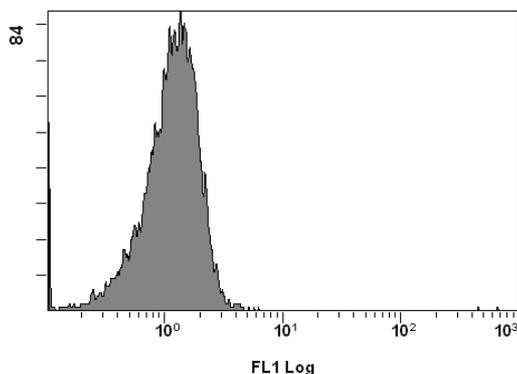
La cytométrie en flux (FCM) étant la principale technique d'étude présentée dans ce manuscrit, je me dois de présenter certains termes du jargon de la technique. L'objectif de ce glossaire est d'améliorer la compréhension des étapes de traitement des données de FCM présentées au chapitre 2.

Généralités

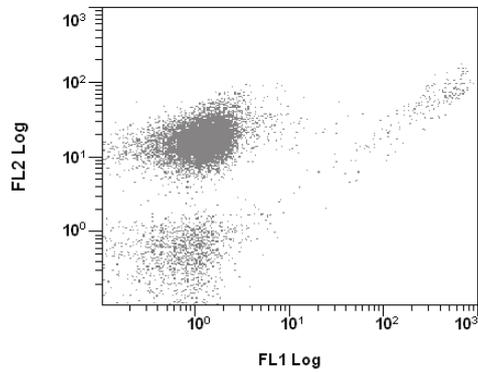
- Paramètre : Chaque variable mesurée par un cytomètre en flux est appelé paramètre. Il peut s'agir par exemple de la diffusion axiale de la lumière (FS), de la diffusion orthogonale de la lumière (SS), de l'intensité de fluorescence, du temps, etc.

Représentation des données en FCM

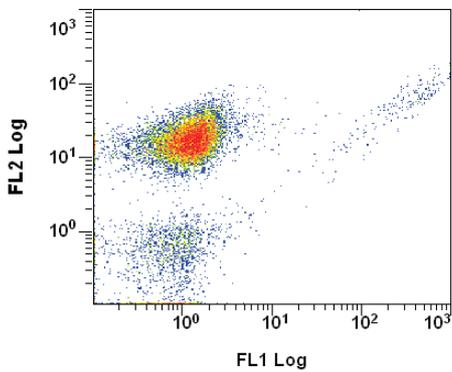
- Histogramme : Mode de représentation monoparamétrique des données.
L'histogramme présente sur son axe des abscisses, la valeur d'un paramètre et en ordonnée, le nombre d'élément ayant cette valeur.



- Dot Plot : Mode de représentation biparamétrique des données. L'intersection des mesures de deux paramètres crée un point.

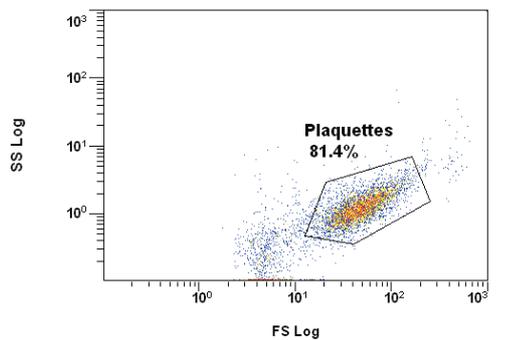


- Density Plot : Mode de représentation intermédiaire entre bi et triparamétrique. Comme dans le cas du Dot Plot, l'intersection de deux mesures d'un élément crée un point. La couleur du point indique si ces mesures sont rares ou fréquentes dans l'échantillon analysé.



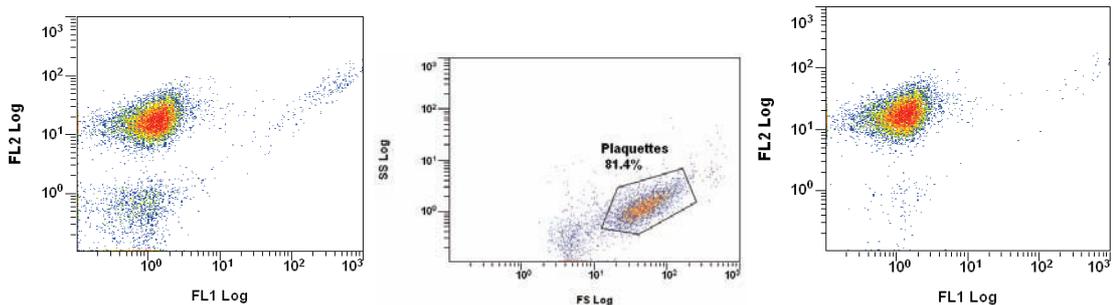
Traitement des données de FCM

- Région : zone de l'espace, elle peut constituer un intervalle sur un histogramme, une surface sur une représentation biparamétrique ou un volume dans une représentation triparamétrique. Une région est définie par les coordonnées qu'elle occupe dans l'espace. Les régions permettent de définir une zone de l'espace pour obtenir les statistiques des mesures lui appartenant.



Region	Number	%Total	%Gated	X-Median 50.0	X-Mean	HP X-CV	Y-Median 50.0	Y-Mean	HP Y-CV
ALL	11516	100.00	100.00	42	52.1	5.49	1.09	1.46	##
Plaqu...	9372	81.38	81.38	47.2	55.2	5.49	1.18	1.35	13.30

- Gate : Région associée à une fonction de restriction. Les mesurer appartenant à une gate sont regroupées sous la forme d'une « famille ». Cette fonction permet d'extraire des informations correspondant à une région d'intérêt.



De gauche à droite : Données de fluorescence brutes. Création d'une gate correspondant à une population d'intérêt, ici des plaquettes. Analyse de la fluorescence associée aux plaquettes

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les Annexines

Les Annexines constituent une famille de protéines comptant 160 membres en 2002, présentes chez tous les organismes eucaryotes à l'exception des levures (Gerke et Moss 2002). Les Annexines sont solubles en solvant aqueux et ont la capacité de se lier aux membranes biologiques en présence d'ions calcium (Ca^{2+}) (Gerke, Creutz, et Moss 2005). Plus précisément, les Annexines se lient aux phospholipides négativement chargés contenus dans les membranes biologiques c'est-à-dire principalement les phosphatidylsérines (PS) (Devaux 1992; Zachowski 1993). Les études *in vitro* ont toutefois montré que les Annexines ne reconnaissent pas spécifiquement les PS mais peuvent se lier à différents types de phospholipides négativement chargés (Blackwood et Ernst 1990). Les Annexines se lient de manière réversible aux membranes, l'association et la dissociation étant entièrement contrôlées par la concentration en Ca^{2+} dans le milieu. Cette propriété n'est pas propre aux Annexines, et est partagée par d'autres familles de protéines comme les facteurs de la coagulation sanguine, certaines kinases et phospholipases (Lemmon 2008). Parmi ces protéines, les Annexines constituent une famille unique par leur structure et par la structure des sites de liaison du Ca^{2+} (Swairjo et al. 1995).

Les études phylogénétiques ont permis de regrouper les Annexines en cinq familles appelées Annexines A à Annexines E (Gerke et Moss 2002). Dans la suite de ce manuscrit, je traiterai uniquement des 13 Annexines humaines c'est-à-dire les Annexine A1 à Annexine A13.

Les Annexines possèdent une structure générale schématisée en figure 1.1. Deux parties sont identifiables. Le segment N terminal, de longueur variable est propre à chaque Annexine. La partie C terminale au contraire est très conservée entre les Annexines et constitue le module de liaison aux membranes. Ce module est constitué de quatre répétitions d'une séquence d'environ 70 acides aminés appelé domaine Annexine, contenant les sites de liaison du Ca^{2+} et des membranes propres aux Annexines (Seaton et Dedman 1998). L'Annexine A6 est la seule protéine à s'écarter de ce schéma général ; elle possède huit domaines Annexines constituant deux modules de liaison aux membranes.

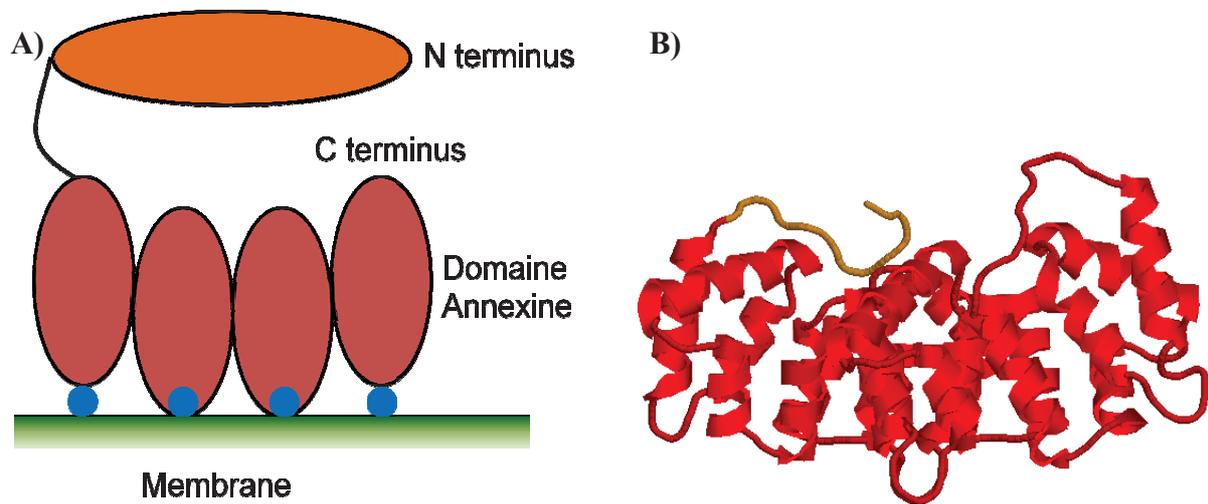


Figure 1.1 : A) Schéma de la structure générale des Annexines. Adapté de (Gerke, Creutz, et Moss 2005). B) Structure cristallographique de l'Annexine A2 (PDB ID : 1W7B). La partie N terminale est représentée en orange et le module de liaison aux membranes est représenté en rouge. La structure présentée en B) ne contient pas les 20 premiers d'acides aminés de la protéine.

Les Annexines constituent la seconde famille de protéines liant le Ca^{2+} dont la structure cristallographique ait été déterminée, après la famille des calmodulines (Seaton 1995). Comparativement au site de liaison de la calmoduline, le fameux « E-F hand », les sites de

liaison des Annexines sont totalement différents. La calmoduline possède quatre sites de liaison identiques du Ca^{2+} alors que les Annexines peuvent lier en moyenne entre 10 et 12 Ca^{2+} (Evans et Nelsestuen 1994), chaque domaine Annexine pouvant lier jusqu'à trois Ca^{2+} . Les trois sites de liaison du Ca^{2+} sont classés en deux familles, les sites de type II de forte affinité pour le Ca^{2+} et les sites de type III d'affinité plus faible pour le Ca^{2+} (Weng et al. 1993). Chaque domaine Annexine possède un site de type II et jusqu'à deux sites de type III, le site de type II ayant une structure similaire au site de liaison du Ca^{2+} de la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2). La figure 1.2 présente les structures des sites de liaison du Ca^{2+} de la calmoduline (A), du domaine Annexine (B) et de la sPLA2 (C). La cristallographie des rayons X a été effectuée sur des Annexines en solution mais il est impossible jusqu'à présent d'obtenir des cristaux 3D en présence de membranes. L'équipe de B. Seaton a réussi à cristalliser l'Annexine A5 (AnxA5) en présence de glycérophosphosérine et de glycérophosphoéthanolamine et a proposé un modèle structural du complexe entre l'AnxA5 et le groupement glycérophosphosérine (Swairjo et al. 1995). Des cristaux 2D d'Annexines formés au niveau de monocouches lipidiques ont été analysés par cristallographie électronique, qui est une technique capable de déterminer la structure de macromolécules à une résolution sub-nanométrique, insuffisante toutefois pour déterminer la position des atomes (Mosser et al. 1991). Ces structures donnent des pistes pour la compréhension des bases moléculaires de l'interaction avec les membranes sans que cette dernière soit totalement comprise à l'heure actuelle.

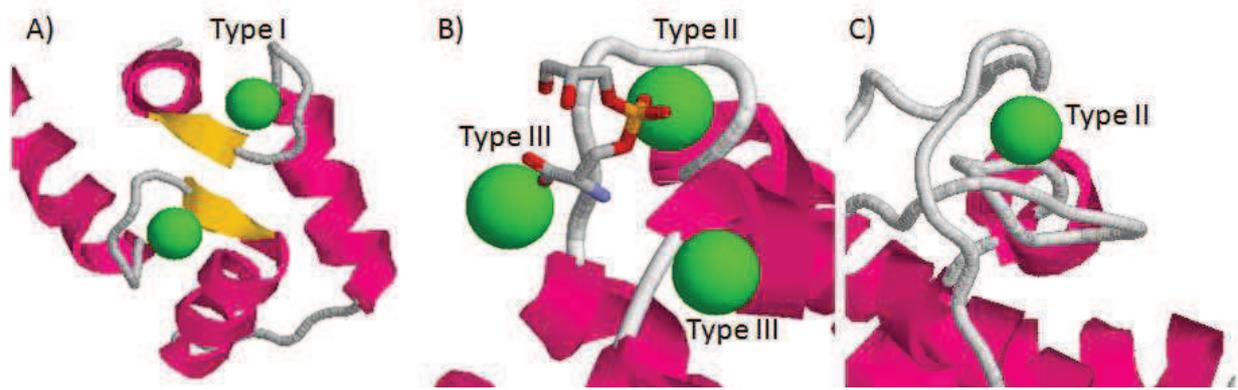


Figure 1.2 : Structure de différents sites de liaison du Ca²⁺. Le Ca²⁺ est représenté par les sphères vertes, les structures secondaires des protéines sont représentées. A) Calmoduline (PDB ID : 1CLL). B) AnxA5 complexée à la glycerophosphosérine, troisième domaine Annexine (PDB ID : 1A8A). C) Phospholipase A2 sécrétée (PDB ID : 1POL).

Outre leurs propriétés de liaison aux membranes, certaines Annexines présentent la particularité de former des assemblages réguliers à la surface des membranes biologiques (Mosser et al. 1991; Govorukhina et al. 2003). Ces véritables cristaux bidimensionnels (2D) ont été observés pour l'Annexine A4 (Kaetzel et al. 2001), l'AnxA5 (Frank Oling, Bergsma-Schutter, et Brisson 2001) et l'AnxA6 (Avila-Sakar, Creutz, et Kretsinger 1998); des assemblages réguliers inter-membranaires ont également été observés principalement dans le cadre du dimère d'Annexine A2-p11 (Lambert et al. 2004). La formation de cristaux 2D est une propriété rare chez les protéines. Les travaux de notre équipe ont démontré qu'une des fonctions de l'AnxA5 était associée à sa capacité de former les cristaux 2D permettant de promouvoir la réparation de membranes cellulaires (Bouter et al. 2011).

Les propriétés fonctionnelles attribuées aux Annexines sont résumées dans (Gerke, Creutz, et Moss 2005; Gerke et Moss 2002). Leur point commun est que toutes les fonctions proposées sont associées à la régulation dynamique des membranes. Un ensemble d'études ont impliqué les Annexines dans les processus d'endocytose, d'exocytose ou de transport de vésicules intracytoplasmiques. Les Annexines pourraient également jouer le rôle d'intermédiaire de

liaison de biomolécules aux membranes, comme par exemple dans le cas de la liaison entre les filaments d'actine et les membranes où l'Annexine A2 est impliquée (Hayes et al. 2004). L'hypothèse la plus récente est que les Annexines participent au processus de réparation membranaire avec une implication des Annexines A1 (McNeil et al. 2006), Annexines A2 (Lennon et al. 2003) et de l'AnxA5 comme précédemment expliqué.

Curieusement, alors que les Annexines ne possèdent pas de peptide signal permettant leur sécrétion, certaines sont présentes dans le milieu extracellulaire et plusieurs fonctions leur sont attribuées. Ainsi l'Annexine A1 est considérée comme un anti-inflammatoire, l'Annexine A2 comme un activateur du plasminogène et l'AnxA5 comme un anticoagulant. Jusqu'à présent les expériences d'extinction de gènes n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotype associé à la perte d'une Annexine.

La capacité à lier les membranes de manière réversible et dépendante du Ca^{2+} est la propriété centrale des Annexines. Pour comprendre quelles sont les origines de cette propriété, l'AnxA5 a été choisie comme modèle d'étude car elle est constituée uniquement du module de liaison aux membranes.

1.1.1 L'Annexine A5 (AnxA5)

L'Annexine A5 (AnxA5) est la plus petite des Annexines avec un poids moléculaire d'environ 35.5 kDa pour 320 acides aminés (Seaton 1995). L'abondance de cette protéine dans le placenta humain a permis de produire suffisamment d'AnxA5 pure pour effectuer des études structurales (Reutelingsperger, Hornstra, et Hemker 1985; Funakoshi et al. 1987). La structure de l'AnxA5 humaine a été déterminée par cristallographie des rayons X en 1990 (Huber, Romisch, et Paques 1990). Comme précédemment expliqué, l'AnxA5 possède en plus de sa capacité à lier les membranes, la propriété remarquable de former des cristaux

bidimensionnels (2D) à la surface de membranes modèles (Mosser et al. 1991; Reviakine, Bergsma-Schutter, et Brisson 1998; Pigault et al. 1994). La figure 1.3 présente la structure de l'AnxA5 sous forme soluble, déterminée par cristallographie des rayons X et sous forme liée aux membranes, déterminée par cristallographie électronique et AFM (Oling et al. 2000; Reviakine et al. 2000).

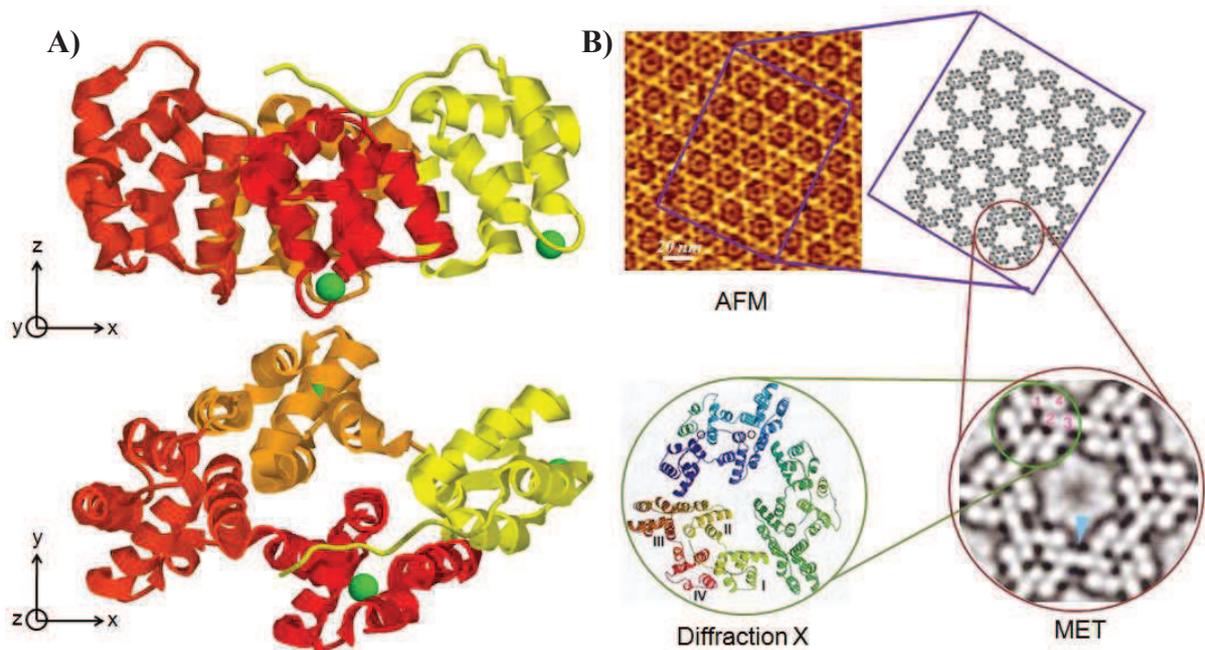


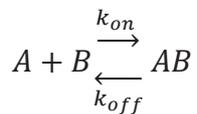
Figure 1.3 : A) Structure de l'AnxA5 par cristallographie des rayons X (PDB ID :1AVH). Chaque domaine Annexine est représenté par une couleur et les ions Ca^{2+} sont en vert. Deux orientations perpendiculaires sont représentées. **B) Cristaux 2D d'AnxA5 analysés par microscopie de force atomique (AFM)** (Reviakine et al. 2000), **microscopie électronique à transmission (MET)** (Oling et al. 2000) **et diffraction des rayons X** (Huber et al. 1992). **Figure adaptée de (Rémi Bérat, 2007).**

1.1.2 Liaison de l'AnxA5 aux membranes

Mon travail de thèse implique une description de l'interaction entre l'AnxA5 et des membranes, je me permets donc d'introduire ici les concepts de constantes d'interaction ainsi que le formalisme qui leur est associé et qui sera utilisé dans la suite de ce manuscrit.

Pour décrire l'interaction entre biomolécules, la biochimie utilise un formalisme issu de la chimie sous la forme suivante:

Soit une molécule A et une molécule B réagissant pour former de manière réversible un complexe AB,



Selon la loi d'action de masse, les équations de vitesse de la réaction sont les suivantes¹ :

la vitesse de formation de AB : $k_{on} \times [A] \times [B]$

la vitesse de dissociation de AB : $k_{off} \times [AB]$

La vitesse de réaction dépend des concentrations de A et de B, et d'une constante cinétique de réaction. La constante cinétique de formation du complexe est notée k_{on} et la constante cinétique de dissociation est notée k_{off} .

A l'équilibre les concentrations des espèces n'évoluent pas ce qui signifie que les vitesses d'association et de dissociation sont égales.

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB] = 0$$

$$k_{on} \times [A] \times [B] = k_{off} \times [AB]$$

$$\frac{[A] \times [B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = Kd$$

¹ Par convention, les concentrations des espèces sont notées entre crochet. Les concentrations sont homogènes à une quantité de matière divisée par un volume (mole/litre = M). Les vitesses sont homogènes à une concentration divisée par un temps (M/s).

La constante d'équilibre de dissociation est notée K_d et est homogène à une concentration. La valeur du K_d définit les concentrations des différentes espèces à l'équilibre. Plus le K_d est faible et plus l'équilibre est en faveur de la formation du complexe. L'affinité est donc d'autant plus grande que le K_d est faible. A titre d'exemple, des K_d de l'ordre du nanomolaire (nM) sont fréquemment trouvés dans le cas de couples anticorps-antigène. Le système biotine-streptavidine représente un des systèmes de plus haute affinité avec un K_d de l'ordre du femtomolaire (10^{-15} M) (Laitinen et al. 2006).

La liaison de l'AnxA5 à des membranes a été étudiée selon deux méthodologies : les études de liaison à l'équilibre et les études de cinétique de liaison. Par définition, les études à l'équilibre permettent de déterminer la constante d'équilibre thermodynamique, ou K_d , du système. Les résultats des études cinétiques permettent de déterminer les constantes cinétiques k_{on} , k_{off} , et également le K_d .

La liaison de l'AnxA5 à l'équilibre a été principalement étudiée par spectroscopie de fluorescence. Une des premières études, réalisée par Tait et collaborateurs en 1989, consistait à marquer l'AnxA5 à la fluorescéine iso thiocyanate (FITC) et à suivre l'extinction de fluorescence dû à la liaison à des liposomes contenant de la PS (cf. Chapitre 1.2.2) (Tait, Gibson, et Fujikawa 1989). Les résultats de cette étude sont que l'AnxA5 lie des liposomes contenant 80% de phosphatidylcholine (PC) et 20% de PS avec un K_d inférieur à 0.1 nM alors que la protéine ne lie pas de liposomes contenant seulement de la PC. La liaison de l'AnxA5 aux membranes contenant 20% de PS est caractérisée par une affinité comparable à l'affinité d'un couple antigène/anticorps.

Une autre méthode utilisée pour suivre la liaison de l'AnxA5 à des membranes est basée sur la fluorescence intrinsèque de la protéine. L'AnxA5 possède un unique tryptophane en position 187, enfoui dans une crevasse de la face de la protéine liant les membranes (Huber, Romisch, et Paques 1990). La fluorescence du tryptophane est un indicateur de la polarité de

l'environnement du tryptophane et de son accessibilité au solvant (Lakowicz 2006). Meers a démontré que la liaison de l'AnxA5 aux membranes modifie l'intensité et le spectre d'émission de tryptophane 187, ces modifications permettent d'étudier la liaison de la protéine à l'équilibre (Meers 1990; Meers et Mealy 1993). En 1994, Pigault et collaborateurs ont utilisé cette méthode pour étudier l'affinité de l'AnxA5 pour des liposomes contenant des taux de PS variables, à des concentrations de Ca^{2+} variables (Pigault et al. 1994). Les résultats sont les suivants. Pour des faibles taux de PS, de fortes concentrations en Ca^{2+} sont nécessaires pour lier l'AnxA5 et inversement pour des taux forts de PS, de faibles concentrations en Ca^{2+} suffisent pour lier l'AnxA5. Ces résultats suggèrent un modèle de liaison plus complexe que celui proposé par Tait et collaborateurs car le K_d n'est pas seulement fonction de la composition en PS mais aussi de la concentration en Ca^{2+} . En 2004 Tait et collaborateurs proposent un modèle d'interaction plus complexe prenant en compte les différents résultats observés et donnent une nouvelle valeur de K_d pour 20%PS et 1 mM Ca^{2+} de l'ordre de 10^{-15} M (Tait, Gibson, et Smith 2004).

La première technique d'étude de cinétique de liaison a été réalisée par Andree et collaborateurs, par ellipsométrie. Par définition, on appelle étude cinétique toute étude où un signal est enregistré au cours du temps. Par conséquent les techniques de biophysique telles que l'ellipsométrie ou la microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) sont des techniques cinétiques. Les résultats obtenus par Andree et collaborateurs ont confirmé que la liaison de l'AnxA5 dépend à la fois du taux de PS et de la concentration en Ca^{2+} (Andree et al. 1990; Andree et al. 1992). Les conditions utilisées en ellipsométrie ne permettent pas de déterminer de constante cinétique d'interaction car la vitesse de liaison est contrôlée par le transport massique de la protéine vers la surface. Pour déterminer une vitesse de liaison, il faut que les concentrations des espèces soient homogènes dans le milieu. En ellipsométrie et dans les autres méthodes « de surface », la protéine en solution vient se lier

sur une surface solide. La liaison des protéines sur la surface crée une zone, à proximité de la surface, où la concentration en protéines libres tend à être nulle (couche de déplétion). La concentration en protéines est donc inégale dans le milieu car elle est plus faible à proximité de la surface. Dans ces conditions, la vitesse de réaction n'est pas limitée par l'affinité de la protéine pour la surface mais par le transport de la protéine depuis le milieu vers l'interface. Néanmoins, le K_d extrapolé à 10^{-10} M est en accord avec les premiers résultats présentés par Tait et collaborateurs (Tait, Gibson, et Fujikawa 1989). Une seconde technique, le QCM-D, a été employée au Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanobioTechnologies (LIMNT) par Ralf Richter, en combinaison avec l'AFM (Ross, Gerke, et Steinem 2003; Richter et al. 2005). La méthode repose sur les propriétés d'un cristal de quartz qui joue le rôle d'un oscillateur dont la fréquence de résonance est modifiée par le dépôt d'un adsorbat (cf. Chapitre 2.5). Le QCM-D mesure le dépôt de protéines en solution sur une surface et possède donc la même limite que l'ellipsométrie, à savoir, que la liaison est limitée par le transport massique. Cette technique permet de mesurer des masses avec une sensibilité de l'ordre de 10 ng.cm^{-2} . La combinaison des résultats de QCM-D, de MET et d'AFM a en revanche permis de proposer un modèle de formation des cristaux 2D d'AnxA5 présenté en figure 1.4.

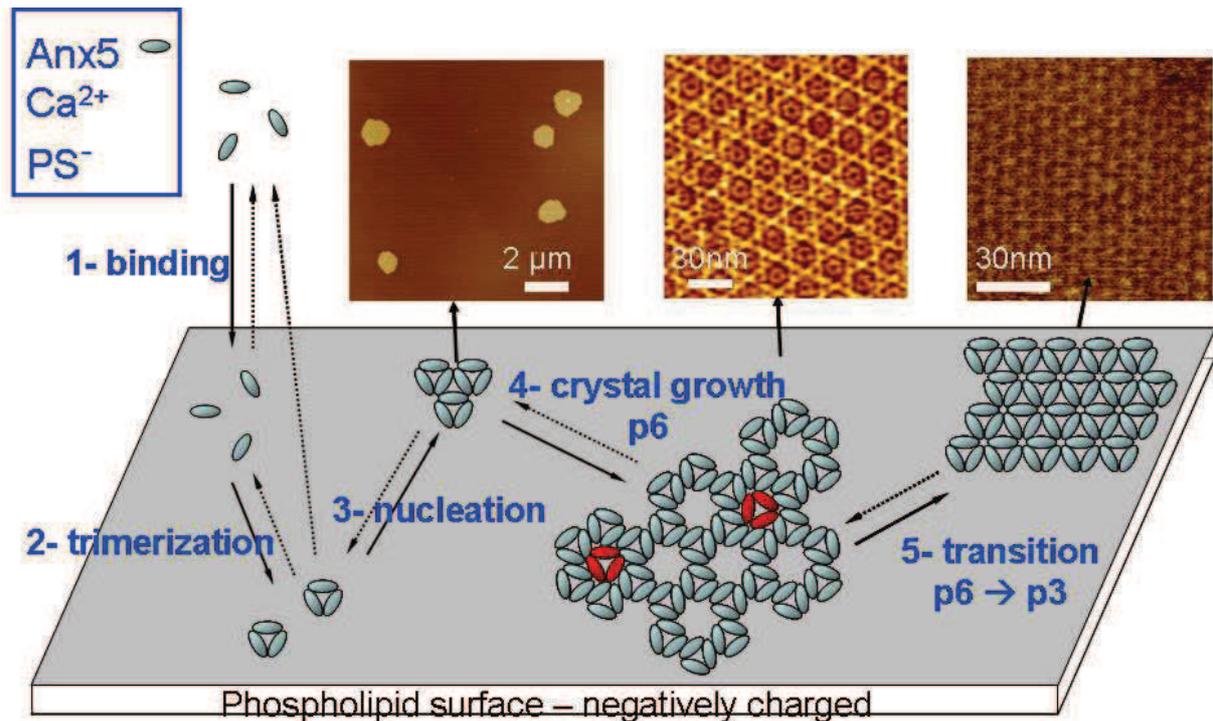


Figure 1.4 : Modèle de liaison aux membranes et de cristallisation 2D de l'AnxA5 (Richter et al. 2005). L'AnxA5 monomérique se lie à la membrane et forme rapidement des trimères qui vont à leur tour s'associer rapidement en cristaux 2D. La conformation du cristal sous forme p6 ou p3 dépend du taux de PS et de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu.

La seule étude ayant permis une analyse cinétique de la liaison d'Annexines à des liposomes en solution est une étude par spectroscopie de fluorescence en cinétique ultra-rapide réalisée en 1995 (Lu, Bazzi, et Nelsestuen 1995). Cette étude ne porte pas sur l'AnxA5 mais sur l'Annexine A6. Les concentrations utilisées en spectroscopie de fluorescence sont telles que le système est à l'équilibre en quelques secondes. Les auteurs ont dû recourir à une technique de spectrofluorimétrie appelée écoulement stoppé (stopped flow), qui permet de suivre l'évolution de la fluorescence avec une résolution de l'ordre de la milliseconde, sur une durée de quelques minutes. Bien que ne portant pas sur l'AnxA5, cette étude donne des valeurs de référence pour les constantes cinétiques de liaison (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) pour une Annexine. Les valeurs de k_{on} obtenues pour l'Annexine A6 sont remarquables car elles sont

proches des limites physiques autorisées par la diffusion des molécules. Ces résultats montrent que le système d'ancrage des Annexines est à la fois très affiné pour les membranes et très efficace car la liaison est proche des limites imposées par la diffusion.

L'AnxA5 liant spécifiquement des membranes biologiques contenant de la PS aux concentrations physiologiques en Ca^{2+} et avec une très haute affinité, plusieurs laboratoires ont développé différents dérivés de l'AnxA5 utilisables en imagerie ou en thérapie. L'AnxA5 a été déclinée sous forme de dérivés fluorescents pour la spectroscopie ou l'imagerie de fluorescence (van Engeland et al. 1998), de dérivés radiomarqués pour l'imagerie in vivo (Boersma et al. 2005), et de protéines de fusion entre l'AnxA5 et une enzyme thrombolytique (Tait et al. 1995). Aujourd'hui l'AnxA5 est une protéine couramment utilisée dans l'étude de l'activation plaquettaire (Dachary-Prigent et al. 1993) ou de l'apoptose (van Genderen et al. 2006), ces deux processus étant associés à l'apparition de PS à la surface des cellules.

Les activités du laboratoire LIMNT sont centrées autour de l'AnxA5. Une partie de notre activité, que j'ai déjà évoquée, consiste à étudier les fonctions cellulaires de l'AnxA5 et plus particulièrement dans le contexte de réparation membranaire (Bouter et al. 2011) ainsi que les propriétés de liaison de l'AnxA5 à des systèmes modèles (Richter et al. 2005). Une autre partie de notre activité consiste à développer des applications basées sur l'AnxA5 telles que des AnxA5 couplées à des peptides pour contrôler l'adhésion cellulaire (Bérat et al. 2007) ou l'utilisation d'AnxA5 comme élément de ciblage de liposomes (Garnier et al. 2009).

Mon travail de thèse a porté sur ces deux activités. La première partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'interaction entre l'AnxA5 et des membranes modèles par cytométrie en flux (FCM). L'objectif de cette étude était de résoudre l'une des dernières questions concernant l'interaction entre l'AnxA5 et les membranes, à savoir identifier le mode de liaison de l'AnxA5 aux membranes et la nature du site de liaison de l'AnxA5. La seconde partie de mon travail a consisté à adapter la méthode d'étude par FCM mise au point dans la première partie de ma thèse au dosage de microparticules plasmatiques (MP) exposant la PS.

L'essentiel de mon travail étant axé autour de la FCM, je vais maintenant décrire cette technique.

1.2 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (FCM) est une technique d'analyse multiparamétrique développée pour l'analyse cellulaire (Givan 2001). La FCM est principalement utilisée pour l'analyse de cellules en laboratoire d'analyse médicale ou en biologie cellulaire. La FCM est également capable d'analyser une grande variété d'objets depuis les virus (Brussaard, Marie, et Bratbak 2000) jusqu'à des larves d'insectes (Catteruccia, Benton, et Crisanti 2005). La seule contrainte en FCM est que l'échantillon doit être constitué d'éléments individualisés dispersés dans un liquide. La FCM analyse individuellement chaque objet et peut déterminer la valeur de plusieurs paramètres pour chacun des objets. Les appareils utilisés sont appelés cytomètres en flux et peuvent analyser entre quelques centaines et plusieurs dizaines de milliers d'objets par seconde (Figure 1.5).

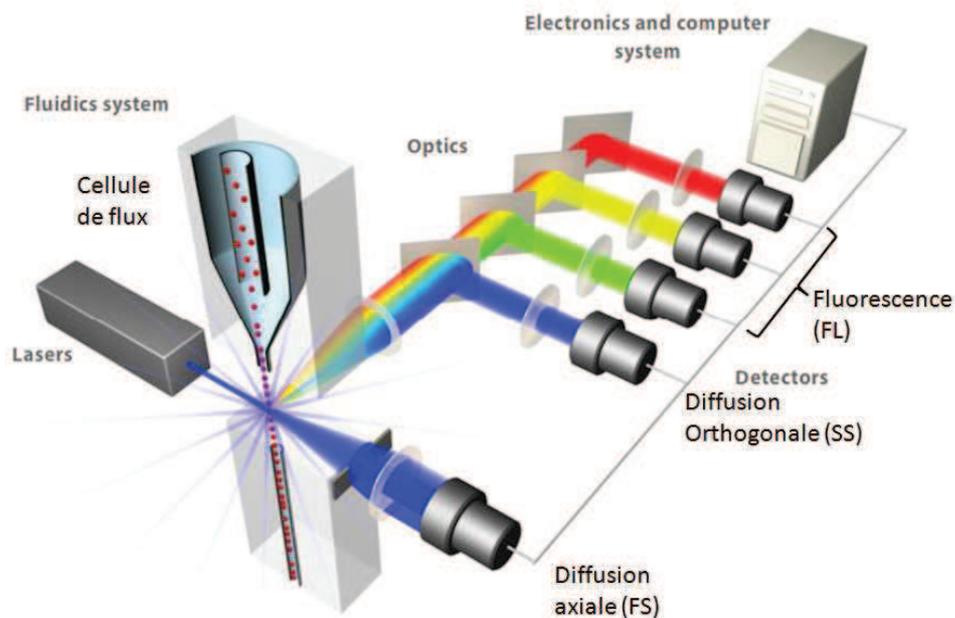


Figure 1.5 : Schéma d'un cytomètre en flux adapté de : <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

Un cytomètre en flux est constitué de trois parties :

- 1) Le système fluidique qui amène l'échantillon jusqu'à la zone de mesure et le met en forme selon le principe de la focalisation hydrodynamique (hydrodynamic focusing). La cellule de flux (flow cell) est le cœur de ce système. Elle permet d'aligner les objets pour qu'ils passent au centre du faisceau laser et les sépare physiquement (Givan 2001).
- 2) Le système optique constitué du laser et du banc optique qui sera décrit en détails dans les parties 1.2.1 et 1.2.2.
- 3) Le système électronique et informatique qui convertit les photons en signal électrique et gère le stockage et l'affichage des mesures.

Un cytomètre en flux mesure en simultanément plusieurs paramètres :

- 1) La diffusion axiale de la lumière (Forward Scatter ou FS ou FSC) qui est proportionnelle à la taille des cellules.
- 2) La diffusion orthogonale de la lumière (Side Scatter ou SS ou SSC ou Right Angle Light Scattering ou RALS) qui dépend de la présence d'hétérogénéités dans l'indice de réfraction

des objets comme celles provoquées par les organites. Ce paramètre est appelé structure ou granulométrie dans le jargon de la FCM.

- 3) Plusieurs intensités de fluorescence, le nombre dépendant du système optique du cytomètre en flux. Aujourd'hui un cytomètre en flux basique peut mesurer quatre intensités de fluorescence, les appareils plus performants pouvant en mesurer plus de dix.

Certains cytomètres en flux spécialisés appelés trieurs de cellules (cell sorter) sont capables de récupérer certains objets jugés d'intérêt après qu'ils aient été analysés. Je vais maintenant expliquer certains aspects de la FCM permettant de comprendre son principe de fonctionnement, ses avantages ainsi que ses limitations. Ma source principale d'information est le livre « Practical Flow Cytometry » de Shapiro (Shapiro 2003).

1.2.1 Comment détecter une cellule en FCM ?

Deux technologies sont classiquement utilisées en FCM. La première technologie est basée sur une mesure de courant électrique et est appelée méthode Coulter. La seconde est basée sur la diffusion de la lumière par les objets analysés.

1.2.1.1 La méthode Coulter

En 1949, Wallace Coulter travaillait sur un appareil permettant de détecter et compter des cellules. Ingénieur électricien de formation, Wallace Coulter a eu l'idée suivante. Soit deux compartiments contenant un liquide conducteur et séparés par un orifice de petite taille (Figure 1.6 A). Si un courant d'intensité constante est appliqué entre les deux compartiments, une différence de potentiel électrique se crée entre les deux compartiments en vertu de la loi

d'Ohm². La résistance du circuit est essentiellement due à l'orifice qui empêche le passage des espèces chargées entre les deux compartiments. Depuis les années 1890, les propriétés électriques des cellules avaient été étudiées et il avait été montré que les cellules sont de mauvais conducteurs électriques. Si une cellule passe à travers l'orifice, la résistance du circuit augmente pendant le passage de la cellule. Si l'intensité du courant est maintenue constante, la différence de potentiel aux bornes du circuit augmente lors du passage de la cellule (Figure 1.6 B). La légende dit que Wallace Coulter aurait créé son premier compteur de cellules en perçant un trou dans la cellophane d'un paquet de cigarette (Shapiro 2003).

La méthode Coulter permet de détecter des cellules et déterminer leur concentration. Le pic de tension généré par le passage d'une cellule est affecté par le volume cellulaire. Après calibration, la méthode Coulter permet de mesurer le volume de cellules. C'est à ma connaissance la seule technique permettant d'obtenir cette information. C'est la méthode utilisée dans tous les appareils de détermination de formule sanguine car elle est robuste et peu coûteuse. La limite de cette technique est que pour être détectée, une cellule doit modifier significativement la résistance du circuit c'est-à-dire avoir un volume suffisant.

On considère qu'une cellule est détectable si son diamètre vaut entre 10 et 70% du diamètre de l'orifice (van der Pol et al. 2010). Dans l'article décrivant le principe de son compteur de cellules, Wallace Coulter spécifie que le diamètre de l'orifice vaut 100µm (Coulter 1957). Aujourd'hui les automates d'hématologie utilisent des orifices dont le diamètre permet d'analyser les plaquettes qui sont les plus petites cellules sanguines avec un diamètre d'environ 4 µm (Frojmovic et Milton 1982).

² Loi d'Ohm : $U = R \times I$ où U est la tension aux bornes du circuit en Volts, R la résistance du circuit en Ohm et I l'intensité du courant traversant le circuit en Ampères.

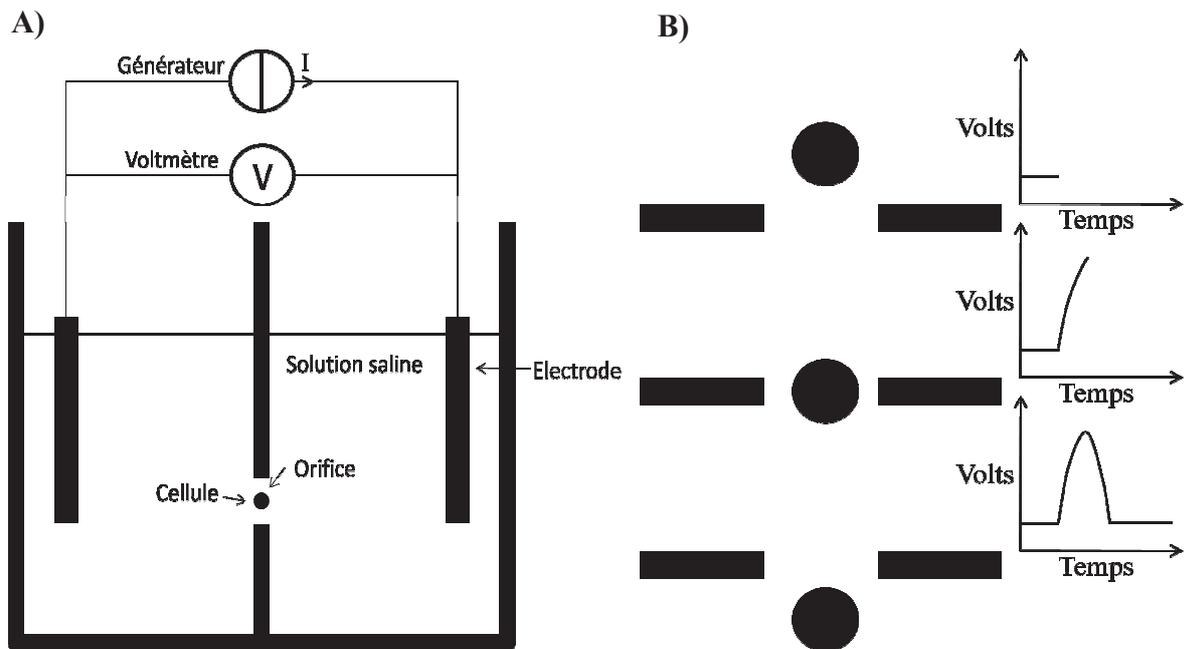


Figure 1.6 : A) Représentation schématique du compteur de cellules Coulter, adaptée de (Shapiro 2003). B) Vue agrandie du passage d'une cellule à travers l'orifice et du pic de tension qui en résulte.

1.2.1.2 Diffusion de la lumière

La seconde guerre mondiale a vu le développement de l'utilisation d'armes bactériologiques dont le principal avantage était leur furtivité. Gucker a été chargé par l'armée des États-Unis de développer un appareil permettant de détecter les spores bactériennes en suspension dans l'air (Gucker et al. 1947). La figure 1.7 montre une vue en coupe de l'appareil développé par Gucker. L'appareil fonctionne sur le principe de la microscopie à champs sombre (dark field microscopy). Brièvement, les photons produits par une lampe (à droite du diagramme, lettre D) sont focalisés par un jeu de lentilles. Un cache opaque et de diamètre inférieur à celui d'une lentille est disposé entre la dernière lentille et l'échantillon. Ce cache bloque tous les photons qui atteindraient directement le détecteur. En absence de spores, le tube photomultiplicateur (à gauche du diagramme, lettre K) ne détecte pas de photons et ne produit pas de signal.

Si un objet passe au niveau de la zone de mesure, dans certaines conditions, l'objet va diffuser des photons vers le détecteur qui va produire un signal en retour.

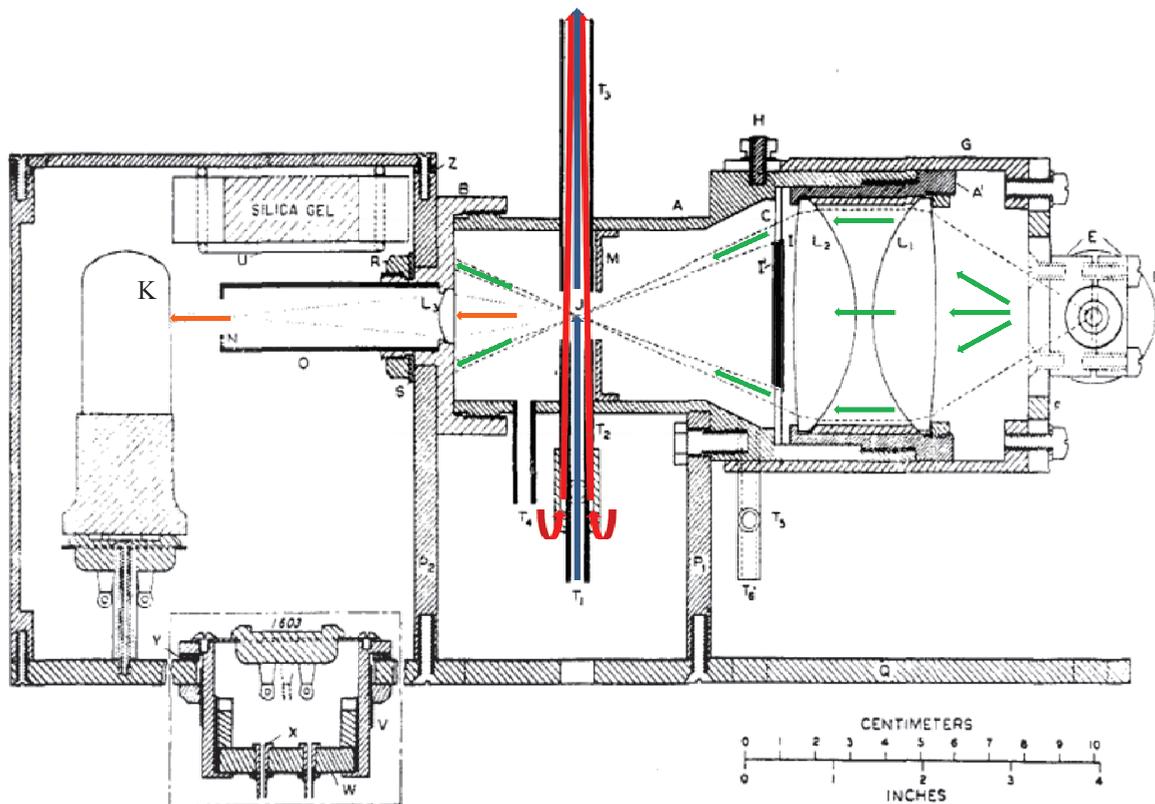


Fig. 1.—Smoke cell unit.

Figure 1.7 : Vue en coupe du compteur de cellules de Gucker (Gucker et al. 1947). Vert : Trajet direct des photons de la source. Orange : Photons diffusés. Bleu : Echantillon et Rouge : Flux d'entraînement de l'échantillon.

Depuis 1947 la principale évolution de cette méthode a été le remplacement de la lampe par des sources laser. Comparativement à la méthode Coulter, la diffusion de la lumière est techniquement plus complexe à mettre en œuvre et économiquement plus coûteuse. La taille limite d'un objet détectable par diffusion de la lumière dépend de plusieurs facteurs (van der Pol et al. 2010). En première approximation, je considérerai la longueur d'onde du laser

comme seuil de détection, soit 488 nm pour le laser à argon ionisé présent conventionnellement dans les cytomètres en flux.

Un des avantages principaux de la détection de cellules par diffusion de la lumière est que cette technique emploie des photons et peut donc être couplée à la fluorescence.

1.2.2 La fluorescence en FCM

La fluorescence est la propriété physique de certains objets, appelés fluorophores, d'absorber des photons d'une longueur d'onde donnée et de réémettre des photons avec une longueur d'onde plus grande (Lakowicz 2006). Le processus de fluorescence a été décrit au niveau moléculaire par le physicien Alexander Jablonski (Figure 1.8). Brièvement une molécule peut, sous certaines conditions, absorber un photon. L'énergie absorbée par la molécule entraîne le passage de l'un de ses électrons de l'état fondamental S_0 à un état excité S_1 ou S_2 . L'énergie nécessaire à cette transition se situe dans une gamme correspondant à l'énergie de photons U.V. (longueur d'onde comprise entre 10 et 400 nm) ou visibles (400 à 800 nm). L'énergie absorbée peut également entraîner des transitions d'états vibrationnels et rotationnels. Une partie de l'énergie est perdue rapidement (10^{-12} s) sous forme de chaleur lors du processus de conversion interne qui ramène l'électron d'un état excité quelconque au premier état excité électronique S_1 et aux états vibrationnels et rotationnels fondamentaux. L'électron retourne rapidement (10^{-8} s) à l'état fondamental S_0 en émettant un photon d'énergie plus faible que l'énergie du photon absorbé³. Dans le cas de la phosphorescence, l'électron dans le premier état excité S_1 passe à l'état triplet T_1 puis retourne lentement (10^{-3} s à quelques secondes) à l'état fondamental.

³ L'énergie d'un photon (E) est liée à sa fréquence (ν) et à sa longueur d'onde (λ) selon l'équation :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

où h est la constante de Planck ($h \approx 6.626 \times 10^{-34}$ J.s) et c la vitesse de la lumière dans le vide ($c \approx 3 \times 10^8$ m.s⁻¹)

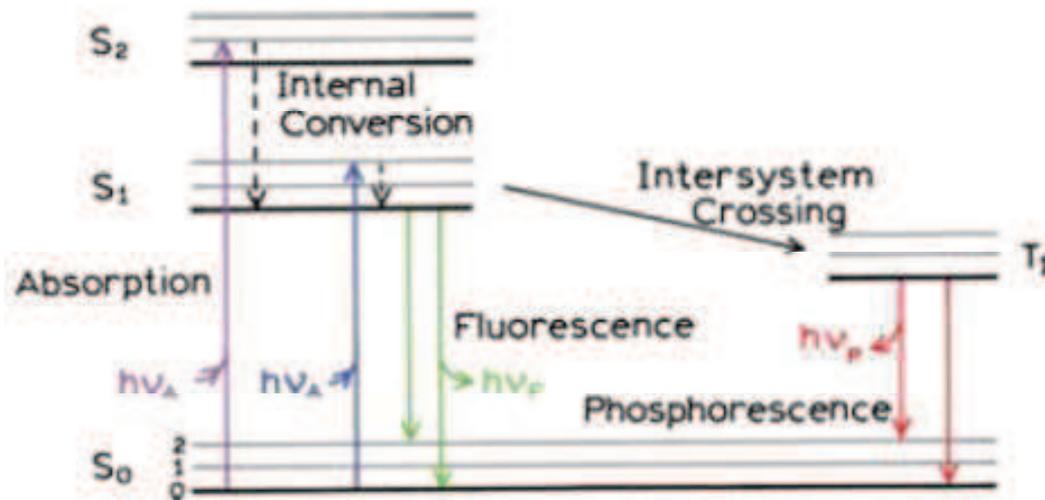


Figure 1.8 : Diagramme de Jablonski issu de (Lakowicz 2006). Les transitions accompagnées de l'absorption ou de l'émission d'un photon (transitions radiatives) sont représentées par les flèches de couleur. Les transitions non radiatives sont représentées par des flèches en pointillés.

Ces explications décrivent uniquement les généralités du processus de fluorescence. La probabilité d'émission de photons par un fluorophore ou rendement quantique ainsi que leur longueur d'onde dépendent de plusieurs paramètres. Les propriétés de l'environnement du fluorophore sont parmi les plus importantes. Dans le cas des protéines, la fluorescence du tryptophane est couramment utilisée pour mesurer le changement de polarité de l'environnement suite à la liaison d'un ligand. Les fluorophores peuvent également interagir entre eux. Par exemple quand deux fluorophores identiques sont proches, leur fluorescence est réduite, on parle d'extinction de fluorescence. Un autre cas courant est le transfert d'énergie par résonance entre deux fluorophores différents ou Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET).

L'absorption d'un photon et l'émission d'un photon par fluorescence est un processus physique très rapide (≈ 10 ns), la fluorescence est donc tout à fait compatible avec la mesure

de plusieurs dizaines de milliers d'objets par seconde. Sur un plan technique, la mesure de fluorescence à cette vitesse pose problème. Conventionnellement la fluorescence est mesurée par un appareil appelé spectrofluorimètre qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence avec une grande sensibilité et avec une résolution en longueur d'onde de l'ordre du nanomètre. Un spectrofluorimètre fonctionne en décomposant la lumière et en sélectionnant une longueur d'onde de mesure à l'aide d'un monochromateur. L'intensité lumineuse est mesurée pour la longueur d'onde choisie à l'aide d'un photodétecteur. Un spectrofluorimètre peut donc mesurer la fluorescence à différentes longueurs d'onde, mais en mesurant une longueur d'onde à la fois. L'enregistrement d'un spectre de fluorescence peut prendre plusieurs minutes en fonction de la précision souhaitée. Pour mesurer individuellement plusieurs dizaines de milliers d'objets par seconde, un cytomètre en flux doit effectuer la mesure en quelques microsecondes. Le principe retenu est de décomposer la lumière à l'aide d'un banc optique équipé de miroirs dichroïques et de filtres et d'utiliser plusieurs photodétecteurs (Figure 1.9).

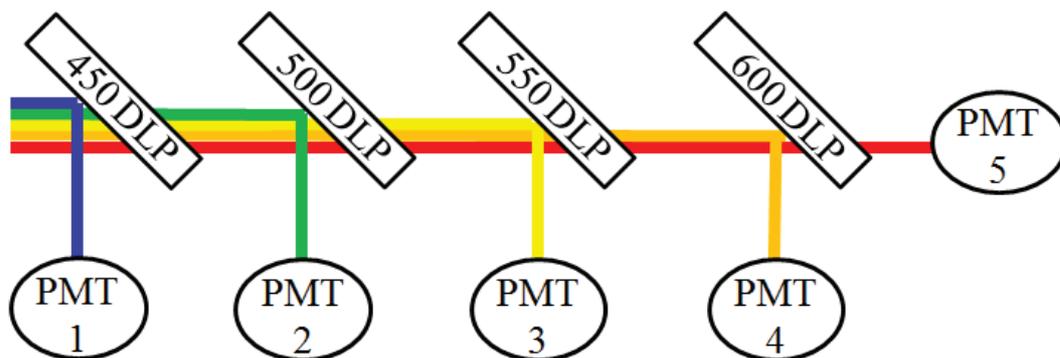


Figure 1.9 : Exemple de banc optique permettant de décomposer la lumière, adapté de (Shapiro 2003). Les miroirs dichroïques passe haut (Dichroic Long Pass ou DLP) réfléchissent les longueurs d'onde inférieures à une valeur seuil et transmettent les longueurs d'onde supérieures à cette même valeur. La valeur seuil est spécifiée sur chaque miroir. Il existe également des miroirs passe bas et passe bande.

Un cytomètre en flux permet donc de mesurer la fluorescence rapidement, avec une mauvaise résolution spectrale mais avec une bonne sensibilité. Les données techniques du cytomètre en flux Beckman Coulter Cytomics FC 500 utilisé dans cette étude spécifient une limite de détection comprise entre 300 et 600 fluorophores par objet.

1.2.3 Intérêt de la FCM à l'étude des interactions moléculaires.

Les cytomètres en flux ont commencé à mesurer des processus en fonction du temps à partir de 1980 (Martin et Swartzendruber 1980). La mesure du temps a été développée dans le but de suivre les processus cinétiques au niveau cellulaire comme par exemple les cinétiques de flux calcique (figure 1.9 A). La FCM a été rapidement employée pour la mesure de cinétique de liaison de ligands à la surface de cellules (voir figure 1.10 B issue de (Sklar et Finney 1982).

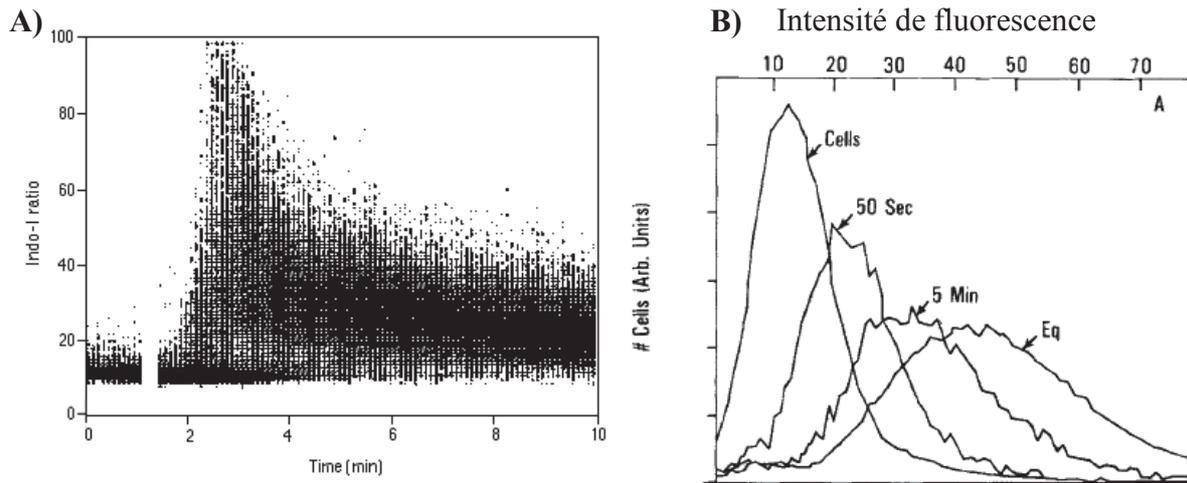


Figure 1.10 : A) Exemple de mesure cinétique de flux calcique par FCM (June, Abe, et Rabinovitch 2001). Chaque point représente une cellule analysée. Cette forme de représentation est donc appelée un « dot plot ». **B) Evolution de la fluorescence d'une population cellulaire au cours du temps (Sklar et Finney 1982).** L'ordonnée représente un nombre de cellules. Cette représentation est appelée un histogramme.

Comparativement aux méthodes classiques d'étude de complexes moléculaires, utilisant par exemple de la radioactivité, la FCM a l'avantage de permettre de mesurer la quantité de ligands liés sans nécessiter de séparer les ligands libres. Les concentrations de fluorophores utilisées sont suffisamment faibles pour ne pas donner de signal en absence de liaison. A l'inverse, si les fluorophores se lient sur une cible, localement, leur concentration sera suffisante pour donner un signal mesurable (Figure 1.11 et Sklar 1987).

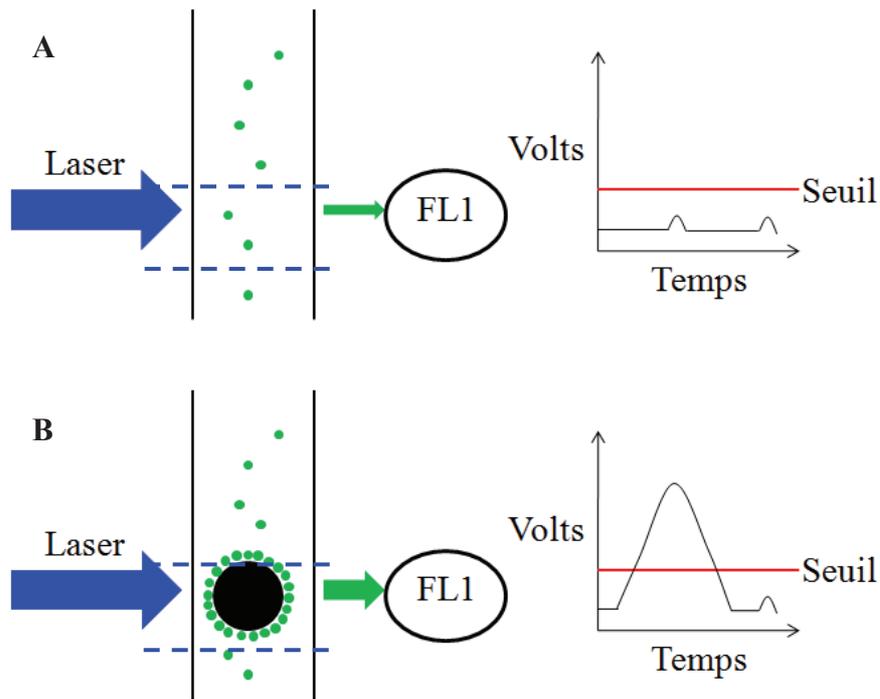


Figure 1.11 : Schéma représentant le principe de mesure de liaison de ligands fluorescents à une cible en présence de ligands libres. A) En absence de liaison, la concentration en fluorophores est trop faible pour que le signal dépasse la valeur seuil. Aucun signal n'est détecté. B) La liaison à la cible induit une concentration localement forte en fluorophores. Le signal de fluorescence, dépassant la valeur seuil, est détecté et enregistré. Le ligand libre dans le volume de mesure représente un signal négligeable comparativement au signal du ligand lié.

La FCM a grandement profité des avancées dans le domaine des sciences des matériaux avec l'utilisation de particules de polymère fonctionnalisées (Nolan et Sklar 1998). Les particules micrométriques sont facilement mesurables en FCM et se manipulent facilement. De plus ces particules sont disponibles dans plusieurs types de matériaux et avec différents sites de greffage chimique ou de protéines greffées (Sklar 2005). L'utilisation de microsphères en FCM a conduit au développement d'approches de type Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), en permettant de multiplier le nombre d'analytes quantifiés dans un seul test.

Le principe est d'utiliser des microsphères contenant deux fluorophores présents en proportions variables, excités par un même laser. Les proportions des deux fluorophores permettent de différencier plusieurs populations de particules pour une taille donnée. La figure 1.12 A) présente un schéma des particules utilisées en test type ELISA multianalyte.

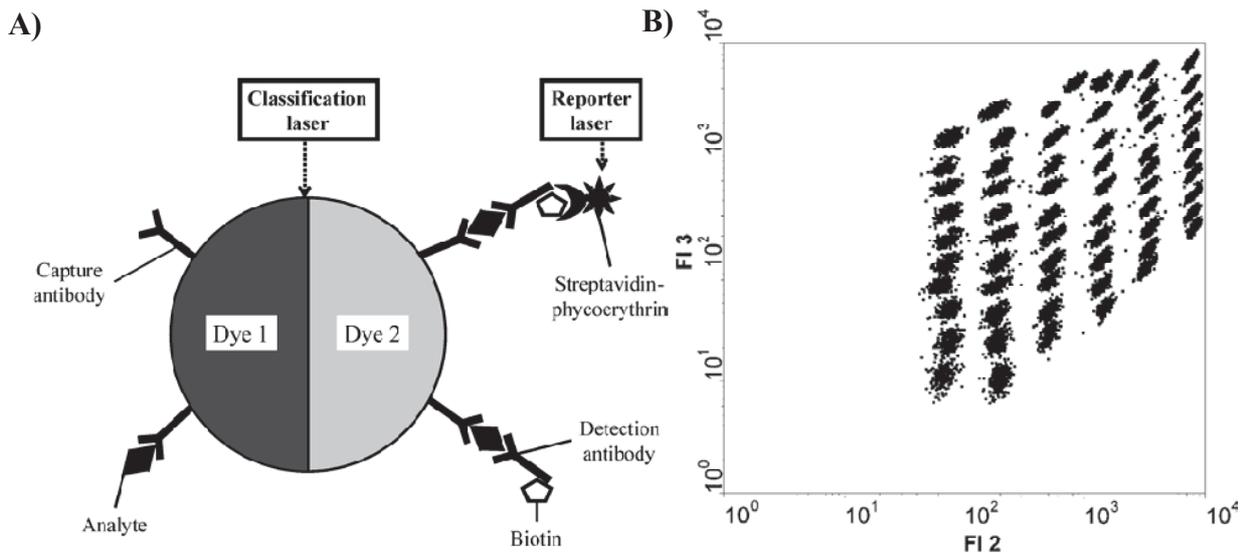


Figure 1.12 : A) Schéma de principe du test xMAP de type ELISA sandwich multianalyte de LUMINEX (Bernhard et al. 2011). B) Analyse de particules de polymère de taille identique, différenciées par l'intensité de fluorescence de deux fluorophores (Kettman et al. 1998). Ces particules ayant la même taille, leurs propriétés de diffusion de la lumière sont identiques. En revanche, la combinaison de deux fluorophores contenus dans les particules permet de distinguer 64 populations différentes de particules. L'utilisation d'un troisième fluorophore permet de multiplier le nombre de populations identifiables.

La figure 1.12 A) présente les particules développées par la société LUMINEX. Chaque population de microsphère peut être couplée avec un anticorps, l'analyte étant détecté par une méthode de type ELISA sandwich. La figure 1.12 B) présente l'analyse de 64 sous familles de

particules codées par le couple d'intensité de deux fluorophores, chaque famille de particule permettant de doser un analyte.

La société LUMINEX qui a développé la technologie xMAP déclare être capable de détecter et de quantifier plus de 500 analytes différents dans un puits de plaque ELISA.

Dans le cas particulier de protéines se liant à des membranes lipidiques, Gilbert et collègues ont proposé une approche innovante en 1992 (Gilbert et al. 1992). Cette approche consiste à créer une bicouche lipidique supportée (Supported Lipid Bilayer ou SLB) sur des microsphères de silice. Les microsphères de silice fonctionnalisées, appelées liposphères, ont été utilisées pour étudier la liaison du facteur de la coagulation VIII en FCM à l'équilibre ainsi qu'en cinétique à des concentrations de l'ordre de quelques nM (Bardelle et al. 1993). Curieusement cette approche a été peu reprise dans la littérature (Lauer et al. 2002; Buranda et al. 2003).

La formation de SLB sur des particules de verre est simple à mettre en œuvre comme démontré par Tamm et Mc Connell puis Bayerl et Bloom (Tamm et McConnell 1985; Bayerl et Bloom 1990). Toutefois à cette époque le processus de formation des SLB n'était pas entièrement compris. De nombreux travaux, dont ceux de notre laboratoire, ont contribué à la compréhension de ce processus tant au niveau de surfaces planes (Keller 1998; Reviakine et al. 2000; Richter, Mukhopadhyay, et Brisson 2003; Richter et Brisson 2005; Richter, Berat, et Brisson 2006) (Figure 1.13 A) que de surfaces courbes de type nanoparticules (Mornet, Lambert, Duguet, et Brisson 2005) (Figure 1.13 B).

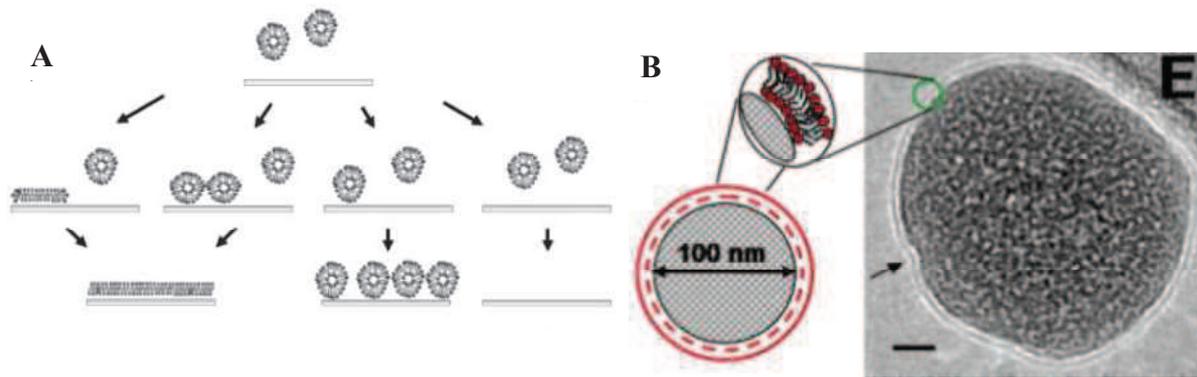


Figure 1.13 :A) Schéma de l'interaction entre des liposomes issus de sonication (SUV) et des surfaces (Richter, Mukhopadhyay, et Brisson 2003). Le scénario définissant le type d'interaction dépend de la charge de la surface, de la composition lipidique et de la composition du milieu. B) Nanoparticule de silice recouverte d'une SLB et observée en cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) (Mornet, Lambert, Duguet, et Brisson 2005). La barre d'échelle représente 20nm.

La première partie de mon travail de thèse portant sur l'étude de l'interaction entre l'AnxA5 et des membranes modèles en FCM, j'ai utilisé l'expertise développée au laboratoire pour créer des microsphères de silice recouvertes d'une SLB ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$) contenant de la PS, similaires aux liposphères développées par Gilbert et collaborateurs. L'objectif a été d'utiliser ces objets pour étudier la liaison de l'AnxA5 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire pour accéder aux constantes cinétiques et thermodynamiques de la réaction.

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à adapter l'utilisation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ pour la quantification de microparticules plasmatiques (MP) exposant de la PS. Les MP sont des objets d'intérêt dans le contexte biomédical que je vais maintenant décrire.

1.3 Les microparticules plasmiques

Les fluides biologiques humains contiennent des vésicules lipidiques produites par les cellules lors de certains processus tels que l'activation ou l'apoptose (VanWijk et al. 2003). Il existe deux types de vésicules appelées microvésicules ou microparticules (MP), et exosomes. Ces objets constituent un domaine de recherche particulièrement actif en raison de leurs implications dans différents processus physiologiques tels que la coagulation sanguine (Morel et al. 2006), l'inflammation (Freysinet 2003; Morel et al. 2004) , ou la communication entre cellules (Mack et al. 2000; Hugel et al. 2005).

Les auteurs distinguent les deux familles de vésicules en fonction du compartiment cellulaire dont elles sont originaires et de leur taille.

La première famille de vésicules, appelée exosomes, est composée de vésicules de petite taille (au maximum 100 nm), issues d'un compartiment intracellulaire appelé corps multivésiculaires (Multivesicular Body). Outre leur taille, les exosomes sont identifiables par la présence à leur surface des protéines de la famille des tétraspanines telles que le marqueur CD63 (Théry, Zitvogel, et Amigorena 2002).

La seconde famille de vésicules est appelée microvésicules ou microparticules (MP) et il sera uniquement question de ces objets dans le reste de ce manuscrit. Les MP sont des vésicules dont la taille est généralement considérée être comprise entre 100 nm et 1 μm (Figure 1.14).

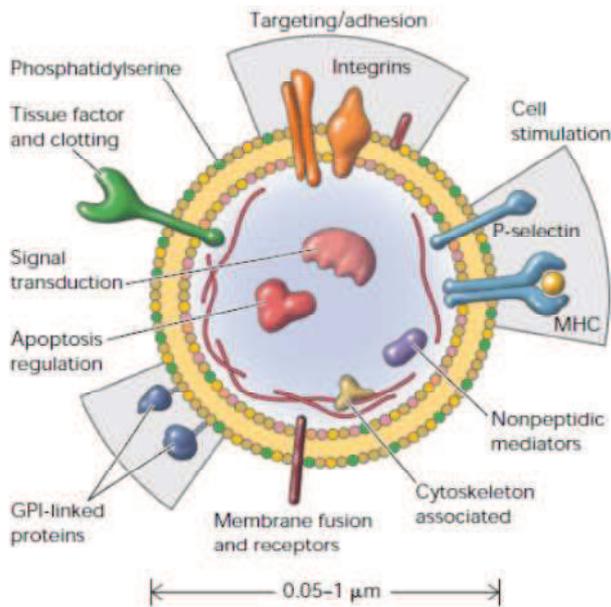


Figure 1.14 : Schéma d'une MP (Hugel et al. 2005).

Contrairement aux exosomes qui proviennent d'un compartiment intracellulaire, les MP proviennent directement de la membrane plasmique des cellules. Il n'existe pas de marqueur commun pour l'ensemble des MP. Par contre les MP exposent des marqueurs de surface spécifiques du type cellulaire dont elles proviennent (Hugel et al. 2005).

La composition des MP dépend donc du type cellulaire d'origine mais également du phénomène à l'origine de leur production par les cellules (Abid Hussein et al. 2003). Plusieurs études ont porté sur la formation de MP à partir de cellules. La formation de MP est liée à une augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} induisant l'activation de protéases dépendantes du calcium (calpaïnes) qui fragilisent le cytosquelette et à une surcharge de phospholipides sur le feuillet externe de la membrane induite par l'effet du Ca^{2+} sur les enzymes membranaires de transport des phospholipides (Figure 1.15) (Dachary-Prigent et al. 1995; Zwaal et Schroit 1997).

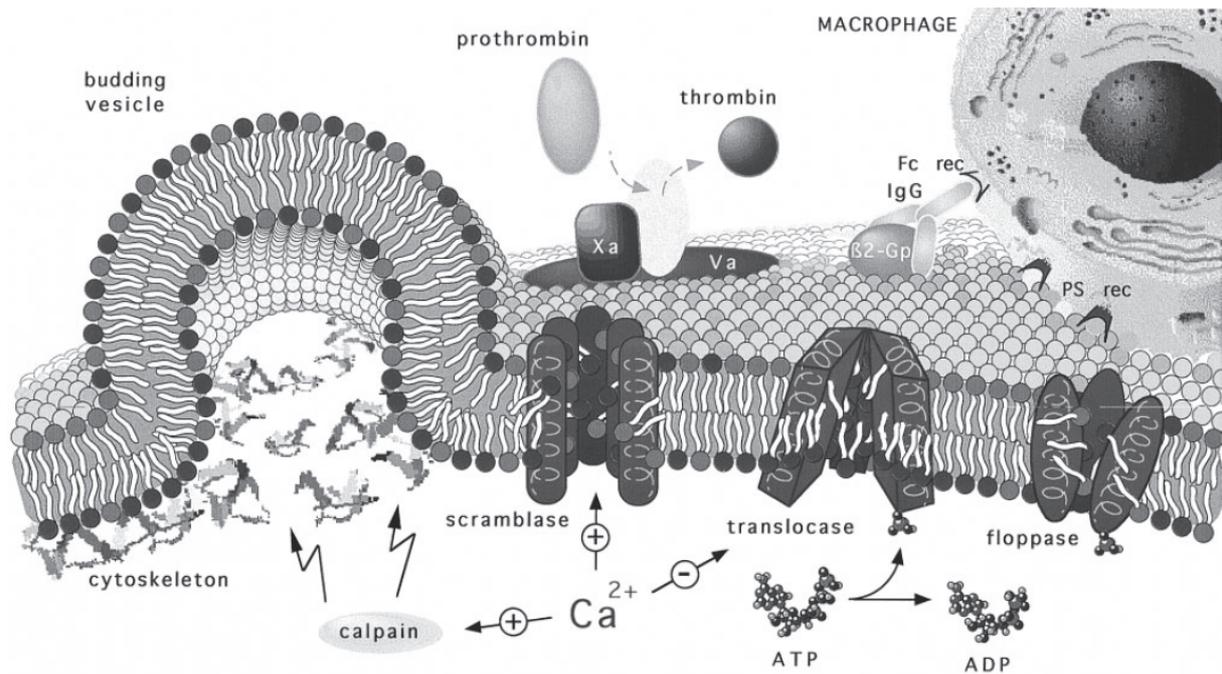


Figure 1.15 : Schéma représentant le mécanisme de formation des MP proposé par (Zwaal et Schroit 1997)

Les MP ont été identifiées dans plusieurs types de fluides biologiques comme le plasma sanguin (Wolf 1967), le liquide céphalorachidien (Doeuvre et al. 2009), la salive (Berckmans et al. 2011), l'urine (Smalley et al. 2008) ou le liquide synovial (Boilard et al. 2010). Les MP constituent donc un domaine de recherche très complexe de par la variété des différents objets et par les difficultés associées à l'étude d'éléments de petite taille dans des milieux biologiques complexes tels que le sang.

Dans la suite de ce manuscrit il sera uniquement question des MPs plasmatiques et plus particulièrement de leur rôle dans la coagulation sanguine normale ou pathologique.

1.3.1 Les microparticules plasmatiques sont procoagulantes

Les propriétés procoagulantes des MP plasmatiques ont été observées dès leur identification en 1967 par Wolf (Wolf 1967). Ces propriétés peuvent s'expliquer d'une part par l'exposition de PS à la surface des MP plasmatiques (Dachary-Prigent et al. 1993) et d'autre part par la présence d'une protéine activatrice de la coagulation, le facteur tissulaire (TF voir Figure 1.14).

Le TF est une protéine membranaire portée par les cellules du sous endothélium vasculaire. Dès 1946, Chargaff et West ont décrit la présence de TF à l'état circulant dans le plasma (Chargaff et West 1946). De plus le TF retrouvé dans le plasma activait la formation de thrombine et pouvait être éliminé par centrifugation à haute vitesse comme celles associées à certains protocoles de préparation de MP (Piccin, Murphy, et Smith 2007).

Dans le contexte de la coagulation sanguine, le TF et la PS jouent des rôles cruciaux (Moran et Viele 2005). Le TF est une molécule induisant la coagulation sanguine en activant le facteur VII de la coagulation alors que la PS permet l'assemblage des complexes activateurs du facteur X (complexe tenase constitué des facteurs IXa et VIIIa) et activateur de la prothrombine (complexe prothrombinase constitué des facteurs Xa et Va) qui amplifient la coagulation (Zwaal, Comfurius, et Bevers 1998). Dans le schéma classique de la coagulation, les plaquettes fournissent la surface exposant la PS lors du processus d'activation. On sait aujourd'hui que les plaquettes produisent également beaucoup de microparticules lors de l'activation (Dachary-Prigent et al. 1993) et que des MP plasmatiques procoagulantes d'origine plaquettaire ou mégacaryocytaire (Flaumenhaft et al. 2009) sont retrouvées chez des personnes saines (Berckmans et al. 2001). Les MP plaquettaires constituent la principale population de MP plasmatiques. Environ 40 à 50 % des MP plasmatiques sont d'origine plaquettaire ou mégacaryocytaire, 30 à 40% sont d'origine érythrocytaire, 10% sont d'origine

leucocytaire et 10% sont d'origine endothéliale (Françoise Dignat-George, communication personnelle).

La présence de MP exposant la PS dans le sang de personnes saines pose la question de leur rôle physiologique.

Deux pathologies plaquettaires ont permis de démontrer que les MP plasmatiques sont nécessaires à la coagulation normale du sang. Le syndrome de Scott est un désordre hémorragique rare induit par l'absence d'exposition de PS à la surface des plaquettes lors de l'activation, qui est associé à l'incapacité de produire des MP (Zwaal, Comfurius, et Bevers 2004). Cette pathologie indique que ces fonctions plaquettaires sont essentielles à une coagulation normale. Dans la maladie de Castaman, les plaquettes présentent un phénotype normal avec exposition de PS lors de l'activation mais ne produisent pas de MP (Castaman, Yu-Feng, et Rodeghiero 1996; Castaman et al. 1997). Cette pathologie étant associée à des hémorragies, il apparaît clairement que la présence de MP dans le sang est nécessaire pour obtenir une coagulation normale.

Ces résultats suggèrent que les MP circulent dans le plasma à une concentration basale, permettant au sang de coaguler en cas de brèche vasculaire. Il est désormais admis qu'un grand nombre de pathologies thrombotiques sont corrélées à une augmentation du taux de MP circulantes. Les MP sont ainsi impliquées dans les thromboses associées aux maladies cardiovasculaires (VanWijk et al. 2003; Lynch et Ludlam 2007; Piccin, Murphy, et Smith 2007), au cancer (Tesselaar et al. 2007; Owens et Mackman 2011) ou à certaines maladies auto-immunes (Combes et al. 1999). Certains traitements chirurgicaux ou médicamenteux induisent également une augmentation de la concentration en MP (Nieuwland et al. 1997; Warkentin et Sheppard 1999). La mesure de la concentration en MP plasmatiques pourrait donc constituer une information prédictive sur le risque de développement de thrombose. Examinons maintenant les différentes approches de mesure des MP.

1.3.2 Mesurer la concentration en microparticules dans un échantillon de plasma

Une série d'articles publiés dans le *Journal of Thrombosis and Haemostasis* en 2004 ont fait un bilan des différentes méthodes de quantification de MP (Jy et al. 2004). Deux grandes familles de méthodes se distinguent. Les méthodes indirectes capturent les MPs et déterminent leur quantité par une réaction enzymatique. Les méthodes directes détectent les MP par différentes méthodes physiques et permettent de déterminer différents paramètres tels que la concentration ou la taille des MP. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients qui sont discutés ci-dessous.

1.3.2.1 Les méthodes indirectes

Les méthodes indirectes sont basées sur un principe dérivé de l'ELISA. Brièvement, les MP sont capturées sur une surface plastique. Les MP sont alors mises en présence des facteurs de la coagulation Va et Xa et de prothrombine pendant un temps précis. La quantité de thrombine formée est limitée par la quantité de MP présentes dans l'échantillon, la quantité de thrombine étant mesurée à l'aide d'un substrat chromogène en spectrophotométrie (Hugel, Zobairi, et Freyssinet 2004). Le mode de capture implique généralement l'AnxA5 mais peut aussi utiliser des anticorps (Nomura 2004), le mode de détection des MP pouvant également utiliser des anticorps comme c'est le cas pour les MP d'origine plaquettaire (Nomura 2004) ou les MP exposant le facteur tissulaire (HYPHEN ZYMUPHEN MP-TF). L'utilisation d'anticorps permet par exemple de capturer uniquement les microparticules d'un type cellulaire donné.

Ce type de test est développé en France et commercialisé par la société HYPHEN. Les performances spécifiées par le test ZYMUPHEN donnent une sensibilité de 0.5 nM équivalente en PS (la valeur d'un plasma normal est < 5 nM et d'un plasma pathologique > 10 nM) et un coefficient de variation inter expérience de 10% au maximum. Le test est donc sensible, reproductible et utilise une méthode largement validée et qui nécessite des personnels de niveau technicien.

L'inconvénient majeur de cette méthode est que les MP sont dispersées dans un volume alors que la capture se fait sur une surface. Ce type de réaction est lent, difficilement maîtrisable, et la fraction des microparticules liées est inconnue. De plus, les MP ayant des tailles très hétérogènes, il est possible que la capture des MP diffère en fonction du diamètre des MP. Le signal est ensuite converti en équivalent de concentration en PS grâce à une solution de liposomes de composition connue. Cette conversion implique que les MP se comportent strictement comme les liposomes, hypothèse difficile à tester.

En conclusion, ces tests sont très certainement capables de détecter une concentration anormalement élevée en MP mais ne peuvent pas mesurer précisément la quantité absolue de MP d'un échantillon.

1.3.2.2 Les méthodes directes

Les méthodes directes utilisées pour détecter et caractériser les MP sont basées sur différents principes physiques. Ces méthodes sont décrites et comparées par van der Pol et collaborateurs dans une revue de 2010 (van der Pol et al. 2010). Parmi les techniques directes, la FCM est sans conteste la plus utilisée. Le principe de l'analyse de MP par FCM est extrêmement simple. Un échantillon de plasma est incubé avec des marqueurs d'intérêt comme par exemple de l'AnxA5 fluorescente ou des anticorps fluorescents.

L'échantillon est ensuite dilué et analysé avec un cytomètre en flux (Jy et al. 2004; Dignat-George et al. 2004; Jimenez et al. 2004; Shet, Key, et Hebbel 2004). La FCM permet de déterminer le nombre d'objets par unité de volume, donne une information sur la répartition des tailles des MP ainsi que sur leur phénotype. Dans cette méthode, la préparation de l'échantillon est plus simple et rapide que dans les méthodes fonctionnelles mais la mesure est plus longue et complexe. L'utilisation de plusieurs marqueurs simultanément nécessite des contrôles rigoureux, un cytomètre en flux et un manipulateur de niveau ingénieur. Cette méthode est une des rares permettant de déterminer la colocalisation d'antigènes.

Comme je l'ai spécifié en 1.3, les MP ont un diamètre compris entre 100 nm et 1 μ m.

Comparons cette valeur aux limites de détection de la FCM, spécifiées en 1.2.2.1 et 1.2.2.2.

Pour la détection de MP par la méthode Coulter, van der Pol indique qu'un objet est détectable si sa taille est comprise entre 10 et 70% du diamètre de l'orifice (van der Pol et al. 2010). La détection de microparticules de 100 nm implique que l'orifice ait un diamètre maximal de 1 μ m. Dans ces conditions, les microparticules d'une taille supérieure à 700 nm ne sont pas détectées et risquent de boucher l'orifice. La méthode Coulter ne permet donc pas de mesurer l'ensemble des tailles des microparticules avec un seul orifice. Conscient de cette limitation, la société IZON a développé un appareil utilisant un orifice percé dans une matière élastique et dont le diamètre peut être modulé (Roberts et al. 2010).

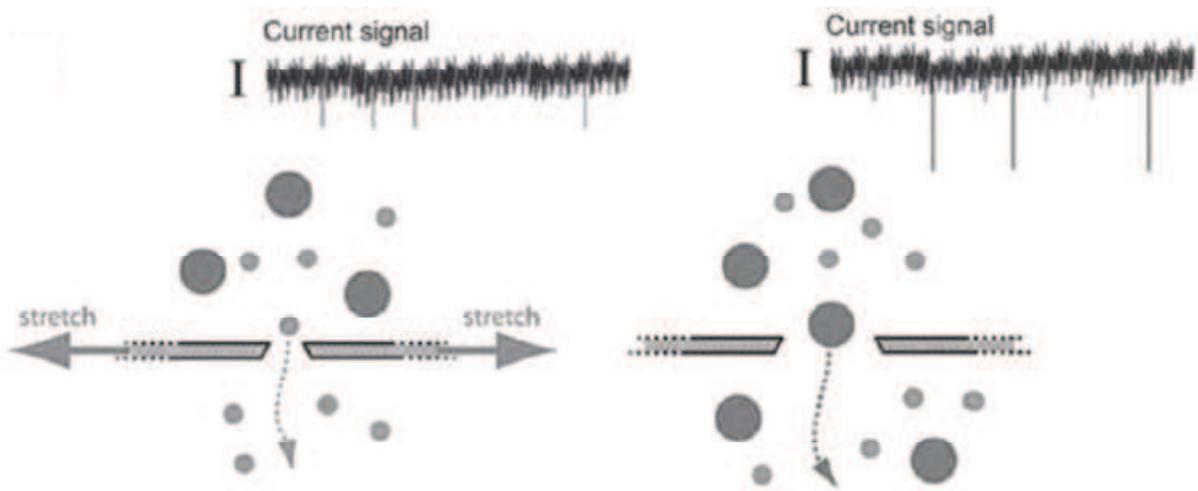


Figure 1.16 : Schéma de la méthode développée par la société IZON. Le principe de mesure est identique à la méthode Coulter mais la taille de l’orifice peut être modulée pour modifier la fenêtre de mesure de l’appareil. Figure issue de (Roberts et al. 2010).

Pour la détection des MP par diffusion de la lumière, j’avais indiqué que, en première approximation que la taille minimale détectable est de l’ordre de la longueur d’onde du laser soit 488 nm pour le laser à argon ionisé, le plus communément utilisé en FCM. En première approximation, cette technique permet donc de mesurer seulement les MP d’une taille supérieure à environ 500 nm. Examinons de plus près l’origine de cette limite. Le principe de diffusion de la lumière par des objets de la taille des MP est régi par les lois de Mie (Shapiro 2003; van der Pol et al. 2010). L’intensité de la lumière diffusée est proportionnelle au diamètre de l’objet d , élevé à la puissance 6 (d^6), donc une MP de $1\mu\text{m}$ diffuse un million de fois plus de lumière qu’une microparticule de 100 nm. A l’heure actuelle, les photodétecteurs des cytomètres en flux ont la capacité de mesurer des intensités lumineuses variant sur quatre ordres de grandeur (1 pour 10 000). La gamme de mesure des détecteurs est donc insuffisante pour mesurer simultanément l’ensemble des objets correspondants compris entre 100 nm et $1\mu\text{m}$. Le diamètre des objets n’est pas le seul paramètre limitant la détection de petits objets, la différence d’indice de réfraction entre le solvant et les objets est également primordiale.

D'après les données de sa fiche technique, le cytomètre en flux FC 500 que j'ai utilisé pendant ma thèse est capable de détecter des particules de 500 nm de diamètre. D'après mes expériences, le FC 500 peut effectivement détecter des particules de polystyrène de 500 nm de diamètre, mais n'est pas capable de détecter des particules de silice de taille identique (données non présentées). Cette différence s'explique par une différence d'indice de réfraction de 1.605 pour le polystyrène contre environ 1.440 pour la silice et 1.342 pour l'eau (Edwin van der Pol, communication personnelle). Pour les tailles proches de la limite de détection des cytomètres en flux, l'indice de réfraction devient un paramètre essentiel. L'indice de réfraction des MP n'est pas précisément connu mais dans le cas où il serait proche de l'indice de réfraction de l'eau, la limite de détection initialement estimée à 488 nm devrait être revue à la hausse.

Ces limitations ont conduit au développement d'une nouvelle génération de cytomètre en flux qui sont disponibles commercialement depuis 2010. Ces cytomètres en flux possèdent des détecteurs de diffusion axiale de la lumière spécialement conçus pour l'analyse de petits objets (Figure 1.17).

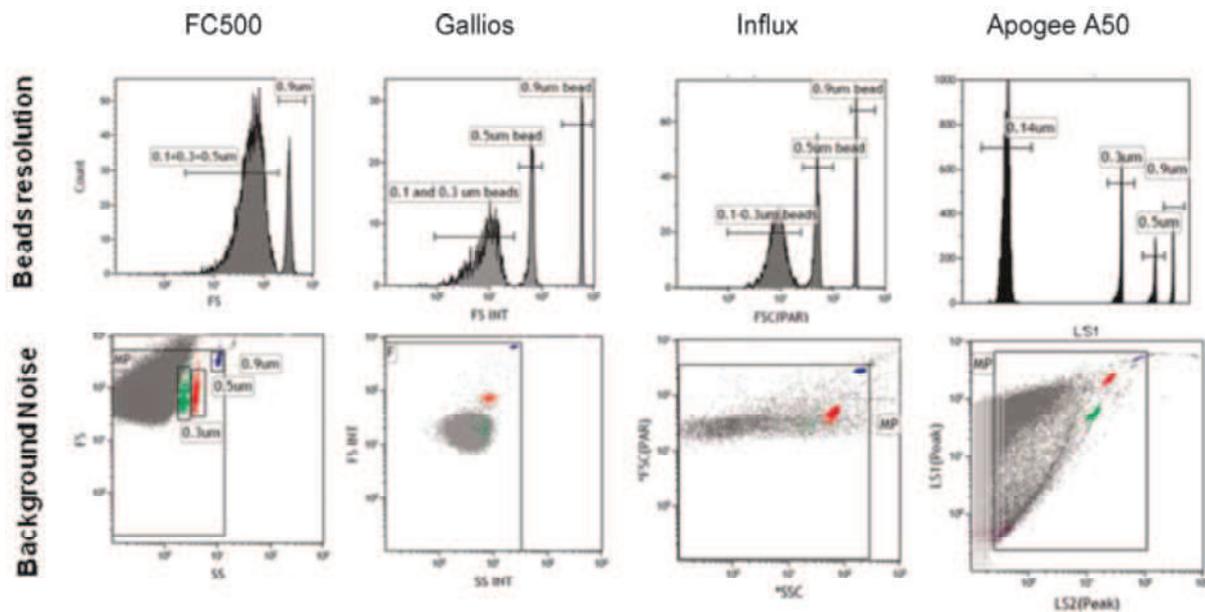


Figure 1.17 : Comparaison du cytomètre en flux FC 500 et de trois cytomètres de nouvelle génération pour l'analyse d'un mélange de particules de latex de 900, 500, 300 et 100 nm Ø (Lacroix et al. 2010). Le FC 500 permet de détecter des particules de 900, 500 et 300 nm Ø sans pouvoir discriminer les particules de 500 nm des particules de 300 nm. Les cytomètres en flux Gallios et Influx détectent des particules jusqu'à 300 nm Ø et peuvent les discriminer des particules de 500 nm Ø alors que l'Apogee A50 permet de détecter et de discriminer des particules jusqu'à 100 nm.

Les nouvelles générations de cytomètres en flux devraient donc permettre de détecter une part plus importante des MP, sans qu'il y ait encore de preuves qu'ils puissent détecter la totalité des MP.

D'autres techniques d'imagerie ou de diffusion ont été proposées pour la caractérisation des MP. Parmi les techniques d'imagerie se distinguent les microscopies photonique, électronique et à champ proche. Les techniques de microscopie optique ont une résolution maximale de 200 nm, elles ne permettent donc pas d'analyser l'ensemble des MP. Un autre problème inhérent à cette méthode est le faible nombre d'objets analysés qui ne permet pas une analyse

statistique. Avec une résolution de l'ordre de 1 nm, la microscopie électronique permet en principe d'analyser l'ensemble des MP et d'étudier l'expression d'antigènes de surface par marquage immunologique avec des nanoparticules d'or. Des images de MP par microscopie électronique ont ainsi été présentées dans plusieurs publications (Wolf 1967; Flaumenhaft et al. 2009; Heijnen et al. 1999; Mrvar-Brecko et al. 2010; E. M. Bevers et al. 1992; Boilard et al. 2010; György et al. 2011). Cependant les méthodes de préparation des échantillons pour la microscopie électronique peuvent induire des artefacts. La technique de préparation la plus répandue qui est la coloration négative, implique la deshydratation de l'échantillon conduisant au collapse des structures vésiculaires et à une concentration artificielle des objets. Les techniques d'immuno-microscopie électronique impliquent des étapes de centrifugation pouvant sélectionner certaines sous populations de MP ou dans la production artificielle de MP dans le cas de centrifugation de plaquettes. La méthode de la cryo-microscopie électronique ne présente pas de telles limitations et son application au cas de l'étude des MP plaquettaires, présentée en annexe de ce document, montre le potentiel de cette technique dans l'étude des MP. Reposant sur un principe physique différent de la microscopie électronique, la microscopie de force atomique (Atomic Force Microscopy ou AFM) possède une résolution équivalente et a été employée dans deux études de MP (Yuana et al. 2009; György et al. 2011). L'AFM est également une technique difficile à mettre en œuvre, permettant la caractérisation d'un nombre extrêmement limité d'objets. D'autre part l'AFM implique d'immobiliser l'objet à imager sur une surface plane, une étape difficilement contrôlable dans le cas des MP. Enfin les forces appliquées par la pointe d'AFM à des échantillons mous comme des liposomes ou des MP, induit une erreur systématique sur la mesure des hauteurs (Reviakine et Brisson 2000). Ces contraintes rendent l'AFM peu adaptée à l'étude des MP.

Parmi les techniques de diffusion, la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ou DLS) est la technique la plus répandue. Cette technique est utilisée conventionnellement pour la caractérisation de nanomatériaux et permet de déterminer précisément la répartition de tailles d'objets. Malheureusement cette technique nécessite une forte concentration en objets et ne permet pas une estimation précise de la taille d'objets s'ils constituent un mélange hétérogène. Dans ces conditions la DLS semble peu indiquée pour la caractérisation de MP.

A l'interface entre imagerie et diffusion, la trajectométrie appliquée à l'analyse de nanoparticules (Nanoparticles Tracking Analysis ou NTA) est une technique en plein essor. Cette technique de vidéomicroscopie détecte des objets par leur diffusion de la lumière et déduit leurs tailles à partir de l'analyse de leurs mouvements browniens (Dragovic et al. 2011). De plus cette technique est compatible avec l'utilisation de fluorophores et permet donc le phénotypage des MP analysées. La technique est capable d'analyser des vésicules lipidiques entre 50 nm et 1 μm de diamètre, une gamme de taille correspondant parfaitement aux MP, les premiers résultats observés avec cette technique sont encourageants mais il faudra plus de résultats pour déterminer si cette technique est applicable en contexte clinique.

En conclusion la nécessité d'une méthode de quantification des MP a conduit au développement d'un grand nombre d'approches, chacune possédant ses avantages et ses limitations. J'ai présenté ici les principales approches correspondant aux méthodes classiques que sont les méthodes ELISA et la FCM ainsi que d'autres méthodes physiques innovantes.

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à créer une méthode de dosage de MP exposant la PS, basée sur l'utilisation de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et d'AnxA5 en FCM. L'objectif de cette méthode étant de mesurer la concentration absolue de l'ensemble des MP exposant la PS sans restriction de taille comme c'est le cas pour le comptage direct en FCM. Le concept de cette méthode est d'utiliser l'AnxA5 comme rapporteur de la présence et de la quantité de MP présente dans un échantillon biologique. L'approche consiste à effectuer une compétition de liaison d'AnxA5 entre des MP et des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. La concentration en AnxA5 étant connue, sa modification induite par la liaison de la protéine à des MP exposant de la PS doit être détectable par l'utilisation de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ de concentration connue comme il sera expliqué au chapitre 3.2, et doit être corrélée à la quantité de MP exposant la PS. Pour valider ce concept j'ai utilisé dans un premier temps, des liposomes comme système modèles des MP avant d'utiliser des MP issues de plaquettes activées *in vitro* et des plasmas humains.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

2.1 Liste des produits utilisés

Les microsphères de silice proviennent de Bangs Laboratories, Inc (Polysciences GmbH, Eppelheim, Allemagne). Les phospholipides 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) et 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-DOPE ou NBD-PE) proviennent d'Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA). Le lipide fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiIC₁₈(5) ou Di), la 6-(fluorescein-5-carboxamido)hexanoic acid, succinimidyl ester (NHS-Fluorescéine) et la fluorescein-5-maleimide (Fluorescéine-Maléimide) proviennent d'Invitrogen (Villebon-sur-Yvette, France). Le fluorophore Cy5-maleimide (cyanine 5 maléimide) provient de GE Healthcare (Vélizy-Villacoublay, France). L'anticoagulant Phenylalanyl-Prolyl-Arginine Chloromethyl Ketone (FPRCK ou PPACK) provient de Haematologic Technologies Inc (Cryopep, Montpellier, France). La thrombine nous a été donnée par le Dr. Jean Max Pasquet ; l'ionophore à calcium A23187 et le peptide TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide) par le Prof. Paquita Nurden ; les anticorps anti-CD41 et anti-CD41-Phycoerythrine par de Dr. Eric Boilard. Tous les autres produits sont choisis avec la plus haute pureté disponible et proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Favallier, France).

2.2 Tampons

Les tampons sont préparés à partir d'eau déionisée produite par un système RiOs5 de Millipore (Molsheim, FRANCE). Le tampon est composé de 150 mM NaCl 10 mM HEPES 2 mM NaN₃ pH 7.4 et est filtré à 0,22 µm. Ce tampon de base est appelé Tampon A5 (TpA5). Quand cela est spécifié le TpA5 contient du CaCl₂, la concentration est alors indiquée. Le TpA5 peut également contenir de l'albumine de sérum de bovin (BSA, Sigma-Aldrich) à 0.1% (1 g.l⁻¹) quand cela est spécifié.

Pour tamponner le milieu, l'HEPES est préféré au phosphate car le calcium forme un précipité insoluble avec le phosphate.

2.3 Microscopies

Les images de microscopie de fluorescence ont été effectuées par Anthony Bouter. Les images ont été acquises sur un microscope inversé de fluorescence IX 81 (Olympus, Rungis, France). Pour augmenter le contraste des images de transmission des µPSiO₂, les images ont été acquises en contraste de phase. Les images de fluorescence ont été acquises en utilisant un cube de fluorescence U-MNIBA2 (Olympus) équipé d'un filtre d'excitation (470-490 nm), d'un dichroïque (505 nm) et d'un filtre d'émission passe-bande (510-550 nm).

Les images de MET et de Cryo-MET ont été effectuées par Joséphine Lai Kee Him et Sisareuth Tan. Pour les images de MET, les échantillons de µPSiO₂ ont été déposés sur des grilles de microscopie électronique en cuivre 300 Mesh Agar Scientific (Oxford Instruments SAS, Gometz-la-Ville, France) recouvertes d'un film de carbone et imagées au moyen d'un

MET CM 120 (FEI Europe, Eindhoven, Pays Bas) fonctionnant à 120 kV. Les images sont acquises au moyen d'une caméra $2k \times 2k$ pixels (Gatan, Grandchamp, France).

Pour les images de Cryo-MET, les échantillons ont été déposés sur des grilles de microscopie recouvertes d'un film de carbone perforé, puis l'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre (Whatman, Versailles, France), et les échantillons sont rapidement congelés dans l'éthane liquide. Les échantillons sont transférés sur un porte objet cryo Gatan 626 et imagés avec un MET Tecnai F20 (FEI) fonctionnant à 200 kV. Les images sont acquises au moyen d'une caméra $2k \times 2k$ pixels USC1000-SSCD (Gatan).

2.4 Spectrofluorimétrie

Les expériences de spectrofluorimétrie ont été effectuées au moyen d'un spectrofluorimètre LS 55 Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France). Les cuves utilisées sont en quartz suprasil Hellma (Paris, France) pour travailler dans l'UV et le visible. Les données acquises par le logiciel FL Winlab sont enregistrées au format .txt pour être importées et traitées dans Excel[®].

2.5 Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)

Le QCM-D est une technique d'étude d'interactions moléculaires sans marqueurs que nous utilisons couramment au LIMNT (Figure 2.1A). Brièvement le QCM-D est une technique développée au début des années 1990 à partir d'une technique préexistante, le QCM. Le QCM est une technique développée dans les années 1960 et très utilisée pour mesurer des processus

d'adsorption sur support solide à partir de la variation de fréquence de résonance d'un matériau piézoélectrique⁴, le quartz (Figure 2.1B et C).

Pour rappel un système oscillant possède une infinité de fréquences de résonances f_n avec la première fréquence de résonance, appelée fréquence fondamentale et notée f_0 et :

$$f_n = n \times f_0$$

où n est appelé le nombre d'harmonique.

En 1959, Sauerbrey propose une équation reliant la variation de fréquence de résonance d'un cristal de quartz à la variation de masse déposée à sa surface (Sauerbrey 1959) :

$$\Delta m = -C \times \frac{\Delta f_n}{n}$$

où Δm est la variation de masse en ng.cm^{-2} , Δf (Hz) est la variation de fréquence de résonance pour l'harmonique n et C une constante dépendante du cristal de quartz et valant $17.7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$ pour les cristaux qui ont une fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz et que nous utilisons au laboratoire.

Cette équation appelée équation de Sauerbrey est uniquement applicable dans le cas de films minces et rigides. Il est important d'ajouter que le QCM mesure la masse des objets en tenant compte de l'eau couplée. Dans le cas des protéines, la masse de l'eau peut représenter une part importante de la masse mesurée en QCM. Le QCM-D permet d'accéder à un second paramètre, la dissipation (D). L'amortissement de l'oscillation permet de calculer la dissipation qui est reliée à la visco-élasticité du matériau déposé sur le cristal de quartz. Les résultats que je présente ne contiennent pas de mesures de dissipation, je ne donnerai donc pas plus d'explications sur ce paramètre. Pour plus d'informations, l'article de Rodahl décrit en détail les bases physiques du QCM-D (Rodahl et al. 1995).

⁴ Un matériau piézoélectrique est un matériau se déformant sous l'effet d'un champ électrique et réciproquement créant un champ électrique sous l'effet d'une déformation.

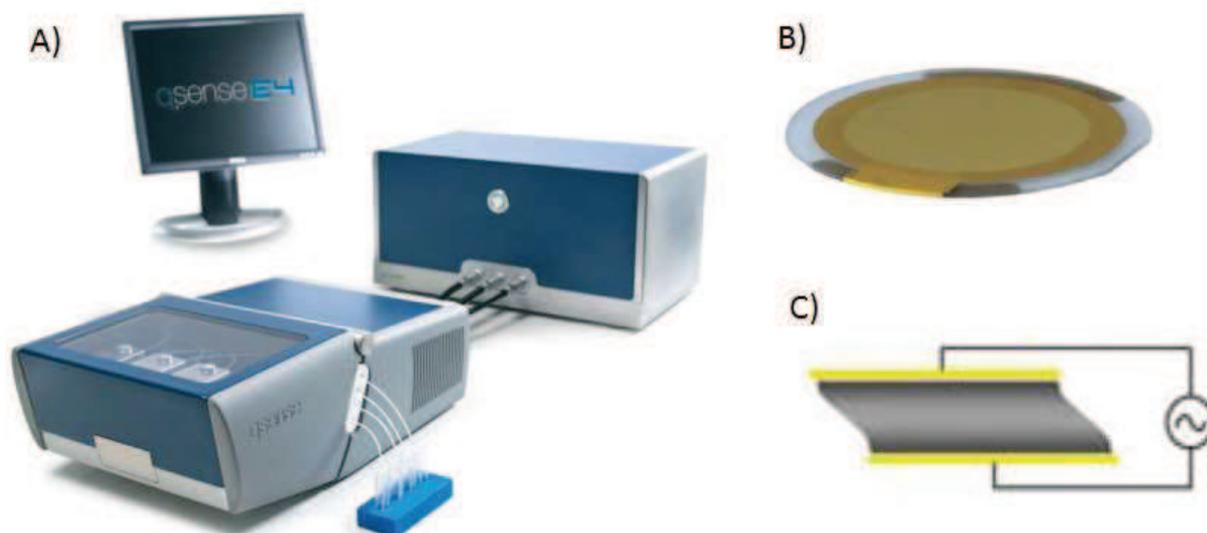


Figure 2.1 : Appareil de QCM-D. A) Vue d'ensemble et B) Cristal de QCM-D vu de dessus, le diamètre réel vaut environ 12 mm (Images <http://www.lot-orient.com/fr/fr/home/qsense/>). C) Oscillation du cristal induite par l'application d'un courant alternatif. (Richter 2004)

2.6 Cytométrie en flux (FCM)

Le principe de fonctionnement de la FCM est expliqué en détail dans le chapitre 1.

Les premières expériences de FCM réalisées pendant ma thèse ont été effectuées sur un FACS Aria (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) à l'IECB. L'essentiel des expériences de FCM a été effectué ultérieurement sur un cytomètre en flux Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Villepinte, France) (Figure 2.2). Le cytomètre en flux est équipé, en plus de son laser à argon ionisé, d'un laser solide émettant à 633 nm. Le cytomètre en flux est équipé du passeur d'échantillon standard de 32 tubes. Ce cytomètre en flux peut utiliser trois flux d'analyse d'échantillon correspondant à environ 10, 30 et 60 μl d'échantillon analysé par minute.



Figure 2.2 : Image du cytomètre en flux Cytomics FC 500. (www.coulterflow.com/)

L'acquisition des données est effectuée à l'aide du logiciel CXP. Les protocoles d'acquisition utilisent tous les paramètres en échelle logarithmique à l'exception du temps qui utilise une échelle linéaire. Le logiciel enregistre les résultats des mesures au format .LMD, un format de fichier propre à la cytométrie en flux.

L'analyse des résultats est effectuée à l'aide du logiciel CXP Analysis. Ce logiciel peut exporter les résultats des mesures vers Excel[®] en utilisant la fonction Automator. L'Automator est une fonction du logiciel CXP fonctionnant de la manière suivante. Tout d'abord, l'Automator nécessite un protocole d'analyse qui spécifie les paramètres, les régions, les gates et les statistiques à exporter vers Excel[®]. Puis les fichiers de résultats sont chargés dans l'Automator. L'Automator applique le protocole d'analyse à la liste de fichiers .LMD et produit une feuille Excel[®] contenant l'ensemble des résultats (Figure 2.3).

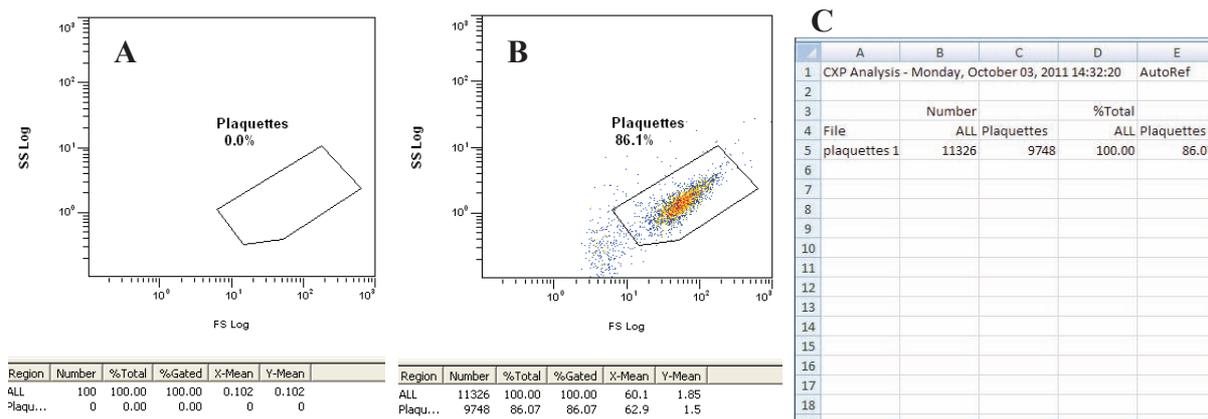


Figure 2.3 : Schéma de la procédure d'export des données par l'Automator. L'Automator applique un protocole d'analyse A) à un fichier de résultats B) et exporte les mesures vers une feuille Excel[®] C).

Pour les cinétiques, mon travail a consisté à créer un protocole d'analyse capable de représenter la fluorescence des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ en fonction du temps. Le protocole identifie les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ par leurs propriétés de diffusion de la lumière et représente leurs valeurs de fluorescence en fonction du temps. Pour obtenir les valeurs de fluorescence moyennes correspondant à chaque minute d'analyse pour une cinétique d'une heure, j'ai dû créer manuellement les 60 régions correspondantes (Figure 2.4). Dans les fichiers .LMD, le temps est codé sur 1024 valeurs, donc pour une cinétique de 1h chaque minute est codée sur 17 valeurs pour une durée exacte de 56,305 seconde. La création d'un protocole capable d'exporter les valeurs de fluorescence vers un tableau Excel[®] est donc une étape fastidieuse dans laquelle des erreurs peuvent survenir.

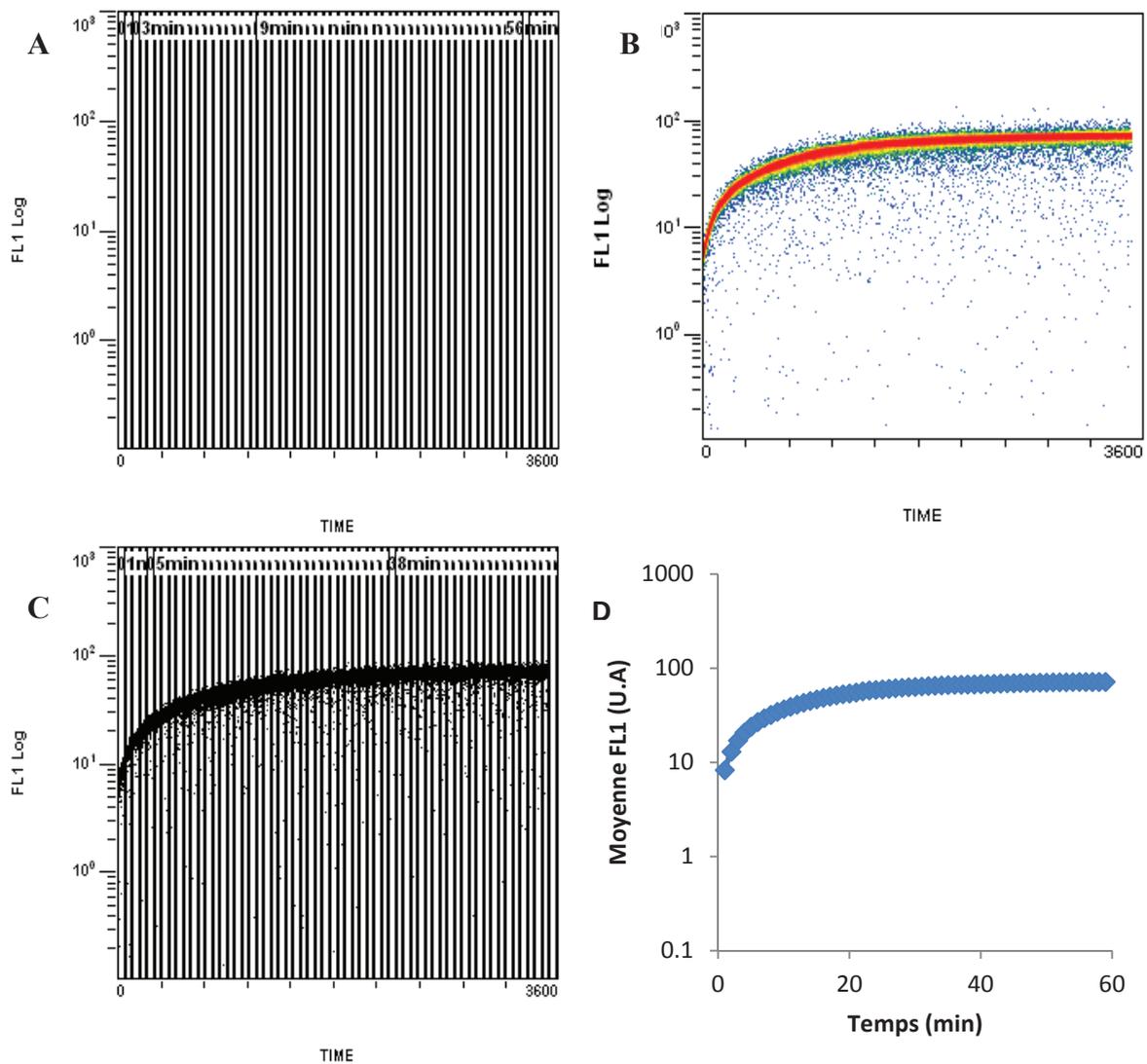


Figure 2.4 : Schéma du traitement des données de cinétiques par l'Automator. Le protocole d'analyse (A) est appliqué sur une cinétique de liaison d'AnxA5 (B) pour donner un résultat (C) exporté vers une feuille Excel[®]. Les résultats exportés permettent d'analyser les résultats dans Excel[®] (D).

La comparaison des figures 2.4 B et D démontre que le traitement appliqué ne modifie pas les résultats. La création et la validation du protocole d'analyse ont été effectuées selon une méthode par essai et erreur. Le critère de validité étant que la somme des événements de chaque région soit égale au nombre total d'évènements fournis par le logiciel. Un autre indice

d'une erreur de protocole est une forte variation du nombre d'évènements entre deux régions correspondant à deux minutes contigües (Figure 2.5).

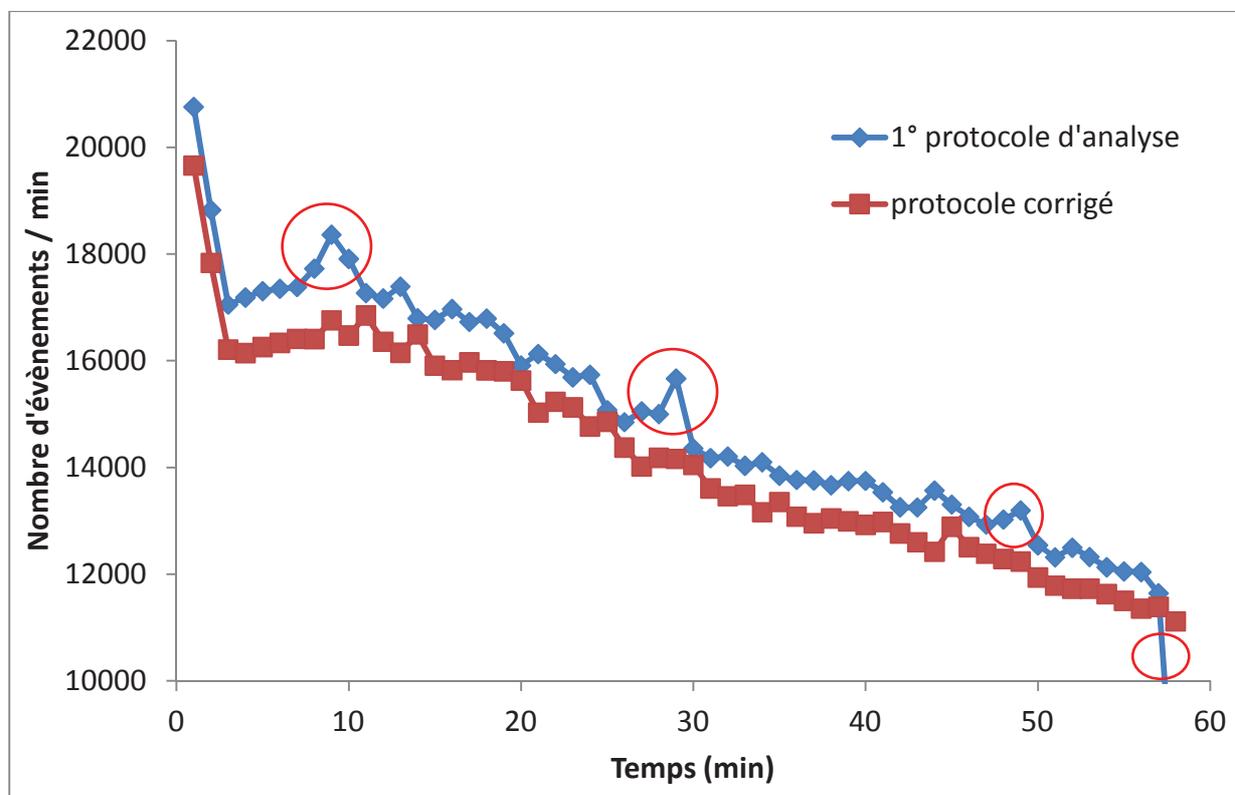


Figure 2.5 : Optimisation du protocole d'analyse de données. Deux protocoles ont été appliqués à une cinétique de liaison d'AnxA5 sur des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ $10^6/\text{ml}$. Les régions où le nombre d'évènements semble anormal dans le premier protocole sont entourées. Après vérification du protocole, des erreurs de découpage avaient été faites. Ces régions disparaissent après la correction du protocole.

La figure 2.5 montre l'évolution du protocole d'analyse des cinétiques présenté à la figure 2.4. Les fluctuations du nombre d'évènements ne sont pas dues à un problème de recouvrement des régions. Pendant les trois premières minutes d'analyse le flux d'échantillon n'est pas stabilisé et la quantité d'évènement est systématiquement plus élevée. Ensuite le nombre d'évènements se stabilise puis décroît, sans doute à cause de la sédimentation des

$\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Le nombre d'évènements analysés à 59 min représente environ 70% du nombre observé à 3 min.

Le logiciel CXP Analysis n'a pas été conçu pour effectuer ce type de traitement. La création de ce type de protocole d'analyse est extrêmement fastidieuse, demande beaucoup de rigueur et il n'est pas possible de modifier le paramètre mesuré en fonction du temps sans devoir recréer complètement un nouveau protocole. L'avantage de ce type de méthode est qu'un seul protocole d'analyse permet l'analyse d'un grand nombre de fichiers si les différents paramètres sont conservés dans un ordre identique. Le protocole s'adapte également à différents temps de mesure, chaque région valant un soixantième du temps de mesure.

2.7 Préparation et mise en forme de liposomes

Les lipides en poudre sont solubilisés en chloroforme et mélangés dans un ballon, dans les proportions désirées. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite avec un évaporateur rotatif (Buchi, Flawil, Suisse) jusqu'à obtention d'un film lipidique. Le film lipidique est réhydraté avec du TpA5 et vortexé. Les lipides sont ensuite soumis à cinq cycles de congélation dans l'azote liquide puis décongélation dans de l'eau chaude et homogénéisation au vortex. Les liposomes formés sont alors sous forme multilamellaire (Multi Lamellar Vesicles, ou MLV) et leur taille n'est pas contrôlée. Les MLV servent de matériel de base pour la préparation de liposomes unilamellaires de petite taille (Small Unilamellar Vesicles, ou SUV) et de grande taille (Large Unilamellar Vesicles, ou LUV) (Figure 2.6).

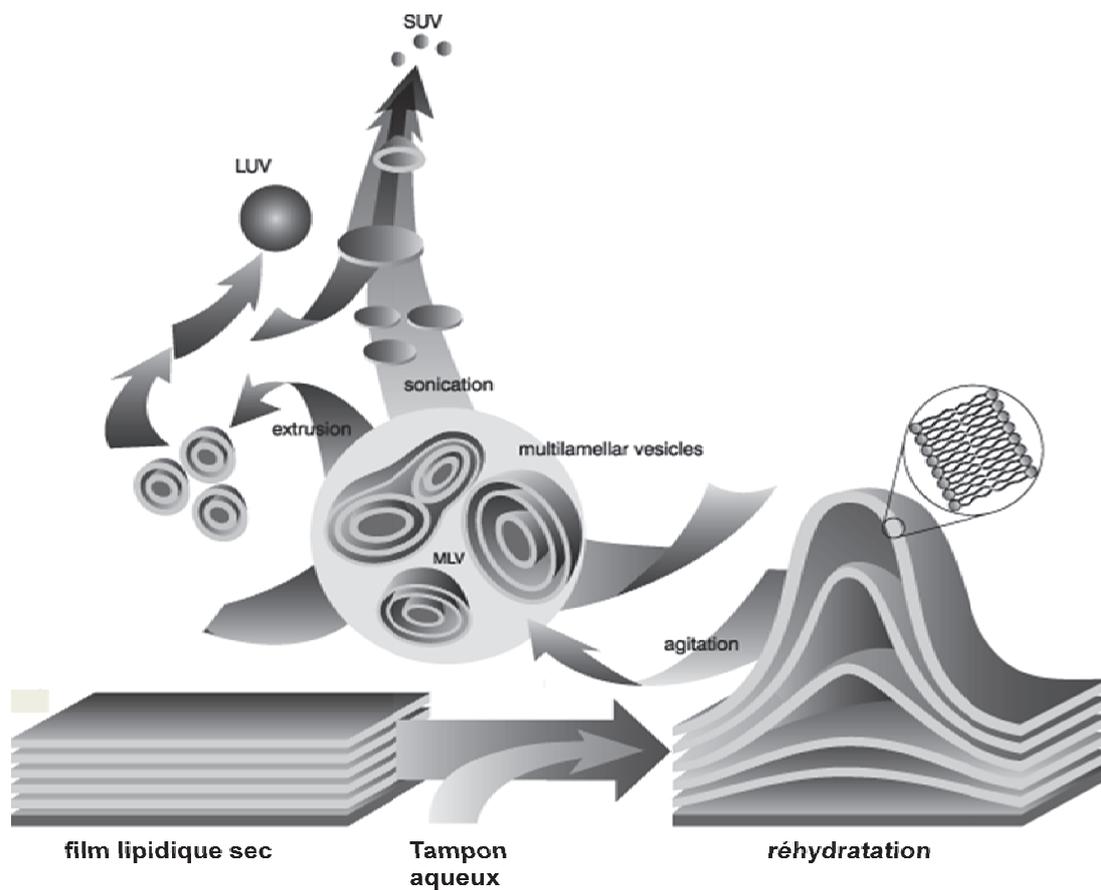


Figure 2.6 : Schéma de production de liposomes adapté de <http://avantilipids.com/>

Les SUV sont préparées par sonication de MLV avec un sonicateur à sonde de titane Branson modèle 250 (Danbury, CT, USA). Lors de la sonication, le récipient contenant les MLV est placé dans un bécher contenant un mélange d'eau et de glace. Les MLV sont soniquées jusqu'à ce que la solution devienne limpide, soit environ 30 minutes de sonication à 20% d'amplitude. La sonde relarguant des particules de titane dans la solution de SUV, les particules de titane sont éliminées par centrifugation à 16 000g pendant 10 min.

Les LUV sont préparées par extrusion de MLV avec un Mini-Extrudeur Avanti. Les MLV sont extrudées à travers des membranes de polycarbonate présentant des pores de diamètre calibrés. Les MLV sont extrudées successivement en utilisant des pores de diamètres de plus en plus petits tels que 800 nm, 400 nm puis 200 nm.

La concentration en phospholipides est déterminée par dosage colorimétrique du phosphate d'après la méthode de Rouser et collaborateurs (Rouser, Fleischer, et Yamamoto 1970). Tout d'abord l'eau contenue dans les échantillons de lipides est évaporée. Les phospholipides sont chauffés 30 min à reflux dans un bain sec à 180 °C en présence d'acide perchlorique pour libérer les phosphates. Un excès de molybdate d'ammonium et d'acide ascorbique est ajouté dans chaque échantillon puis les échantillons sont chauffés au bain marie à environ 100 °C pendant cinq minutes. Les échantillons développent une coloration bleue, d'absorbance proportionnelle à la quantité initiale de phosphates (Figure 2.7).

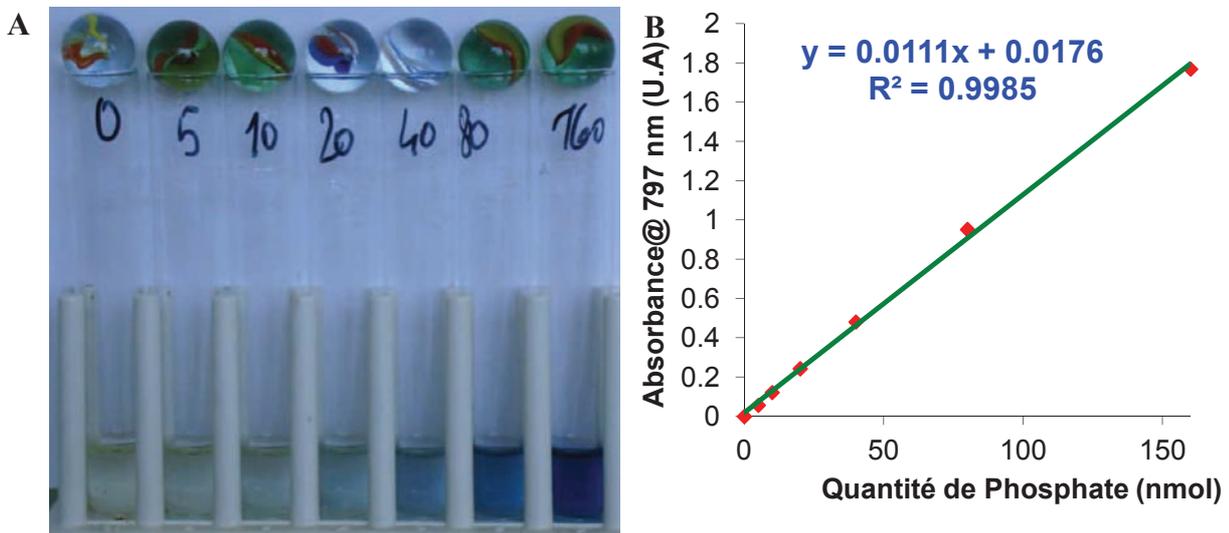


Figure 2.7 : A) Image de tubes contenant une gamme d'étalonnage de dosage des phosphates et B) mesure de leur absorbance par spectrophotométrie. Les quantités de phosphates inscrites sur les tubes correspondent à des nanomoles de phosphate. L'absorbance des solutions est proportionnelle à la quantité de phosphates comme le montre la courbe B). Le seuil de détection est d'environ 1 nmol de phosphate soit 0.8 µg de phospholipides.

2.8 Production de microsphères de silice recouvertes d'une bicouche lipidique supportée ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$)

Les microsphères de silice sont mélangées avec des SUVs en TpA5. Une production standard consiste à mélanger 10^8 μPSiO_2 avec 30 μg de SUVs dans un volume final de 1ml pendant une heure. Cette quantité de lipides correspond à dix fois la quantité théorique de lipides nécessaire pour recouvrir 10^8 μPSiO_2 . Les microsphères de silice sont purifiées par cinq séries de centrifugation de 80 g pendant cinq minutes avec élimination de 800 μl de surnageant et remplacement par 800 μl de TpA5. Les culots sont resuspendus par aspiration et refoulement à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles d'air. Le cinquième culot de microsphères de silice est repris en TpA5 contenant 0.1% de BSA. Les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont stockées à 4 °C à l'abri de la lumière.

La présence de BSA et le stockage à basse température permettent d'améliorer la conservation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ qui restent majoritairement sous forme de microsphères individualisées (données non présentées). Un tube de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ non entamé peut être conservé pendant plusieurs mois à 4 °C, les tubes entamés doivent être consommés en deux à trois semaines.

2.9 Production d'AnxA5 fluorescentes

Durant ma thèse j'ai principalement utilisé une AnxA5 mutante contenant une seule cystéine, nommée AnxA5_B. Les AnxA5 que nous utilisons au laboratoire sont des protéines recombinantes produites en système bactérien. La production de protéines, la purification et le couplage avec des fluorophores ont été effectués par Céline Gounou.

L'ADNc codant pour l'AnxA5 de rat est utilisé pour la production de l'AnxA5 Wild Type (AnxA5_{WT}). L'AnxA5_B est un double mutant (T163C ; C314S) produit par mutagenèse dirigée. L'AnxA5_{WT} possède une cystéine localisée dans l'une des hélices α du quatrième

domaine Anx, proche de l'extrémité C terminale. Cette position induit un encombrement stérique de la fonction thiol qui est peu réactive pour le couplage chimique. La position 163, localisée dans la boucle séparant les deuxième et troisième domaines Annexine, la plus exposée au solvant permet une réactivité maximale (Figure 2.8).

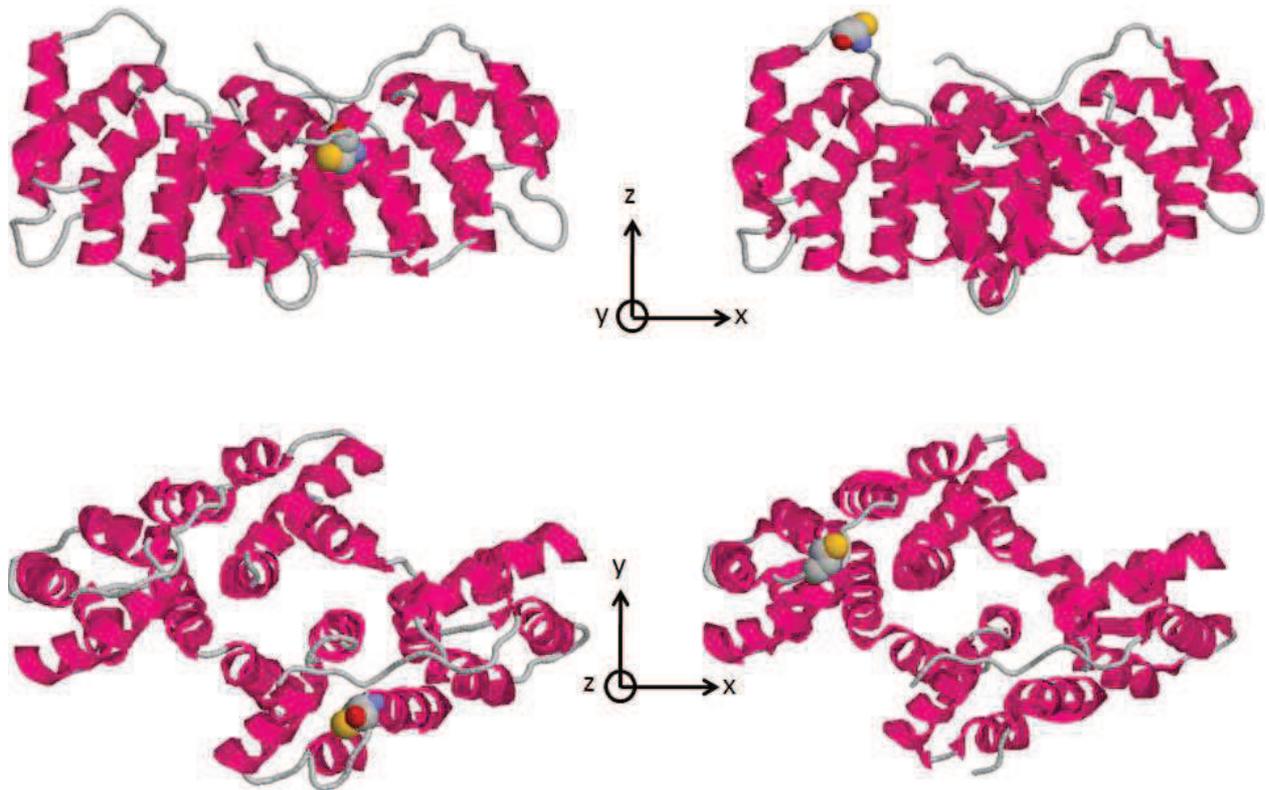


Figure 2.8 : Comparaison des structures de l'AnxA5_{WT} et de l'AnxA5_B. Seules les structures secondaires sont représentées. Pour plus de lisibilité, les atomes des cystéines sont intégralement représentés et colorés selon leur nature chimique (carbone en gris, azote en bleu, oxygène en rouge et soufre en jaune). La structure de l'AnxA5_{WT} est représentée selon deux orientations dans la partie gauche, la partie droite représente l'AnxA5_B selon les mêmes orientations. PDB ID 1A8A pour l'AnxA5_{WT} et 2H0M pour l'AnxA5_B. Les images sont produites en utilisant le programme RasMol (www.openrasmol.org).

Les AnxA5_{WT} et AnxA5_B ont été clonées dans des plasmides d'expression pET11b (GE-Healthcare). Des bactéries *Escherichia Coli* BL21(DE3) ont été transformées par choc thermique avec ces plasmides. Les bactéries sont ensuite cultivées une nuit à 37 °C sur milieu LB⁵ solide, et sont sélectionnées à l'ampicilline. Une colonie bactérienne est prélevée et transférée dans 800 ml de milieu LB liquide supplémenté en ampicilline et cultivée à 30 °C. Quand les bactéries sont en phase exponentielle de croissance, l'expression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 16 h à 30 °C.

Les bactéries sont isolées par centrifugation 4500 rpm 10 min à 4 °C, puis sont lysées par sonication 5 min à 13 Watts au moyen d'un sonicateur Branson modèle 250. Les fragments membranaires sont éliminés par centrifugation 2 h à 12 000 g, le surnageant contenant les protéines d'intérêt est conservé à 4 °C jusqu'à la purification. Pour la purification, le surnageant est filtré sur un filtre de 0,22 μm puis purifié par deux étapes de chromatographie sur un système de Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Äkta Purifier GE Healthcare (Vélizy-Villacoublay, FRANCE). La première chromatographie est une chromatographie d'exclusion stérique effectuée sur une colonne Superdex-200. La seconde est une chromatographie échangeuse anionique effectuée sur une colonne MonoQ en utilisant un gradient linéaire de NaCl pour l'élution. A chaque étape de chromatographie, les fractions absorbant à 280 nm sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et l'AnxA5 est identifiée par sa taille. Une production de protéines typique donne environ 40 mg d'AnxA5 pure à partir de 800 ml de culture bactérienne.

Pour l'AnxA5_B, la protéine purifiée monomérique est dimérisée par formation d'un pont dissulfure en présence de 2,2'-dithiodipyridine (DTDP) à un rapport de 2 AnxA5_B pour 1 DTDP, une nuit à température ambiante. Le dimère est ensuite purifié par chromatographie

⁵ Les initiales LB peuvent signifier Lysogeny Broth, Luria Broth, Luria-Bertani broth ou Lennox Broth suivant les auteurs. Selon l'auteur original Giuseppe Bertani, les initiales LB signifient Lysogeny Broth (Bertani 2004).

d'échange anionique sur MonoQ. Cette étape supplémentaire permet de purifier les AnxA5_B dont le SH est réactif et d'éliminer les protéines dont le SH serait altéré.

Pour le couplage des protéines avec des fluorophores, deux stratégies de couplage sont employées.

Pour l'AnxA5_{WT}, le couplage covalent est effectué sur les fonctions amines portées par la protéine en utilisant des fluorophores-NHS (ester de N-Hydroxysuccinimide). La forme NHS correspond à une forme d'ester activé comportant un bon groupement partant, donnant après réaction une liaison amide stable (Figure 2.9).

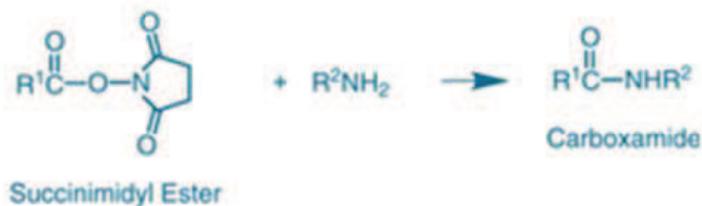


Figure 2.9 : Schéma de réaction entre une amine et un ester de NHS. Adapté du Molecular Probes Handbook Chapitre 1 Section 1.1.

Brièvement, l'AnxA5_{WT} est mélangée avec un excès de cinq fois en moles de fluorophore-NHS dans un tampon HEPES pendant la nuit. Les fluorophores libres restant après la réaction sont éliminés par filtration sur des membranes filtrantes Microcons de 10 kDa (Millipore). La protéine est lavée jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus coloré. La protéine est ensuite récupérée et stockée à 4 °C à l'abri de la lumière.

Cette technique de couplage simple et assez courante donne des protéines fluorescentes, mais le nombre de fluorophores par protéine est difficilement contrôlable. De plus les fluorophores peuvent réagir avec des sites essentiels à la liaison des membranes.

Pour l'AnxA5_B, le couplage est effectué sur la fonction thiol de la cystéine introduite par mutation en utilisant des fluorophores présentant un groupement maléimide. Le maléimide est un groupement chimique réagissant spécifiquement avec les thiols pour donner un thioether stable (Figure 2.10).

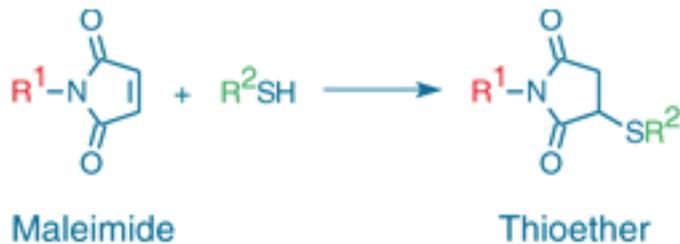


Figure 2.10 : Schéma de réaction entre un thiol et un maléimide. Adapté du Molecular Probes Handbook Chapitre 2 Section 2.1.

Le principe du couplage est le suivant. Dans un premier temps le dimère d'AnxA5_B est réduit au Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) pour donner deux monomères d'AnxA5_B. Puis le fluorophore-maléimide est ajouté au mélange avec un excès de trois fois en moles. Après une nuit de réaction, le fluorophore en excès est séparé par filtration sur membranes filtrantes Microcon de 10 kDa et la protéine est stockée à l'abri de la lumière à 4 °C.

Les protéines fluorescentes sont contrôlées par SDS-PAGE, le couplage entraînant l'apparition d'une bande de protéine décalée vers les hautes masses. Les protéines sont également contrôlées en spectrométrie de masse pour vérifier l'efficacité du couplage chimique et par QCM-D pour vérifier que le couplage n'altère pas la liaison aux membranes (Figure 2.11).

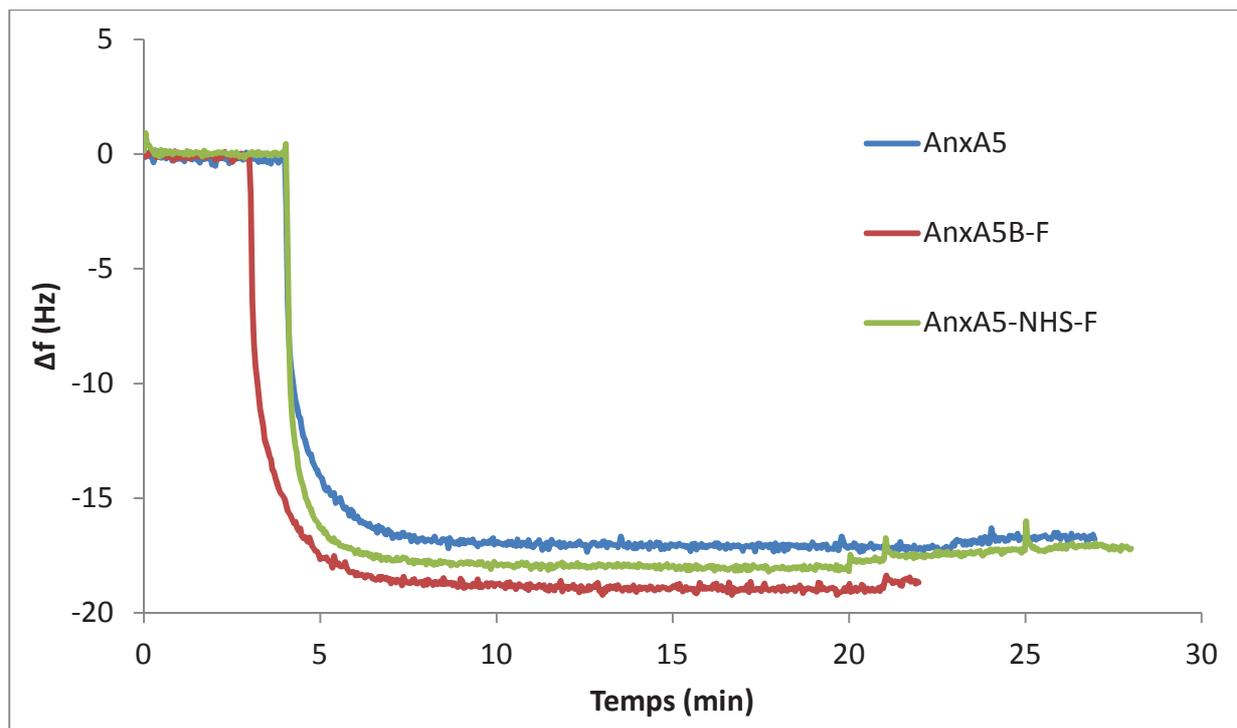


Figure 2.11 : Comparaison de la liaison de différentes AnxA5 sur SLB PC :PS (4 :1) par QCM-D. La courbe bleue représente un résultat obtenu pour l'AnxA5_{WT}, la courbe rouge pour de l'AnxA5_B-Fluorescéine et la courbe verte pour de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine.

Les résultats présentés à la figure 2.11 montrent qu'il existe une grande similarité entre les propriétés de liaison des différentes AnxA5 à des SLB. Le Δf mesuré entre 10 et 15 minutes, vaut -17.0 ± 0.1 Hz pour l'AnxA5_{WT} ; -17.9 ± 0.1 Hz pour l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine et -18.9 ± 0.1 Hz pour l'AnxA5_B-Fluorescéine. La différence de Δf observée pourrait être expliquée par le couplage chimique en tenant en compte la masse du fluorophore et de l'eau liée. Ces résultats démontrent que le couplage chimique n'altère pas les propriétés de liaison de la protéine aux membranes.

2.10 Préparation de plaquettes et de microparticules plasmatiques

Les protocoles de prélèvement et de préparation des échantillons sanguins constituent une source de variabilité primordiale dans le domaine des MP. Pour la préparation de MP, j'ai suivi un protocole communiqué par le Pr. Françoise Dignat-George. Les plaquettes et les MP sont préparées à partir de sang de donneurs sains ayant donné leur consentement. Le sang est prélevé par ponction veineuse à l'aide d'un système tube à prélèvement sous vide de 3 ml (Sarsdest Monovette, Marnay, France) et anticoagulé au citrate de sodium (10.6 mM citrate final). Pour limiter l'activation plaquettaire, le prélèvement est effectué à l'aide d'une aiguille de 21 G (0.8 mm Ø), sans garrot et le premier tube de sang n'est pas utilisé. Les échantillons de sang sont préparés dans l'heure suivant leur prélèvement.

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est préparé par centrifugation du sang 10 minutes à 200 g. Le plasma est prélevé jusqu'à 1 cm au dessus de la couche de leucocytes et contient environ 5×10^8 plaquettes/ml.

Pour les MP plasmatiques, le sang est centrifugé une première fois 15 minutes à 1500g. Le plasma est prélevé jusqu'à 1cm de la couche de leucocytes et aliquoté sous forme de tubes de 500 µl. Le plasma est ensuite centrifugé 2 minutes à 13 000g pour éliminer les plaquettes résiduelles. Chaque aliquote de 500 µl de plasma donne 400 µl de plasma appelé Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP). Le PPP est utilisé frais ou est conservé congelé à -80 °C.

Dans toutes les expériences où du plasma est mis en présence de Ca^{2+} , la coagulation est prévenue par l'ajout de 10 µM de peptide PPACK, un inhibiteur irréversible de la thrombine (Bode, Turk, et Karshikov 1992).

Pour les expériences de centrifugation des MP issues de PPP, du PPP fraîchement préparé est ultracentrifugé à l'aide d'une centrifugeuse Optima MAX-E benchtop ultracentrifuge (Beckman Coulter) équipée d'un rotor TLA110. Les échantillons sont centrifugés à 100 000 g (49 000 rpm) pendant 1 h à 20 °C, puis la partie supérieure de l'échantillon est éliminée avec précaution car le culot n'est pas visible. Le culot est resuspendu dans 100 µl de TpA5 puis aliquoté. Les échantillons ainsi aliquotés sont utilisés frais ou sont conservés congelés à -80 °C.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Production de microsphères de silice recouvertes d'une bicouche lipidique supportée

Pour produire les microsphères de silice recouvertes d'une bicouche lipidique supportée ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$), je me suis principalement basé sur les travaux de Gilbert et collaborateurs (Gilbert et al. 1992; Gilbert 2005). Gilbert a choisi des particules de verre de 1.6 μm de diamètre car elles permettent une purification simple par sédimentation à basse vitesse, tout en sédimentant lentement à pesanteur normale. Ces propriétés permettent de considérer que la concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ reste homogène lors des expériences de liaison d'AnxA5.

J'ai travaillé essentiellement à partir de microsphères de silice (μPSiO_2) de 1.5 μm de diamètre. Les données fournies par le fabricant donnent un diamètre de $1.54 \pm 0.16 \mu\text{m}$ déterminé par la méthode Coulter. Pour tester ces données, les microsphères ont été analysées en microscopie électronique à transmission (MET) pour déterminer leur taille (Figure 3.1) et en cytométrie en flux (FCM) pour analyser leur dispersité (Figure 3.2).

Les images de MET montrent des particules sphériques et très majoritairement individualisées. Certaines particules apparaissent doubles mais demeurent rares. Le diamètre des particules mesuré sur une centaine de μPSiO_2 donne une valeur de $1.39 \pm 0.07 \mu\text{m}$. La différence entre la valeur mesurée en MET et par la méthode Coulter est d'environ 10% mais en MET nous choisissons de ne pas tenir compte des particules doubles.

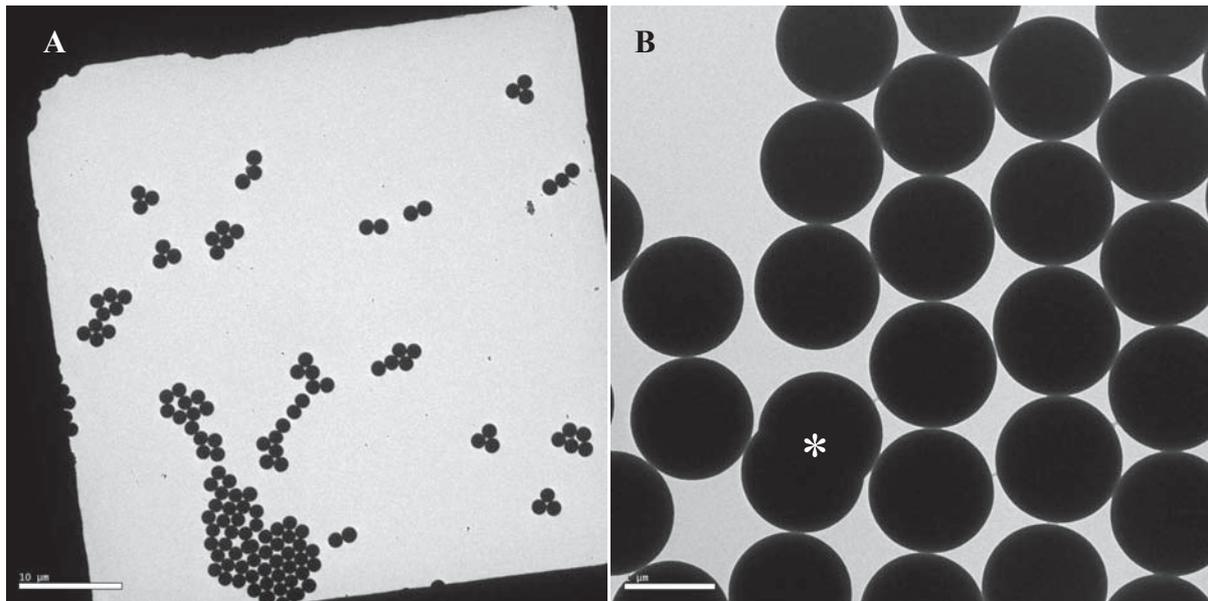


Figure 3.1 : Microsphères de silice observées en MET. Barres d'échelle A) 10 µm et B) 1 µm. Images Sisareuth Tan. L'image B) montre une particule double marquée par un astérisque.

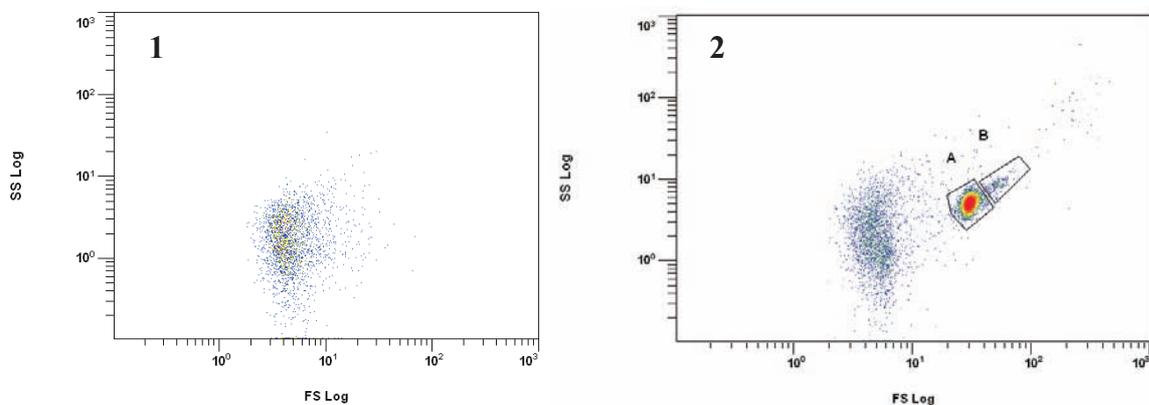


Figure 3.2 : Microsphères de silice 10^6 /ml diluées en eau et analysées en FCM. 1) signal de l'eau ; 2) particules diluées en eau. Les microsphères de silice se distinguent clairement du signal de l'eau. La région A représente les particules individualisées et la région B, les doublets de particules.

Les particules diluées en eau et analysées en FCM forment une population homogène avec 98% de particules individualisées et 2% de doublets de particules.

3.1.1 Formation d'une bicouche lipidique supportée sur les microsphères de silice.

Pour déposer une bicouche lipidique supportée (SLB) à la surface des μPSiO_2 , la stratégie utilisée est le dépôt et la rupture spontanée de petits liposomes unilamellaires (SUV). Cette méthode consiste à mélanger un support de silice et des SUV dans un milieu approprié. C'est une méthode simple à mettre en œuvre et couramment employée pour former des SLB sur des supports de différentes natures chimiques (silice, mica, oxyde de titane), sous forme de surfaces planes ou de nanoparticules (Mornet, Lambert, Duguet, et Brisson 2005; Richter, Mukhopadhyay, et Brisson 2003; Reviakine, Bergsma-Schutter, et Brisson 1998). La formation d'une SLB sur un support de silice dépend de la composition lipidique des SUV et de la composition ionique du milieu. Pour les expériences de liaison d'AnxA5, la SLB doit contenir de la PS. Au LIMNT, nous utilisons couramment des SUV contenant 20% de phosphatidylsérine (PS) en masse car cette composition correspond à la quantité de PS présente dans la membrane plasmique des cellules humaines (Devaux 1992; Zachowski 1993). Pour la formation de SLB sur support plan de silice, nous utilisons couramment du TpA5 (Chapitre 2.2) supplémenté avec 2 mM calcium (Ca^{2+}). Toutefois les μPSiO_2 diluées en TpA5 2 mM Ca^{2+} tendent à s'agréger (Figure 3.3).

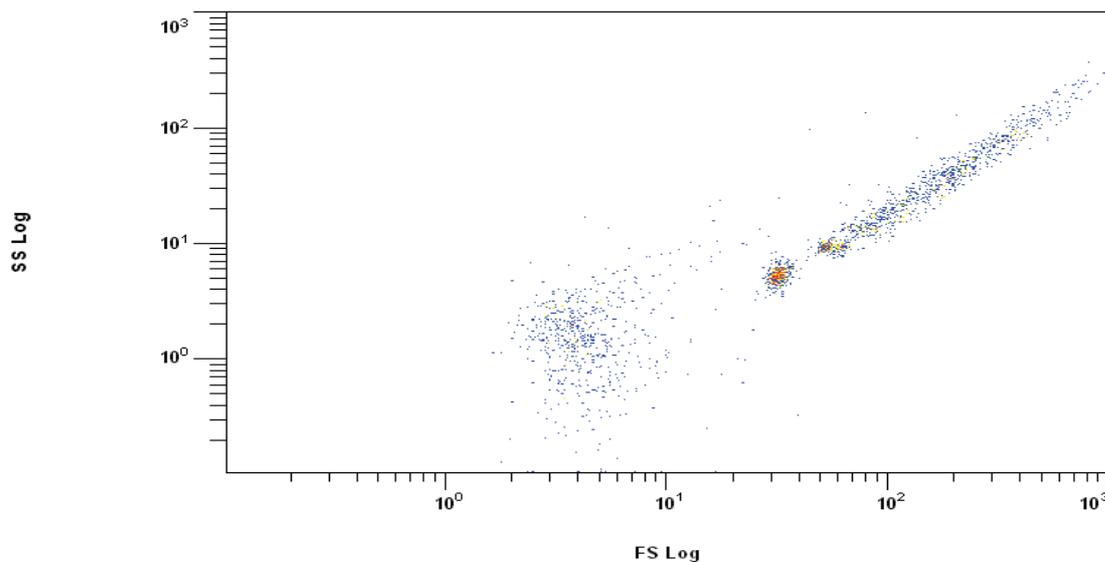


Figure 3.3 : μPSiO_2 diluées en TpA5 2 mM Ca^{2+} analysées par FCM. Les particules individualisées sont encore visibles et les agrégats donnent un aspect « en queue de comète ». En conséquence, j'ai choisi d'essayer de ne pas ajouter de Ca^{2+} dans le milieu afin de limiter l'agrégation des μPSiO_2 lors de l'interaction avec les SUV. D'après la littérature, la présence de Ca^{2+} n'est pas nécessaire à la formation de SLB sur silice pour des SUV contenant 20% de PS (Reviakine et al. 2000; Beneš et al. 2004).

En QCM-D sur une surface de silice plane, ces conditions permettent la formation d'une SLB dont le Δf est comparable à celui obtenu pour une SLB formée en présence de Ca^{2+} (Figure 3.4).

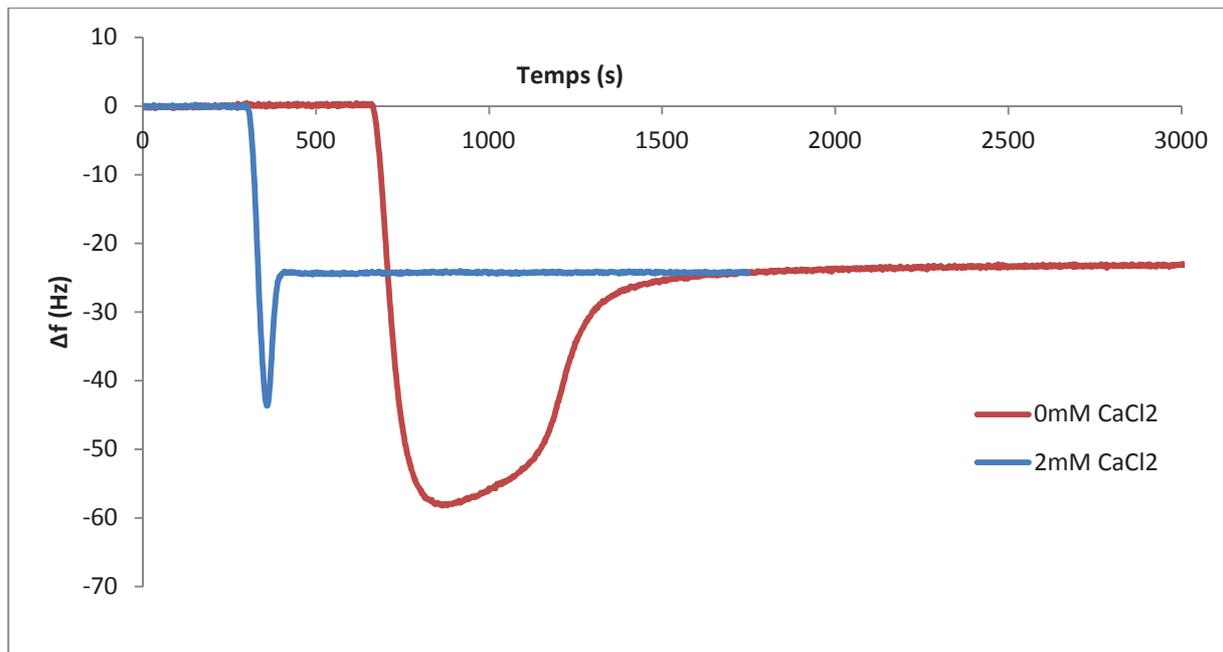


Figure 3.4 : Sensorgramme de QCM-D montrant l'adsorption et la formation de SLB à partir de SUV contenant 20% de PS, en présence (bleu) et en absence (rouge) de Ca^{2+} . Seules les variations de fréquence sont représentées. Les deux courbes présentent des cinétiques différentes mais ont le même profil biphasique et la même valeur finale de Δf , indiquant la formation d'une SLB.

Comme attendu, la présence de Ca^{2+} n'est pas requise pour former une SLB mais accélère le processus. Ce résultat est en accord avec d'autres études (Reviakine et al. 2000; Beneš et al. 2004).

La méthode de formation de SLB implique de mélanger des μPSiO_2 et des SUV. Pour que les μPSiO_2 soient recouvertes de manière uniforme, les SUV sont ajoutées en excès. Les μPSiO_2 doivent ensuite être séparées des SUV libres. Dans l'article décrivant la production des liposphères, Gilbert et collaborateurs séparent les μPSiO_2 des SUV par cinq étapes de centrifugation de trois minutes à 80 g. Pour déterminer les conditions optimales de purification, j'ai utilisé la diffusion de la lumière mesurée en spectrophotométrie et la FCM.

Les μPSiO_2 diffusent la lumière, j'ai utilisé la mesure d'absorbance à 600 nm pour mesurer la concentration en μPSiO_2 dans des solutions comme nous le faisons au laboratoire pour suivre la concentration en bactéries. Expérimentalement, le coefficient d'extinction (ϵ) des μPSiO_2 vaut $8 \times 10^{-9} \text{ ml} \cdot \mu\text{PSiO}_2^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et le seuil de détection en absorbance est de $2 \times 10^6 \mu\text{PSiO}_2/\text{ml}$. Cette méthode est peu sensible et peu précise, mais elle m'a permis de commencer à optimiser les conditions de purification des μPSiO_2 sur des solutions concentrées. J'ai testé différentes conditions de centrifugation en faisant varier le temps de centrifugation, la force appliquée et le type de rotor. A chaque étape de centrifugation, 80% du volume du tube est éliminé soit 800 μl pour 1 ml, le culot de μPSiO_2 étant ensuite complété avec du tampon. Un exemple de résultat expérimental est représenté en figure 3.5.

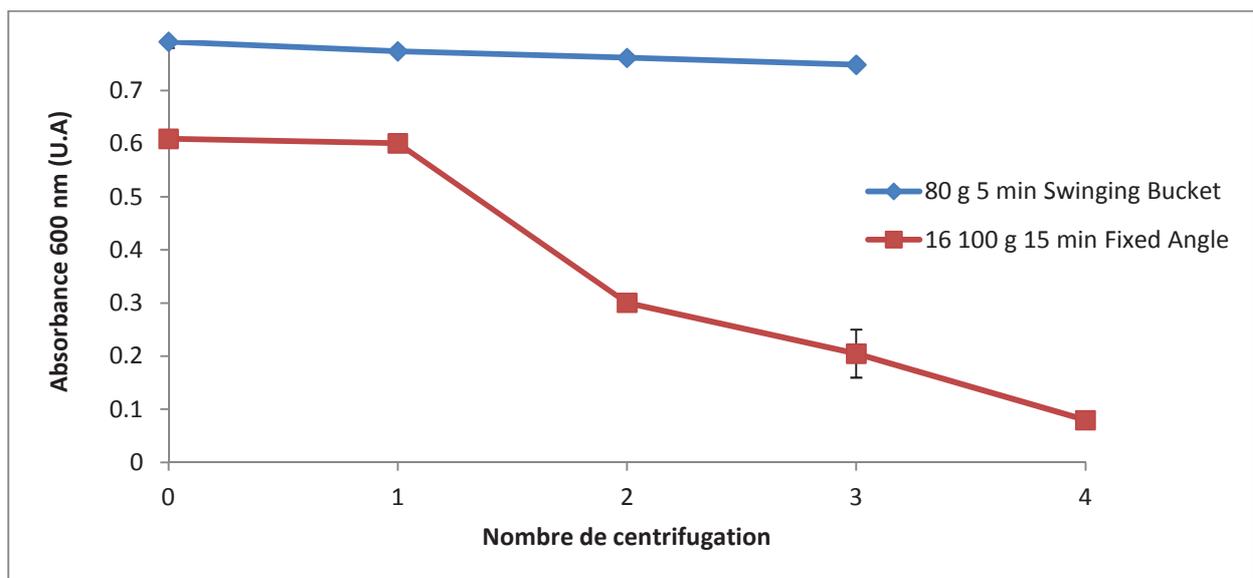


Figure 3.5 : Sédimentation des μPSiO_2 suivie par mesure d'absorbance des culots de μPSiO_2 resuspendus, à 600 nm.

Les résultats présentés dans la figure 3.5 montrent l'absorbance de culots de μPSiO_2 resuspendus après plusieurs centrifugations à haute vitesse (rouge) et basse vitesse (bleu).

Pour la centrifugation à haute vitesse dans un rotor à angle fixe, chaque étape entraîne une nette diminution de la concentration en μPSiO_2 et après quatre étapes de centrifugation, l'absorbance atteint environ 13% de sa valeur initiale. Dans le cas de la centrifugation à basse vitesse dans un rotor à angle variable (swinging bucket), l'absorbance diminue faiblement à chaque étape de centrifugation et après trois étapes de centrifugation, l'absorbance atteint encore 95% de sa valeur initiale. Ces résultats démontrent qu'il est possible de purifier des μPSiO_2 en TpA5 à condition d'utiliser un rotor à angle variable. D'après la mesure d'absorbance, le rendement de récupération des microsphères de silice est supérieur à 98% à chaque étape de centrifugation pour 1 ml d'échantillon centrifugé cinq minutes à 80 g.

Les surnageants de centrifugation analysés en FCM donnent des concentrations en μPSiO_2 de $(1.86 \pm 1.36) \times 10^6$ /ml pour une concentration initiale de 10^8 /ml, soit 98% de rendement de récupération à chaque étape de centrifugation. Ces résultats confirment que les μPSiO_2 sédimentent à 80 g et cinq minutes permettent de purifier l'essentiel des particules contenues dans 1 ml.

3.1.2 Caractérisation de la formation d'une SLB sur les microsphères de silice.

Comme l'expliquent Troutier et Ladavière (Troutier et Ladavière 2007), il n'est pas facile de caractériser la formation d'une SLB sur des μPSiO_2 de 1.5 μm de diamètre. Ces objets sont petits pour de la microscopie optique et gros pour de la microscopie électronique en transmission (MET).

Pour démontrer l'association de phospholipides sous forme de SLB, j'ai utilisé deux méthodes. La première méthode consiste à utiliser un lipide fluorescent intégré aux SUV comme rapporteur de l'association et la seconde à doser les phospholipides associés à une quantité connue de microparticules de silice.

3.1.2.1 Différents modes d'association des SUV sur les μPSiO_2

Selon le modèle proposé par Richter et collaborateurs (Richter, Mukhopadhyay, et Brisson 2003), le mélange de SUV chargées négativement et de μPSiO_2 également chargées négativement, peut conduire à trois états différents. Les μPSiO_2 peuvent ne lier aucune SUV; les SUV peuvent s'adsorber sans éclater et former une monocouche à la surface des μPSiO_2 (Single Vesicular Layer ou SVL) ou les SUV peuvent s'adsorber et éclater en formant une SLB (la figure 1.13A présente les trois modèles d'interaction).

Le choix d'un scénario parmi les trois est déterminé à la fois par la charge des SUV, la force ionique du milieu et la présence de cations divalents. Considérons uniquement les cas de SVL et SLB. Le mode d'association modifie-t-il la quantité de phospholipides liés par μPSiO_2 ?

3.1.2.1.1 Cas d'une SVL

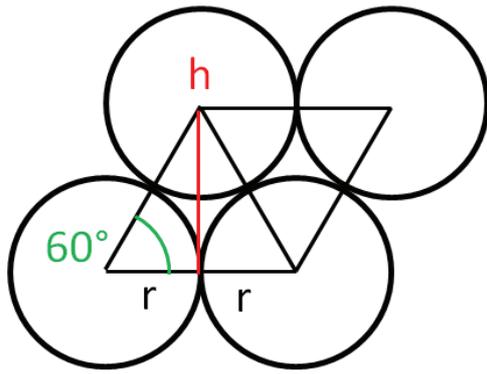
Considérons les SUV comme des sphères indéformables de 50 nm de diamètre disposées selon l'arrangement le plus compact possible à la surface de μPSiO_2 de 1.54 μm de diamètre. Le rayon d'une μPSiO_2 étant environ 30 fois supérieur au rayon d'une SUV, nous considérerons que les SUV se lient sur une surface plane égale à la surface d'une μPSiO_2 .

Soit N le nombre de SUV déposées sur une μPSiO_2 .

$$N = \frac{\text{Surface développée par une } \mu\text{PSiO}_2}{\text{Surface projetée d'une SUV}}$$

A densité maximale, les sphères forment un assemblage régulier appelé arrangement compact (close packing, visible sur la figure 3.1B).

Soit r le rayon d'une sphère.



Les centres des sphères forment des triangles équilatéraux de côté $2r$. Chaque sphère est partagée entre six triangles et chaque triangle contient trois portions de sphère soit une demi-sphère. La surface projetée d'une sphère est donc le double de la surface d'un triangle.

$$S_{\text{sphère}} = 2 \times \frac{2rh}{2} = 2rh$$

$$\text{Or } h = 2r \sin \frac{\pi}{3} = 2r \frac{\sqrt{3}}{2} = r\sqrt{3}$$

$$\text{Donc } S_{\text{sphère}} = 2rh = 2\sqrt{3} r^2$$

Dans cette conformation, la surface projetée par une sphère vaut $2\sqrt{3} r^2$.

$$N = \frac{4\pi R^2}{2\sqrt{3} r^2}$$

où r est le rayon d'une SUV et R le rayon d'une μPSiO_2 .

$N \approx 3441$ SUV de 50 nm de diamètre par μPSiO_2 de 1.54 μm de diamètre.

Une SUV est constituée d'une bicouche de phospholipides en phase fluide d'une épaisseur d'environ 5 nm. La surface occupée par un phospholipide en phase fluide vaut environ 0,6 nm^2 .

Soit m le nombre de phospholipides contenus dans une SUV.

$$m = \frac{\text{Surface externe d'une SUV} + \text{Surface interne d'une SUV}}{\text{Surface d'un phospholipide en phase fluide}}$$

$$m = \frac{4\pi r^2 + 4\pi(r - 5)^2}{0,6}$$

où r est le rayon d'une SUV exprimé en nanomètres.

$m \approx 21\,468$ phospholipides par SUV de 50 nm de diamètre.

Soit n le nombre de phospholipides déposés à la surface d'une μPSiO_2 dans le cas d'une SVL.

$n = N \times m \approx 7,4 \times 10^7$ phospholipides par μPSiO_2 de $1,54\mu\text{m}$ de diamètre.

3.1.2.1.2 Cas d'une SLB

Dans le cas d'une SLB uniforme déposée à la surface d'une μPSiO_2 , le calcul devient :

$$n = \frac{\text{Surface développée par une } \mu\text{PSiO}_2 \times 2}{\text{Surface développée par un phospholipide en phase fluide}}$$

$$n = \frac{4\pi R^2 \times 2}{0,6}$$

où R est le rayon d'une μPSiO_2 exprimé en nanomètres.

$n \approx 2,5 \times 10^7$ phospholipides par μPSiO_2 de $1,54\mu\text{m}$ de diamètre.

Dans le cas d'une SVL, la quantité de phospholipides retenus par μPSiO_2 est environ trois fois plus importante que la quantité retenue dans le cas d'une SLB. Le même calcul effectué pour des SUV d'un diamètre compris entre 20 et 100 nm donnent entre 2.2 et 3.2 fois plus de lipides dans le cas d'une SVL. Un dosage des phospholipides doit permettre de distinguer ces

deux scénarios. Deux approches ont été envisagées pour faire la distinction. Dans un premier temps j'ai utilisé la fluorescence pour mettre en évidence l'interaction entre la silice et les SUV et tenter de doser les lipides retenus sur les μPSiO_2 . Dans un second temps j'ai directement dosé les phosphates issus des phospholipides retenus sur les μPSiO_2 .

3.1.2.2 Formation de SLB suivie par fluorescence

La silice est un matériau non fluorescent dans le domaine U.V.-Visible. L'ajout d'un lipide fluorescent lors de la formation des SUV (Chapitre 2.8) permet de déterminer si des lipides restent associés aux μPSiO_2 après les étapes de purification et de déterminer la quantité de lipides retenus.

Gilbert a utilisé la microscopie de fluorescence pour caractériser la morphologie des liposphères et la spectrofluorimétrie pour quantifier les lipides liés (Gilbert et al. 1992). La fluorescence des liposphères étant homogène, Gilbert a conclu qu'elles étaient recouvertes d'une SLB homogène. J'ai également employé cette méthode pour caractériser les μPSiO_2 purifiées (Chapitre 2). Un exemple d'image de microscopie de fluorescence des μPSiO_2 mélangées avec des SUVs fluorescentes puis purifiées est montré en figure 3.6.

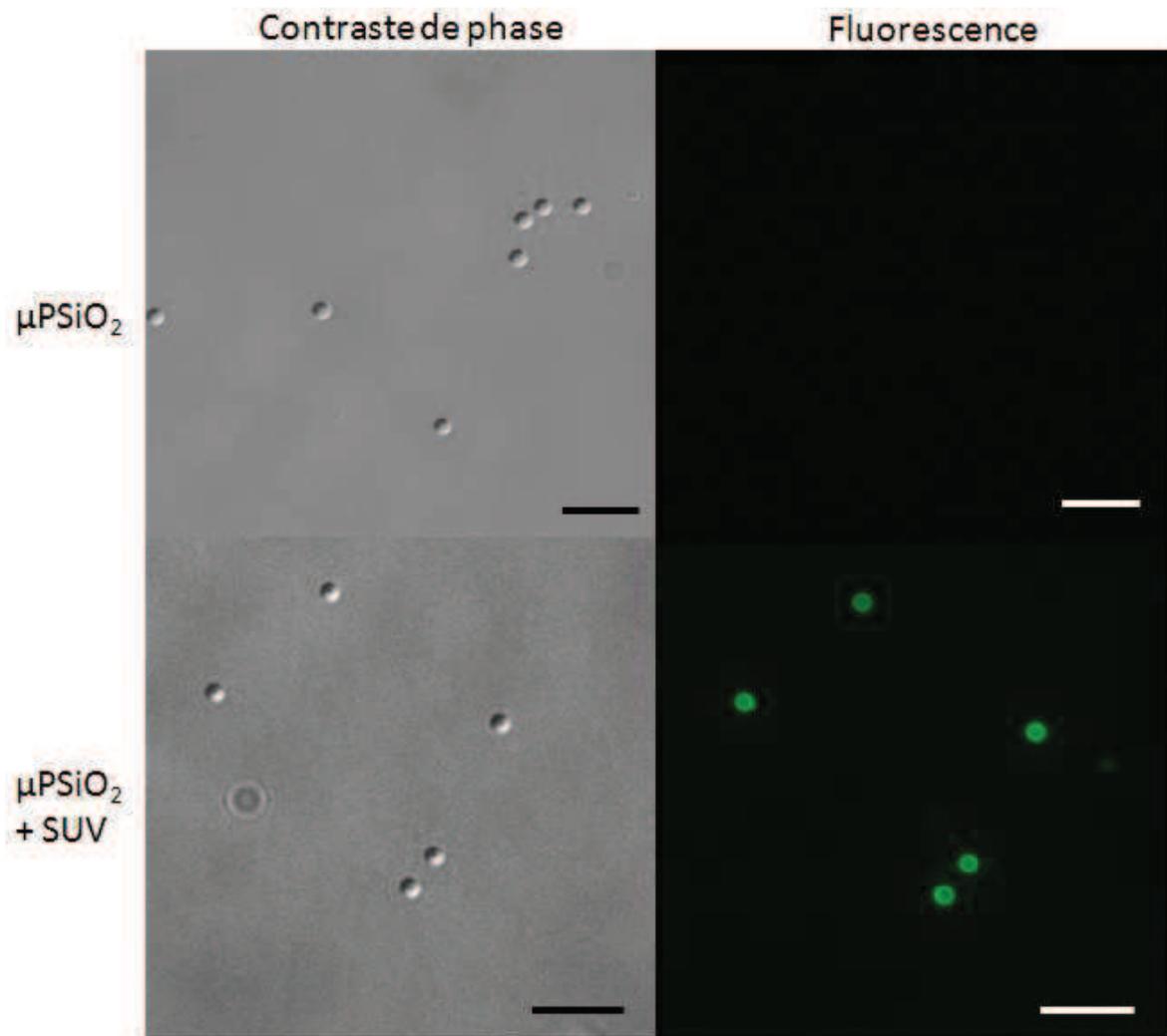


Figure 3.6 : Comparaison de μPSiO_2 et de μPSiO_2 purifiées après mélange avec des SUV fluorescents contenant 2% de NBD-DOPE (10^7 /ml), observées par microscopie de fluorescence (Images Anthony Bouter) Les images de gauche sont obtenues par contraste de phase et les images de droite en fluorescence. Les barres d'échelle représentent 10 μm .

Les μPSiO_2 mélangées avec des SUV fluorescents puis purifiées deviennent fluorescentes. La conclusion de cette expérience est que les SUVs interagissent de façon stable avec les μPSiO_2 . La fluorescence paraît être répartie de manière régulière, ce qui indique un mode d'association régulier mais, ne permet pas de distinguer une SLB d'une SVL.

J'ai également utilisé la FCM pour quantifier l'association de SUV fluorescents aux μPSiO_2 . Comparativement aux techniques de microscopie, la FCM permet de quantifier la valeur de

fluorescence associée à chaque μPSiO_2 . La figure 3.7 montre un exemple de l'analyse de μPSiO_2 seules (rouge) ou après réaction avec des SUV fluorescentes (bleu). Les microsphères mises en contact avec des SUV fluorescentes présentent une fluorescence homogène. Il y a donc bien une interaction stable entre les SUV et les μPSiO_2 .

Dans une expérience consistant à mesurer la fluorescence de huit échantillons indépendants de μPSiO_2 mélangées avec des SUV contenant 1% de fluorophore Di et purifiées, la moyenne de fluorescence du Di valait 241.5 ± 5.7 unités arbitraires et le coefficient de variation à mi hauteur des histogrammes valait $(0.55 \pm 0.03)\%$. Par comparaison, les particules de polymère servant à la calibration en FCM et dont la fluorescence est homogène ont un coefficient de variation à mi hauteur inférieur à 2%. La fluorescence associée aux μPSiO_2 est donc homogène, ce qui signifie que les SUV se lient aux μPSiO_2 selon un seul mode de liaison soit SVL soit SLB.

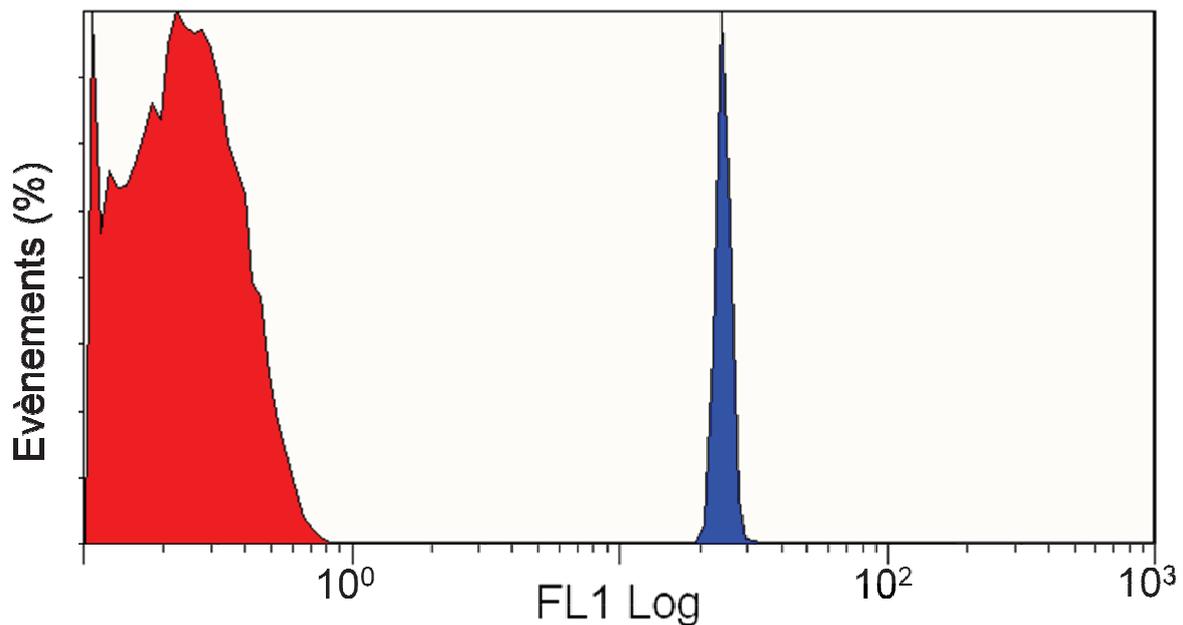


Figure 3.7 : Analyse de la fluorescence de microsphères de silice par FCM.

L'histogramme rouge représente la fluorescence de microsphères de silice contrôle (moyenne de fluorescence = $0.163 = \bar{F}$). L'histogramme bleu représente la fluorescence de microsphères de silice ayant été mélangées avec des SUV contenant 2% de NBD, puis purifiées ($\bar{F} = 14.7$).

La FCM donne une mesure relative de la fluorescence des objets. La FCM peut également déterminer la quantité de fluorophores associés à un objet à l'aide de particules de calibration contenant un nombre de fluorophores connus. Il n'est cependant pas possible de déterminer directement la quantité de lipides associés aux microsphères de silice à partir de la valeur de fluorescence mesurée en FCM.

Pour déterminer la quantité de lipides associés aux microsphères de silice par fluorescence, j'ai employé la spectrofluorimétrie. A l'inverse de la FCM qui mesure individuellement la fluorescence associée aux μPSiO_2 , la spectrofluorimétrie est une technique de mesure macroscopique qui mesure l'intensité de fluorescence totale d'un échantillon sans distinguer les SUV liées des SUV libres. La spectrofluorimétrie est également une méthode relative mais elle peut être calibrée à l'aide des SUVs de concentration connue.

Pour déterminer le mode d'association des SUV aux μPSiO_2 , j'ai mélangé une quantité fixe de μPSiO_2 avec des quantités variables de SUV fluorescentes, exprimées en facteur d'excès. Le facteur d'excès correspond au rapport de la quantité de SUV totale à la quantité de SUV théoriquement nécessaire pour former une SLB. J'ai ensuite mesuré la fluorescence des échantillons au cours de la purification (Figure 3.8). La fluorescence des échantillons décroît au cours de la purification et atteint une valeur plateau. Pour différentes quantités initiales de SUV, le plateau de fluorescence donne la même valeur de fluorescence aux incertitudes près et qui correspond uniquement à la fluorescence des SUV liées aux μPSiO_2 . L'intensité de fluorescence est convertie en concentration en lipides à partir d'une gamme étalon de SUV. La concentration en lipides liés aux μPSiO_2 est estimée à $2.65 \pm 1.05 \mu\text{g/ml}$ pour $10^8 \mu\text{PSiO}_2/\text{ml}$ soit $(2.2 \pm 0.8) \times 10^7$ phospholipides par μPSiO_2 . Cette valeur est plus proche de la valeur de 2.5×10^7 phospholipides/ml pour une SLB que de la valeur limite de 5.5×10^7 phospholipides par μPSiO_2 correspondant à une SVL.

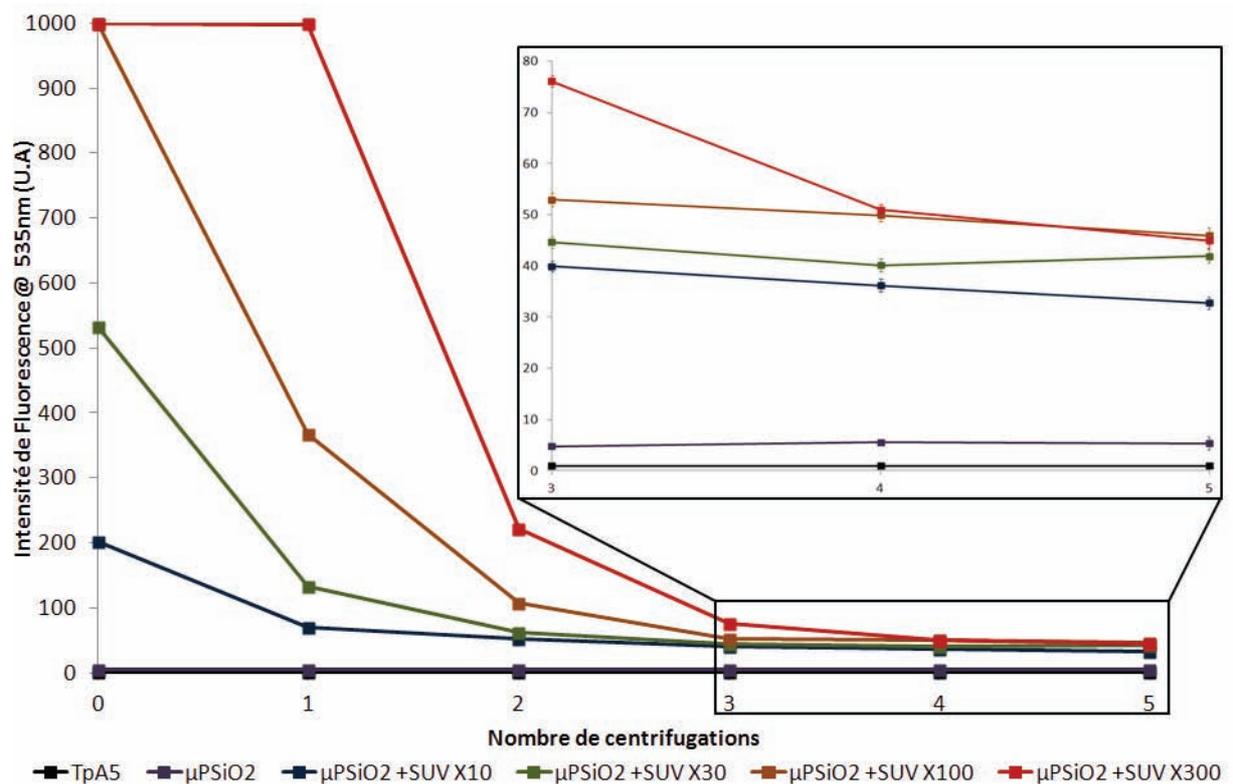


Figure 3.8 : Quantification des lipides retenus sur les μPSiO_2 par spectrofluorimétrie.

L'excès de lipides est compris entre 10 et 300 \times . Chaque étape de centrifugation correspond à une dilution d'un facteur cinq des SUV non liées. A la cinquième étape de centrifugation, toutes les μPSiO_2 purifiées ont la même fluorescence, qui est supérieure à la fluorescence des μPSiO_2 seules.

Le dosage des phospholipides par spectrofluorimétrie donne un résultat en accord avec le scénario d'une SLB. Toutefois la mesure de l'intensité de fluorescence est peu précise, l'écart type des mesures valant plus du tiers de la moyenne. J'ai donc utilisé une méthode indépendante de dosage des phospholipides qui consiste à doser les phosphates par la méthode de Rouser et collaborateurs (Rouser, Fleischer, et Yamamoto 1970).

3.1.2.3 Dosage des phospholipides par dosage du phosphate

Comme expliqué au chapitre 2.8, nous utilisons couramment le dosage des phosphates pour quantifier les phospholipides. C'est une méthode très reproductible permettant de mesurer des microgrammes de phospholipides avec une incertitude de l'ordre du microgramme. La quantification des phospholipides utilise la spectrophotométrie, or les μPSiO_2 diffusent la lumière et interfèrent avec la mesure, donc les μPSiO_2 ont été éliminées par centrifugation avant la mesure en spectrophotométrie. Pour vérifier si la silice réagit comme le phosphate et interfère avec le dosage, le résultat de dosage des μPSiO_2 mélangées à des SUV et purifiées est comparé au signal des μPSiO_2 seules.

Des échantillons de μPSiO_2 contenant 10^9 μPSiO_2 ont été mélangés avec 300 μg de SUV contenant 20% PS dans 1 ml final de tampon A5. Les μPSiO_2 sont ensuite purifiées par centrifugation, en fin de purification les SUV non liées sont diluées 3125 fois et représentent une quantité de phospholipides négligeable devant la quantité de phospholipides retenus par les μPSiO_2 . Les échantillons sont dosés selon la procédure détaillée au chapitre 2.7 en ajoutant une étape de séparation des μPSiO_2 avant la mesure d'absorbance. Les résultats du dosage sont comparés aux résultats obtenus avec des μPSiO_2 seules (Figure 3.9).

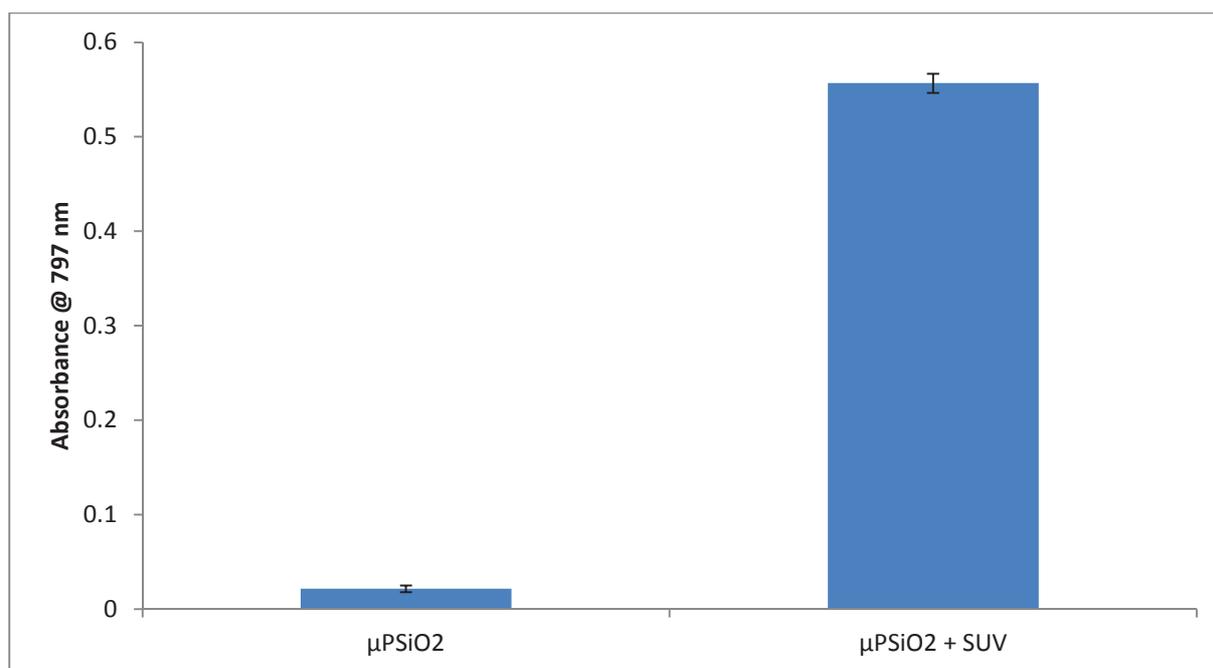


Figure 3.9 : Dosage colorimétrique des phospholipides retenus sur 10^9 μPSiO_2 . Les mesures représentent l'absorbance d'échantillons de μPSiO_2 seules (μPSiO_2) et de μPSiO_2 mélangées avec des SUV puis purifiées ($\mu\text{PSiO}_2 + \text{SUV}$).

Les résultats présentés en figure 3.9 montrent que l'absorbance des échantillons de μPSiO_2 mélangées à des SUV puis purifiées est significativement supérieure à celle des μPSiO_2 seules. Les mesures d'absorbance sont converties en quantité de phosphate grâce à la gamme étalon présentée au chapitre 2.7. La quantité de phospholipides retenus par 10^9 microsphères de silice est mesurée à 48 ± 2 nmol, soit une quantité de phospholipides par μPSiO_2 de l'ordre de $(2.89 \pm 0.12) \times 10^7$ phospholipides.

La valeur de 2.89×10^7 phospholipides par μPSiO_2 est légèrement supérieure à la valeur 2.5×10^7 phospholipides par μPSiO_2 correspondant à une SLB et largement inférieure à la valeur 5.5×10^7 phospholipides par μPSiO_2 , correspondant à une SVL. Le résultat est donc en faveur d'une SLB. La différence avec la quantité théorique pouvant s'expliquer par l'incertitude sur la surface développée par les microsphères de silice ou les approximations du calcul.

En conclusion, les deux techniques indépendantes que sont la spectrofluorimétrie et le dosage des phospholipides donnent des résultats en accord avec l'hypothèse d'une SLB.

Nous considérerons donc que les μPSiO_2 sont recouvertes d'une SLB homogène, contenant 20% de PS pour permettre la liaison de l'AnxA5. Les $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ peuvent être rendues fluorescentes par l'ajout de lipides fluorescents. En FCM, la présence d'un lipide fluorescent indique la présence de la SLB et l'évolution de la fluorescence au cours du temps est un indicateur de sa qualité. Le signal de fluorescence des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ permet également leur détection dans un milieu complexe tel que le plasma. Les $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ se préparent facilement et le temps de préparation est inférieur à deux heures. Les $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ peuvent être conservées à 4 °C pendant plus de six mois dans un milieu contenant 0,1% de BSA, la BSA prévenant la formation d'agrégats. La figure 3.10 présente un exemple d'analyse de $\mu\text{PSiO}_2@SLB-2\%NBD$ effectuée sept mois après leur production.

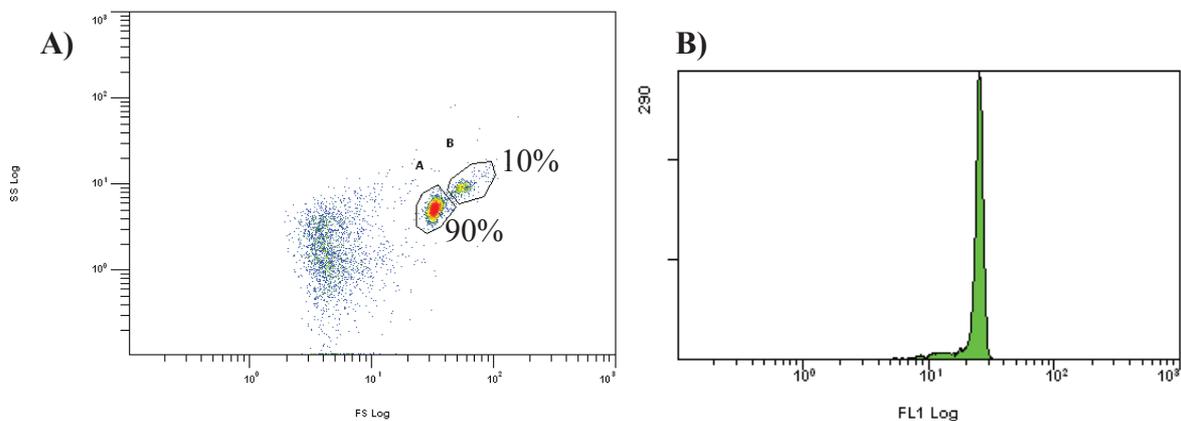


Figure 3.10 : Analyse de $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ âgées de sept mois, en FCM. A) Density plot représentant la diffusion de la lumière des objets. B) Histogramme de fluorescence du NBD. Après sept mois les μPSiO_2 sont à 90% sous forme individualisées et l'histogramme de fluorescence présente un coefficient de variation à mi hauteur du pic de 1,01% indiquant une fluorescence homogène.

3.2 Liaison de l'AnxA5 à des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ mesurée par FCM

Un des objectifs de mon travail a été d'étudier la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ décrites au chapitre 3.1.

D'après les données de structure et de liaison, la surface occupée par une AnxA5 est comprise entre 25.5 et 30.7 nm² (Huber, Romisch, et Paques 1990; Oling, Bergsma-Schutter, et Brisson 2001; Andree et al. 1990). Considérons en première approximation qu'une AnxA5 occupe 30 nm². La surface d'une particule étant connue, il est possible d'estimer le nombre maximum d'AnxA5 liées sur une $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

Soit n le nombre de molécules d'AnxA5 liées au maximum sur une $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

$$n = \frac{\text{Surface d'une microsphère de silice}}{\text{Surface occupée par une AnxA5}}$$

$$n = \frac{4\pi R^2}{30}$$

Avec R le rayon des μPSiO_2 exprimé en nm.

$$n = 248\,353.4 \approx 2.5 \times 10^5 \text{ AnxA5 par } \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}.$$

Par conséquent, en tenant compte des valeurs de surface de 25.5 à 30.7 nm² spécifiées dans la littérature pour une AnxA5 :

$$242\,691 < n < 292\,181 \text{ AnxA5 par } \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}.$$

3.2.1 Mise en évidence de l'interaction entre l'AnxA5 et les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ par SDS-PAGE

Avant de présenter les résultats de FCM, je vais présenter ceux obtenus par une méthode classique de biochimie, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le SDS-PAGE est une technique conventionnelle d'étude des protéines dans laquelle les protéines sont séparées selon leur masse. Les protéines sont colorées à l'aide de bleu de coomassie et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines entre environ 0.25 et 2 μg de protéines. Le principe de l'expérience est de préparer des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ couvertes d'AnxA5, l'AnxA5 non liée étant séparée par centrifugation. Les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ sont analysées par SDS-PAGE, le SDS présent dans le gel dénature l'AnxA5 liée aux $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ qui se dissocie puis migre dans le gel. La quantité d'AnxA5 retenue par les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ est ensuite estimée à partir de l'intensité de la coloration en utilisant une gamme d'AnxA5 comme référence. La figure 3.10 montre le résultat de la migration d'une gamme d'AnxA5 (A) et d'une gamme d'AnxA5 incubée avec $7 \times 10^7 \mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ (C).

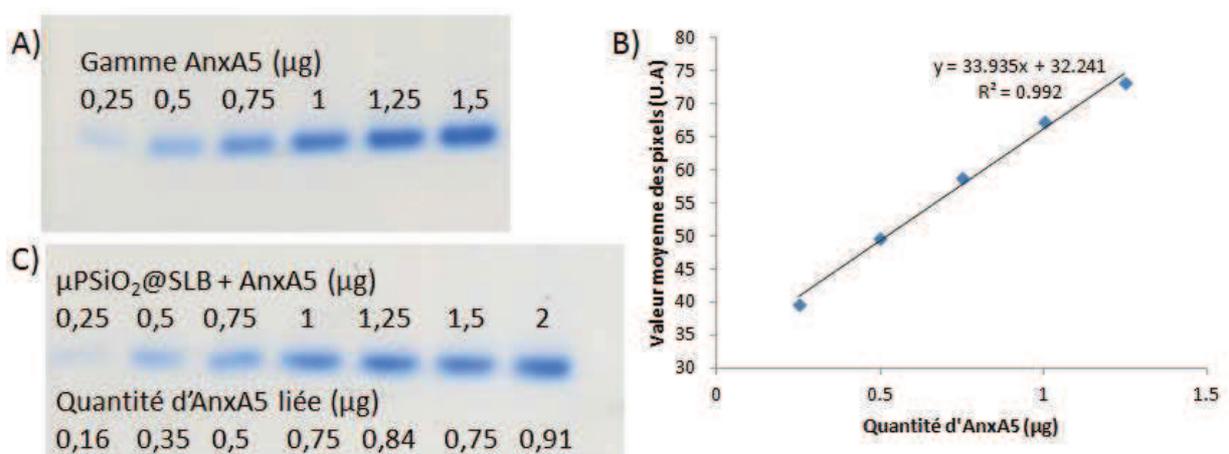


Figure 3.10 : SDS-PAGE présentant la liaison de l'AnxA5 à $7 \times 10^7 \mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$. A) Gamme d'AnxA5. B) Gamme d'AnxA5 analysée avec ImageJ. C) AnxA5 liée aux $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$.

La quantité d'AnxA5 retenue augmente jusqu'à atteindre 0,91 μg pour 7×10^7 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ soit environ 2.2×10^5 molécules d'AnxA5 par $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Ce résultat est proche de la valeur 2.5×10^5 molécules d'AnxA5 par $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ correspondant au maximum calculé précédemment. Le SDS-PAGE n'est cependant pas assez précis pour déterminer la quantité exacte de protéines liées.

Ces résultats qualitatifs prouvent que les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont capables de lier l'AnxA5.

3.2.2 Mise en évidence de l'interaction entre l'AnxA5 et les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ par FCM.

La liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est aisément démontrable par FCM. Le résultat d'une expérience type est présenté en figure 3.11. En premier lieu, de l'AnxA5-Fluorescente et des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont mélangées dans un tampon ne contenant pas de Ca^{2+} . Les concentrations sont ajustées afin que le signal de la protéine libre induise peu de signal de coïncidence, par exemple 100 ng/ml AnxA5-Fluorescente pour 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$. Le mélange est analysé en FCM, puis du Ca^{2+} est ajouté dans le milieu. J'ai principalement travaillé avec une concentration physiologique en Ca^{2+} , soit 2 mM Ca^{2+} . Après une seconde mesure, un chélateur du Ca^{2+} est ajouté au mélange. J'ai utilisé 5 mM d'EGTA pour 2 mM de Ca^{2+} soit un excès d'EGTA car la stœchiométrie de l'interaction est un EGTA pour un ion Ca^{2+} .

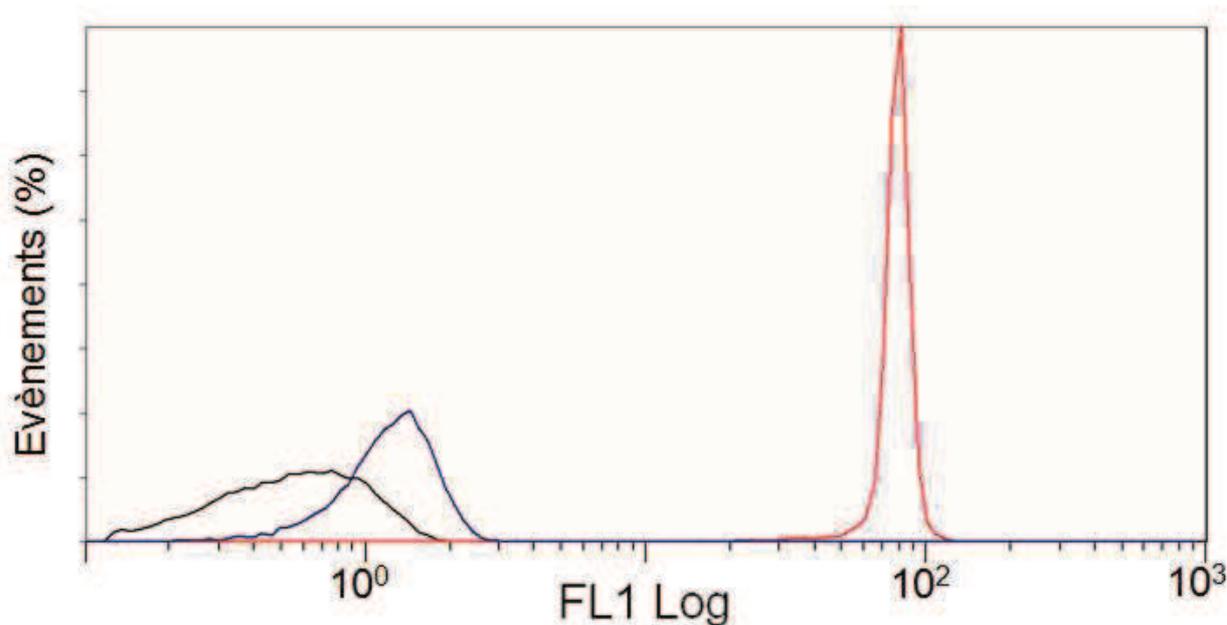


Figure 3.11 : Histogramme de fluorescence d'un mélange $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6$ /ml + AnxA5_B-Fluorescéine 100 ng/ml analysé par FCM. La courbe noire représente le mélange en TpA5 ($\bar{F} = 0.605$). La courbe rouge représente le mélange après ajout de 2 mM CaCl_2 ($\bar{F} = 75.9$) et la courbe bleue, le mélange après ajout de 5 mM EGTA ($\bar{F} = 1.23$).

Les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ deviennent fluorescentes après ajout de Ca^{2+} et perdent leur fluorescence après ajout d'EGTA. Ce comportement est typique de la liaison Ca^{2+} dépendante de l'AnxA5 aux SLB contenant de la PS. La liaison de l'AnxA5 aux SLB est gouvernée par la concentration en Ca^{2+} . La liaison est quasiment réversible car la moyenne de fluorescence après ajout d'EGTA est très proche de la valeur avant ajout de Ca^{2+} . La légère différence pouvant être expliquée par le fait que les complexes $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ modifient les propriétés de fluorescence de la fluorescéine, empêchant le retour à la valeur initiale de fluorescence (Chapitre 3.4).

Pour confirmer que la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est bien dépendante de la PS, la liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à des μPSiO_2 dont la SLB est constituée uniquement de DOPC a été mesurée. Les résultats de l'expérience sont présentés en figure 3.12.

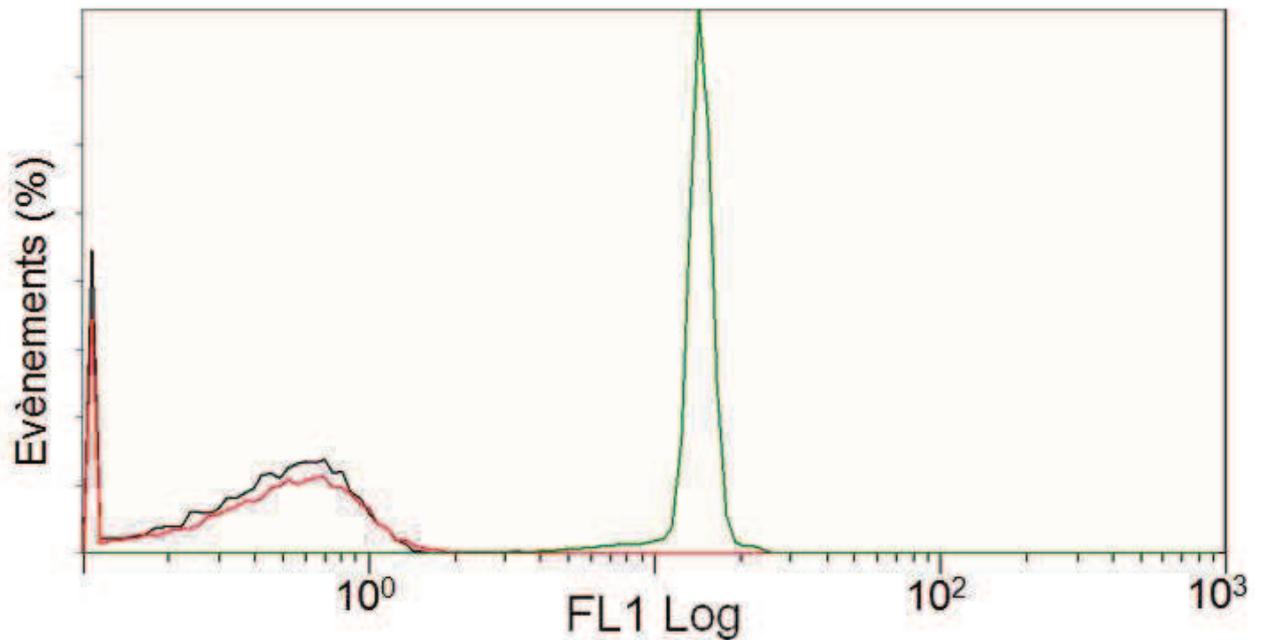


Figure 3.12 : Histogramme de fluorescence d'un mélange $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB (PC) } 10^6/\text{ml} + \text{AnxA5}_B\text{-Fluorescéine } 100 \text{ ng/ml}$ analysé par FCM. La courbe noire représente le mélange en TpA5 ($\bar{F} = 0.501$). La courbe rouge représente le mélange après ajout de 2 mM CaCl_2 ($\bar{F} = 0.472$) et la courbe verte, le mélange après ajout de 100 mM CaCl_2 ($\bar{F} = 13.9$).

Dans le cas d'une SLB uniquement constituée de DOPC, l'AnxA5 ne se lie pas à 2 mM Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} à 100 mM induit une augmentation de la moyenne de fluorescence qui est interprétée comme une liaison partielle de la protéine aux $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB (PC)}$. Ce résultat est en accord avec des études précédentes (Andree et al. 1990; Bandorowicz-Pikula 2003).

Dans la littérature, la liaison de l'AnxA5 aux membranes contenant de la PS est décrite comme nécessitant une concentration en Ca^{2+} comprise entre 1 et 5 mM selon les auteurs (Andree et al. 1990; Meers et Mealy 1993; Tait, Gibson, et Smith 2004; Richter et al. 2005). J'ai donc testé l'influence de la concentration en Ca^{2+} sur la liaison de l'AnxA5 à des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ de différentes compositions lipidiques (Figure 3.13).

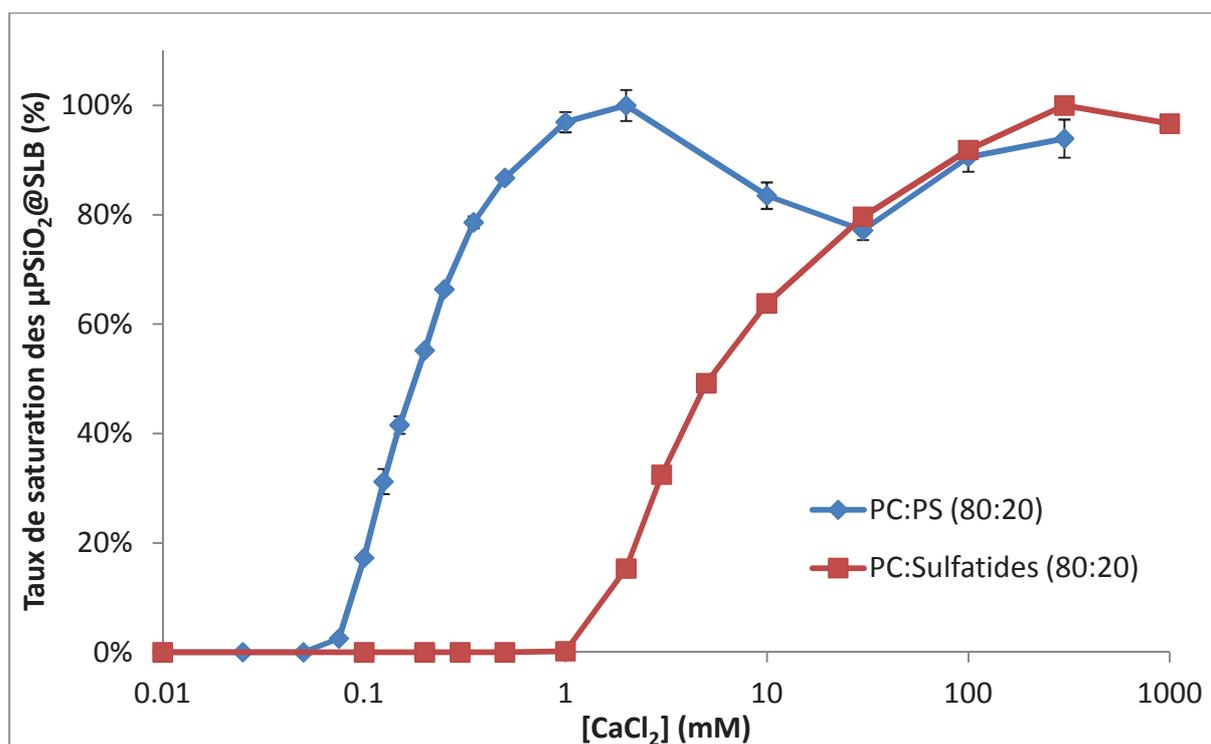


Figure 3.13 : Influence de la concentration en CaCl₂ sur le marquage à l'AnxA5_B-Cy5 10 ng/ml de μPSiO₂@SLB 20%PS (bleu) et 20% sulfatides (rouge) 10⁶ /ml.

Les données présentées en figure 3.13 montrent la liaison d'AnxA5-Fluorescente aux μPSiO₂@SLB pour différentes concentrations en Ca²⁺ et pour deux compositions lipidiques différentes. Il apparait clairement que la liaison de l'AnxA5 est influencée par la composition lipidique car la concentration en Ca²⁺ permettant de lier la moitié des AnxA5 passe de 175 μM Ca²⁺ pour la SLB contenant 20% de PS à plus de 5 mM Ca²⁺ pour la SLB contenant 20% de sulfatides. Les sulfatides sont des lipides négativement chargés dérivés de la sphingosine, la différence de comportement avec la PS ne peut donc pas s'expliquer par la charge des lipides. La liaison de l'AnxA5 sur des SLB contenant des sulfatides n'a pas été étudiée en détail, dans le reste de ce manuscrit il sera uniquement question de SLB comportant 20% de PS. Dans le cas d'une SLB contenant 20% de PS, l'AnxA5 commence à se lier aux μPSiO₂@SLB à partir de 75 μM Ca²⁺, atteint la moitié du maximum de liaison pour 175 μM Ca²⁺ et le maximum entre 1 et 2 mM Ca²⁺. La fluorescence de l'AnxA5 diminue ensuite

jusqu'à 30 mM Ca^{2+} et ré-augmente entre 100 et 300 mM Ca^{2+} . La perte de fluorescence pour 10 et 30 mM Ca^{2+} est un phénomène reproductible que nous ne pouvons pas expliquer à l'heure actuelle. Pour maximiser le signal de fluorescence et utiliser des concentrations correspondant aux valeurs physiologiques, j'ai choisi de travailler uniquement à 2 mM Ca^{2+} . Cette expérience démontre que la liaison d'AnxA5 suivie par FCM nécessite de maîtriser parfaitement la concentration en Ca^{2+} dans le milieu.

3.2.3 Comparaison de la liaison de l'AnxA5 et de l'AnxA5-Fluorescéine à des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$

La FCM, qui sera la principale technique d'étude dans la suite de ce manuscrit, utilise une AnxA5 rendue fluorescente. Il convient d'étudier si le greffage d'un fluorophore affecte les propriétés de liaison de l'AnxA5. Pour étudier cette question, j'ai mélangé en proportions variables de l'AnxA5 et de l'AnxA5_B-Fluorescéine. Les mélanges ont ensuite été incubés avec des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. La fluorescence des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ a été mesurée puis reportée en fonction du pourcentage de protéines fluorescentes (Figure 3.14).

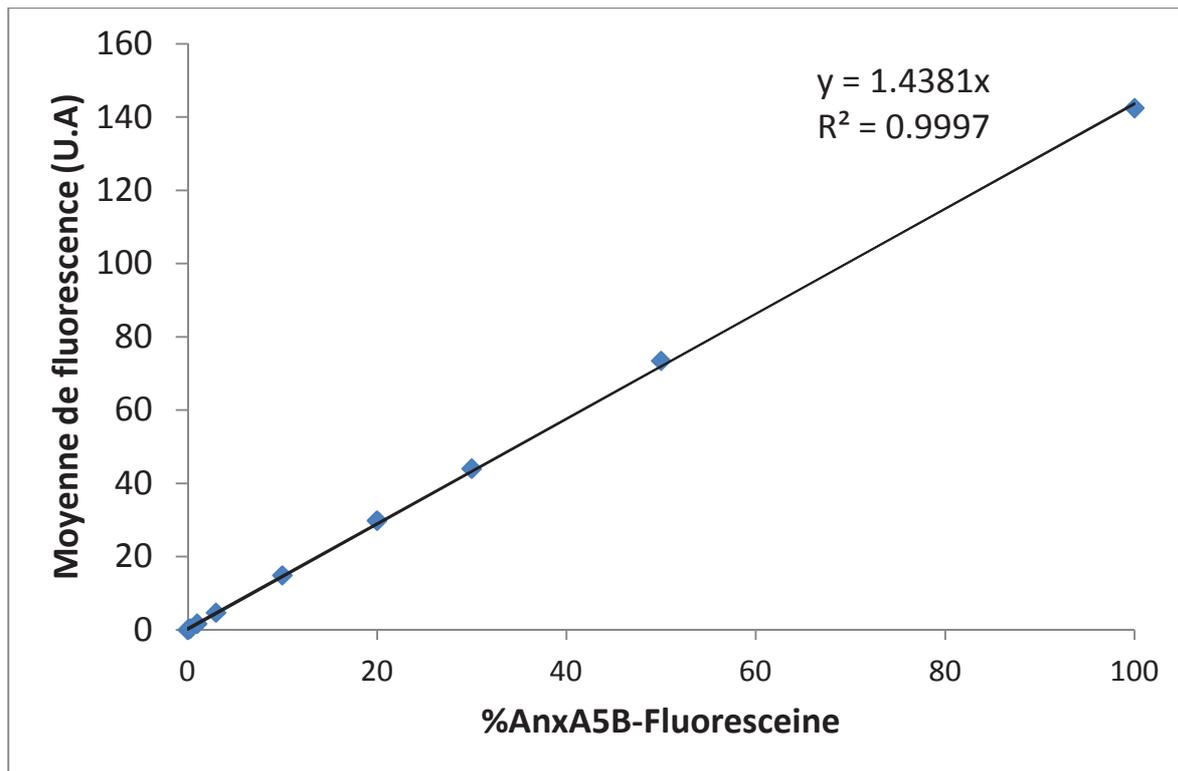


Figure 3.14 : Fluorescence moyenne mesurée par FCM de 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@$ SLB/ml mélangées à 100 ng/ml AnxA5 comportant un taux variable d'AnxA5_B-Fluorescéine.

La fluorescence moyenne des $\mu\text{PSiO}_2@$ SLB est strictement proportionnelle au pourcentage d'AnxA5_B-F contenue dans le mélange. Ce résultat indique que les molécules d'AnxA5 et d'AnxA5_B-Fluorescéine ont le même comportement de liaison et que les propriétés de liaison de l'AnxA5_B-Fluorescéine aux SLB ne sont pas affectées par le couplage du fluorophore. D'autre part, d'après les données de la figure 3.10, la fluorescence de la fluorescéine n'est pas diminuée par extinction de fluorescence même en utilisant 100% de protéines fluorescentes. En conclusion, les $\mu\text{PSiO}_2@$ SLB permettent d'étudier la liaison d'AnxA5 par FCM en utilisant des AnxA5 rendues fluorescentes et dont les propriétés de liaison sont comparables à celles de la protéine native. J'ai donc utilisé cette approche pour étudier les propriétés de liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@$ SLB par FCM.

Dans un premier temps j'ai étudié les propriétés de liaison de la protéine à l'équilibre, puis dans un second temps, j'ai étudié les propriétés de liaison de l'AnxA5 en cinétique.

3.2.4 Liaison à l'équilibre.

Les expériences de liaison à l'équilibre ont consisté à mélanger des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et une AnxA5 fluorescente, puis à mesurer le signal de fluorescence associé aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Le système est à l'équilibre quand le signal de fluorescence n'évolue plus, soit environ une heure pour $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$. Si le concept de l'expérience est simple, beaucoup de paramètres sont modifiables tels que les concentrations en AnxA5 ou en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$, la composition lipidique des SLB ou encore la nature des fluorophores qui peuvent être couplés à l'AnxA5.

Dans la majorité des expériences de liaison à l'équilibre j'ai utilisé des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ comportant 20% de PS et soit de l'AnxA5_B-Fluorescéine soit de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine.

Un résultat prototypique de ces expériences est présenté en figure 3.15.

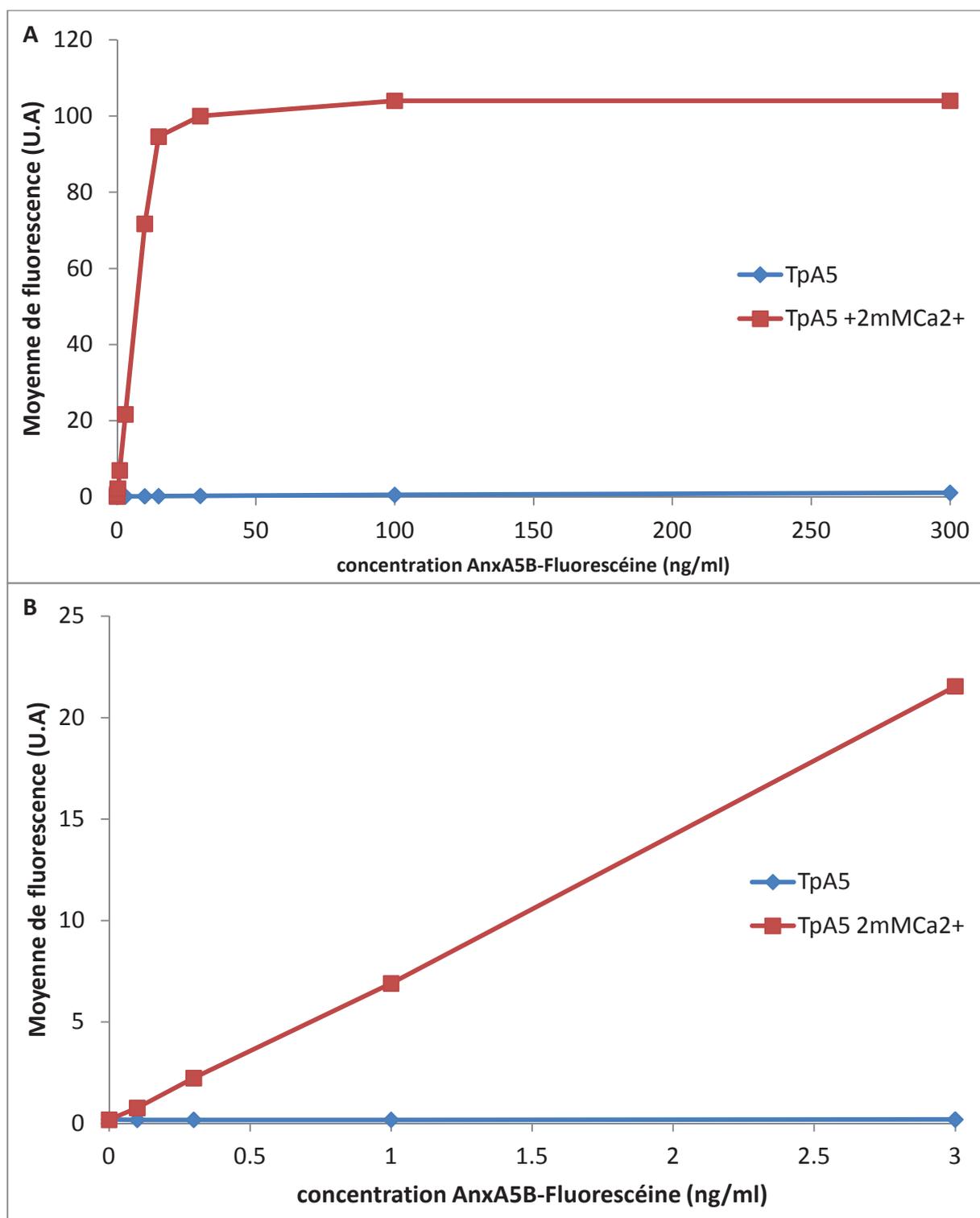


Figure 3.15 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml à l'équilibre, mesurée par FCM. La figure A représente la gamme complète de concentrations testées et la figure B est un agrandissement de la zone des faibles concentrations. Courbe bleue, mesures avant ajout de Ca²⁺ et courbe rouge, mesures après ajout de Ca²⁺ et à l'équilibre.

Les données de liaison à l'équilibre présentées en figure 3.15 montrent que la fluorescence augmente jusqu'à 30 ng/ml puis se stabilise. D'une manière tout à fait remarquable la fluorescence est strictement proportionnelle à la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine jusqu'à 10 ng/ml. La liaison est donc saturable et présente un aspect biphasique : une première phase de croissance linéaire et une seconde phase de saturation avec apparition d'un plateau. L'intersection des droites correspondant aux phases de plateau et de proportionnalité donne une quantité d'AnxA5 liée maximale de 14.51 ng. Pour une concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ de $10^6/\text{ml}$, l'estimation faite au chapitre 3.2 donne une liaison maximale de 15 ng d'AnxA5 (soit 417 pmol). Ce résultat signifie que la liaison est quantitative avant la saturation ou au minimum jusqu'à 10 ng/ml soit environ 66% de saturation. La méthode est très sensible car, dans cette expérience, la plus faible concentration testée soit 0.1 ng/ml ou 2.7 pM donne une moyenne de fluorescence significativement différente du 0 avec une intensité de fluorescence de 0.766 ± 0.004 contre 0.182 ± 0.002 pour le point à 0 ng/ml. L'extrapolation de ces résultats vers les faibles concentrations en AnxA5 donne un seuil de détection de 0,02 ng/ml. Les moyennes de fluorescence représentées en figure 3.15 résultent de la mesure de $8637 \pm 4937 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ par minute. Le nombre d'évènements mesuré par minute est sujet à un coefficient de variation⁶ d'environ 57% imputable à l'instabilité du flux d'échantillon pendant les premières minutes d'analyse en FCM (présenté en figure 2.5). Les moyennes de fluorescence sont beaucoup plus reproductibles avec un coefficient de variation moyen de 10%.

L'expérience a été reproduite en utilisant des solutions de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et d'AnxA5_B-F différentes, en triplant chaque point pour tester la reproductibilité de la mesure. Les résultats sont présentés en figure 3.16.

⁶ Le coefficient de variation (exprimé en pourcent) est le rapport de l'écart type à la moyenne d'une mesure.

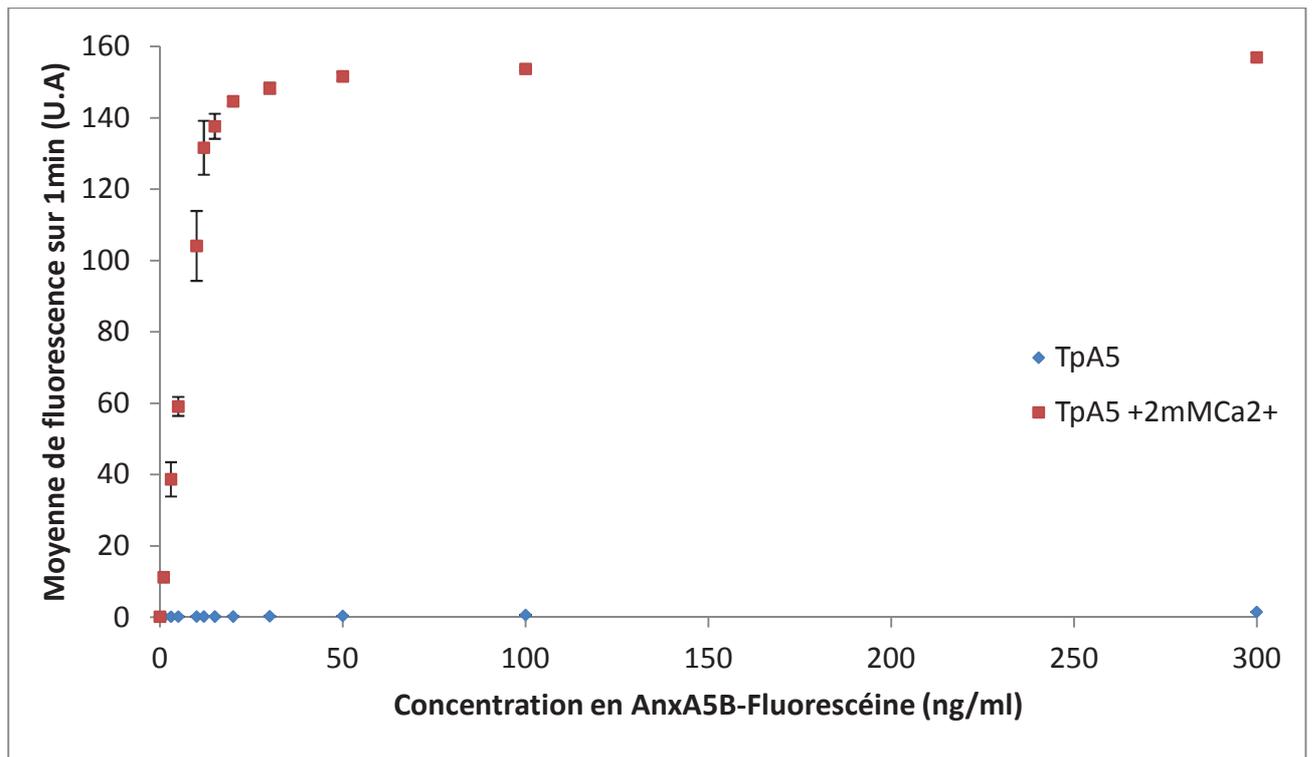


Figure 3.16 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine sur $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB } 10^6$ /ml à l'équilibre mesurée par FCM. Chaque point représente la moyenne de fluorescence de trois échantillons préparés et mesurés de manière indépendante. Les barres d'erreur représentent l'écart type des trois mesures.

Dans cette seconde expérience, la valeur du plateau de fluorescence est beaucoup plus élevée que dans la première expérience (environ 156 unités de fluorescence contre 104). Cette différence est due à l'utilisation de lots différents d'AnxA5_B fluorescentes. L'AnxA5_B possède une seule cystéine et donc un seul site de couplage pour un fluorophore-Maléimide, la différence de marquage observée entre deux lots d'AnxA5_B-Fluorescente peut provenir d'une différence dans le taux de couplage du fluorophore ou d'une altération des propriétés du fluorophore avant le couplage. Pour pouvoir comparer différentes expériences entre elles, j'ai choisi de normaliser les résultats en comparant les taux de saturation des particules dans les différentes conditions.

Je définis le taux de saturation d'une $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ comme :

$$\text{Taux de saturation} = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0}$$

où F est la fluorescence d'un échantillon, F_0 la fluorescence de l'échantillon en absence de Ca^{2+} et F_{max} la fluorescence maximale observée à la saturation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

3.2.4.1 Limite de détection

L'expérience présentée à la figure 3.14 montrait que 0.1 ng/ml AnxA5_B-Fluorescéine mélangés avec 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ donnent un signal supérieur au bruit. La limite de détection de la méthode avait été extrapolée mais il convient de tenter de la définir expérimentalement. Pour définir le seuil de détection de la méthode, j'ai conservé la même concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ tout en diminuant la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine. Une expérience type est présentée en figure 3.16.

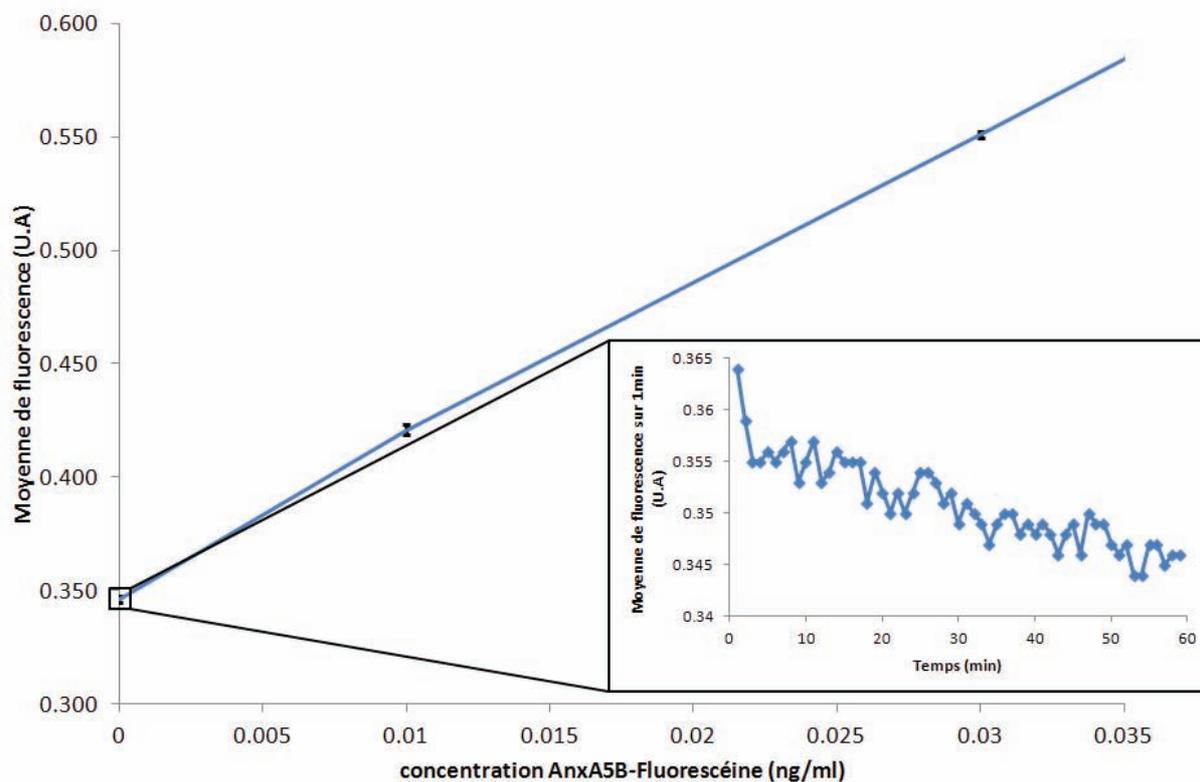


Figure 3.17 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine sur 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml à l'équilibre mesurée par FCM. Chaque point représente la moyenne de dix mesures de fluorescence, les barres d'erreur représentent l'écart type des mesures. Pour démontrer la robustesse du signal, la fluorescence du point à 0 ng/ml sur 1 h est représentée dans l'encart Le point à 1 ng/ml est hors graphique.

Dans la figure 3.17, la plus faible concentration en protéines utilisée (0.01 ng/ml) donne une moyenne de fluorescence de 0.421 ± 0.002 contre 0.346 ± 0.001 pour le point en absence de protéines. Le seuil de détection à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml est donc inférieur à 0.01 ng/ml et l'extrapolation donne un seuil de détection d'environ 0.002 ng/ml en AnxA5.

Un seuil de détection de 0.002 ng/ml en AnxA5 ou 56 fM correspond à un taux de saturation d'environ 0.01% soit environ 35 AnxA5_B-Fluorescéine par μPSiO₂@SLB. Cette valeur est plus faible que la limite de détection du FC 500 spécifiée par le constructeur qui est d'environ 600 fluorescéines par objet.

Cette dernière valeur correspondrait à une concentration en AnxA5 de 0.036 ng/ml pour 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$. La concentration 0.01 ng/ml donnant un signal mesurable, la limite de 600 fluorescéines par objet est surévaluée.

3.2.4.2 Détermination du K_d

La partie linéaire des courbes présentées en figure 3.15 et 3.16 montre que les concentrations en AnxA5 et en $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ sont grandes devant le K_d du système. Comme expliqué au chapitre 1, la connaissance des concentrations initiales et du K_d du système permet de calculer l'état final d'un système. Considérons un modèle d'interaction simple avec des sites de liaison indépendants et équivalents. La concentration initiale en AnxA5 étant connue, considérons que la concentration en sites de liaison de l'AnxA5 est égale à la concentration en AnxA5 nécessaire pour saturer les $\mu\text{PSiO}_2@SLB$. Il est alors possible de calculer la concentration en AnxA5 liée, ou le taux de saturation des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$, pour chaque concentration d'AnxA5.

Le modèle d'interaction peut s'écrire :



$$\text{Avec } K_d = \frac{[\text{AnxA5 libre}] \times [\text{Site libre}]}{[\text{AnxA5 liée}]} \quad \text{Equation 1}$$

D'après la loi de conservation de la matière :

$$\begin{cases} [\text{AnxA5 totale}] = [\text{AnxA5 libre}] + [\text{AnxA5 liée}] \\ [\text{Site total}] = [\text{Site libre}] + [\text{AnxA5 liée}] \end{cases}$$

L'équation 1 devient donc :

$$Kd = \frac{([AnxA5\ totale] - [AnxA5\ liée]) \times ([Site\ total] - [AnxA5\ liée])}{[AnxA5\ liée]}$$

$$[AnxA5\ liée]^2 + [AnxA5\ liée] \times (-[AnxA5\ totale] - [Site\ total] - Kd) + [AnxA5\ totale] \times [Site\ total] = 0$$

La résolution de cette équation permet de calculer deux valeurs possibles de $[AnxA5\ liée]$, une des valeurs étant aberrante (concentration négative ou supérieure à la concentration totale en sites ou en AnxA5). La $[AnxA5\ liée]$ étant connue, le taux de saturation des sites ou des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est calculable de la manière suivante :

$$\text{Taux de saturation} = \frac{[AnxA5\ liée]}{[Site\ total]}$$

Il est donc possible de définir des bornes dans lesquelles sont comprises le Kd en comparant les données observées avec des données calculées en imposant une valeur de Kd. En utilisant la méthode des moindres carrés et le solveur d'équation d'Excel[®], j'ai pu optimiser l'estimation de la valeur du Kd (Figure 3.18).

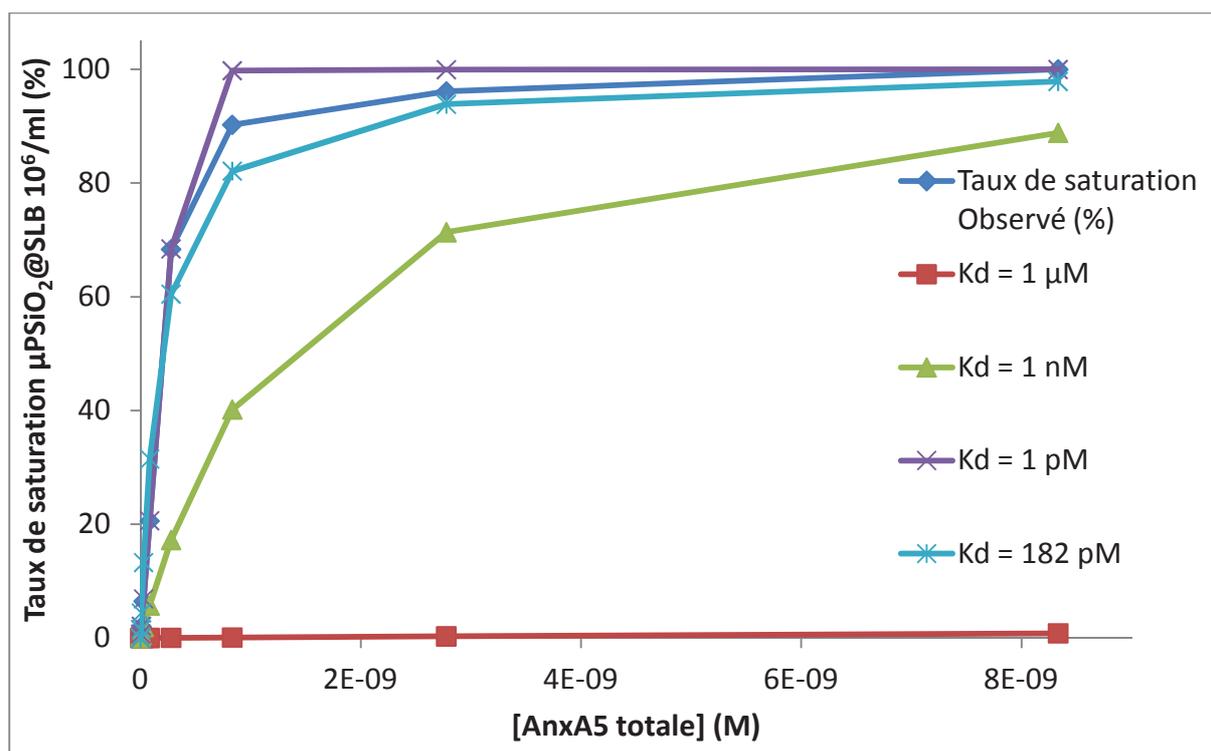


Figure 3.18 : Comparaison des taux de saturation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6/\text{ml}$ observé et calculés pour différentes valeurs de K_d . La valeur de K_d correspondant le plus aux données observées a été déterminée par la méthode des moindres carrés à une valeur de 182 pM.

Le taux de saturation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6/\text{ml}$ mesuré dans cette expérience implique que le K_d de l'AnxA5 pour les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est compris entre un nanomolaire et un picomolaire. J'ai essayé d'optimiser cette valeur par la méthode des moindres carrés via le solveur d'Excel[®]. Le K_d optimisé vaut 182 pM, bien que la superposition avec les données observées en figure 3.18 ne soit pas complète. Cette valeur est dans la gamme de celles proposées par Tait, à savoir une valeur inférieure à 0.1 nanomolaire et une valeur de l'ordre d'un femtomolaire (Tait, Gibson, et Fujikawa 1989; Tait, Gibson, et Smith 2004).

Pour compléter cette étude j'ai effectué plusieurs séries d'expériences en abaissant les concentrations en AnxA5 et $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ d'un facteur 10 (figure 3.19), 100 (figure 3.20) et 1000 (figure 3.21). Dans ces conditions, la liaison de la protéine est lente, l'équilibre étant atteint après plusieurs jours d'interaction dans la condition la plus diluée.

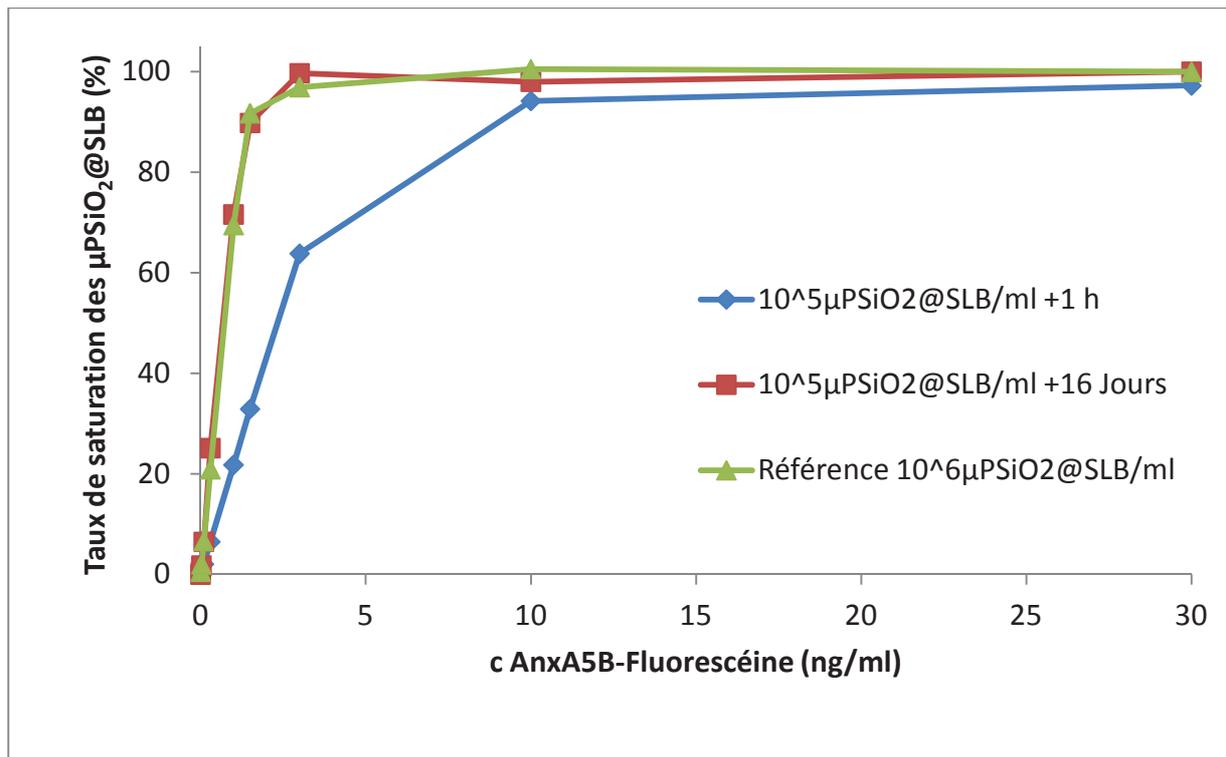


Figure 3.19 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10⁵ μPSiO₂@SLB/ml à l'équilibre. Les courbes bleue et rouge représentent les mêmes échantillons mesurés après 1 h et 16 jours. La courbe verte représente la transposition des données obtenues à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml, les concentrations ayant été corrigées pour être comparées à 10⁵ μPSiO₂@SLB/ml.

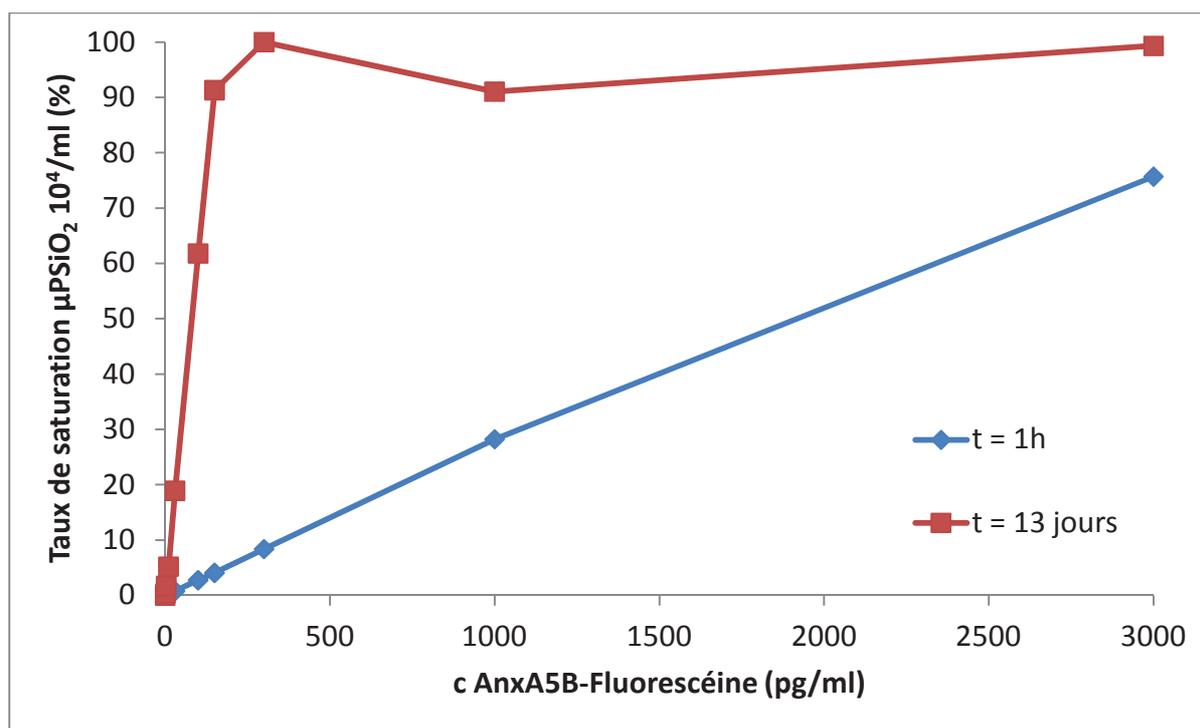


Figure 3.20 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10⁴ μPSiO₂@SLB/ml. Les courbes bleue et rouge représentent la fluorescence mesurée après 1 h et 13 jours d'interaction, respectivement.

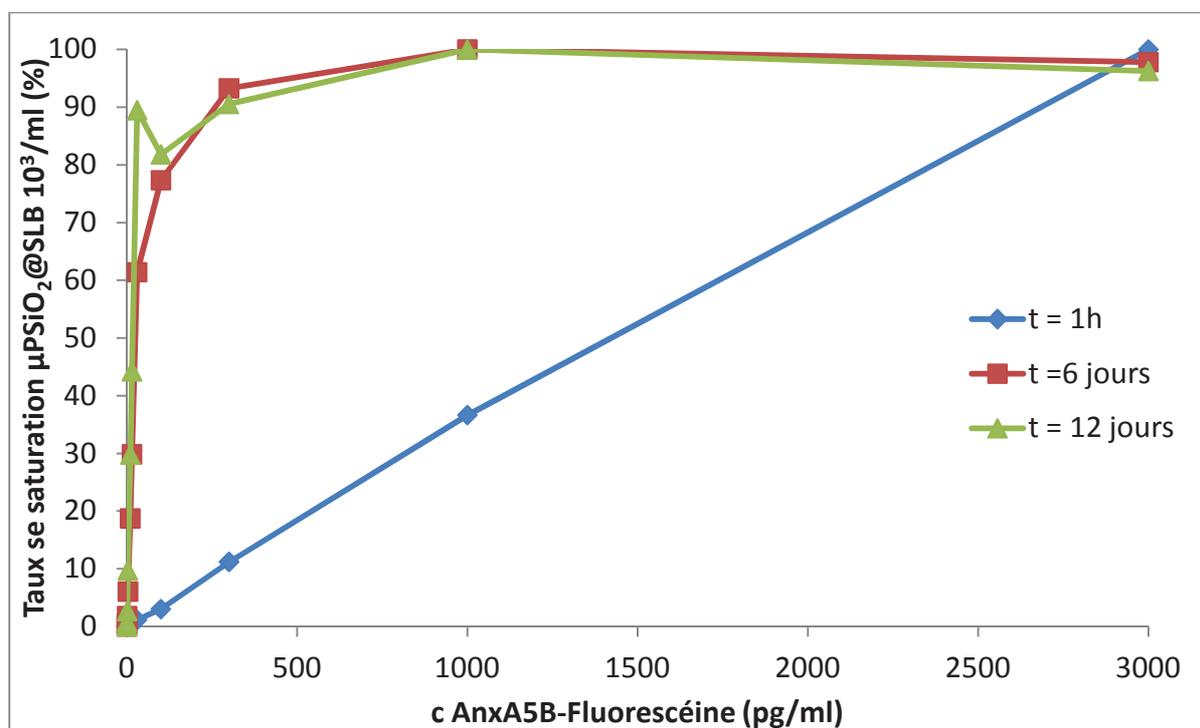


Figure 3.21 : Liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10³ μPSiO₂@SLB/ml. Les courbes bleue, rouge et verte représentent la fluorescence mesurée après 1 h, 6 jours et 12 jours d'interaction, respectivement.

La plus basse concentration en AnxA5_B-Fluorescéine testée, un picogramme par millilitre ou environ 30 femtomol par litre (fM), donne un signal mesurable pour $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ après 6 jours. La méthode est donc extrêmement sensible. Toutefois cette sensibilité à un coût, d'une part le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre peut prendre plusieurs jours dans ces conditions et d'autre part le temps de mesure est augmenté pour qu'un nombre suffisant de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ soit mesuré. Par exemple pour $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$, 205 ± 21 événements sont mesurés en 10 minutes. Les courbes à 10^5 et $10^4 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ ressemblent aux données obtenues à $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ c'est-à-dire qu'elles présentent une partie linéaire et un plateau. Pour les données à $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$, le changement de régime est moins net et la fluorescence semble décrire une hyperbole. Ce comportement signifie que les concentrations testées se rapprochent du K_d .

Comparons les résultats observés à $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ aux résultats calculés pour des K_d fixés arbitrairement (figure 3.22)

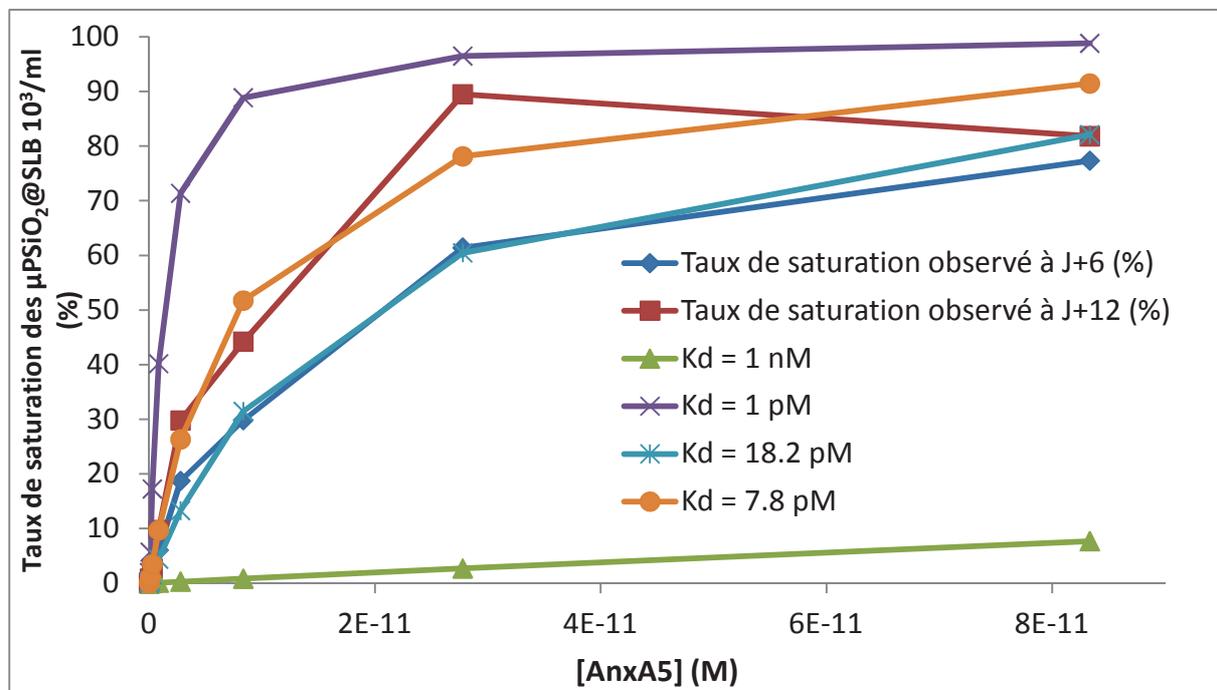


Figure 3.22 : Comparaison des taux de saturation des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^3/\text{ml}$ observés et calculés pour différents K_d .

Les résultats obtenus à 10^3 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ confirment que le K_d de l'AnxA5 pour les particules se situe entre un nanomolaire et un picomolaire. L'optimisation du K_d par la méthode des moindres carrés donne 18.2 pM en utilisant comme base les taux de saturation observés à J+6 et 7.8 pM en utilisant les données à J+12. En conclusion, ces expériences suggèrent que le K_d de la liaison entre AnxA5 et membranes est de l'ordre de (13.0 ± 5.2) pM pour des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ contenant 20% de PS, à 2 mM Ca^{2+} . Toutefois ces valeurs sont à considérer avec précaution car le système pourrait ne pas être à l'équilibre.

Dans les conditions de très forte dilution, le signal de diffusion de la lumière des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ peut devenir proche ou inférieur au bruit induit par le tampon. Dans ces conditions, l'utilisation de μPSiO_2 recouvertes d'une SLB fluorescente peut permettre de mieux séparer leur signal du bruit et de mesurer des concentrations inférieures à 10^3 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$. La diminution de la concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ pourrai permettre d'affiner l'estimation du K_d en utilisant des concentrations plus faibles en AnxA5.

En conclusion, la liaison de l'AnxA5 a été étudiée par FCM à des concentrations jamais atteintes. La méthode a une limite de détection de 35 AnxA5 par $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$, toutefois les faibles concentrations en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ entraînent deux problèmes. Tout d'abord la mesure de faibles concentrations en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ augmente le temps de mesure et diminue le rapport signal sur bruit. Ensuite, les basses concentrations augmentent le temps nécessaire pour que le système atteigne l'équilibre. Ce dernier point peut être retourné sous forme d'avantage et bien que la FCM soit une technique à priori peu adaptée, elle permet de mesurer la cinétique de liaison de l'AnxA5. Contrairement aux méthodes cinétiques citées au chapitre 1, la FCM n'est pas limitée par le transport massique et doit permettre d'accéder aux constantes cinétiques de liaison. La suite de mon travail a consisté à étudier la cinétique de liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

3.2.5 Cinétique de liaison

Dans les conditions expérimentales spécifiées au chapitre précédent, la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est lente et peut réclamer plusieurs jours pour atteindre l'équilibre. La FCM étant une technique relativement peu consommatrice en échantillon, il est possible de faire des acquisitions longues (≥ 1 h). Ces deux propriétés rendaient tout à fait possible l'étude de la cinétique de liaison de l'AnxA5 par FCM.

Le protocole expérimental est simple. Des mélanges d'AnxA5 et de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont préparés en absence de Ca^{2+} et leur fluorescence est mesurée. Les échantillons sont ensuite calcifiés, homogénéisés puis leur fluorescence est mesurée. Le temps de latence entre l'ajout de Ca^{2+} et la mesure est contrôlé manuellement à l'aide d'un chronomètre et est estimé à 60 ± 2 secondes. Les cinétiques sont acquises en continu pendant un temps pouvant aller jusqu'à 1h. Les conditions sont choisies de sorte que l'échantillon ne soit pas intégralement consommé, ce qui permet d'effectuer des mesures complémentaires après plusieurs heures ou plusieurs jours d'interaction.

Une cinétique typique est représentée en figure 3.23. Initialement, en absence de Ca^{2+} , la fluorescence des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est égale à 0.595 U.A. Après ajout de 2 mM Ca^{2+} , la fluorescence des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ croît rapidement et atteint un plateau de fluorescence avec une valeur de 55.27 ± 0.20 U.A en environ 5 minutes. L'ajout de 5 mM EGTA entraîne une perte de fluorescence trop rapide pour que la cinétique soit mesurée et atteint une valeur de fluorescence de 0.62 ± 0.05 U.A.

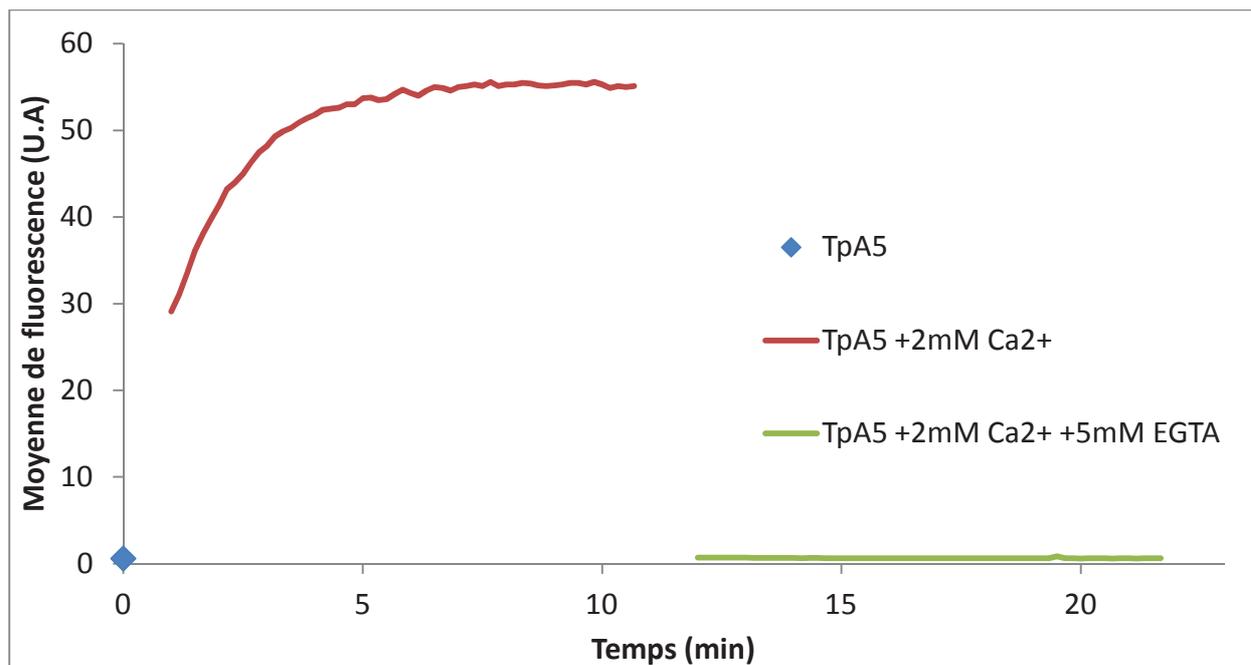


Figure 3.23 : Cinétique d'interaction d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine 100 ng/ml avec 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml. L'échantillon est initialement mesuré sur une minute (point bleu). Après ajout de 2 mM Ca²⁺, l'échantillon est mesuré pendant dix minutes (courbe rouge). Après ajout de 5 mM EGTA, l'échantillon est mesuré pendant dix minutes supplémentaires (courbe verte).

Les cinétiques d'interaction de l'AnxA5 avec les μPSiO₂@SLB par FCM possèdent un point commun avec les cinétiques d'interaction en QCM-D. Si les deux techniques permettent de détecter la liaison de protéines après ajout de Ca²⁺, aucune ne permet de mesurer précisément la cinétique de dissociation après ajout d'EGTA. Le processus de dissociation induit par l'EGTA est complet en moins d'une minute, il nécessiterait donc l'utilisation de techniques ayant une résolution temporelle beaucoup plus élevée pour être analysé en détail. A ma connaissance, la seule cinétique de dissociation d'une Annexine induite par un chélateur du Ca²⁺ a été mesurée par spectrofluorimétrie en écoulement stoppé (stopped flow) par Lu et collaborateurs (Lu, Bazzi, et Nelsestuen 1995).

Les expériences de cinétique d'interaction ont été effectuées en reprenant les mêmes conditions expérimentales que celles employées pour les expériences de liaison à l'équilibre. Les résultats obtenus pour 10^6 $\mu\text{PSiO}_2/\text{ml}$ sont représentés en figure 3.24.

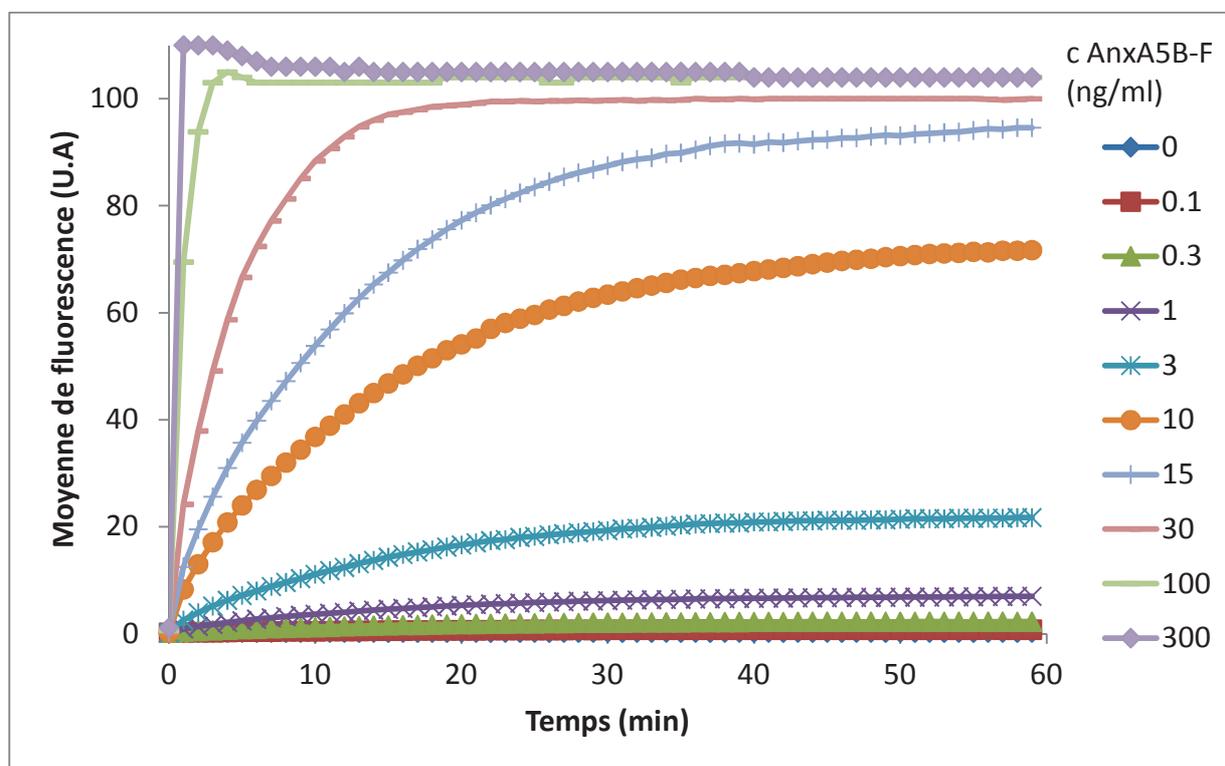


Figure 3.24 : Cinétiques d'association d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10^6 $\mu\text{PSiO}_2/\text{SLB}/\text{ml}$.

Le point à 0 minute représente la fluorescence mesurée en absence de Ca^{2+} . Les points entre 1 et 59 minutes sont issus d'une seule acquisition.

Les cinétiques à 10^6 $\mu\text{PSiO}_2/\text{SLB}/\text{ml}$ atteignent toutes un plateau en moins de 1 h. Pour les plus fortes concentrations, le plateau est atteint en quelques minutes à peine (environ 5 minutes pour 100 ng/ml AnxA5), ou en un temps trop court pour être mesuré pour la condition 300 ng/ml AnxA5. Tout comme pour les expériences d'équilibre de liaison, j'ai également effectué des cinétiques de liaison en réduisant les concentrations en AnxA5 et en $\mu\text{PSiO}_2/\text{SLB}$.

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes pour $10^5 \mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$ (Figure 3.25), $10^4 \mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$ (Figure 3.26) et $10^3 \mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$ (Figure 3.27).

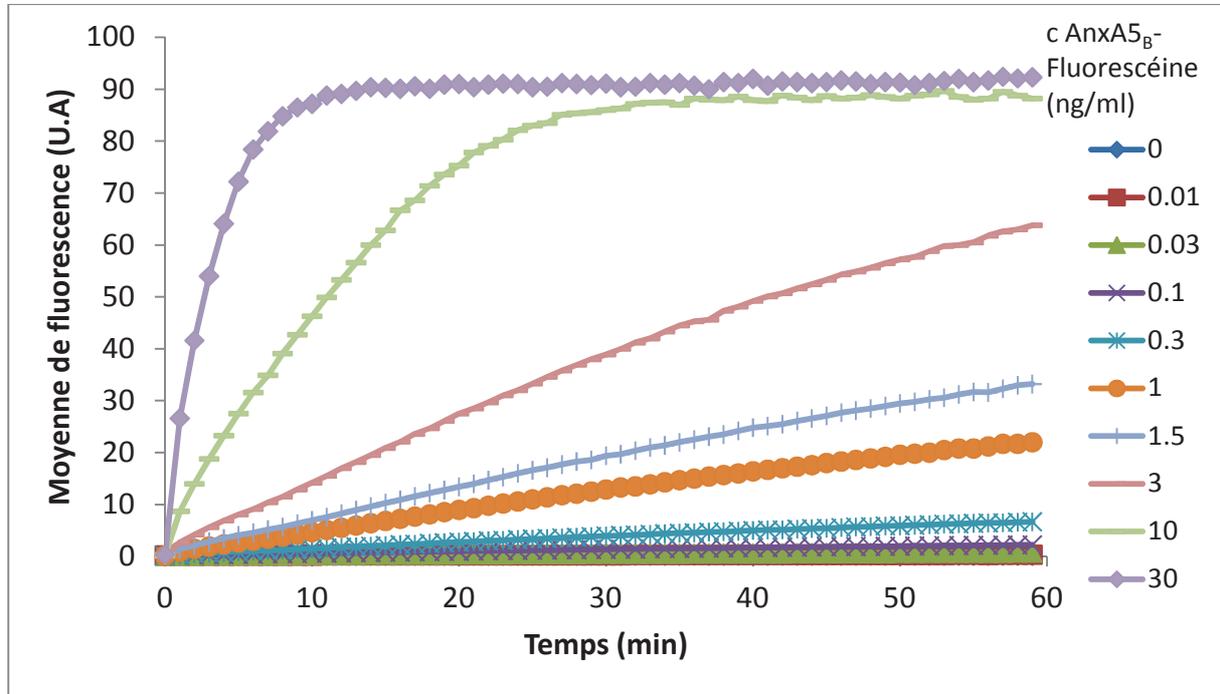


Figure 3.25 : Cinétiques d'association d'AnxA5_B-Fluorescéine à $10^5 \mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$.

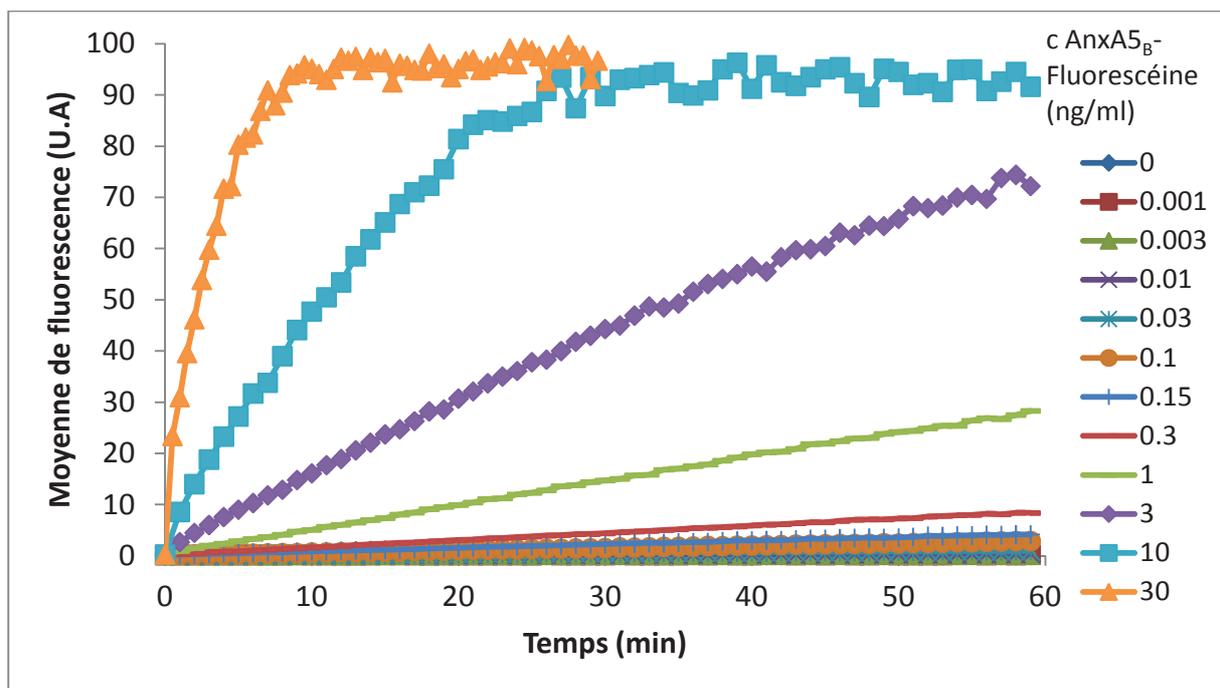


Figure 3.26 : Cinétiques d'association d'AnxA5_B-Fluorescéine à $10^4 \mu\text{PSiO}_2@SLB/ml$.

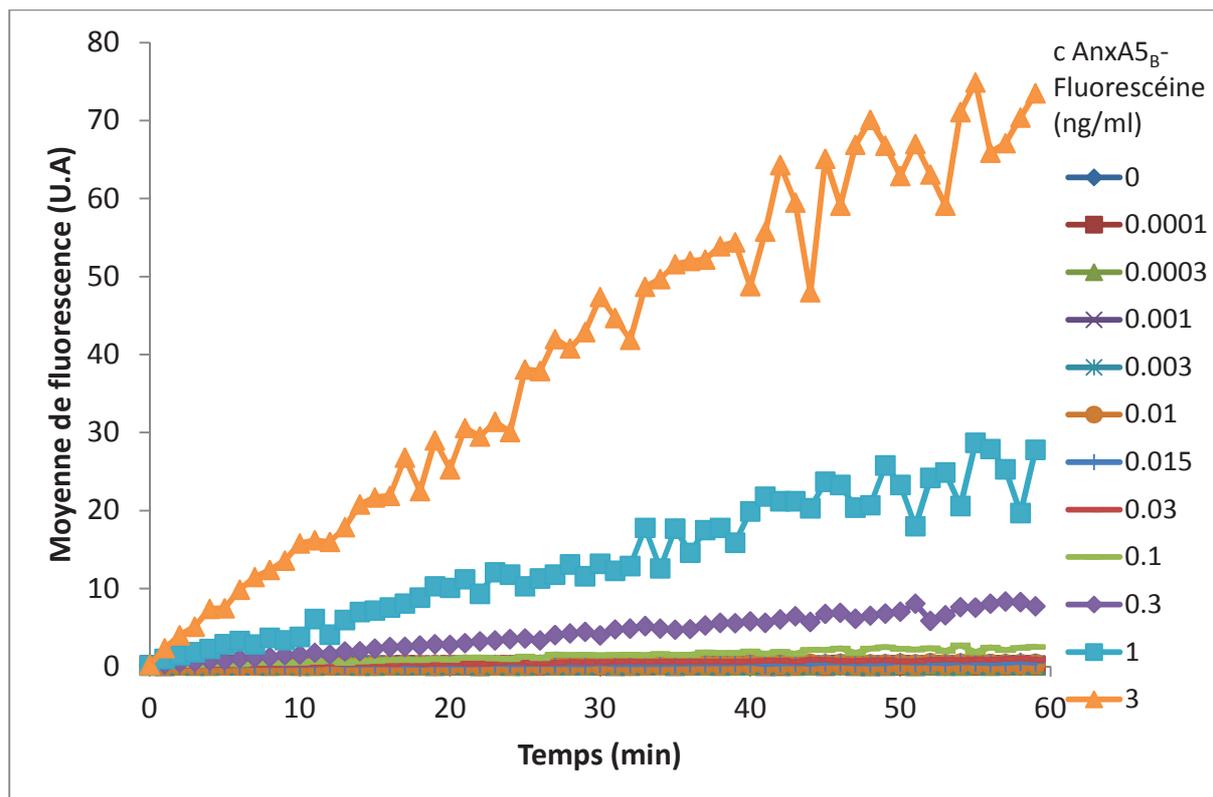


Figure 3.27 : Cinétiques d'association d'AnxA5_B-Fluorescéine à 10³ μPSiO₂@SLB/ml.

Comme attendu, les cinétiques mesurées en diminuant les concentrations en réactants sont plus lentes que les cinétiques réalisées à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml. On peut noter pour les cinétiques à 10⁵ μPSiO₂@SLB/ml que les plus basses concentrations n'atteignent pas la saturation de fluorescence en une heure. Les valeurs du plateau de fluorescence peuvent toutefois être extrapolées à partir des données de liaison à l'équilibre. Pour 10³ μPSiO₂@SLB/ml la dilution est telle qu'aucune des cinétiques n'atteint de plateau à une heure. On observe également un effet de la dilution sur l'échantillonnage, le nombre de μPSiO₂@SLB mesurées par minute passant de 15 000 ± 5 000 pour 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml à 15 ± 5 pour 10³ μPSiO₂@SLB/ml. Cette diminution explique l'aspect bruité des cinétiques de liaison à 10³ μPSiO₂@SLB/ml.

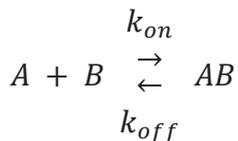
Les cinétiques d'interaction en FCM permettent de déterminer directement la valeur de la constante cinétique d'association (k_{on}).

La constante cinétique de dissociation peut également être déterminée mais nécessite un protocole expérimental plus complexe qui sera détaillé plus loin.

Le k_{on} peut être déterminé de deux manières distinctes. La première méthode consiste à étudier la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 à partir de la pente à l'origine et la seconde à considérer que la fluorescence évolue de manière exponentielle au cours du temps.

3.2.5.1 Méthode des vitesses initiales

Comme expliqué au chapitre 1.2.2, dans le cas d'une réaction équilibrée simple de type :



$$\text{A tout instant : } \frac{d[AB]}{dt} = k_{on} \times [A] \times [B] - k_{off} \times [AB]$$

Au début de la réaction :

$$\begin{cases} [A] \approx [A]_{Totale} \\ [B] \approx [B]_{Totale} \\ [AB] \approx 0 \end{cases}$$

Donc quand $t \rightarrow 0$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on} \times [A]_{Totale} \times [B]_{Totale}$$

En d'autres mots, la vitesse initiale de formation du complexe est proportionnelle aux concentrations initiales des réactifs. Le k_{on} est donc déterminé en deux étapes.

Dans une première étape, la vitesse initiale de réaction est mesurée en maintenant $[B]$ constante, $[A]$ étant variable. Le graphique représentant $\frac{d[AB]}{dt} = f([A])$ correspond à une droite de pente $k_{on} \times [B]_{Totale}$.

Le k_{on} est alors obtenu en divisant la pente par $[B]_{Totale}$.

Pour effectuer cette analyse, le signal de fluorescence doit être converti en concentration en complexe. Cette conversion est effectuée en multipliant le taux de saturation des sites de liaison portés par les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ par la concentration en AnxA5 nécessaire pour saturer les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

Les résultats de l'expérience présentée à la figure 3.24 ont été traités selon cette méthode et les résultats sont présentés en figure 3.28.

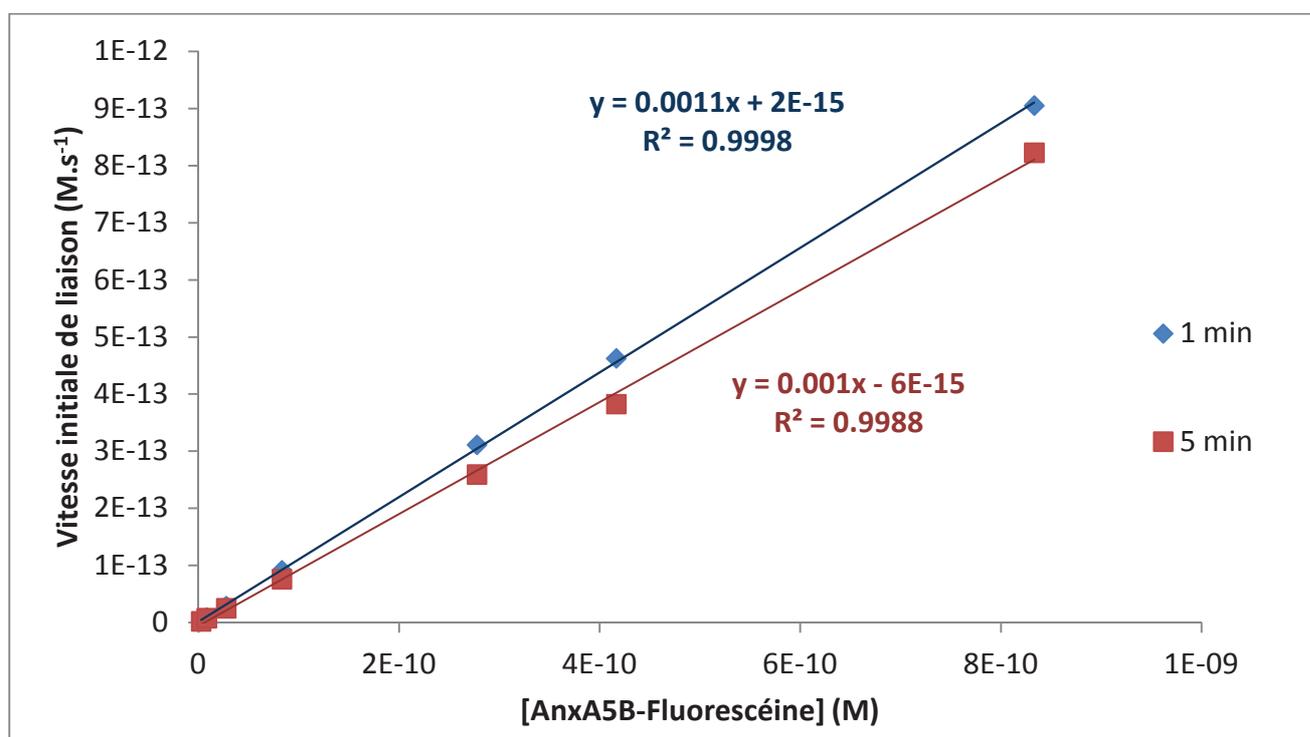


Figure 3.28 : Graphique représentant les vitesses initiales de liaison pour 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ et des concentrations en AnxA5_B-Fluorescéine variables (voir Figure 3.24). Courbe bleue) Vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 mesurée pendant une minute. Courbe rouge) Vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 mesurée pendant cinq minutes. Les points expérimentaux sont reliés entre eux par une droite de régression dont l'équation est affichée sur le graphique.

Le graphique représenté à la figure 3.28 permet d'observer que la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 est proportionnelle à la concentration d'AnxA5 pour une concentration fixe en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. La pente de la droite de régression a pour valeur $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En considérant que la concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ vaut $1.7 \times 10^{-15} \text{ M}$, le k_{on} calculé vaut $(6.3 \pm 0.6) \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'analyse des vitesses initiales de liaison effectuée de la même manière pour $10^5 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ donne les résultats suivants (Figure 3.29).

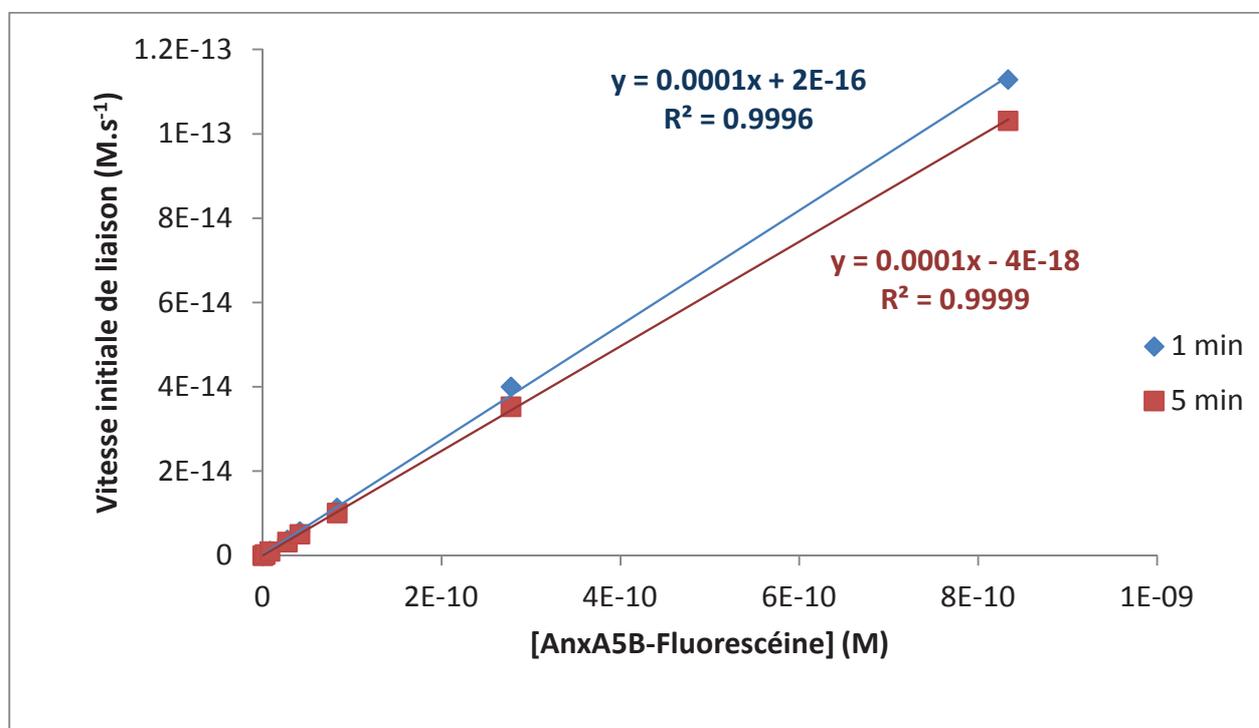


Figure 3.29 : Graphique représentant les vitesses initiales de liaison de l'AnxA5 pour $10^5 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ et des concentrations en AnxA5_B-Fluorescéine variables (voir Figure 3.25).

Comme attendu la figure 3.29 démontre que la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5_B-Fluorescéine est proportionnelle à sa concentration.

Comme attendu également la pente des droites de régression est environ dix fois plus faible que la pente observée pour $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$. La pente valant $(1.24 \pm 0.12) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et la concentration en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ étant estimée à $1.7 \times 10^{-16} \text{ M}$, le k_{on} calculé vaut $(7.3 \pm 0.7) \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'analyse des données mesurées à 10^4 et $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ montre que le k_{on} calculé vaut $8.32 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $10^4 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$, et $8.42 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $10^3 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$.

En conclusion la méthode des vitesses initiales est une méthode simple permettant de déterminer le k_{on} , qui nécessite toutefois d'estimer la concentration en AnxA5 liée. Le k_{on} déterminé par cette méthode est dans l'intervalle $[6.3-8.4] \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Dans l'article de référence sur la cinétique de liaison de l'Annexine A6, Lu et collaborateurs donnent une valeur de k_{on} comprise entre $[0.27-6] \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les valeurs obtenues ici pour l'AnxA5 sont environ 10 fois supérieures à celles de l'Annexine A6. Il existe une différence importante dans la structure des ces deux protéines, l'Annexine A6 étant similaire à un dimère d'AnxA5. D'autre part, l'étude de Lu et collaborateurs et l'étude présente diffèrent grandement par les gammes de concentrations analysées.

3.2.5.2 Evolution exponentielle de la fluorescence en fonction du temps.

La seconde approche permettant de déterminer le k_{on} est une approche plus descriptive. Cette approche ne fait pas d'hypothèse sur le mécanisme de liaison mais décrit le phénomène cinétique observé en cherchant les facteurs l'influençant.

Les équations et les méthodes décrites dans ce chapitre proviennent d'Odile Viratelle (Viratelle 1997).

Considérons une équation d'exponentielle de la forme :

$$Y = Ae^{-Bt} + C$$

Avec Y un phénomène exponentiel ; A,B et C des constantes avec $B > 0$ et t le temps ≥ 0 .

Les limites de l'équation sont :

$$\begin{cases} t = 0; Y_0 = A + C \\ t \rightarrow \infty; Y_\infty \rightarrow C \end{cases}$$

L'équation de l'exponentielle peut donc être réécrite sous forme descriptive comme :

$$Y = (Y_0 - Y_\infty)e^{-Bt} + Y_\infty$$

La constante B est la constante de temps de l'exponentielle, sa valeur influence le temps nécessaire pour que le processus évolue depuis Y_0 vers Y_∞ .

Expérimentalement, pour déterminer si un phénomène suit une loi exponentielle, une transformation mathématique est appliquée aux données qui consiste à transformer une exponentielle en une droite, on parle de linéarisation. Un exemple de linéarisation est la suivante :

$$\ln|Y - Y_\infty| = \ln|Y_0 - Y_\infty| - Bt$$

Le simple fait que la transformation $\ln|Y - Y_\infty|$ donne une droite, prouve qu'Y évolue de façon exponentielle au cours du temps. La valeur de la constante de temps de l'exponentielle est donnée par la pente de la linéarisation. Ce type d'approche est classiquement utilisé comme par exemple dans (Lu, Bazzi, et Nelsestuen 1995; Weber et Changeux 1974).

Appliquons une linéarisation d'exponentielle aux données présentées en figure 3.24 (Figure 3.30).

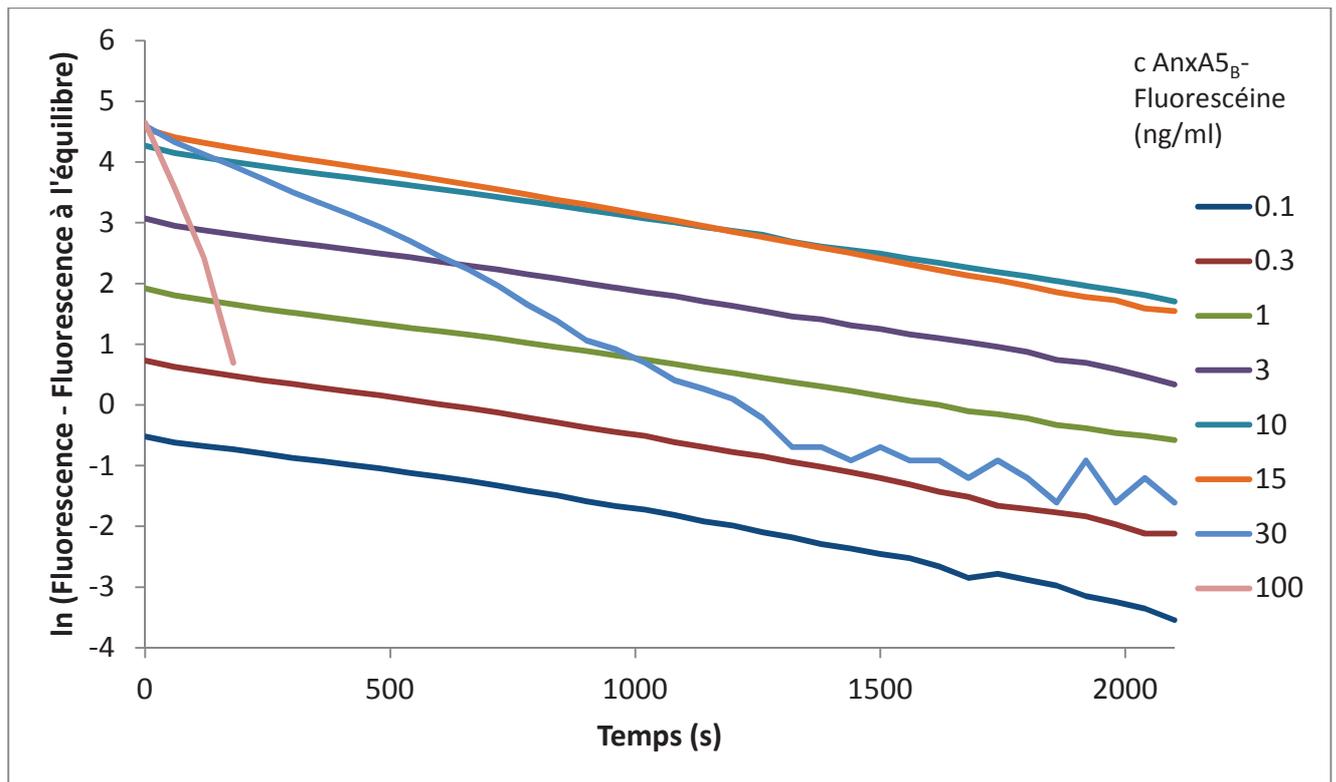


Figure 3.30 : Graphique représentant le résultat de la linéarisation des courbes de liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine à $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ (Figure 3.24).

La linéarisation des données de fluorescence donne des droites pour toutes les concentrations d'AnxA5 mais pour les plus fortes concentrations en AnxA5, seule les premières minutes de cinétique donnent une droite. Pour les faibles concentrations en AnxA5, les droites sont remarquablement parallèles. La fluorescence liée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ évolue donc de manière exponentielle au cours du temps. La linéarisation s'écarte d'une droite quand la fluorescence est proche de la saturation, ce qui explique pourquoi dans le cas des plus fortes concentrations en AnxA5 seule la portion initiale des cinétiques donne des droites (voir la condition 30ng/ml AnxA5_B-Fluorescéine de la figure 3.30, à comparer à la figure 3.24).

La figure 3.31 présente les valeurs des constantes de temps des exponentielles pour les différentes concentrations en AnxA5 (Figure 3.31).

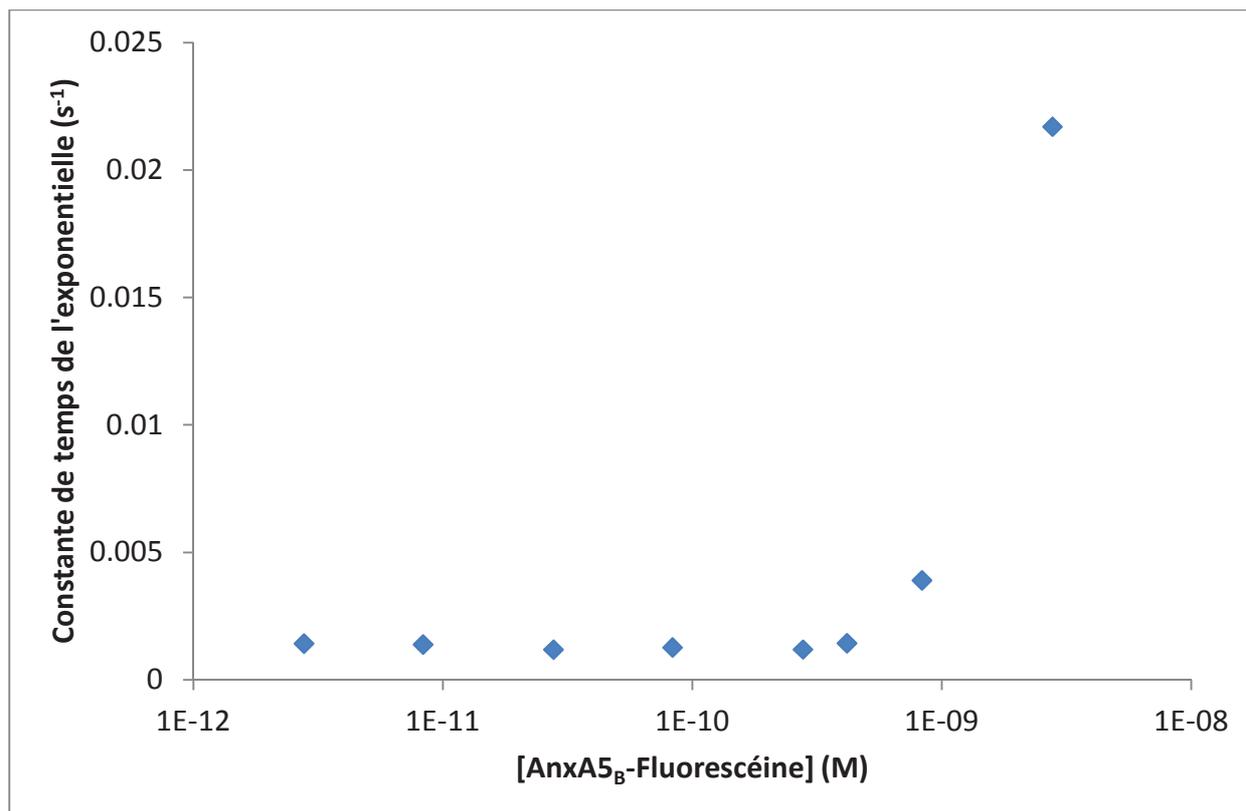


Figure 3.31 : Influence de la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine sur la constante de temps de l'exponentielle, calculée d'après les données de liaison à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml (Figure 3.24). La concentration en protéines est représentée sur une échelle logarithmique.

La courbe représentée en figure 3.31 présente deux régimes distincts. Dans la première partie de la courbe, la constante de temps de l'exponentielle est indépendante de la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine. Dans la seconde partie de la courbe, la constante de temps de l'exponentielle augmente et est dépendante de la concentration en protéines. Le changement de régime semble avoir lieu dans la zone où la concentration en protéines est suffisante pour saturer les μPSiO₂@SLB.

Pour toutes les concentrations en μPSiO₂@SLB testées, ce comportement biphasique est observé, avec une partie de la courbe où la constante de temps de l'exponentielle est indépendante de la concentration en protéines et une partie où la constante de temps est dépendante de la concentration en AnxA5.

Reportons la valeur de cette constante de temps indépendante de la concentration en AnxA5 en fonction de la concentration en sites de liaison de l'AnxA5 (Figure 3.32).

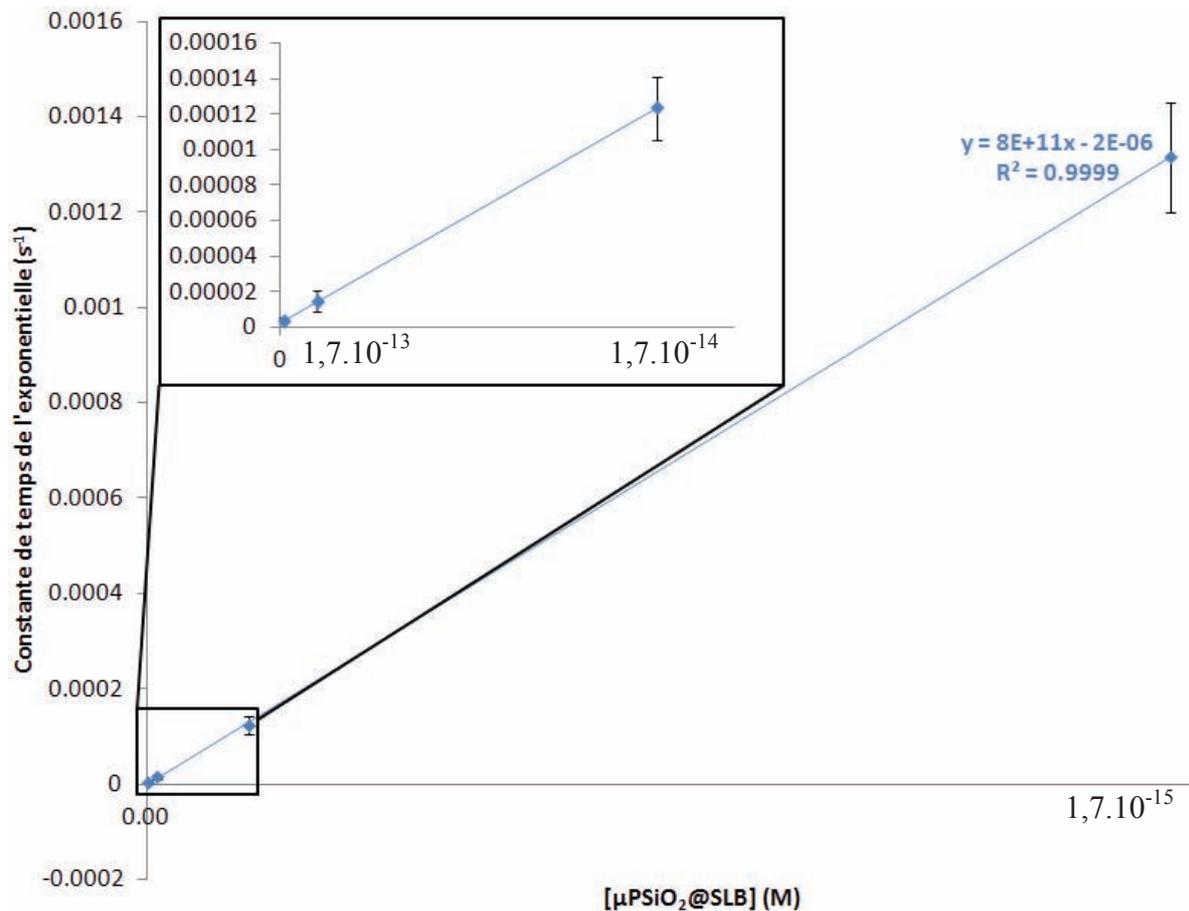


Figure 3.32 : Influence de la concentration en $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ sur la constante de temps de l'exponentielle indépendante de la concentration en protéines. L'équation de la droite de régression est représentée sur le graphique.

La figure 3.32 montre que la valeur de la constante de temps indépendante de la concentration en protéines est proportionnelle à la concentration en sites de liaison. La pente est homogène à des $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, c'est-à-dire à une constante de temps d'ordre 2 comme le k_{on} . La valeur de $8 \times 10^{11} \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est comprise entre 6.3 et $8.4 \cdot 10^{11} \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et est donc en accord avec la valeur de k_{on} , calculée à partir de l'analyse des vitesses initiales de liaison.

Examinons maintenant le cas où la constante de temps est dépendante de la concentration en protéines (Figure 3.33).

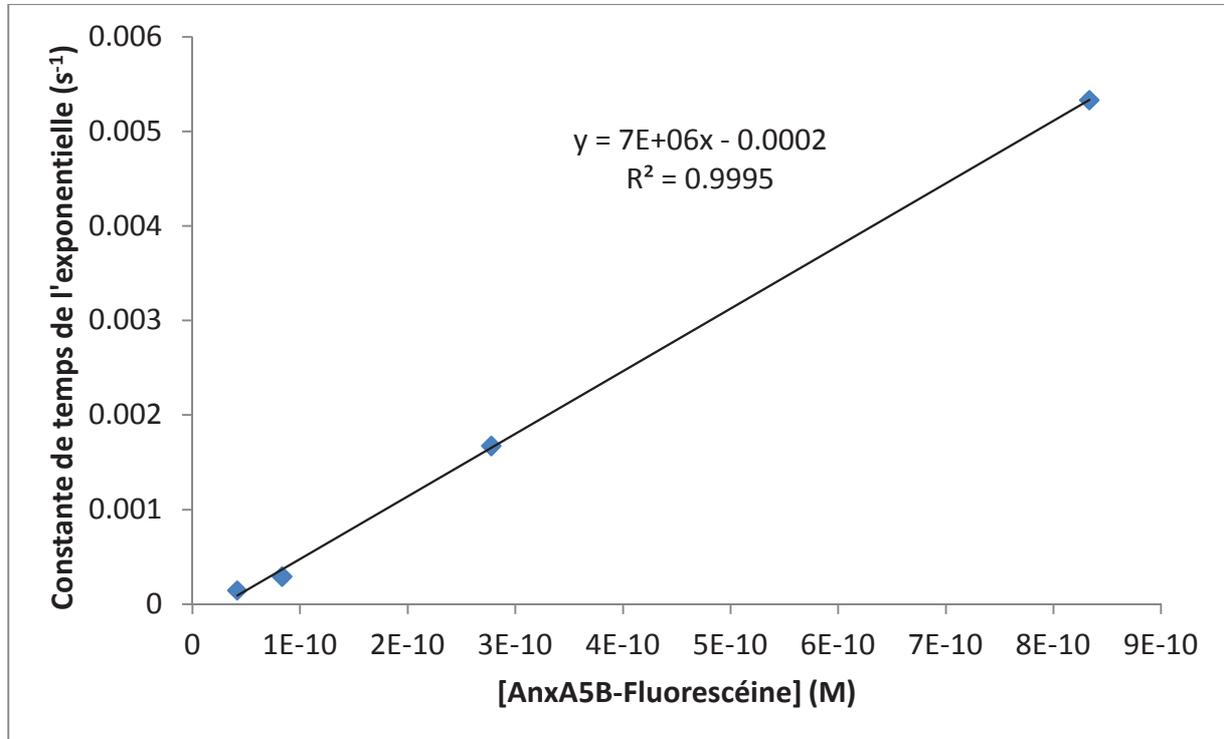


Figure 3.33 : Influence de la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine sur la constante de temps de l'exponentielle, calculée à partir des données de liaison à 10⁵ μPSiO₂@SLB/ml (Figure 3.25). La portion du graphique où la constante de temps est indépendante de la concentration en protéines n'est pas représentée.

La figure 3.33 montre que la valeur de la constante de temps de l'exponentielle est proportionnelle à la concentration en protéines dans ce domaine de concentration. Qu'en est-il de l'influence de la concentration en sites sur la valeur de la pente ? (Figure 3.34).

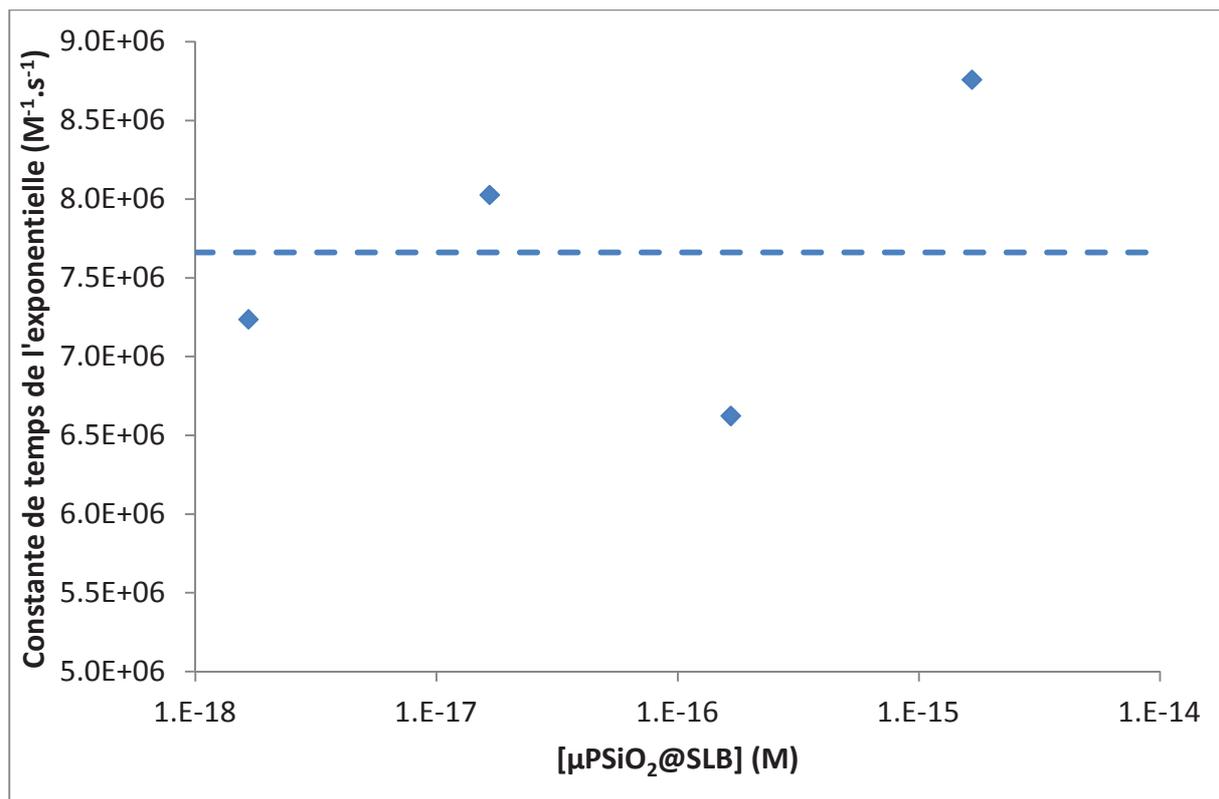


Figure 3.34 : Influence de la concentration en sites de liaison sur la valeur de la constante de temps dépendante de la concentration en AnxA5_B-Fluorescéine. Les concentrations en protéines sont représentées sur une échelle logarithmique.

La figure 3.34 montre que la constante de temps dépendante de la concentration en protéines est indépendante de la concentration en sites de liaison. Cette constante vaut $(7.66 \pm 0.93) \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et est également homogène à un k_{on} . Cette valeur est très inférieure à la valeur du k_{on} comprise entre 6.3 et $8.4 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ calculée à partir des vitesses initiales de liaison, mais la différence peut être expliquée par l'incertitude sur les cinétiques mesurées à forte concentration en AnxA5 et par le faible nombre de points testés.

Dans leur article de 1995, Lu et collaborateurs (Lu, Bazzi, et Nelsestuen 1995) proposent de comparer la valeur expérimentale du k_{on} à une valeur limite imposée par la diffusion des molécules. Dans ce cas modèle, lorsque deux molécules se rencontrent, elles réagissent instantanément, le seul phénomène limitant la réaction étant alors la diffusion des molécules. Cette valeur limite est calculée à partir de l'équation de Smoluchowski (Smoluchowski 1917) :

$$k_{coll} = 4\pi N_A (D_1 + D_2) (R_1 + R_2) / 1000$$

où N_A est la constante d'Avogadro ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), D_1 et D_2 sont les coefficients de diffusion des deux espèces (exprimé en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et R_1 et R_2 sont les rayons des deux espèces (exprimé en cm).

En première approximation, D de l'AnxA5 étant très supérieur à D des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ et R des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ étant très supérieur à R de l'AnxA5, l'équation peut être simplifiée en :

$$k_{coll} = 4\pi N_A D R / 1000$$

où D est le coefficient de diffusion de l'AnxA5 exprimé en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et R le rayon des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ exprimé en cm.

Le coefficient de diffusion de l'AnxA5 est estimé à partir de l'équation de Stokes-Einstein en considérant la protéine comme une sphère avec une masse volumique (ρ) de $1.4 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$:

$$m = V \times \rho$$

Avec m la masse de l'AnxA5, V le volume de l'AnxA5 et ρ la masse volumique de la protéine.

$$m = \frac{4}{3} \pi r^3 \times \rho$$

où r est le rayon de la sphère.

L'équation peut être réécrite sous la forme :

$$r = \sqrt[3]{\frac{3m}{4\pi\rho}}$$

L'équation de Stokes-Einstein relie le coefficient de diffusion de sphères dans un fluide à leur rayon selon la formule :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Où k_B est la constante de Boltzmann ($1.381 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T la température (K), η la viscosité de l'eau (10^{-3} Pa.s) et r le rayon de la sphère (m). Le rayon de la sphère pouvant être exprimé en fonction de la masse de la protéine, l'équation peut être réécrite sous la forme :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta \sqrt[3]{\frac{3m}{4\pi\rho}}} \approx 1.006 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} = 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Cette valeur estimée est proche de la valeur expérimentale de $1.22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ déterminée en spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) par Jérôme Wenger (communication personnelle) pour l'AnxA5_B-Cy5.

Donc :

$$k_{coll} = 4\pi N_A D R / 1000 \approx 5.86 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

La valeur du k_{on} calculée pour la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ est donc très proche de la valeur calculée du k_{coll} . Ceci démontre l'extrême affinité de l'AnxA5 pour les membranes exposant de la PS, la liaison étant limitée par la diffusion des molécules.

3.2.5.3 Constante cinétique de dissociation (k_{off})

Comme la figure 3.23 le montre, la dissociation induite par l'ajout d'EGTA est trop rapide pour être suivie par FCM. Une méthode utilisée par Weber et Changeux dans un cas comparable a été de « chasser » la protéine marquée à l'aide d'un fort excès de protéine non marquée (Weber et Changeux 1974). Ce type d'expérience est effectué en deux temps. Dans un premier temps l'AnxA5_B-Fluorescéine et les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont mélangés pour former un complexe. Quand l'équilibre est atteint, une grande quantité d'AnxA5 non fluorescente est ajoutée au mélange (Weber et Changeux utilisaient une quantité de protéines non marquées équivalente à 30 000 fois la quantité de protéines marquées).

Le schéma de la réaction est donc le suivant :



Sur le plan expérimental, ce type d'expérience peut poser problème car elle implique de consommer de grandes quantités de protéines non marquées. Par exemple dans le cas d'une liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine 100 ng/ml sur $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ 10^6 /ml telle que celle présentée à la figure 3.23, la quantité d'AnxA5 à ajouter serait de 3mg/ml en reprenant des conditions expérimentales similaires à celles de Weber et Changeux.

J'ai donc choisi d'effectuer la liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine 100 ng/ml à 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ /ml, puis de diluer le mélange d'un facteur cent avant d'ajouter 30 μg /ml d'AnxA5. Le résultat de cette expérience est présenté en figure 3.35.

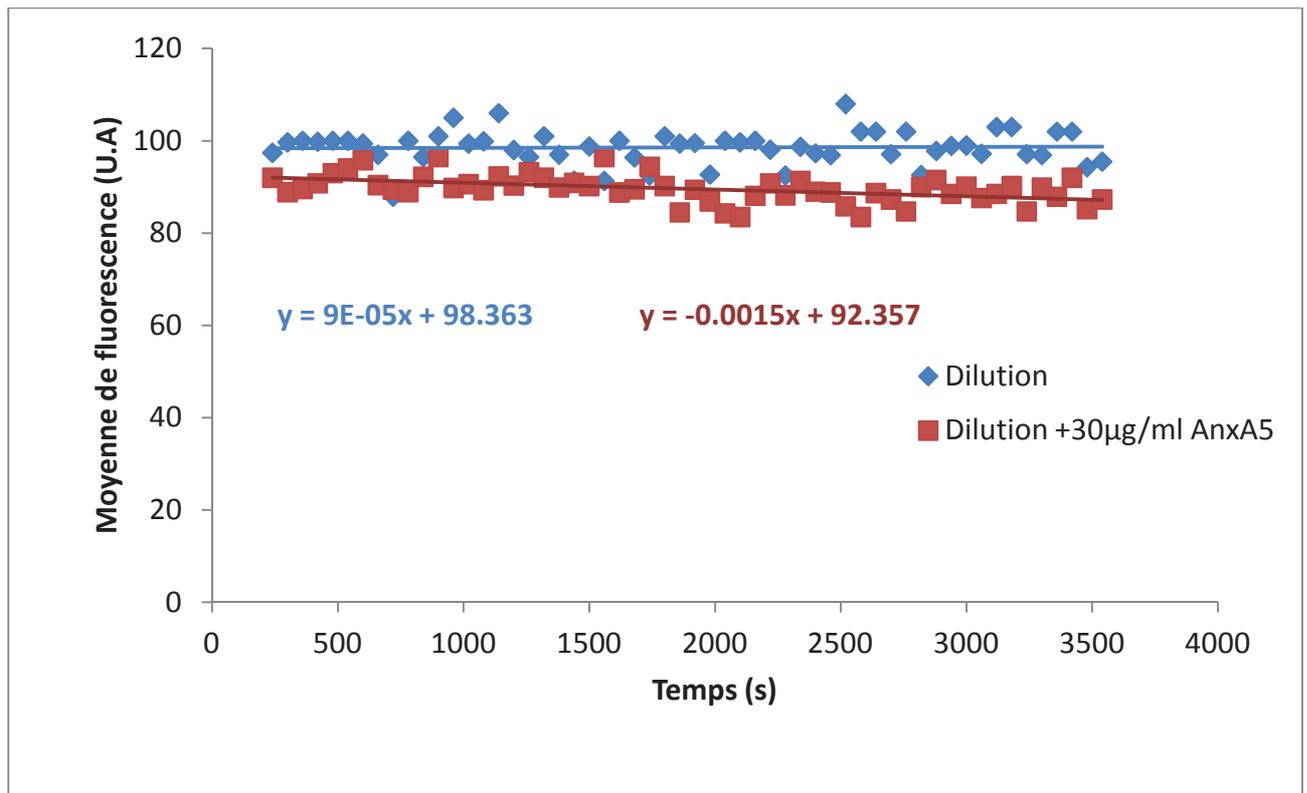


Figure 3.35 : Fluorescence de $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ +AnxA5_B-Fluorescéine 100 ng/ml diluées 100 fois en tampon (courbe bleue) ou en tampon contenant 30 µg/ml d'AnxA5 (courbe rouge). Les régressions linéaires correspondant à chacune des courbes sont représentées sur le graphique ainsi que leurs équations.

La figure 3.35 montre que la fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ n'est pas affectée par la dilution (la courbe bleue a une pente proche de zéro) et que la fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ décroît légèrement en présence d'un fort excès d'AnxA5 (la courbe rouge a une pente négative).

La décroissance de la fluorescence résulte de la dissociation de l'AnxA5_B-Fluorescéine. La diminution de la concentration en complexe [AB] est censée suivre une relation de la forme

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{off} [AB]$$

où $[AB] \rightarrow 0$ quand $t \rightarrow \infty$

Comme expliqué précédemment, l'équation descriptive des exponentielles est de la forme :

$$Y = (Y_0 - Y_\infty)e^{-Bt} + Y_\infty$$

Si $Y_\infty = 0$ alors l'équation de l'exponentielle peut s'écrire :

$$Y = Y_0e^{-Bt} \text{ et donc } \ln(Y) = \ln(Y_0) - Bt$$

La transformation $\ln(\text{Fluorescence})$ doit donner une droite de pente $-k_{\text{off}}$ (Figure 3.36).

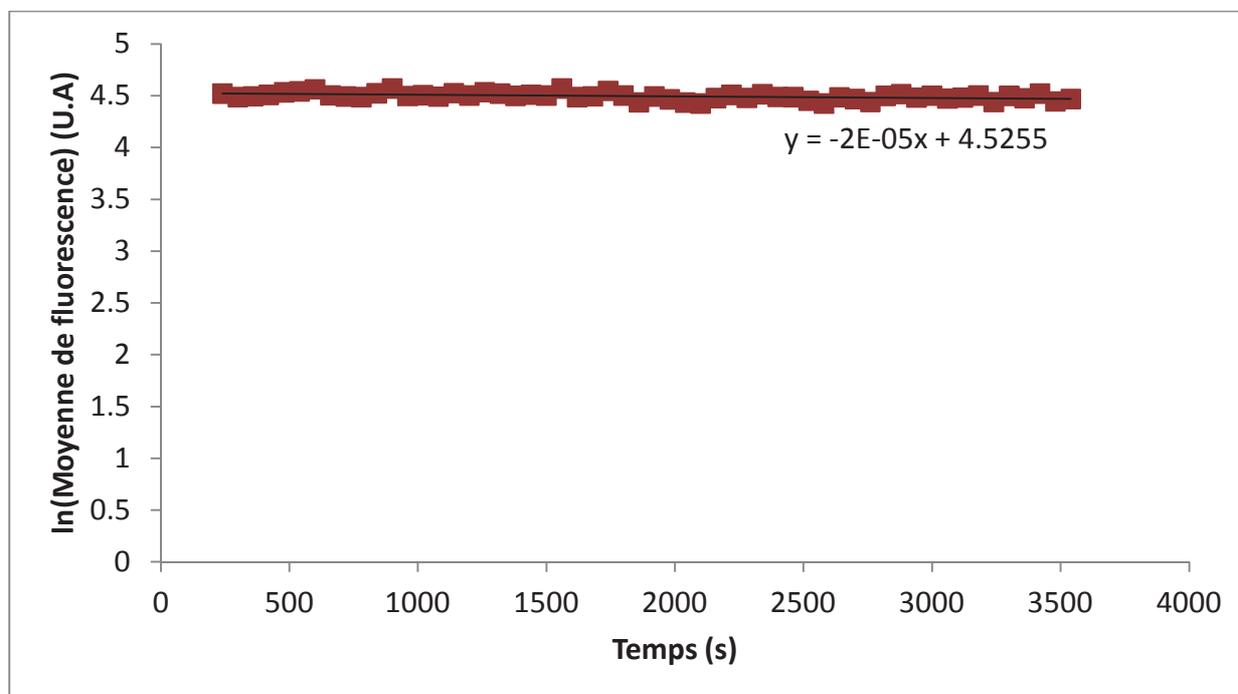


Figure 3.36 Détermination du k_{off} par linéarisation selon une loi exponentielle.

La figure 3.36 montre que la fluorescence décroît suivant une loi exponentielle dont la constante de temps vaut $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Une spécificité des réactions chimiques d'ordre 1 est que la constante de temps de la réaction peut également être exprimée sous la forme du temps nécessaire pour que la moitié de la réaction soit effectuée.

Ce temps appelé $t_{1/2}$ est égale à $\frac{\ln 2}{k}$.

$$\text{Donc } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{2 \times 10^{-5}} \approx 42\,618 \text{ s} = 11.84 \text{ h.}$$

Le $t_{1/2}$ de la réaction de dissociation est proche de 12 h, la dissociation de la protéine en présence de 2 mM Ca^{2+} est donc très lente.

La connaissance des k_{on} et k_{off} permet de calculer le K_d car comme expliqué au chapitre 1.2.2 :

$$\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_d = \frac{2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}}{[6.3 - 8.4] \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}} = [2.4 - 3.2] \times 10^{-17} \text{ M}$$

Ces valeurs sont à comparer aux valeurs de l'ordre de 10^{-15} M obtenues par Tait et collaborateurs (Tait, Gibson, et Smith 2004). Ces dernières études correspondaient à des liposomes de 110 nm de diamètre composés de 20% PS et à 1 mM Ca^{2+} . Comme je le montre plus tard au chapitre 3.3, l'affinité de l'AnxA5 pour des liposomes de petite taille est significativement plus faible que pour des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ de taille micrométrique. Par conséquent, la différence entre les valeurs obtenues dans cette étude et celle de Tait peuvent être expliquées par la différence dans les membranes utilisées.

Par contre, le K_d calculé d'après les valeurs cinétiques entre 2.4 et 3.2×10^{-17} M n'est pas en accord avec le K_d calculé d'après les données de liaison à l'équilibre à 13.0 ± 5.2 pM.

La différence pourrait s'expliquer par le fait que le système n'était pas encore à l'équilibre au moment où les données ont été mesurées et n'a donc pas de réel sens physique.

L'ensemble des résultats traitant de la cinétique et de l'équilibre de liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ fera l'objet d'un article. La détermination des constantes cinétiques de liaison de l'AnxA5 à des membranes constitue une avancée significative de notre compréhension de ce système. Toutefois l'élucidation de la nature élémentaire de l'interaction entre AnxA5 et membranes nécessite encore de préciser l'influence du Ca^{2+} .

3.3 Compétition de liaison de l'AnxA5 entre des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ et des membranes synthétiques (liposomes)

Le second objectif de mon travail de thèse était de mettre au point une méthode de quantification des microparticules plasmatiques (MP) exposant de la PS par FCM. La stratégie mise en œuvre a consisté à étudier la compétition de liaison de l'AnxA5 entre des MP et des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$. Pour mettre au point et valider cette méthode de compétition, j'ai initialement remplacé les MP par un système modèle de liposomes contenant de la PS. Deux approches complémentaires ont été étudiées, correspondant à des études de liaison à l'équilibre et en cinétique.

Dans un premier temps j'ai étudié l'influence de la présence de liposomes sur la liaison de l'AnxA5-Fluorescéine à des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ à l'équilibre.

3.3.1 Compétition de liaison à l'équilibre.

La compétition à l'équilibre est le type de compétition le plus simple à mettre en œuvre d'un point de vue expérimental. Elle consiste à mélanger des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ avec des liposomes, de l'AnxA5_B-Fluorescéine et du Ca^{2+} . Pour obtenir un effet maximal de la présence de liposomes, je choisis dans un premier temps d'incuber les liposomes avec l'AnxA5 avant d'ajouter les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$, étant donné que la constante cinétique de dissociation (k_{off}) est très lente. Un résultat typique est montré en figure 3.37.

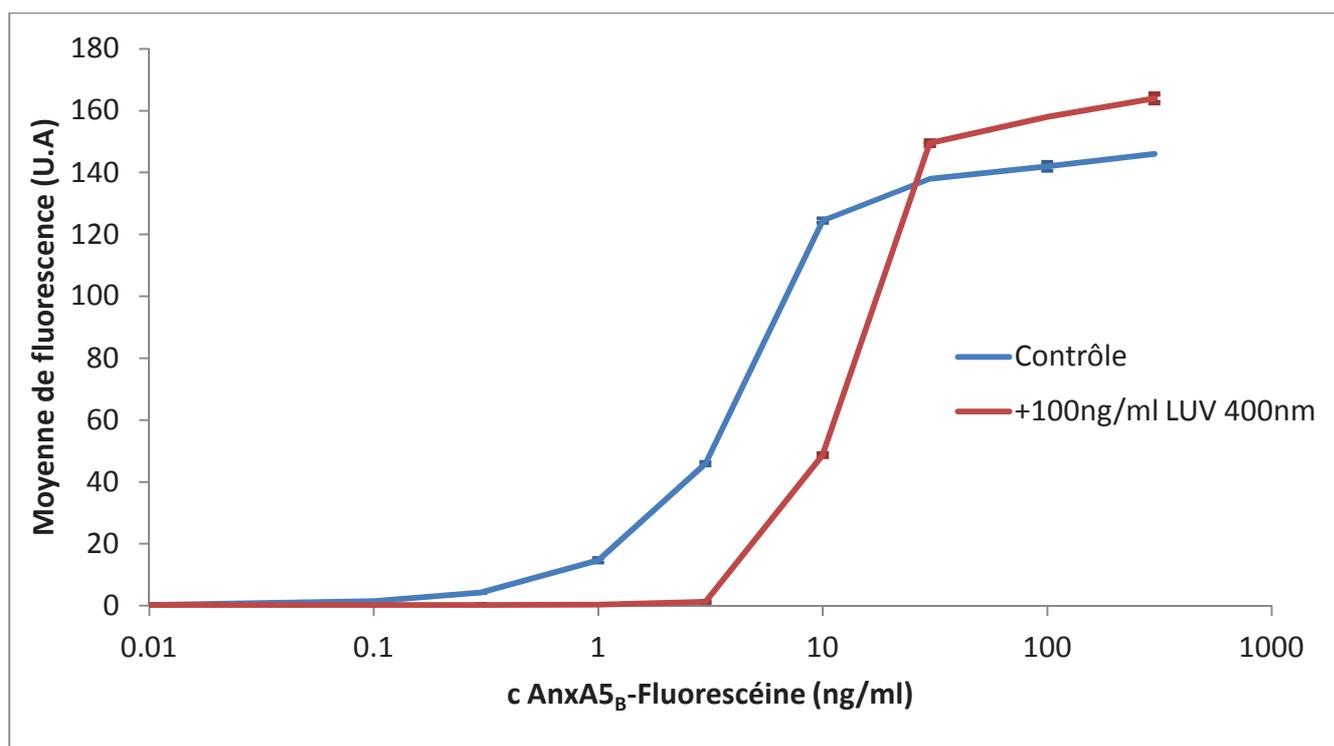


Figure 3.37 : Influence de la présence de LUV 400nm 80%DOPC 20%DOPS sur la fluorescence à l'équilibre de $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$. Chaque point représente la moyenne de deux mesures et les barres d'erreur l'écart type sur ces mesures. Les concentrations en AnxA5_B-Fluorescéine sont représentées selon une échelle logarithmique.

Les résultats présentés en figure 3.37 démontrent que la fluorescence moyenne des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est affectée par la présence de liposomes. La fluorescence moyenne des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ en présence de LUV reste nulle jusqu'à 1 ng d'AnxA5_B-Fluorescéine. Pour 3 ng et 10 ng AnxA5_B-Fluorescéine, les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ deviennent fluorescentes mais sont significativement moins fluorescentes que les contrôles correspondants. A partir de 30 ng d'AnxA5_B-Fluorescéine, la fluorescence moyenne des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ devient supérieure aux valeurs contrôles.

A faible concentration d'AnxA5, les LUV capturent l'ensemble de l'AnxA5, ce qui explique l'intensité de fluorescence quasi-nulle liée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Dans la dernière partie de la courbe, la fluorescence des échantillons en présence de LUV dépasse la valeur du contrôle ce qui est interprétée comme une liaison de LUV aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ induite par l'AnxA5_B-Fluorescéine. Cette liaison inattendue peut être expliquée par la présence de traces de dimères d'AnxA5_B résiduelles (Voir chapitre 2.9 pour les détails de la production et de la purification). La capacité de plusieurs AnxA5-Fluorescentes à lier des liposomes a été testée en QCM-D (Figure 3.38).

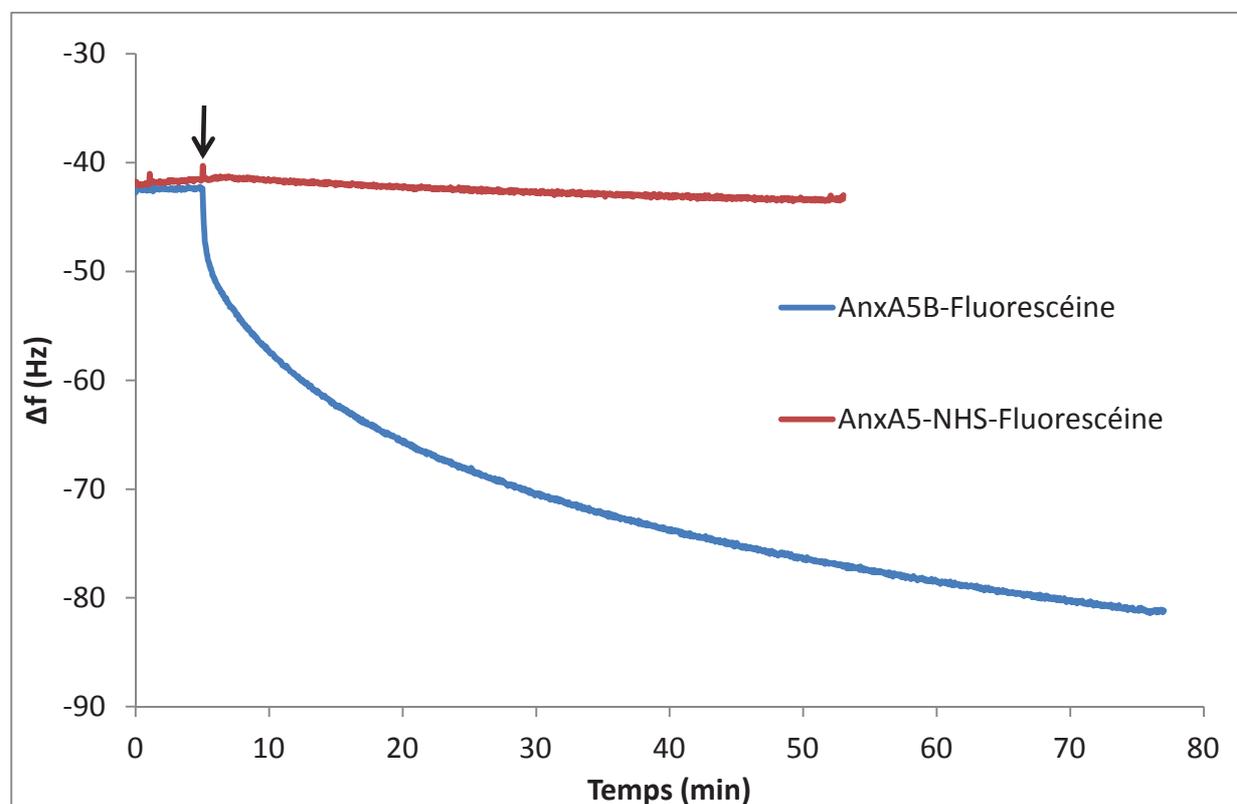


Figure 3.38 : Injection de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SUV 20%PS sur une monocouche d'AnxA5_B-Fluorescéine (courbe bleue) ou d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine (courbe rouge) déposée sur une SLB. La flèche matérialise le moment d'injection des SUV. Pour plus de clarté, la formation de la SLB et l'injection des deux AnxA5 ne sont pas représentés sur la figure.

Les résultats de QCM-D présentés en figure 3.38 montrent, dans le cas de l'AnxA5_B-Fluorescéine, une diminution de fréquence, mettant en évidence la liaison de SUV. Par contre dans le cas de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine, aucune liaison n'est observée. L'interprétation la plus directe de ces résultats est que l'AnxA5_B-Fluorescéine contient des traces de dimères d'AnxA5_B.

Les résultats de QCM-D présentés en figure 3.38 m'ont incité à tester l'utilisation d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine.

La figure 3.39 représente une expérience de compétition de liaison à l'équilibre avec de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine à la place de l'AnxA5_B-Fluorescéine, et différents types de liposomes comme compétiteurs.

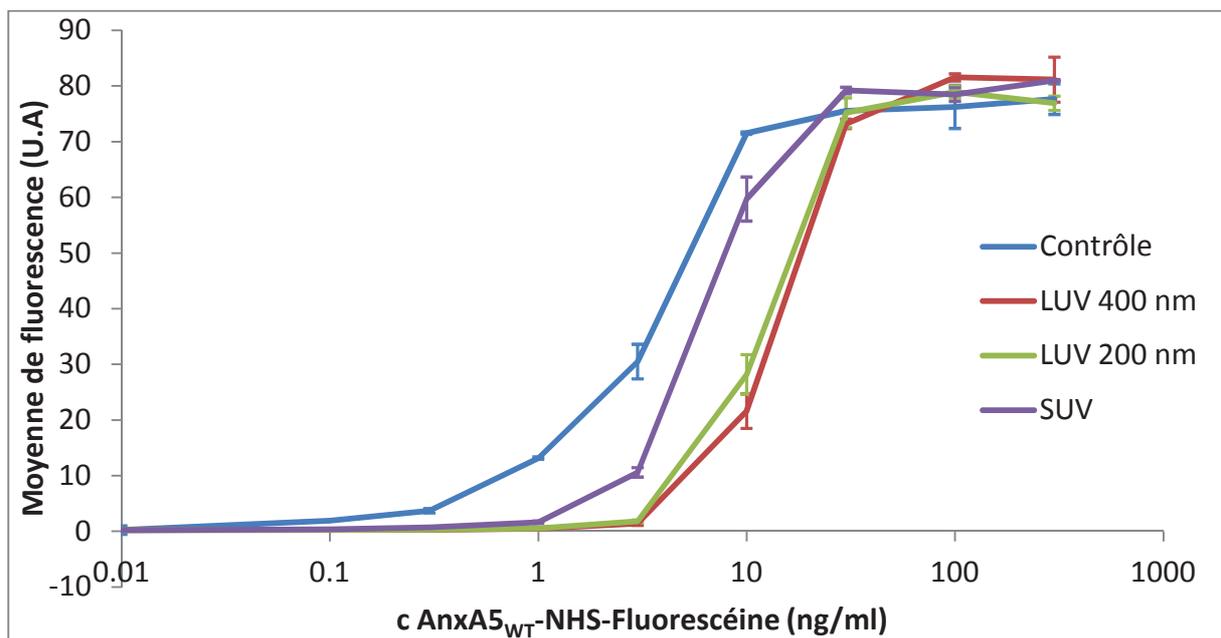


Figure 3.39 : Compétition de liaison d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine à l'équilibre. Les différents liposomes utilisés sont spécifiés dans la légende et sont utilisés à 100 ng/ml. La concentration en A5_{WT}-NHS-Fluorescéine est représentée selon une échelle logarithmique.

Dans l'expérience présentée en figure 3.39, l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine se comporte comme l'AnxA5_B-Fluorescéine aux faibles concentrations en protéines. A la différence de l'AnxA5_B-Fluorescéine, les valeurs obtenues en présence d'un excès d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine sont égales aux valeurs obtenues en absence de liposomes. Ces observations suggèrent que le comportement inattendu de l'AnxA5_B-Fluorescéine à forte concentration était dû à la présence de traces de dimères d'AnxA5_B.

Cette expérience démontre également que pour une concentration massique équivalente, l'inhibition de fluorescence dépend de la taille des liposomes utilisés. Les LUV de 200 et 400 nm ont un comportement semblable mais les SUV à concentration massique équivalente entraînent une perte de fluorescence plus faible.

Ces observations suggèrent que l'AnxA5 se lie plus faiblement à des SUV qu'à des LUV. Cette différence de comportement peut s'expliquer par une affinité plus faible de l'AnxA5 pour les surfaces fortement courbées, comme proposé par les études de Andree et collaborateurs (Andree et al. 1992).

J'ai tenté de déterminer quelle est la plus faible concentration en liposomes affectant significativement la fluorescence à l'équilibre des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$, c'est-à-dire la limite de détection de cette méthode.

Pour déterminer le seuil de détection des liposomes, une quantité fixe d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine a été incubée en présence d'une quantité variable de liposomes avant d'ajouter une quantité fixe de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Un résultat typique est présenté en figure 3.40.

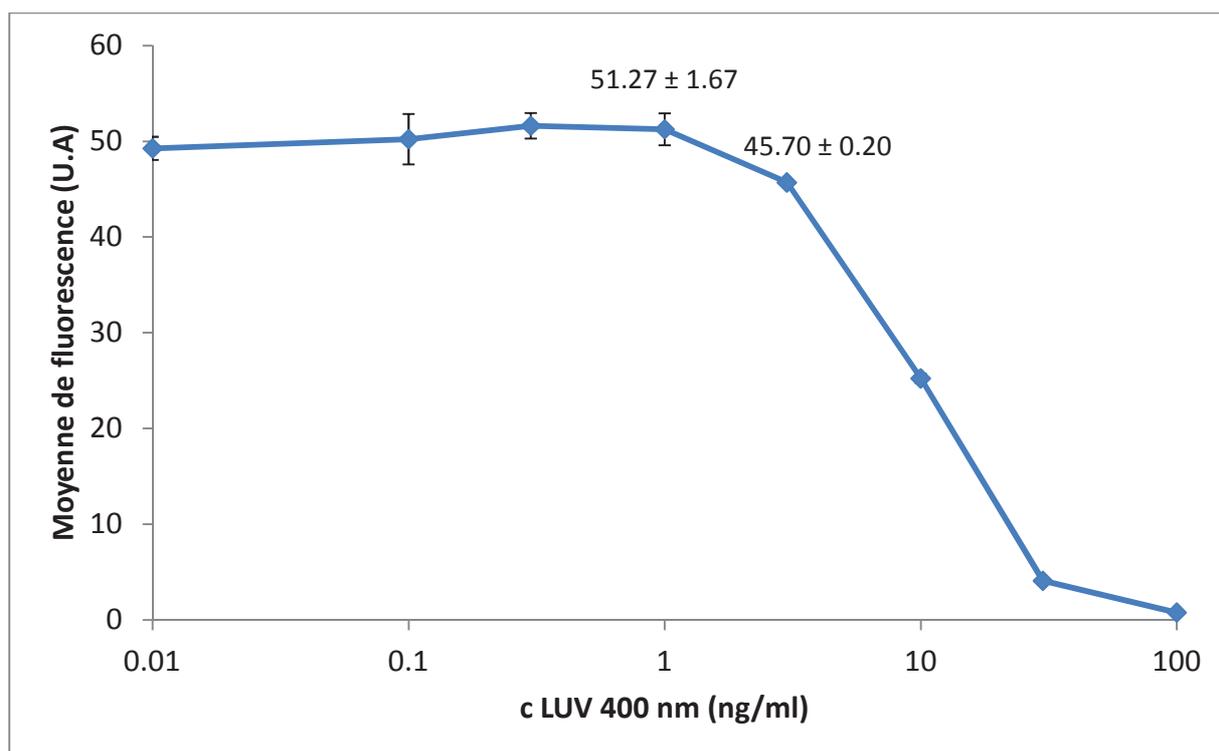


Figure 3.40 : Effet de la concentration en LUV de 400 nm sur la fluorescence à l'équilibre de 10^5 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ en présence de 1.5 ng AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine/ml. Chaque point représente la moyenne des mesures de trois échantillons indépendants et les barres d'erreur représentent l'écart type de ces mesures. La concentration en LUV est représentée selon une échelle logarithmique.

Les résultats présentés en figure 3.40 montrent que la fluorescence de 10^5 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ est significativement affectée par la préincubation de 3 ng/ml de LUV 400 nm avec 1.5 ng/ml d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine.

La fluorescence moyenne des particules décroît avec la concentration en LUV et devient quasiment nulle à 100 ng/ml de LUV. La dépendance entre la fluorescence moyenne des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et la concentration en liposomes est plus complexe qu'une dépendance linéaire comme le montre la figure 3.41.

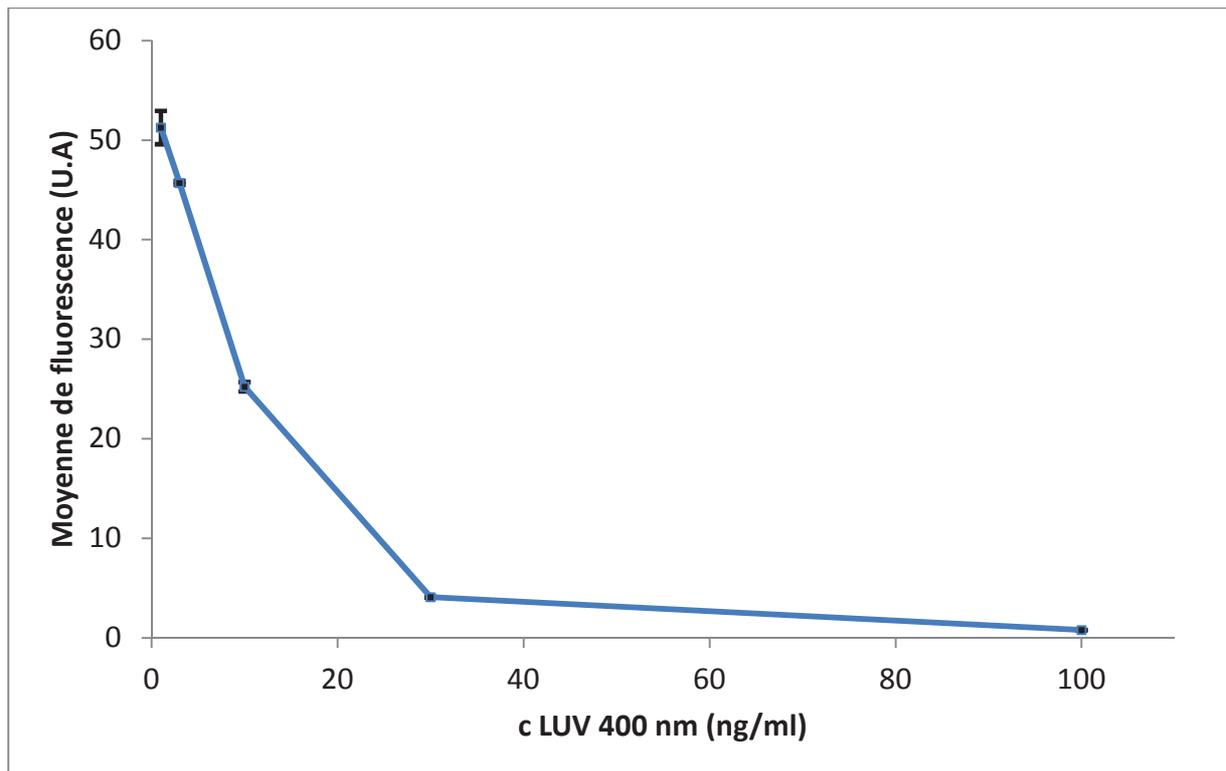


Figure 3.41 : Détail de la figure 3.40 où seules les concentrations entre 1 et 100 ng/ml en LUV sont représentées. L'échelle de concentration en liposomes est linéaire dans ce cas. La décroissance de la fluorescence avec la concentration en liposomes peut être décrite par deux demi-droites.

Pour déterminer avec exactitude la dépendance entre fluorescence à l'équilibre et concentration en liposomes, il faudrait tester plus de concentrations en liposomes mais ce n'était pas l'objectif de l'expérience. La figure 3.41 montre une dépendance linéaire entre concentration en LUV 400 nm et moyenne de fluorescence entre 1 et 10 ng/ml de LUV. Si la dépendance était parfaitement connue, alors ce type d'expérience permettrait de doser des solutions de liposomes dans une gamme de concentration d'une dizaine de nanogrammes par millilitre. Par comparaison, ce type de test est au moins 100 fois plus sensible que le dosage des phospholipides par le dosage du phosphate selon la méthode de Rouser et collaborateurs (Rouser, Fleischer, et Yamamoto 1970).

L'inconvénient majeur de ce test est le temps d'interaction, plusieurs heures, nécessaire à la réaction des liposomes avec l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine ainsi que le temps d'interaction de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine avec les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$. La méthode est donc sensible mais n'est pas rapide.

Pour tenter d'obtenir un dosage sensible et rapide de liposomes, j'ai étudié dans une deuxième étape, la compétition de liaison de l'AnxA5 et de liposomes en cinétique.

3.3.2 Compétition de liaison en cinétique

Comparativement aux compétitions de liaison à l'équilibre, les compétitions de liaison en cinétique sont beaucoup plus contraignantes sur un plan expérimental car les cinétiques sont induites manuellement. La compétition de liaison en cinétique peut être envisagée de deux manières différentes. La compétition peut être effectuée en mélangeant les liposomes, l'AnxA5 et les $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ puis en induisant la liaison par l'ajout de Ca^{2+} ; j'appellerai ce type d'approche une compétition aléatoire car la protéine peut se lier aux liposomes ou aux $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$, la probabilité de liaison étant alors affectée à la fois par l'affinité relative de l'AnxA5 pour les deux types de membranes et par leurs concentrations relatives. Cette première approche permet d'éviter les temps d'incubation. La compétition peut également être effectuée en incubant dans un premier temps l'AnxA5 et les liposomes en présence de Ca^{2+} , puis en rajoutant des $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB}$ et en suivant la cinétique de liaison. Cette seconde approche, que j'appellerai une compétition séquentielle, implique un temps d'attente de une à deux heures mais peut apporter un bénéfice en termes de sensibilité.

Un exemple de résultat obtenu par compétition aléatoire avec des SUV est présenté en figure 3.42.

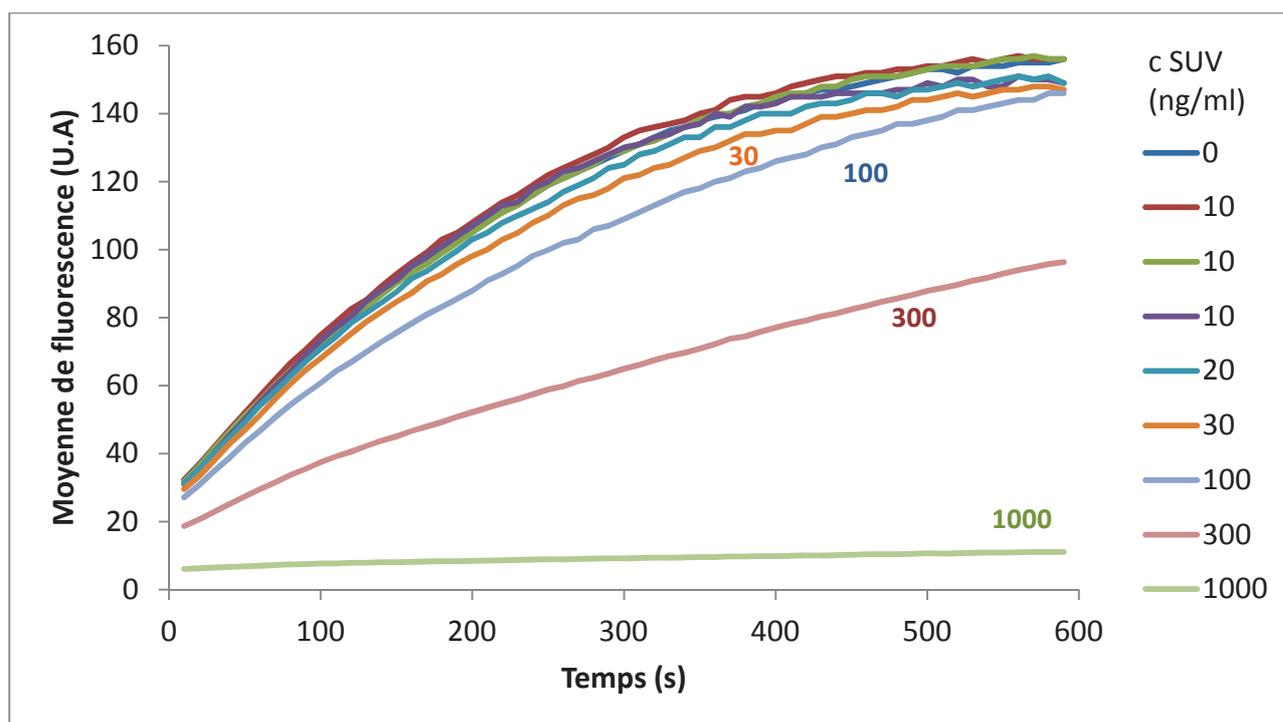


Figure 3.42 : Compétition pour la liaison de 30 ng/ml d'AnxA5_B-Fluorescéine entre des SUV et des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6/\text{ml}$, en compétition aléatoire.

Dans cette expérience, la cinétique de liaison de l'AnxA5 a été mesurée pendant 10 minutes soit en absence de SUV soit en présence de SUV et en triplicat pour le point à 10ng/ml de SUV. La cinétique de liaison de l'AnxA5_B-Fluorescéine est affectée par la concentration en SUV comme le montre la courbe à 1 $\mu\text{g/ml}$ de SUV. La sensibilité de cette méthode semble se situer vers 30 à 100 ng/ml de SUV dans ces conditions expérimentales. Il aurait fallu répliquer ces points pour déterminer la sensibilité avec précision. La compétition aléatoire est au moins dix fois moins sensible que la compétition à l'équilibre pour une expérience de deux heures contre douze pour la compétition à l'équilibre. Je tiens à souligner le fait que cette expérience a été effectuée avec de l'AnxA5_B-Fluorescéine et des SUV c'est-à-dire des conditions dans lesquelles la sensibilité doit être la plus faible.

J'ai répété l'expérience en utilisant de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine et des LUV 400nm comme compétiteurs (Figure 3.43).

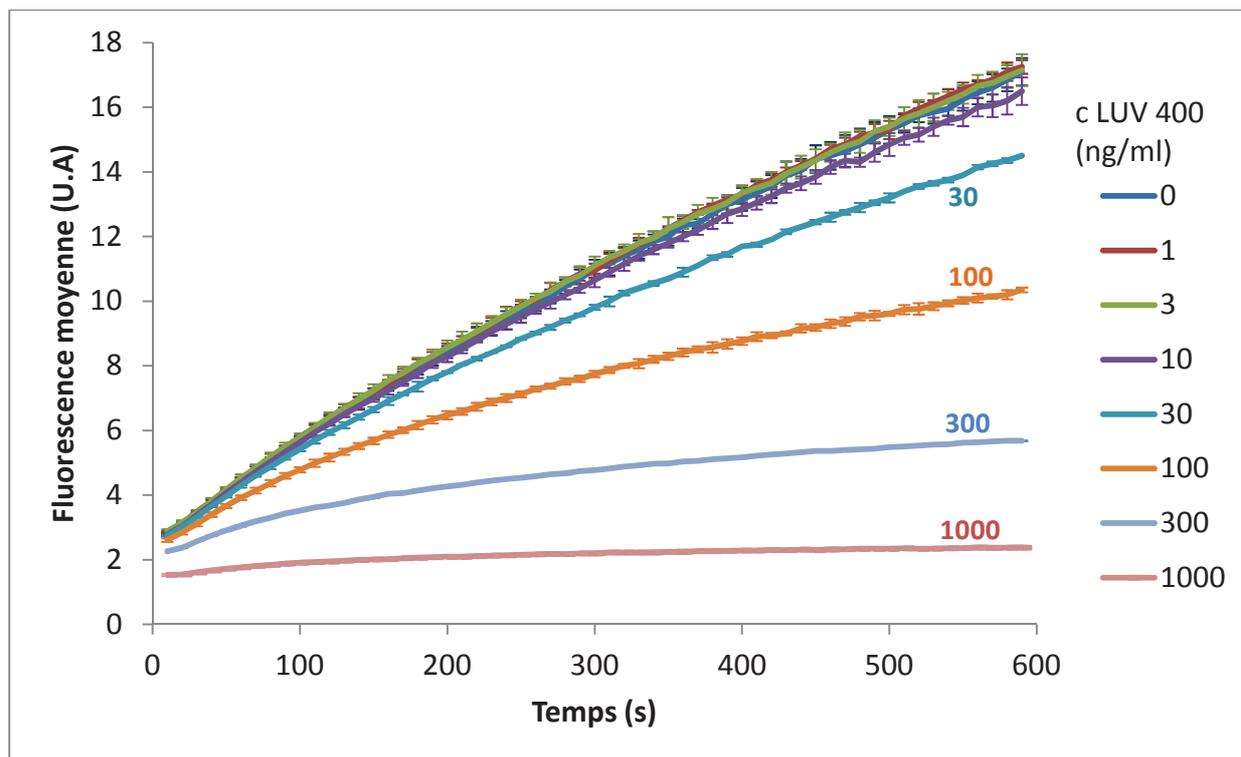


Figure 3.43 : Compétition pour la liaison de 5 ng/ml d'AnxA5NHS-Fluorescéine entre des LUV 400 et de $10^6 \mu\text{PSiO}_2\text{@SLB/ml}$, en compétition aléatoire de liaison. Chaque courbe représente la moyenne des fluorescences de deux échantillons indépendants et les barres d'erreur les écarts types correspondants à ces mesures.

L'expérience présentée en figure 3.43 a été effectuée dans des conditions où la variation de fluorescence inter échantillon peut être mesurée. Une quantité de 30ng/ml de LUV 400 affecte significativement la cinétique de liaison de l'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine sur un enregistrement de dix minutes. La différence entre la valeur contrôle et le point à 10ng/ml en LUV 400 étant du même ordre de grandeur que la somme des incertitudes sur la mesure de fluorescence à 10 ng/ml en LUV et en absence de LUV, je considère que la différence n'est pas significative.

La limite de sensibilité de la méthode est donc comprise entre 10 et 30 ng/ml.

Toutefois s'il existe une différence visible au niveau des cinétiques, une approche analytique permettant de quantifier cette différence a été envisagée.

Pour quantifier la différence entre ces courbes, il serait en principe possible de les décrire complètement comme cela a été présenté pour les cinétiques de liaison directes de l'AnxA5 sur les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Pour simplifier l'analyse, j'ai décidé d'analyser les vitesses initiales de liaison de l'AnxA5 sur les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. La figure 3.44 représente cette analyse appliquée aux données présentées en figure 3.43.

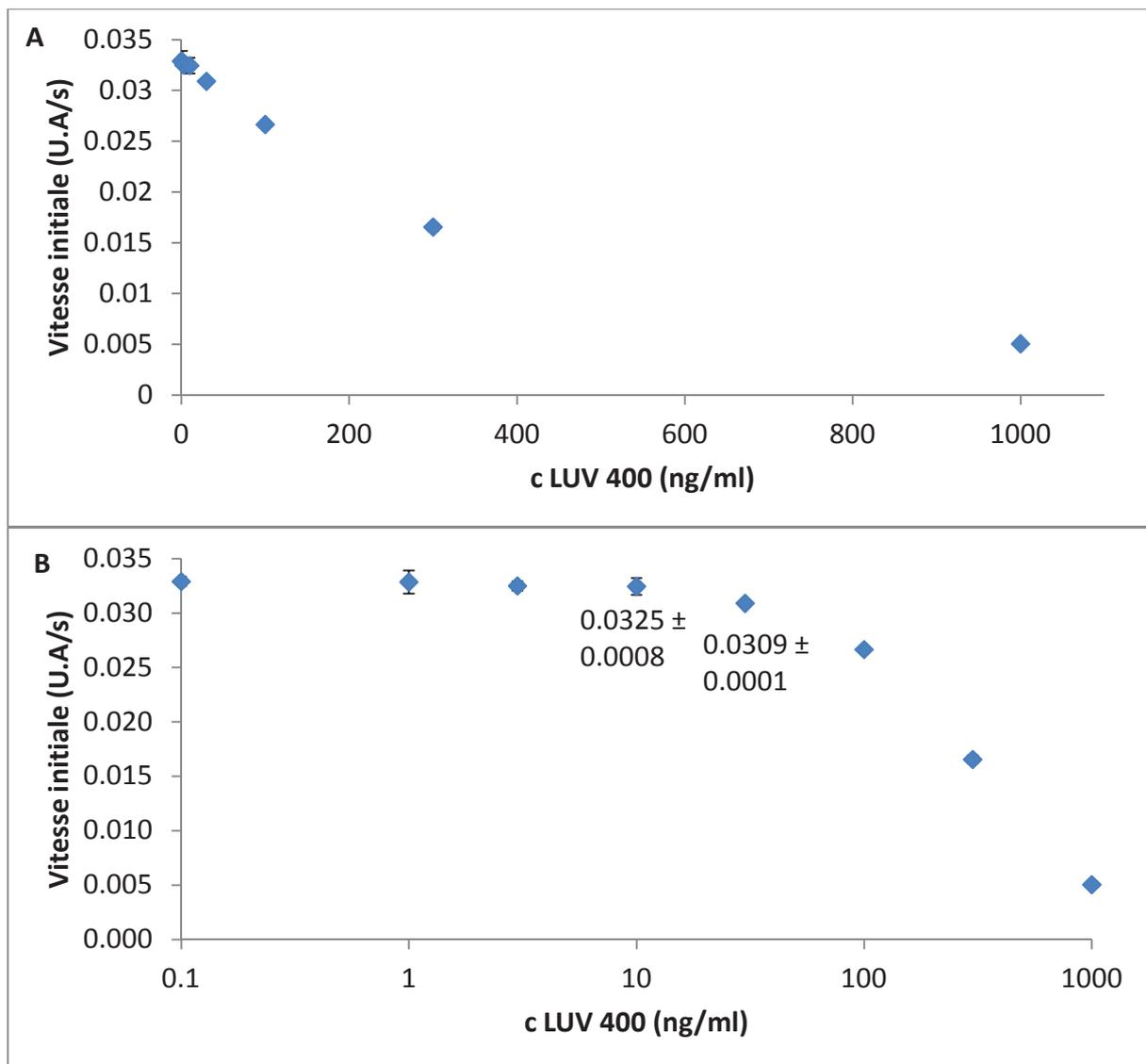


Figure 3.44 : Analyse de la vitesse initiale de liaison dans le cas de la compétition aléatoire présentée à la figure 3.43. La vitesse initiale est mesurée sur les 50 premières secondes d'acquisition. A) concentration en LUV selon une échelle linéaire et B) selon une échelle logarithmique.

La figure 3.44 A montre que la concentration en LUV 400 nm influence la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5. La vitesse initiale de liaison est proportionnelle à la concentration en LUV jusqu'à 300 ng/ml LUV. La figure 3.44 B permet de déterminer la concentration minimale en LUV affectant la vitesse initiale de liaison. La différence de vitesse initiale est significativement affectée à partir de 30 ng/ml de LUV avec une vitesse initiale de $(30.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ U.A/s contre $(32.9 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ U.A/s pour le contrôle. J'ai testé différentes variations sur ce protocole en diminuant les concentrations en AnxA5 et en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ pour tenter d'améliorer la sensibilité du test, sans que cela ait un effet significatif sur le seuil de détection.

Dans le cas d'une compétition de liaison aléatoire, l'analyse des vitesses initiales de liaison permet le dosage de LUV dans une gamme comprise entre 30 ng/ml et plus de 300 ng/ml, à partir d'acquisitions d'une minute environ et sans temps d'incubation entre la préparation de l'échantillon et la mesure. Par comparaison et dans des conditions similaires, la mesure de fluorescence à l'équilibre apporte un gain de sensibilité d'un facteur 10 pour environ 8 heures d'incubation.

J'ai cherché à déterminer si la composition lipidique influence également la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5. Les résultats présentés figure 3.38 montrent que pour une même composition lipidique et à concentration massique équivalente, les LUV produisent un signal plus important que les SUV. J'ai donc comparé la compétition aléatoire entre des LUV composées de 20% de PS et des SUV de 30 et 50% de PS (Figure 3.45)

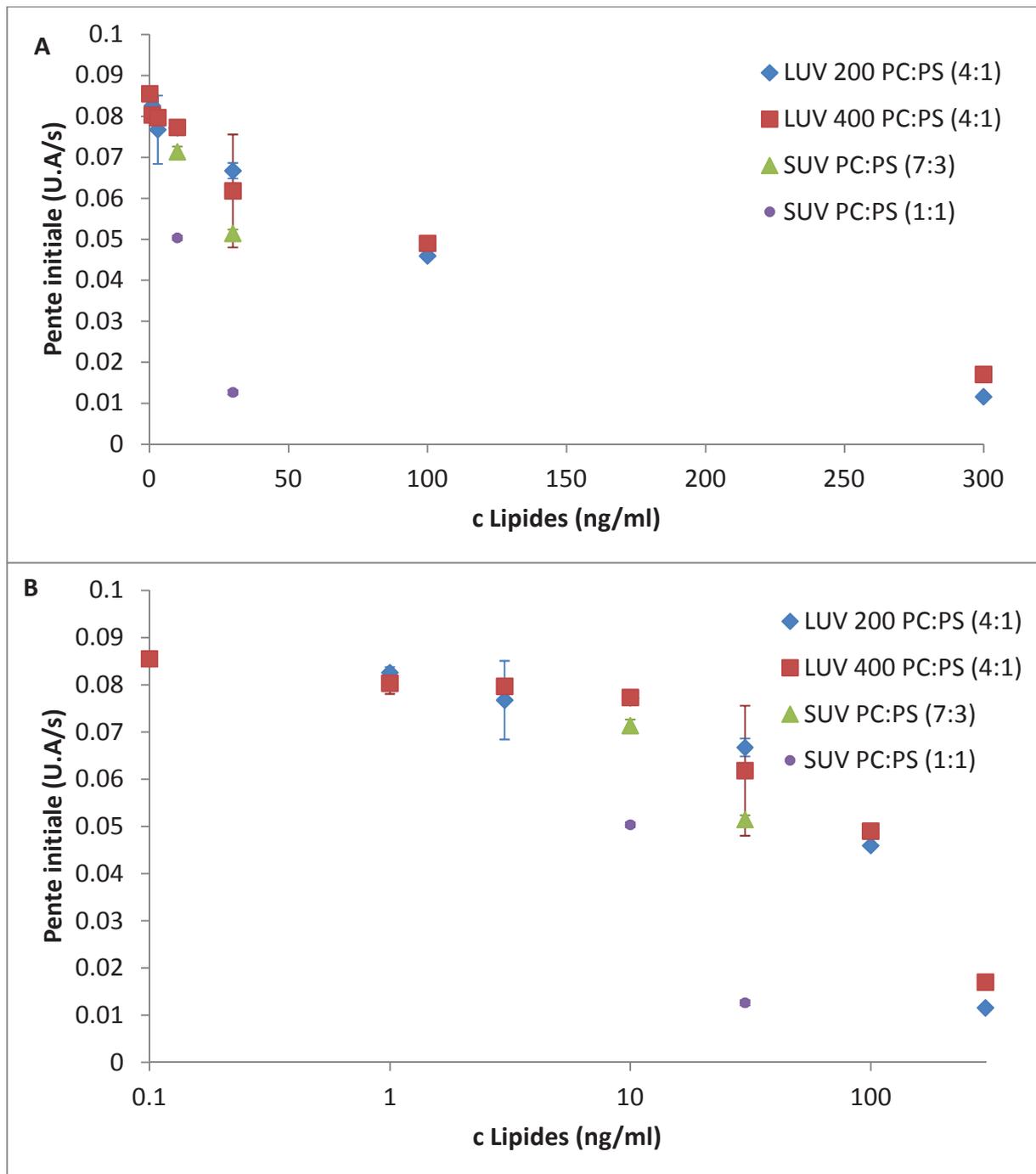


Figure 3.45 : Influence de la composition lipidique des liposomes sur la vitesse initiale de liaison d'AnxA5 10 ng/ml à des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6$ /ml par mesure de compétition en aléatoire. (A), concentration en lipides selon une échelle linéaire et (B), selon une échelle logarithmique.

Les résultats présentés en figure 3.45 montrent que la vitesse initiale de liaison est influencée par la composition lipidique des liposomes. La vitesse de liaison diminue lorsque le taux de PS augmente. 30 ng de SUV contenant 50% de PS induisent une diminution de vitesse initiale de liaison de plus de 80%. Ceci est d'autant plus remarquable que comme montré précédemment (Figure 3.39), l'AnxA5 se lie moins à des liposomes de faible diamètre. La définition de la limite de sensibilité d'un test de détection de liposomes ou de MP doit donc tenir compte à la fois de la composition lipidique et de la taille des liposomes utilisés. Dans cette étude, les liposomes utilisés sont composés de 20% de PS afin d'être proche de la composition lipidique des membranes biologiques humaines.

Examinons maintenant la compétition séquentielle de liaison. Cette solution est considérée comme intermédiaire entre la compétition cinétique et la compétition à l'équilibre, car elle nécessite un temps intermédiaire d'interaction entre les liposomes et l'AnxA5.

Le principe de la compétition séquentielle de liaison est le suivant : dans un premier temps les liposomes sont incubés avec l'AnxA5 pendant plusieurs heures. Puis des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont ajoutées et la cinétique de liaison est mesurée. Comme montré précédemment, la cinétique de liaison de l'AnxA5 sur les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est directement reliée à la concentration en AnxA5 libre. En préincubant les liposomes et l'AnxA5 en présence de Ca^{2+} la concentration en AnxA5 libre diminue ce qui se traduit par une diminution de la vitesse initiale de liaison aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Les μPSiO_2 vont lier l'AnxA5 libre puis l'AnxA5 liée aux liposomes va se dissocier lentement (à cause de la valeur du k_{off}) et le système atteindra la même configuration que dans le cas d'une compétition à l'équilibre. Donc à concentration équivalente en liposomes, la cinétique de liaison devrait être plus affectée en compétition de liaison séquentielle qu'en compétition de liaison aléatoire.

Dans le cas des compétitions séquentielles de liaison, j'ai utilisé une AnxA5_B couplée au fluorophore Cy5 en combinaison avec des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ contenant 1% de NBD-PE. Le

NBD-PE permet d'identifier les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ en combinant la diffusion de la lumière et la fluorescence. Pour ces expériences, il est préférable d'utiliser l'AnxA5_B-Cy5 de manière à dissocier le signal des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ du signal de liaison de la protéine.

Dans un premier temps je présenterai une expérience comparant une cinétique de compétition aléatoire à une cinétique de compétition séquentielle. Les résultats sont présentés en figure 3.46.

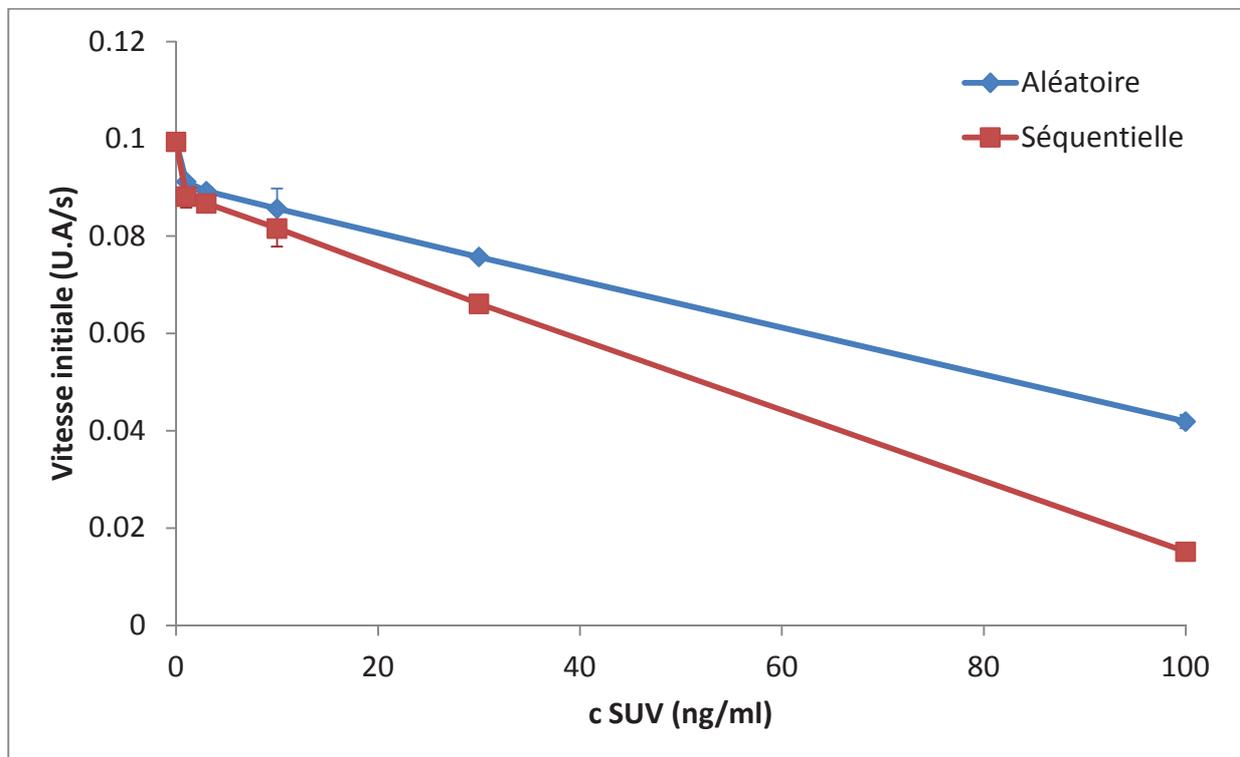


Figure 3.46 : Comparaison des compétitions cinétiques aléatoire et séquentielle réalisées à partir de 10 ng/ml AnxA5_B-Cy5 et 10⁶ $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ /ml. Les vitesses initiales de liaison sont comparées.

Les résultats présentés en figure 3.46 montrent que la compétition séquentielle donne, à concentration égale, une réduction de vitesse supérieure à la compétition aléatoire. La valeur de la pente de régression linéaire (non présentée) est en valeur absolue, 50% plus importante pour la compétition séquentielle que pour la compétition aléatoire.

La compétition cinétique séquentielle permet donc d'améliorer la sensibilité au prix d'un temps expérimental de quelques heures.

J'ai testé la compétition séquentielle avec pour objectif de déterminer le seuil de sensibilité de cette méthode (Figure 3.47).

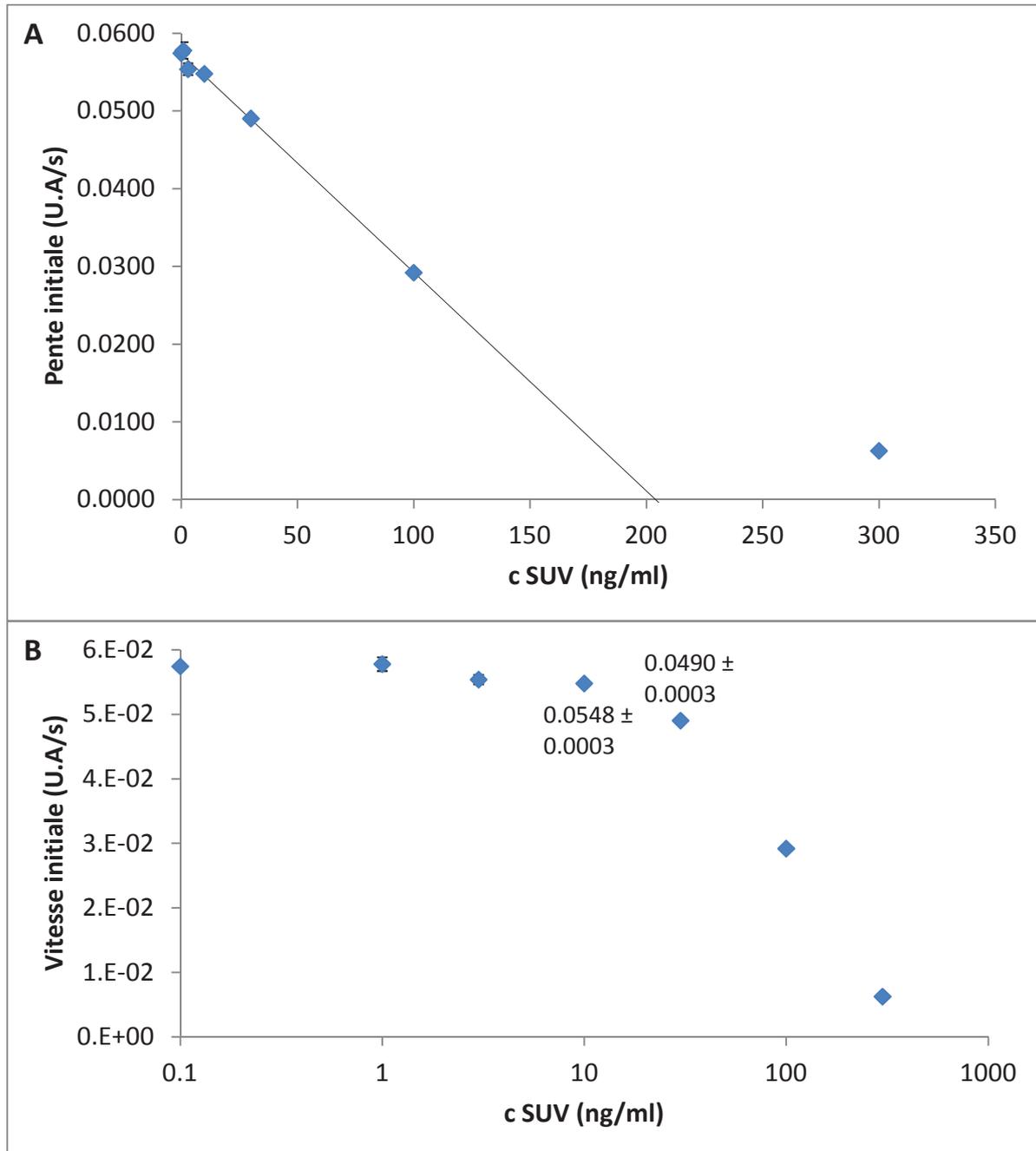


Figure 3.47 : Analyse des vitesses initiales de liaison en compétition de liaison séquentielle pour 10 ng/ml AnxA5_B-Cy5 et 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml. La concentration en lipides est représentée selon une échelle linéaire (A) et selon une échelle logarithmique (B).

Les résultats présentés en figure 3.47 B montrent que la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5_B-Cy5 est significativement affectée à partir de 30 ng/ml en SUV avec une vitesse de 0.0490 ± 0.0003 U.A/s contre 0.0574 ± 0.0003 U.A/s pour le contrôle. La figure 3.47 A montre que la vitesse initiale de liaison est proportionnelle à la concentration en SUV dans une certaine gamme de concentration, le point à 300 ng/ml en SUVs s'écartant significativement de la droite de proportionnalité.

La sensibilité de cette méthode (exprimée en concentration massique en lipides) est donc comparable à la sensibilité de la compétition aléatoire. Toutefois il faut prendre en compte que la compétition séquentielle a été effectuée avec des SUV et non des LUV comme pour la compétition aléatoire. Or, comme le montrait la figure 3.38, la détection de SUV est moins sensible que la détection de LUV. La compétition séquentielle est donc probablement plus sensible que la compétition aléatoire. Il serait nécessaire de réaliser une expérience de compétition séquentielle de liaison avec des LUV pour valider cette hypothèse.

En résumé les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que la liaison de l'AnxA5 sur les $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ est affectée par la présence de liposomes contenant de la PS, permettant ainsi de créer une méthode de dosage des lipides par FCM. Le dosage peut être effectué selon plusieurs modalités nécessitant des temps variables avec une limite de détection de l'ordre de 10 à 100 ng de lipides/ml. Le résultat du dosage, dépendant de la taille des liposomes utilisés et de leur composition lipidique, nécessite pour être quantitatif de tenir compte de ces deux paramètres lors de la calibration.

L'objectif de mon travail étant de mettre au point une méthode de dosage des microparticules plasmatiques exposant de la PS, j'ai donc appliqué à des échantillons de plasma humain les méthodes mises en œuvre pour le dosage des liposomes.

3.4 Liaison de l'AnxA5 aux plaquettes et aux microparticules plasmatiques, déterminée par FCM

Comme indiqué au chapitre 1, l'un des objectifs de ma thèse est de développer une méthode de dosage des microparticules plasmatiques exposant de la PS, par FCM. Les résultats du chapitre 3.3 ont montré que la FCM permet de doser les liposomes contenant de la PS, en étudiant la liaison de l'AnxA5 à des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Il reste à prouver que cette méthode de dosage des liposomes est adaptable à des microparticules plasmatiques. Cette question n'est pas anodine car la littérature concernant les microparticules ne statue pas de manière définitive sur leur composition lipidique ou sur leur capacité à lier l'AnxA5 (Connor et al. 2010).

3.4.1 Liaison de l'AnxA5 aux plaquettes non activées et activées

L'AnxA5 est un outil communément utilisé pour étudier l'activation plaquettaire, car l'activation plaquettaire implique l'exposition de PS (Thiagarajan et Tait 1990; Dachary-Prigent et al. 1993). Pour me familiariser avec cette thématique plus hématologique que biochimique, j'ai commencé à travailler sur des plaquettes issues d'un PRP et sur leur marquage à l'AnxA5 par FCM. La figure 3.47 présente une analyse de plaquettes non activées et activées par FCM.

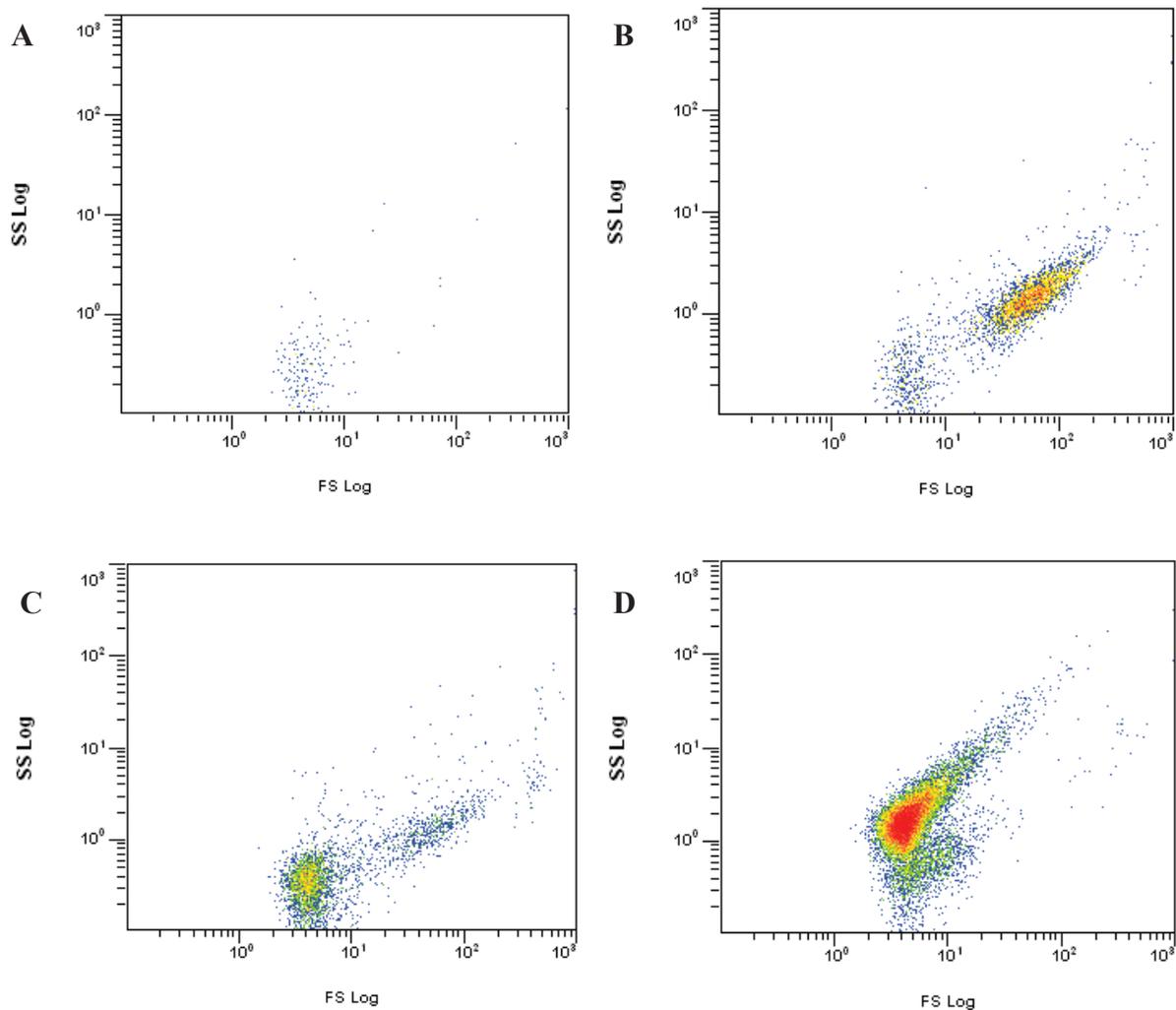


Figure 3.48 : Plaquettes non activées (B) et activées (C et D) 10^5 /ml, analysées par FCM. Les résultats sont présentés sous forme de density plots. A) Tampon. B) Plaquettes non activées. C) Plaquettes activées par 0.5 U/ml de thrombine. D) Plaquettes activées par 50 μ M d'ionophore A23187.

La FCM mesure les intensités relatives de diffusion de la lumière, j'ai donc choisi de présenter le signal produit par le tampon seul, présenté en figure 3.48 A). La figure 3.48 B) présente le signal de plaquettes non activées diluées en tampon. La comparaison avec la figure 3.48 A) permet d'identifier un massif de points clairement distinct du signal du tampon et identifié comme le signal propre aux plaquettes. Comparativement à des microsphères de silice, les plaquettes donnent un signal de diffusion beaucoup plus dispersé.

Les plaquettes ont été activées à la thrombine ou avec un ionophore à Ca^{2+} (A23187). L'activation des plaquettes à la thrombine est sans doute plus proche des conditions d'activation physiologique quoique l'activation implique une augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} , de même que l'activation à l'ionophore. Les plaquettes activées présentées en figures 3.48 C) et D) présentent des propriétés de diffusion de la lumière modifiées par rapport au contrôle figure 3.48 B). Ce résultat est en accord avec la littérature (Dachary-Prigent et al. 1993). Dans le cas de l'activation à la thrombine (figure 3.48 C), certains événements restent dans la région correspondant aux plaquettes mais la majorité est confondue avec la région contenant le signal du tampon seul, figure 3.48 A). Pour l'activation à l'ionophore, toutes les plaquettes ont été transformées en des objets dont les propriétés de diffusion de la lumière sont similaires au tampon.

La diffusion de la lumière permet d'identifier sans ambiguïté les plaquettes non activées. Dans le cas des plaquettes activées leur signal est partiellement confondu avec le signal du tampon. L'analyse de ces objets nécessite l'utilisation d'un marqueur fluorescent pour les distinguer du signal du tampon. Pour l'analyse des plaquettes par FCM, j'ai utilisé un anticorps anti-CD41 couplé à la phycoérythrine (PE). Le marqueur CD41 correspond à la glycoprotéine IIb (GPIIb) qui constitue avec la GPIIIa le récepteur au fibrinogène présent à la surface des plaquettes.

Un exemple d'analyse de plaquettes non activées marquées à l'anti-CD41-PE est présenté en figure 3.49.

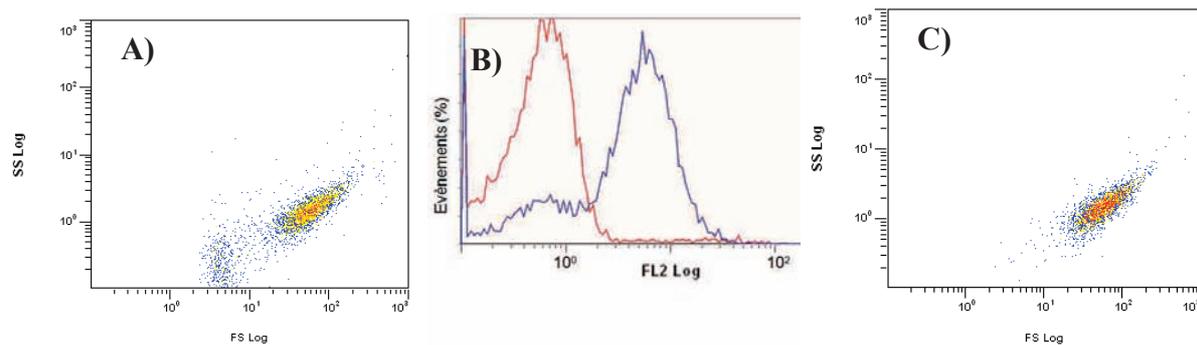


Figure 3.49 : Plaquettes non activées marquées à l’anti-CD41-PE. A) Density plot FS vs SS appliqué sur les données brutes. B) Superposition d’histogrammes de fluorescence d’échantillons de plaquettes marquées à l’anti-CD41-PE (histogramme bleu) et avec un anticorps-PE non spécifique (histogramme rouge). C) Density plot FS vs SS appliqué sur les éléments marqués au CD41.

La figure 3.49 montre que le marquage à l’anti-CD41-PE permet d’éliminer le signal du tampon. J’ai ensuite étudié le marquage à l’AnxA5_B-Fluorescéine des éléments marqués à l’anti-CD41-PE (Figure 3.50).

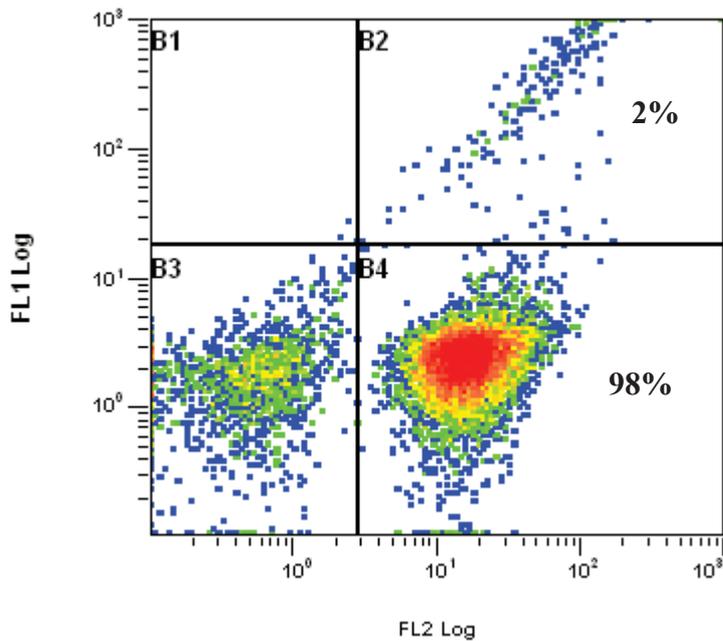


Figure 3.50 : Density plot représentant la fluorescence AnxA5_B-Fluorescéine (FL1) vs anti-CD41-PE (FL2) correspondant à un échantillon de plaquettes non activées.

Les résultats présentés en figure 3.50 montrent la présence de trois populations d'objets différant par leur fluorescence. La population notée B3 correspond au signal du tampon, la population B4 correspond à des plaquettes ne liant pas l'AnxA5 et la population B2 à des plaquettes marquées à l'AnxA5. La population de plaquettes marquées à l'AnxA5 représente (2.0 ± 0.5)% de la population des plaquettes totales. Ce résultat est en accord avec la littérature (Thiagarajan et Tait 1990) et signifie soit que le sang contient un faible pourcentage des plaquettes activées, soit que la préparation de l'échantillon induit l'activation d'un faible nombre de plaquettes.

Pour résoudre cette question, j'ai marqué des plaquettes non activées et activées à l'aide de concentrations variables en AnxA5_B-Fluorescéine (Figure 3.51).

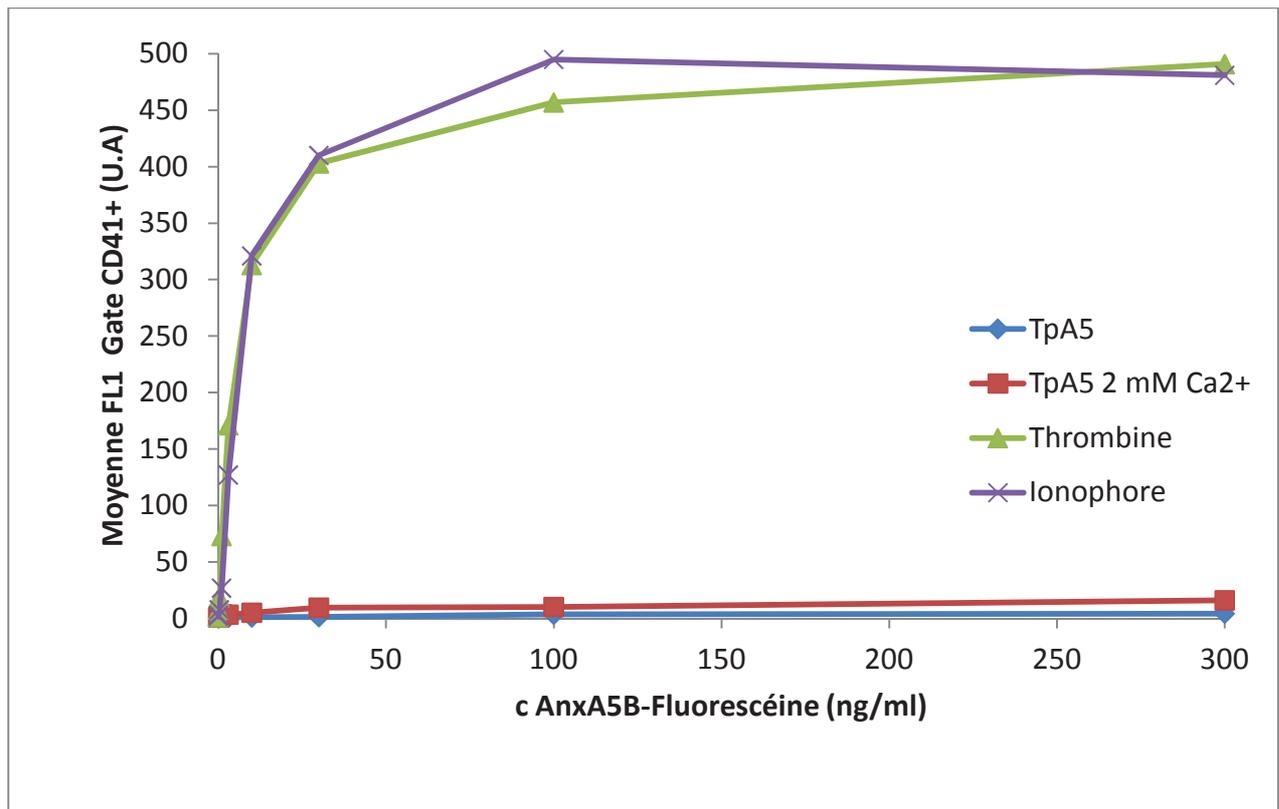


Figure 3.51 : Marquage de plaquettes non activées et activées (10^5 /ml) avec une gamme de concentration en AnxA5_B-Fluorescéine. Bleu) Plaquettes non activées TpA5 0 mM Ca²⁺. Rouge) Plaquettes non activées TpA5 2 mM Ca²⁺. Vert) Plaquettes activées par 0.5 U/ml de Thrombine en TpA5 2 mM Ca²⁺. Violet) Plaquettes activées par 50 μ M d'A23187 en TpA5 2 mM Ca²⁺.

Les résultats présentés en figure 3.51 indiquent que les plaquettes non activées lient une faible quantité d'AnxA5 (comparer les points bleus aux points rouges). Cependant seul un faible pourcentage (2.0 ± 0.5)% des plaquettes non activées lient l'AnxA5, comme le montre la figure 3.50. Le signal des plaquettes activées est beaucoup plus important que le signal des plaquettes non activées, quel que soit le mode d'activation des plaquettes. Jusqu'à 10 ng d'AnxA5/ml, la fluorescence moyenne des plaquettes semble proportionnelle à la concentration en protéines. A partir de 30 ng/ml, la mesure s'écarte de la droite de proportionnalité, puis à partir de 100 ng/ml la fluorescence atteint un plateau.

Cette expérience est informative car elle démontre que la liaison de l'AnxA5 aux plaquettes activées est saturable comme dans le cas de la liaison aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ ou aux liposomes. Si les microparticules se comportent comme des plaquettes activées, alors leur quantification est parfaitement envisageable.

Etant donné que les plaquettes activées lient l'AnxA5, j'ai étudié l'influence de leur présence sur la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$. Dans l'expérience suivante j'ai incubé des échantillons contenant une quantité fixe de plaquettes activées avec des quantités variables d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine jusqu'à l'équilibre avant de rajouter des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ en concentration fixe. La fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est ensuite mesurée à l'équilibre (Figure 3.52).

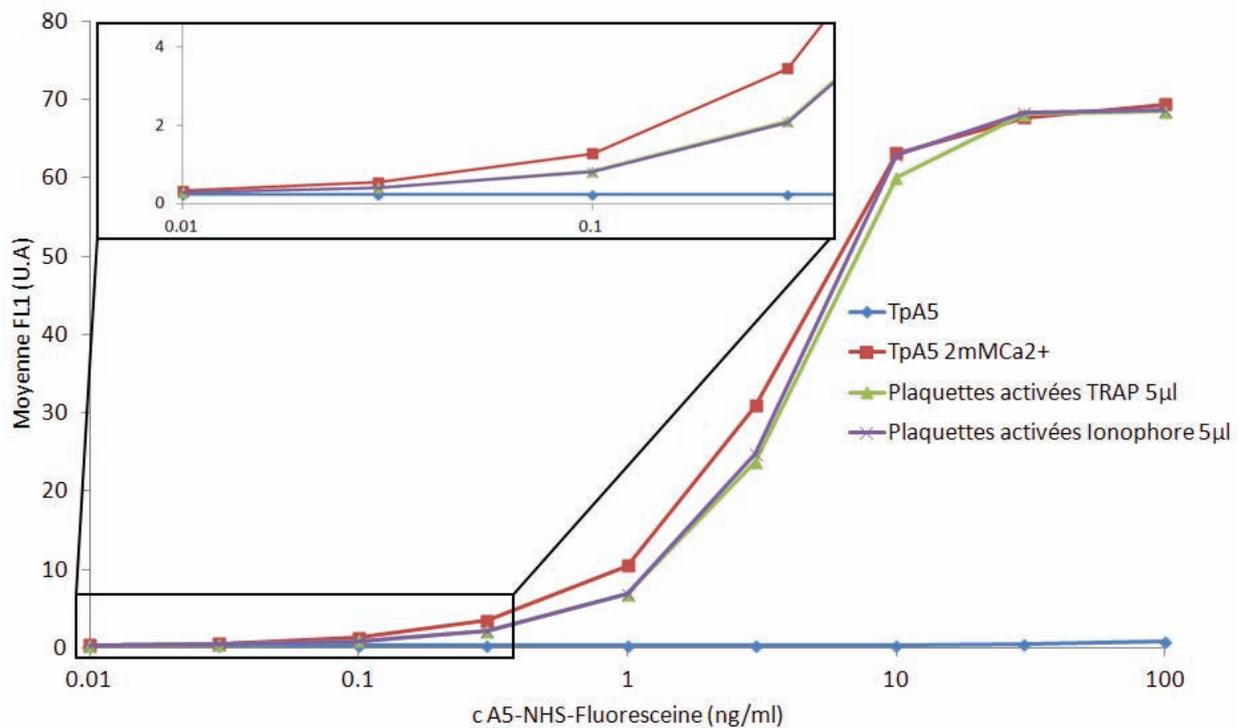


Figure 3.52 : Compétition de liaison à l'équilibre d'AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine entre des plaquettes activées et des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ 10^6 ml.

Les données présentées en figure 3.52 montrent l'influence de la présence de plaquettes activées sur la fluorescence associée à $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ pour différentes concentrations en AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine. Jusqu'à 10 ng/ml en AnxA5, la fluorescence des échantillons contenant des plaquettes activées est inférieure en moyenne de $(32 \pm 7)\%$ au contrôle correspondant et il n'y a pas de différence de comportement entre les plaquettes activées au peptide TRAP ou à l'ionophore. Pour 30 et 100 ng/ml en AnxA5, les résultats sont identiques entre les échantillons contenant des plaquettes activées et le contrôle. La diminution de fluorescence jusqu'à 10 ng/ml en AnxA5_{WT}-NHS-Fluorescéine est due à la liaison d'une partie de l'AnxA5 aux plaquettes activées. Bien qu'une différence significative de moyenne de fluorescence existe, la corrélation entre une différence de vitesse de liaison et une quantité de membranes est plus simple à définir et à étudier.

L'objectif de mon travail étant de mettre au point une méthode de dosage de microparticules (MP) plasmatiques exposant de la PS, la suite logique des expériences consistait à travailler sur du plasma, ou plus précisément du plasma pauvre en plaquettes (PPP).

3.4.2 Liaison de l'AnxA5 aux microparticules plasmatiques.

Comme indiqué auparavant, un des objectifs de mon travail de thèse était de quantifier les MP exposant de la PS dans des échantillons plasmatiques par les approches développées précédemment. Je n'ai pu aborder que le début de cette étude et en conséquence, les résultats présentés ci-dessous doivent être considérés comme préliminaires.

La problématique de la quantification des MP doit faire face à deux problèmes majeurs. J'ai principalement insisté sur les difficultés techniques associées à la mesure des microparticules induites par leur petite taille et leur hétérogénéité. Un autre problème majeur est l'influence

des conditions préanalytiques sur la quantité de MPs présentes dans un échantillon (Ayers et al. 2011). Les conditions pré-analytiques rassemblent l'ensemble des étapes de préparation des échantillons sanguins en vue de la quantification des MPs. Comme les microparticules peuvent être produites par l'activation cellulaire, principalement plaquettaires, les conditions de préparation doivent viser à éliminer toutes les cellules sanguines sans induire leur activation. J'ai appliqué les recommandations du Pr. Françoise Dignat-George et du Dr. Jean-Marie Freyssinet pour la préparation du PPP. Dans un premier temps j'ai déterminé la concentration en plaquettes résiduelles dans le PPP en FCM avec un marquage anti-CD41-PE (Figure 3.53).

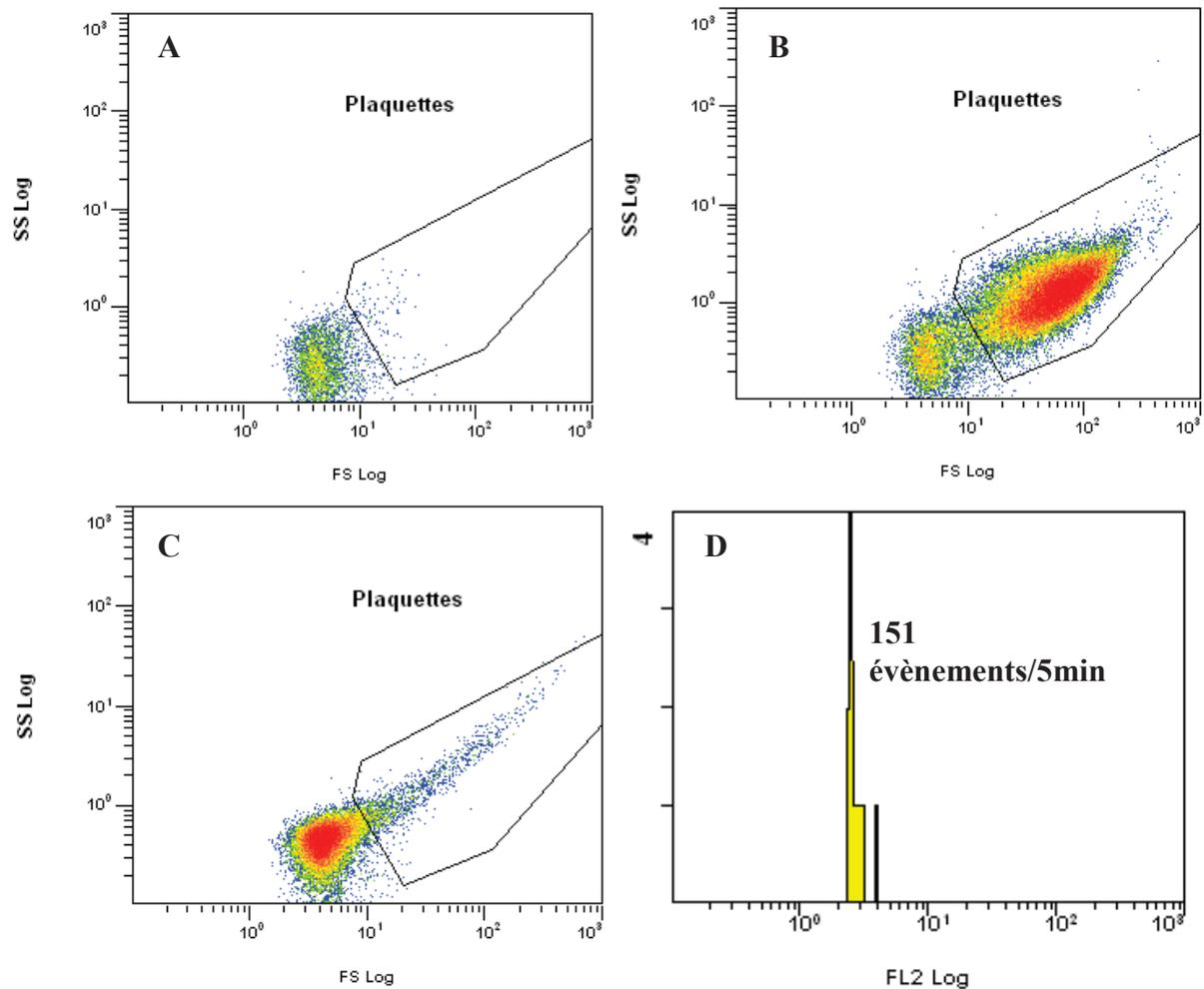


Figure 3.53 : PRP et PPP analysés en FCM avec un marquage par un anticorps anti-CD41-PE. A) Tampon seul. B) PRP dilué 200 fois en tampon. C) PPP dilué 2.5 fois en tampon. D) Histogramme de fluorescence des éléments exposant l'antigène CD41 dans le PPP.

Les résultats présentés en figure 3.53 présentent des plaquettes issues de PRP et du PPP analysés dans des conditions identiques. La figure B) montre par comparaison avec la figure A) que les plaquettes non activées sont facilement identifiables par leur signal de diffusion de la lumière comme expliqué au chapitre 3.4.1. Le PPP dilué (figure C) présente des éléments dans la région correspondant aux plaquettes. Pour réaliser le comptage des plaquettes j'ai effectué un marquage à l'anti-CD41-PE. Le nombre d'évènements marqués par l'anticorps

anti-CD41 mesuré par comparaison à un échantillon contrôle donne 151 éléments marqués pour 5 minutes d'analyse. En tenant compte du volume analysé par unité de temps (environ 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) et du facteur de dilution, la concentration en plaquettes dans le PPP est 7550 /ml. Le sang contenant entre 2×10^8 et 4×10^8 plaquettes/ml et jusqu'à $5 \times 10^8/\text{ml}$ pour le PRP, les centrifugations permettent d'éliminer l'essentiel des plaquettes avec une quantité résiduelle correspondant à une plaquette pour 20 000 plaquettes initiales.

L'analyse n'a été réalisée que sur un échantillon. La concentration en plaquettes résiduelles dans les PPP préparés au laboratoire est donc considérée être de l'ordre de $10^4/\text{ml}$.

L'influence de la présence de PPP sur la liaison à l'équilibre de l'AnxA5 a été étudiée (Figure 3.54).

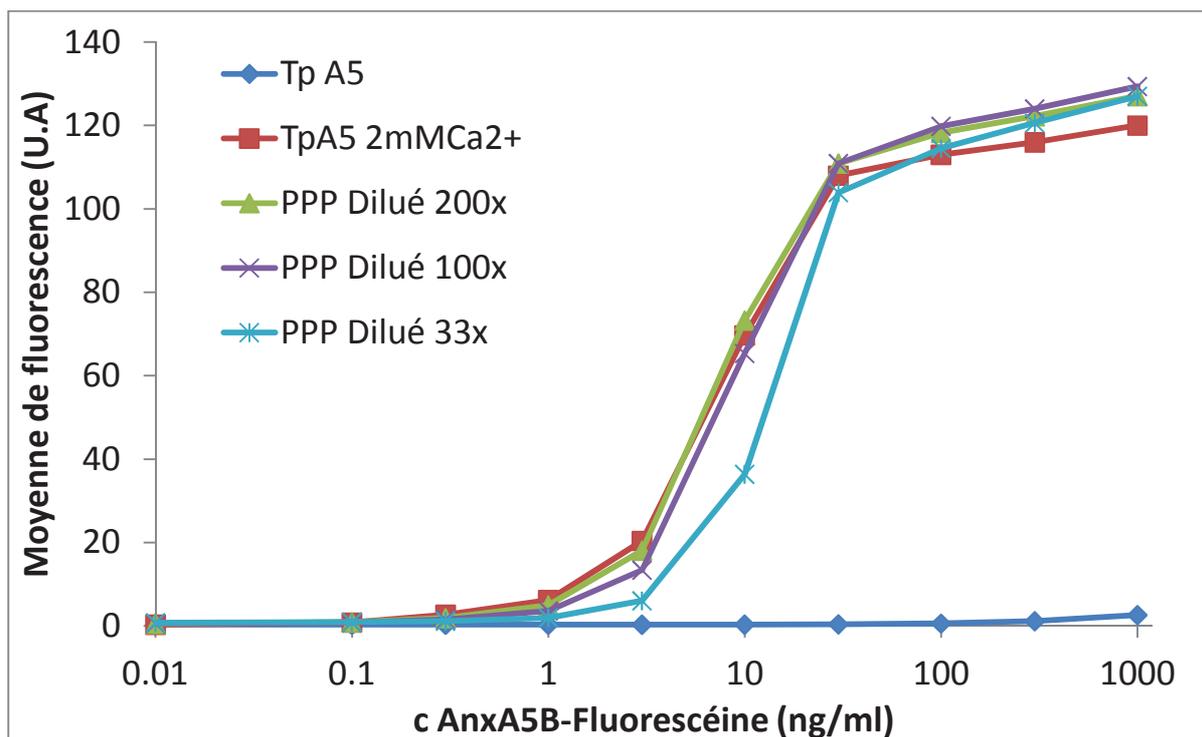


Figure 3.54 : Fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB } 10^6/\text{ml}$ en présence et en absence de PPP.

Les données présentées en figure 3.54 montrent l'influence de la présence et de la quantité de PPP sur la liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$, à l'équilibre. Pour des concentrations en AnxA5-Fluorescéine allant jusqu'à 3 ng/ml, la fluorescence des échantillons contenant du PPP est inférieure à la fluorescence du contrôle. Entre 3 et 30ng/ml en AnxA5-Fluorescéine, seul l'échantillon contenant du PPP dilué 33 fois présente une fluorescence diminuée par rapport au contrôle. Au-delà de 30 ng/ml en AnxA5-Fluorescéine, les valeurs de fluorescence atteignent un plateau. Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'AnxA5 se lie aux MP présentes dans les échantillons de PPP, induisant une diminution de la fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

Cependant le plasma est un milieu complexe et des expériences complémentaires ont été entreprises pour évaluer l'influence du plasma sur la fluorescence des fluorophores. En effet des études complémentaires réalisées au laboratoire indiquent une forte baisse de la fluorescence de la fluorescéine en présence de plasma (données non publiées). Dans une série d'expériences de spectrofluorimétrie, l'intensité de fluorescence de solutions de fluorophores dilués en tampon a été comparée à l'intensité de fluorescence de solutions de fluorophores dilués en plasma (Figure 3.55).

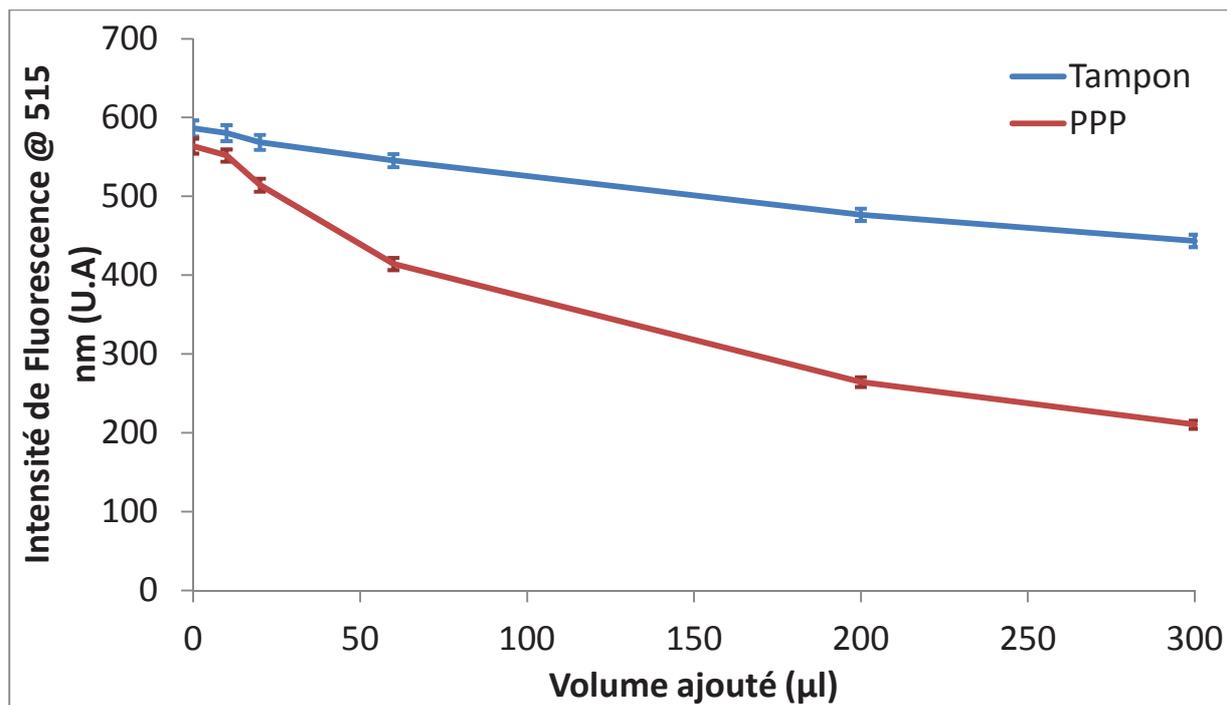


Figure 3.55 : Effet de l'ajout de plasma (EDTA) sur la fluorescence d'une solution de fluorescéine de 2 ml.

Les résultats présentés en figure 3.55 montrent une baisse de la fluorescence en cas d'ajout de tampon ce qui est explicable par la dilution du fluorophore. La fluorescence semble décroître de manière linéaire avec le volume de tampon ajouté. Dans le cas de l'ajout de PPP, elle décroît significativement plus que la référence en tampon avec une perte de fluorescence d'environ 53% pour 200 µl de PPP ajoutés contre environ 19% en tampon. Ceci indique clairement que le plasma a un effet sur la fluorescence de la fluorescéine qui ne peut pas être expliqué par la dilution du fluorophore. Plusieurs séries d'expériences ont été menées afin de découvrir si un composant particulier du plasma, avait un effet sur la fluorescence de la fluorescéine. Plusieurs tests ont été effectués sur les effets de l'EGTA (ou EDTA) et du Ca^{2+} sur la fluorescence de la fluorescéine. Séparément, l'EGTA (ou l'EDTA) et le Ca^{2+} n'ont pas d'effet sur la fluorescence de la fluorescéine alors que les mélanges induisent une perte importante de fluorescence (données non présentées). D'autres expériences ont montré que la

fluorescence de la fluorescéine n'est pas affectée par la présence de citrate mais est affectée par la présence de BSA (données non présentées). Par conséquent l'utilisation de fluorescéine en plasma semble compromise car le plasma humain contient de la HSA, l'analogue humain de la BSA. La perte de fluorescence observée à la figure 3.54 pourrait être expliquée par un effet direct du PPP sur la fluorescence de la fluorescéine, toutefois la plus forte concentration en PPP utilisée à la figure 3.54 induit une perte de fluorescence supérieure à 50% jusqu'à 10 ng/ml en AnxA5_B-Fluorescéine alors que les données de la figure 3.55 indiquent une perte de fluorescence de 25% due à l'effet du PPP sur la fluorescéine. Les résultats de la figure 3.54 peuvent donc être expliqués par la combinaison de l'effet du PPP sur la fluorescéine et de la liaison d'AnxA5 sur les MP. Néanmoins il serait utile de disposer d'un fluorophore insensible à la présence de PPP.

Le même type de tests effectués sur le Cy5 donne les résultats suivants (figure 3.56).

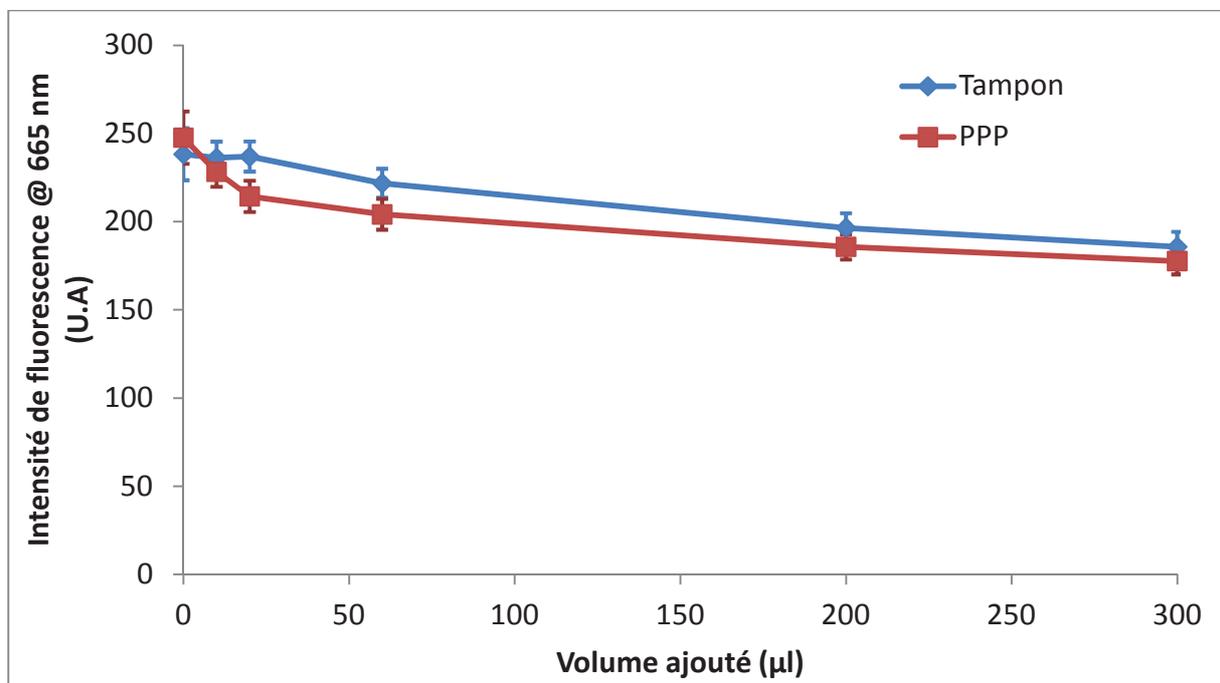


Figure 3.56 : Influence de la présence de plasma (EDTA) sur la fluorescence du Cy5.

Les résultats présentés en figure 3.56 montrent que la fluorescence du Cy5 n'est pas, ou peu, affectée par la présence de plasma aux erreurs de mesure près. Le Cy5 est donc un fluorophore préférable à la fluorescéine pour le travail en plasma. D'autres fluorophores tels que la PE sont insensibles à la présence de plasma mais avec une masse de 240 kDa, une molécule de PE a une masse équivalente à sept AnxA5 ce qui risquerait de modifier les propriétés de liaison de la protéine.

Pour des raisons de manque de temps, je n'ai pas pu tester l'influence de la présence de PPP sur la fluorescence de l'AnxA5_B-Cy5 en compétition à l'équilibre. J'ai toutefois effectué une expérience mesurant l'effet de la présence de PPP sur la cinétique de liaison de l'AnxA5_B-Cy5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$.

La vitesse initiale de liaison de 10 ng/ml d'AnxA5_B-Cy5 a été mesurée pour 10^6 $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ et un volume de plasma ajouté variable. Pour compenser la présence de citrate de sodium pouvant lier le Ca^{2+} , les cinétiques ont été induites par l'ajout de 10mM Ca^{2+} (Figure 3.57).

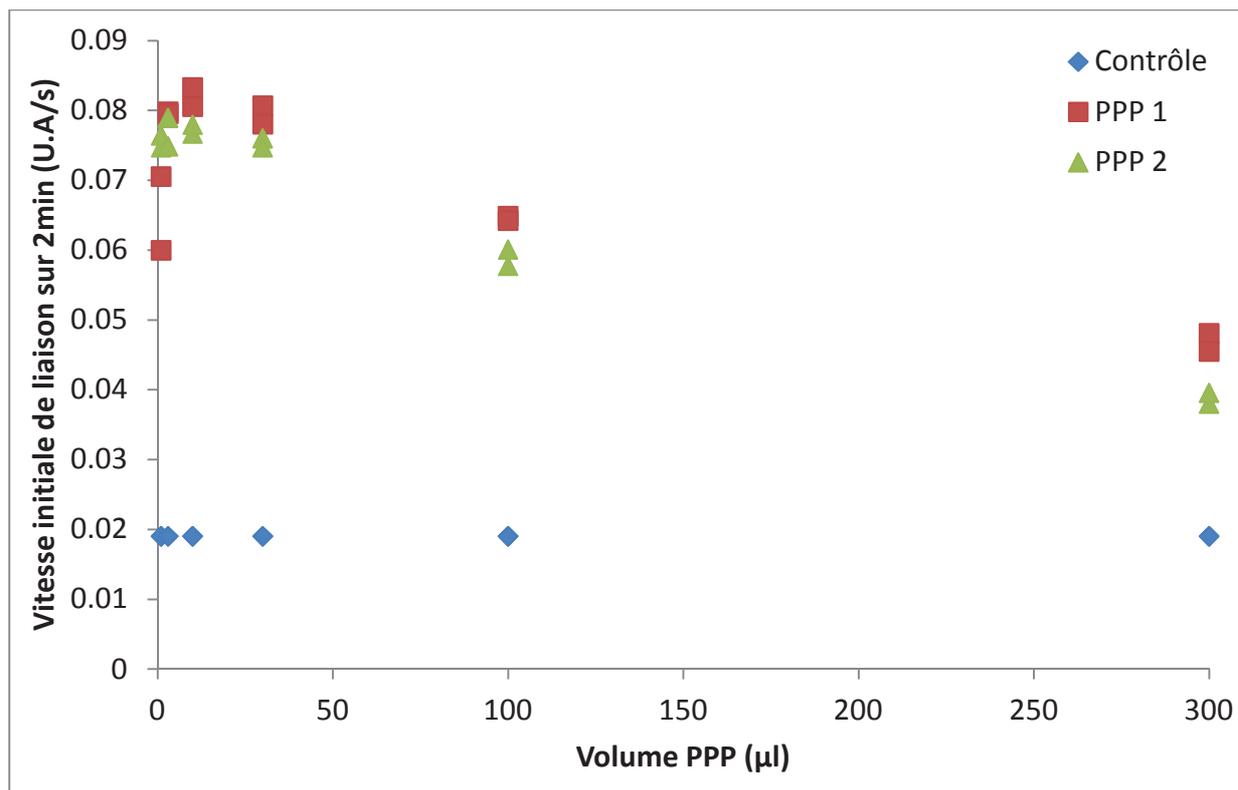


Figure 3.57 : Influence de l'addition de plasma sur la vitesse initiale de liaison de 10 ng d'AnxA5_B-Cy5/ml à 10⁶ μPSiO₂@SLB/ml.

Les données présentées en figure 3.57 montrent que la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 diminue lorsque le volume de PPP ajouté augmente entre 10 et 300 μl dans 1 ml de volume final. Il est possible d'estimer la concentration en membranes dans le PPP à partir des données obtenues pour les SUV, à concentration égale en AnxA5_B-Cy5 (figure 3.47). Considérons que la vitesse de liaison de l'AnxA5_B-Cy5 passe d'environ 0.08 U.A/s à 0.06 U.A/s en présence de 100 μl de PPP par ml et que, dans le cas de SUV, la vitesse initiale passe d'environ 0.06 U.A/s à 0.03 U.A/s pour 100 ng/ml. Une concentration en SUV de 100 ng/ml induit une variation de vitesse de 50% environ. Le PPP dilué, qui induit une variation de 25 % de la vitesse de liaison, est équivalent à une concentration de 50 ng/ml de SUV. Le PPP pur contiendrait donc 500 ng/ml de membranes composées de 20 % de PS soit 100 ng/ml de PS ou 125 nM PS. D'après les données du test ELISA commercialisé par HYPHEN, le PPP

d'individus sains contient moins de 5 nM PS. La calibration ayant été effectuée avec des SUV, la quantité de membranes dans l'échantillon de PPP est surestimée

De manière paradoxale, la vitesse initiale de l'AnxA5_B-Cy5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ est plus faible pour le contrôle qu'en présence de PPP. J'ai pu vérifier expérimentalement que la concentration en Ca^{2+} influence la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 et que la vitesse initiale de liaison est plus basse à 10 mM Ca^{2+} qu'à 2 mM Ca^{2+} (données non présentées). La présence de citrate dans les échantillons de PPP pourrait avoir modifié la concentration en Ca^{2+} , ce qui expliquerait que la vitesse de liaison de l'AnxA5 soit plus importante en PPP.

Ainsi que je l'indique précédemment, cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et doit être répétée et complétée pour être interprétée convenablement.

Pour s'affranchir des problèmes associés à l'utilisation de plasma, j'ai utilisé une approche alternative qui consiste à séparer les MP du plasma par ultracentrifugation (Jy et al. 2004). Un résultat de compétition de liaison à l'équilibre de 2.5 ng/ml AnxA5_B-Fluorescéine en présence de MP ultracentrifugées et $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$ est présenté en figure 3.58.

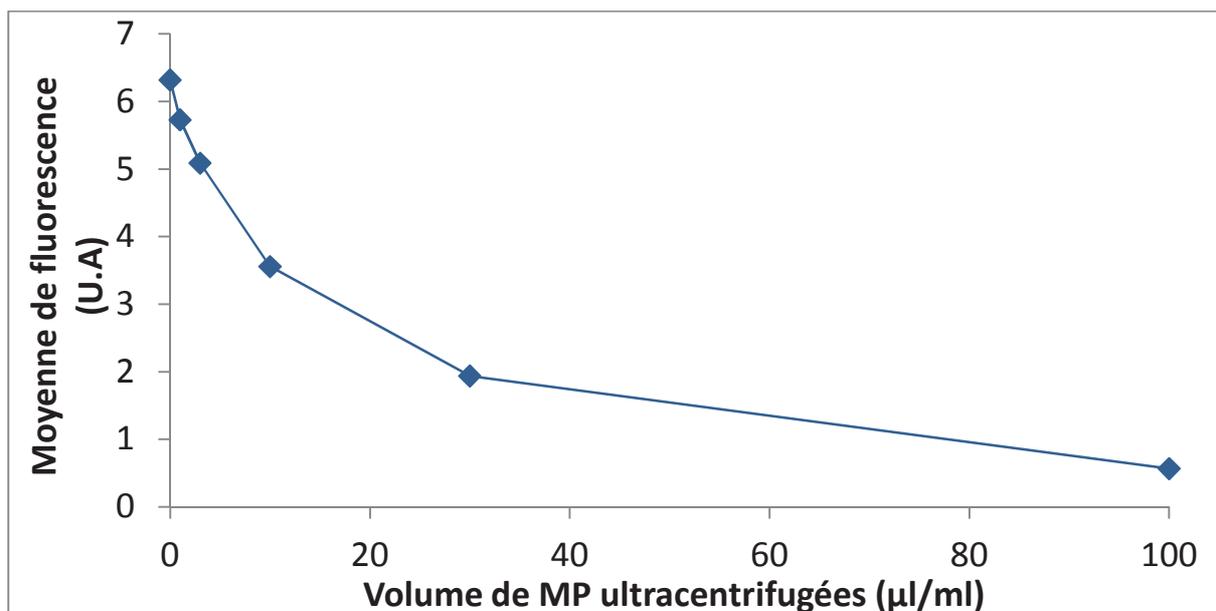


Figure 3.58 : Compétition de liaison d'AnxA5_B-Fluorescéine 2.5 ng/ml avec des MP ultracentrifugées et $10^6 \mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}/\text{ml}$.

Les résultats présentés en figure 3.58 montrent que la moyenne de fluorescence associée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ décroît de manière continue avec la concentration en MP. Une quantité d'environ 20 μl de MP induit une diminution du signal de fluorescence de 50%. Cette expérience démontre que l'approche utilisée permet d'étudier les MP au sein d'échantillons de PPP et confirme que les difficultés rencontrées avec les échantillons de plasma sont dues à la présence d'éléments interférents avec la fluorescence comme démontré précédemment. La concentration en MP estimée d'après les expériences de compétition à l'équilibre avec des LUV donne une concentration en lipides d'environ 0.5 ng/ml dans le PPP non centrifugé soit 0.6 nM PS. Ce résultat est en accord avec les valeurs données par HYPHEN. Des tests seront prochainement réalisés avec des plasmas pathologiques. La quantification de MP plasmatiques procoagulantes par ce test de compétition fera l'objet d'un article (manuscrit en préparation).

Une autre alternative permettant de s'affranchir des problèmes liés à la présence de plasma est de laver des plaquettes par centrifugation avant de les activer avec 12.5 μM de TRAP pour provoquer la formation de MP. L'analyse de cet échantillon en FCM ne permet plus de détecter de plaquettes intactes, l'activation ayant conduit à une transformation quasiment intégrale des plaquettes en MP. Les MP ainsi produites dans un milieu contrôlé sont utilisées dans un test de compétition de liaison d'AnxA5 en cinétique identique au test présenté en figure 3.57 (Figure 3.59).

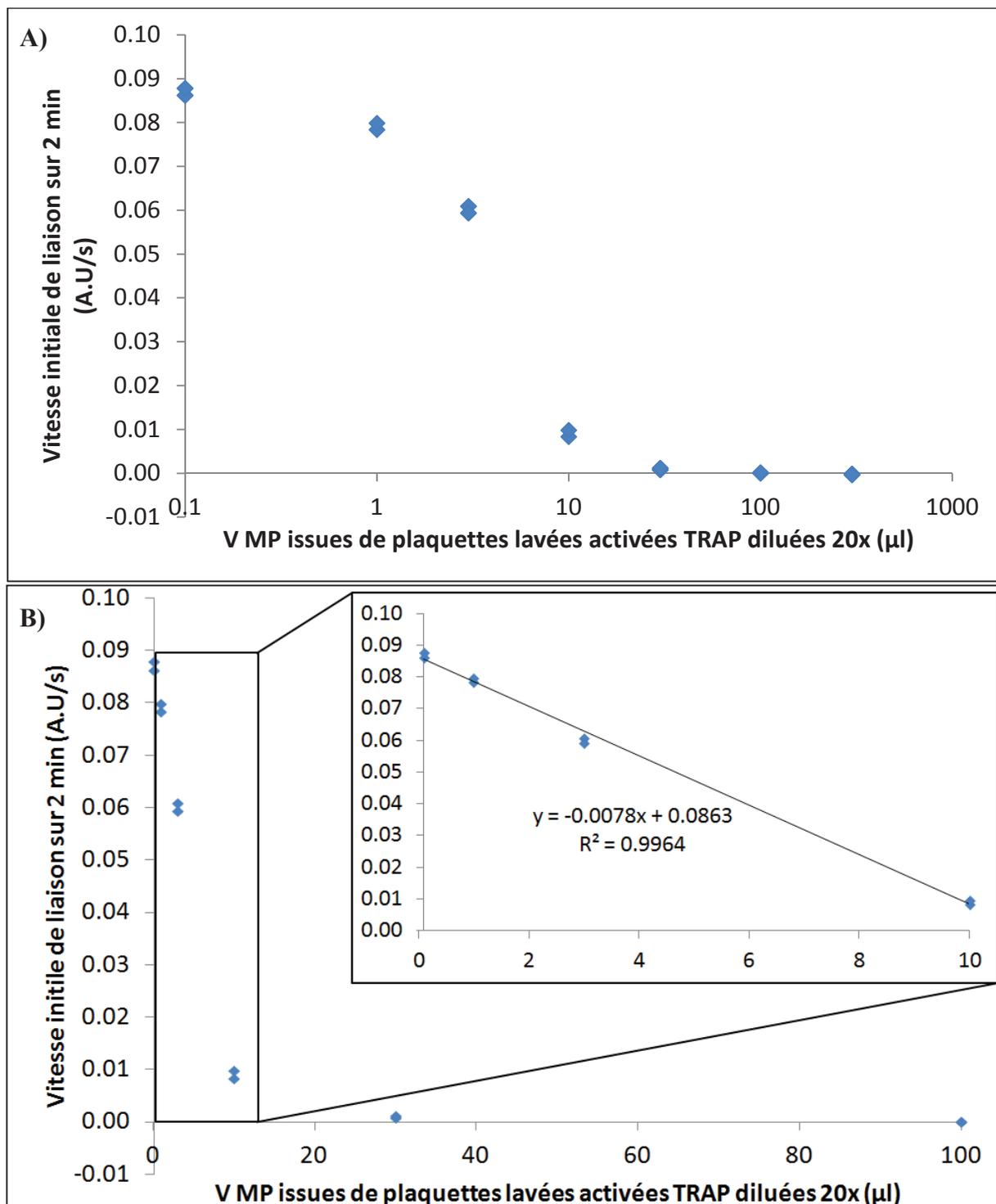


Figure 3.59 : Influence de l'addition de MP issues de plaquettes lavées et activées par 12.5 μM TRAP sur la vitesse initiale de liaison de 10 ng d'AnxA5_B-Cy5/ml à 10⁶ $\mu\text{PSiO}_2\text{@SLB/ml}$. A) Volume de MP représenté selon une échelle logarithmique et B) selon une échelle linéaire (B). Volume final = 1 ml.

Les données présentées en figure 3.59 montrent une diminution de la vitesse initiale de liaison de l'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ quand l'AnxA5 a été incubée avec des MP issues de plaquettes activées, dans un milieu contrôlé. L'encart de la figure 3.59 B) montre que la relation entre vitesse initiale de liaison et volume de MP est linéaire entre 0 et 10 μl de MP diluées 20 \times comme c'était le cas avec des liposomes en figure 3.47. Une gamme de calibration de vitesse initiale pour différentes concentrations en AnxA5 a été effectuée avec les mêmes particules et protéine (non présentée), permettant ainsi de convertir la pente en présence de MP à la concentration résiduelle en AnxA5 après incubation en présence de MP. Cette information permettant de calculer la quantité d'AnxA5 liée aux MP est directement reliée à la quantité de MP présente dans l'échantillon.

En conclusion, cette expérience valide le concept de quantification de MP issues de PS par compétition de liaison en cinétique, mais la présence d'éléments perturbateurs dans le plasma et l'absence de contrôle de la concentration en Ca^{2+} dans les échantillons empêchent son application en l'état à des échantillons biologiques.

3.5 Caractérisation structurale des Microparticules Plasmatiques Pro-coagulantes

En parallèle aux travaux décrits au Chapitre 3.4, j'ai activement participé à un projet visant à caractériser les MP au niveau structural, par cryo-MET, et à déterminer l'histogramme des tailles des MP plasmatiques et des MP exposant de la PS, à partir d'échantillons de plaquettes activées. Cette étude a été réalisée pour la partie cryo-MET par Sisareuth Tan. J'ai assuré la préparation des échantillons, la réalisation des expériences de FCM et j'ai participé à la coordination de l'étude et à la discussion des résultats. La partie relative aux expériences de FCM a été présentée au chapitre précédent.

L'intérêt principal de cette étude est de présenter, pour la première fois, l'ensemble des MP existant dans des échantillons de plasma pauvre en plaquettes (PPP) et des échantillons de plaquettes activées. Trois types morphologiques de MP sont observés, aboutissant à la classification suivante. Des MP isolées, ou MP de type-1, ont une taille comprise majoritairement entre 50 nm et 500 nm, et sont réparties de manière quasi-égale entre MP exposant de la PS ou non. Des grappes de vésicules, ou MP de type-2, constituent environ 10% des MP totales. Leur taille varie de 500 nm à 2 μm et la majorité d'entre elles exposent de la PS. Un troisième type de structure, appelé MP de type-3, présente l'aspect d'un agrégat protéique et est observé rarement mais de manière reproductible dans les échantillons de plasma. Les MP de type-3 ont une taille comprise entre 1 μm et 3 μm et n'exposent pas de PS. L'ensemble de ces informations est résumé dans le schéma de la Figure 3.60.

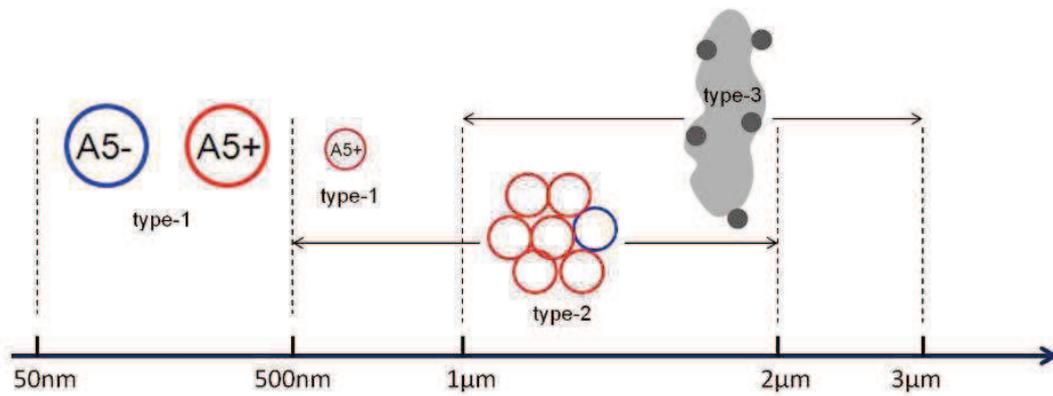


Figure 3.60 Répartition des tailles des différents types de MP observés dans les échantillons de PPP et de plaquettes activées. Les MP exposant de la PS sont représentées avec un pourtour rouge et celles n'exposant pas de PS avec un pourtour bleu.

Cette étude apporte une information nouvelle sur la morphologie, la distribution de tailles et la composition des MP plasmatiques. Un article présentant ces résultats a été soumis à la revue Blood fin Novembre 2011.

Chapitre 4

Conclusions et perspectives

Mon travail de thèse a consisté en deux projets principaux. Le premier projet, qui a constitué la majeure partie de mon travail de thèse, a concerné l'étude fondamentale de la liaison élémentaire de la liaison entre l'AnxA5 et des membranes lipidiques modèles. Le second projet a constitué une application de l'approche originale développée dans le premier projet et a concerné l'étude des microparticules (MP) plasmatiques pro-coagulantes, avec pour objectif le développement d'une méthode de quantification des sites PS exposés par les MP.

Le but global du premier projet de mon travail de thèse était de répondre aux questions : Quel est le mécanisme élémentaire de la liaison entre l'AnxA5 et les membranes ? A quel élément moléculaire se lie l'AnxA5 ? Pour espérer répondre à ces questions, l'objectif fixé a été d'analyser cette interaction de la manière la plus détaillée possible, dans une gamme de concentrations en AnxA5 la plus faible possible, et d'extraire les paramètres cinétiques de l'interaction, de manière à préciser la nature du complexe élémentaire entre l'AnxA5, la phosphatidylsérine (PS) et le Ca^{2+} .

Un des éléments centraux de mon travail de thèse a été le développement d'une approche originale de mesure de la liaison de l'AnxA5 à des microsphères de silice couvertes d'une bicouche lipidique supportée ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$), par cytométrie en flux. Une seule autre étude a préalablement utilisé cette approche dans le contexte de l'AnxA5, de manière purement qualitative (Stuart, Reutelingsperger, et Frederik 1998).

La FCM présente plusieurs avantages intrinsèques, dont la capacité de détecter de faibles intensités de fluorescence, équivalentes à environ 35 AnxA5 par $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ (Chapitre 3.2.4.1) sur des objets uniques, ici des microsphères de silice, et de permettre de contrôler à la fois la concentration en AnxA5 et en sites de liaison. J'ai développé et optimisé un protocole de production des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ qui est simple, reproductible et peut être effectué en quelques heures. Les $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ sont stables et peuvent être conservés à 4 °C pendant au minimum six mois. Plusieurs approches devraient permettre d'accélérer la préparation de ces objets et d'améliorer encore leur stabilité. Les études de liaison à l'équilibre d'AnxA5 aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ exposant de la PS ont été réalisées dans des conditions de très faible concentration en protéines, de l'ordre de quelques pg/ml, soit quelques dizaines de fM. Ces études ont permis de déterminer avec précision la constante de dissociation (K_d) de l'AnxA5 pour les membranes, qui est d'environ 3×10^{-17} M (Chapitre 3.2.4.2). La valeur obtenue est en accord avec les travaux précédents du groupe de J. Tait (Tait, Gibson, et Smith 2004). Cette valeur indique que l'interaction entre l'AnxA5, les membranes et le Ca^{2+} a une affinité comparable, ou même supérieure, à celle du complexe biotine-streptavidine, système dont l'affinité est considérée comme la plus forte dans le domaine biologique, avec un K_d de l'ordre de 10^{-15} M (Laitinen et al. 2006). La remarquable sensibilité de la cytométrie en flux a permis d'analyser l'interaction à très faibles concentrations en $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et en AnxA5, conditions dans lesquelles il devient possible d'étudier la cinétique de liaison de l'AnxA5 à des membranes. La détermination des constantes cinétiques constitue un des principaux résultats de mon travail de thèse. Contrairement aux approches précédemment utilisées pour étudier la cinétique de liaison de l'AnxA5, telles que l'ellipsométrie ou le QCM-D, où la réaction a lieu sur un support solide, en FCM l'interaction est étudiée entre espèces diffusant librement en solution.

Le processus n'est donc pas limité par le transport convectif des molécules vers la surface de liaison. L'analyse des expériences de FCM a permis de déterminer la valeur de la constante cinétique d'association, k_{on} , entre AnxA5 et des $\mu\text{PSiO}_2@SLB$ exposant 20% de PS. Le k_{on} a une valeur de l'ordre de $(7.4 \pm 1.0) \times 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour une concentration de Ca^{2+} de 2 mM. Cette valeur est proche de la valeur maximale limitée par la diffusion des molécules, ce qui signifie que chaque choc entre une molécule d'AnxA5 et une surface membranaire est efficace. La constante cinétique de dissociation, k_{off} a été estimée à environ $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Chapitre3.2.5).

Les paramètres cinétiques de la liaison de l'AnxA5 à des membranes sont donc décrits ici, pour la première fois. La démonstration que la réaction entre l'AnxA5 et les membranes exposant de la PS est limitée par la diffusion constitue une information essentielle dans l'élucidation du mécanisme élémentaire de cette interaction. Les résultats acquis sont largement suffisants pour donner lieu à une publication. Toutefois, la nature exacte du mécanisme de liaison de l'AnxA5 aux membranes reste à élucider. Nous avons un ensemble d'indices nous permettant de faire l'hypothèse de travail selon laquelle le paramètre déterminant de l'interaction entre AnxA5 et membranes, et entre Annexines et membranes en général, est la concentration de surface en ions calcium. Cette concentration surfacique en ions calcium dépendrait en premier lieu de la nature et de la concentration en charges négatives à la surface des membranes. Il est notable que l'AnxA5, ainsi que les autres, Annexines se lient aux phospholipides chargés négativement quelle que soit la nature exacte de la tête polaire. Un des projets en cours au laboratoire est de déterminer la concentration en ions Ca^{2+} au niveau de la membrane et d'étudier l'influence de ce paramètre sur la liaison de l'AnxA5. Cette question est expérimentalement très complexe à résoudre et il n'existe pas de technique simple permettant de répondre à cette question de manière directe. Plusieurs approches basées soit sur des techniques de fluorescence soit sur des mesures de radioactivité

seront mises en œuvre prochainement pour répondre à cette question. Nous considérons que cette question est la dernière à résoudre afin de pouvoir proposer un modèle mécanistique de l'interaction élémentaire entre l'AnxA5, les membranes et le calcium.

La seconde partie de mon travail de thèse a porté sur la mise au point d'un test de quantification de membranes exposant de la PS, avec pour objectif premier de mesurer de manière directe et absolue la quantité de MP exposant la PS dans divers types d'échantillons biologiques. Il est en effet admis que les MP exposant la PS ont un rôle pro-coagulant et sont impliquées dans de nombreux accidents thrombotiques. Comme ceci est indiqué précédemment, les méthodes actuelles de caractérisation des MP, que ce soit la FCM ou les méthodes de capture sur plaque, se heurtent à diverses limitations. Aucune méthode n'est actuellement reconnue comme fiable par la communauté des scientifiques experts dans ce domaine. La stratégie mise en œuvre constitue une extension directe de l'approche de quantification de la liaison de l'AnxA5 à des membranes supportées sur des microsphères de silice ($\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$), décrite ci-dessus. L'approche consiste à effectuer un test de compétition de liaison d'AnxA5 fluorescente entre des membranes ou MP que l'on veut caractériser et une quantité connue de $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$, de mesurer par FCM la quantité d'AnxA5 liée aux $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ et déduire la quantité d'AnxA5 liée aux MP. Dans une première étape, j'ai développé cette stratégie au niveau de liposomes synthétiques et à optimiser l'approche expérimentale. Les différentes expériences de compétition de liaison entre des liposomes et de l'AnxA5 à l'équilibre (Chapitre 3.3.1) ou en cinétique (Chapitre 3.3.2) parviennent aux mêmes conclusions, à savoir qu'il est possible de doser des membranes exposant de la PS, par FCM, et avec une sensibilité de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes de lipides par millilitre, ce qui est dans une gamme d'intérêt pour la détection de microparticules circulantes. Parmi les différentes approches testées, l'analyse de la cinétique de liaison d'AnxA5 à des $\mu\text{PSiO}_2@\text{SLB}$ d'AnxA5 incubée à l'équilibre avec des

membranes constitue une méthodologie offrant un bon compromis entre temps d'expérience et sensibilité. En revanche la méthode demande beaucoup de rigueur et nécessiterait d'être automatisée pour être employée dans le contexte d'un laboratoire d'analyse hématologique. L'application de cette stratégie à la quantification de MP plasmatiques exposant de la PS a débuté il y a quelques mois et est en cours de réalisation, mais n'est pas achevée. Notre choix s'est porté sur des microparticules d'origine plaquettaire exposant de la PS. Les premiers résultats, présentés dans le premier manuscrit envoyé, étaient encourageants. Ils avaient été obtenus au niveau d'échantillons de MP centrifugées. Notre objectif étant de mesurer les MP directement au sein d'échantillons biologiques, en évitant des étapes de centrifugation qui peuvent introduire un biais dans l'analyse, j'ai réalisé récemment quelques expériences supplémentaires à partir de MP obtenues par activation plaquettaire. Ces résultats, qui sont incorporées en pages 160 à 162 du présent document, sont très encourageants. Nous estimons pouvoir conclure que l'application de cette stratégie est validée dans le cas d'échantillons plasmatiques. Il est maintenant nécessaire de réaliser un grand nombre de tests, sur divers types d'échantillons biologiques, pour établir cette affirmation. Cette étude sera donc activement poursuivie avec pour objectif de rassembler ces travaux en un article qui devrait être soumis au printemps 2012.

D'autre part, il est important d'insister sur le fait que ces expériences sont réalisées en conditions de laboratoire de recherche. Pourraient-elles être appliquées en dans un contexte clinique ? A l'heure actuelle et sans partenariat industriel, la compétition cinétique est impossible à utiliser dans un contexte clinique. Les développements futurs viseront donc à optimiser les conditions utilisées en compétition à l'équilibre afin de trouver un compromis entre le temps et la sensibilité de cette méthode. Il sera intéressant de développer un partenariat avec une unité de recherche associée à un centre hospitalier afin d'appliquer le test

à un nombre d'échantillons important ainsi que d'avoir accès à des échantillons issus d'individus sains et pathologiques.

En parallèle à ces deux projets, j'ai activement participé à un autre projet du laboratoire portant sur la caractérisation ultrastructurale des MP plasmatiques, par cryo-microscopie électronique en transmission (MET). Cette étude, intégrée sous la forme d'un article en annexe de ce manuscrit, fournit pour la première fois un histogramme de répartition des tailles des MP, confirmant que la majorité des MP se situent sous la limite de détection de la FCM. Ce travail prouve également que toutes les MP issues de plaquettes activées ne lient pas l'AnxA5, permettant ainsi de résoudre certains résultats contradictoires de la littérature concernant la composition des MP. La méthode mise en œuvre est d'application générale et constitue une base de travail fondamentale pour l'ensemble du domaine des MP. Cette étude démontre la nécessité de développer de nouveaux outils et de nouvelles méthodes et de combiner les approches d'analyse des MP.

Bibliographie

Abid Hussein, M. N., E. W. Meesters, N. Osmanovic, F. P. H. Th M. Romijn, R. Nieuwland, et A. Sturk. 2003. « Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1 (11): 2434-2443.

Andree, H A, M C Stuart, W T Hermens, C P Reutelingsperger, H C Hemker, P M Frederik, et G M Willems. 1992. « Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (25): 17907 -17912.

Andree, H.A.M., C.P.M. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H.C. Hemker, W.T. Hermens, et G.M. Willems. 1990. « Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers ». *Journal of Biological Chemistry* 265 (9): 4923-4928.

Avila-Sakar, A J, C E Creutz, et R H Kretsinger. 1998. « Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1387 (1-2) (septembre 8): 103-116.

Ayers, Lisa, Malcolm Kohler, Paul Harrison, Ian Sargent, Rebecca Dragovic, Marianne Schaap, Rienk Nieuwland, Susan A. Brooks, et Berne Ferry. 2011. « Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability within the assay ». *Thrombosis Research* 127 (4) (avril): 370-377.

Bandorowicz-Pikula, Joanna. 2003. *Annexins: Biological Importance and Annexin-Related Pathologies*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, juillet.

Bardelle, C, B Furie, B C Furie, et G E Gilbert. 1993. « Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (12) (avril 25): 8815 -8824.

Bayerl, T. M., et M. Bloom. 1990. « Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. A new vesicular model system studied by ^2H -nuclear magnetic resonance ». *Biophysical journal* 58 (2): 357-62.

Beneš, M., D. Billy, A. Benda, H. Speijer, M. Hof, et W.Th. Hermans. 2004. « Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass ». *Langmuir* 20 (23): 10129-10137.

Bérat, Rémi. 2007. *Assemblages 2D de l'Annexine A5 applications biotechnologiques & aspects fonctionnels*.

Bérat, Rémi, Murielle Rémy-Zolghadry, Céline Gounou, Claude Manigand, Sisareuth Tan, Carmen Saltó, Ernest Arenas, Laurence Bordenave, et Alain R Brisson. 2007. « Peptide-presenting two-dimensional protein matrix on supported lipid bilayers: an efficient platform for cell adhesion ». *Biointerphases* 2 (4) (décembre): 165-172.

- Berckmans, R. J., R. Neiuwland, A. N. Boing, F. P. Romijn, C. E. Hack, et A. Sturk. 2001. « Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation ». *Thrombosis and haemostasis* 85 (4): 639-46.
- Berckmans, René J., Auguste Sturk, Laurens M. van Tienen, Marianne C. L. Schaap, et Rienk Nieuwland. 2011. « Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva ». *Blood* 117 (11) (mars 17): 3172 -3180.
- Bernhard, Oliver K., Rommel A. Mathias, Thomas W. Barnes, et Richard J. Simpson. 2011. A Fluorescent Microsphere-Based Method for Assay of Multiple Analytes in Plasma. Dans *Serum/Plasma Proteomics*, 728:195 -206. *Methods in Molecular Biology*. mai 1.
- Bertani, Giuseppe. 2004. « Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems ». *Journal of Bacteriology* 186 (3) (février 1): 595 -600.
- Bevers, E. M., T. Wiedmer, P. Comfurius, S. J. Shattil, H. J. Weiss, R. F. Zwaal, et P. J. Sims. 1992. « Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome ». *Blood* 79 (2): 380-388.
- Blackwood, R.A., et J.D. Ernst. 1990. « Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins ». *Biochemical Journal* 266 (1): 195-200.
- Bode, W., D. Turk, et A. Karshikov. 1992. « The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships ». *Protein Sci* 1 (4): 426-71.
- Boersma, H. H., B. L. Kietselaer, L. M. Stolk, A. Bennaghmouch, L. Hofstra, J. Narula, G. A. Heidendal, et C. P. Reutelingsperger. 2005. « Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications ». *J Nucl Med* 46 (12): 2035-50.
- Boilard, E., P.A. Nigrovic, K. Larabee, G.F.M. Watts, J.S. Coblyn, M.E. Weinblatt, E.M. Massarotti, et al. 2010. « Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production ». *Science* 327 (5965): 580-583.
- Bouter, A., C. Gounou, R. Bérat, S. Tan, B. Gallois, T. Granier, B.L. D'Estaintot, E. Pöschl, B. Brachvogel, et A.R. Brisson. 2011. « Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair ». *Nature Communications* 2 (1).
- Brussaard, C. P. D., D. Marie, et G. Bratbak. 2000. « Flow cytometric detection of viruses ». *Journal of Virological Methods* 85 (1-2): 175-182.
- Buranda, T., J. Huang, G.V. Ramarao, L.K. Ista, R.S. Larson, T.L. Ward, L.A. Sklar, et G.P. Lopez. 2003. « Biomimetic molecular assemblies on glass and mesoporous silica microbeads for biotechnology ». *Langmuir* 19 (5): 1654-1663.

- Castaman, G., L. Yu-Feng, E. Battistin, et F. Rodeghiero. 1997. « Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation ». *British Journal of Haematology* 96 (3): 458-463.
- Castaman, G., L. Yu-Feng, et F. Rodeghiero. 1996. « A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation [25] ». *Lancet* 347 (9002): 700-701.
- Catteruccia, Flaminia, Jason P Benton, et Andrea Crisanti. 2005. « An Anopheles transgenic sexing strain for vector control ». *Nat Biotech* 23 (11) (novembre): 1414-1417.
- Chargaff, E, et R West. 1946. « The biological significance of the thromboplastic protein of blood ». *The Journal of Biological Chemistry* 166 (1) (novembre): 189-197.
- Combes, V., A.-C. Simon, G.-E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol, et F. Dignat-George. 1999. « In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant ». *Journal of Clinical Investigation* 104 (1): 93-102.
- Connor, D.E., T. Exner, D.D.F. Ma, et J.E. Joseph. 2010. « The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib ». *Thrombosis and Haemostasis* 103 (5): 1044-1052.
- Coulter, Wallace Henry. 1957. « High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. » *Proceedings of the National Electronics Conference, 1956* 12: 1034-1042.
- Dachary-Prigent, J., J. M. Freyssinet, J. M. Pasquet, J. C. Carron, et A. T. Nurden. 1993. « Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups ». *Blood* 81 (10): 2554-65.
- Dachary-Prigent, J., J. M. Pasquet, J. M. Freyssinet, et A. T. Nurden. 1995. « Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors ». *Biochemistry* 34 (36): 11625-34.
- Devaux, P F. 1992. « Protein Involvement in Transmembrane Lipid Asymmetry ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21 (1) (juin): 417-439.
- Dignat-George, F., F. Sabatier, L. Camoin-Jau, et J. Sampol. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (10) (octobre 1): 1844-1845.
- Doevre, Loïc, Laurent Plawinski, Florence Toti, et Eduardo Anglés-Cano. 2009. « Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience ». *Journal of Neurochemistry* 110 (2) (juillet 1): 457-468.
- Dragovic, R.A., C. Gardiner, A.S. Brooks, D.S. Tannetta, D.J.P. Ferguson, P. Hole, B. Carr, et al. 2011. « Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7 (6): 780-788.

van Engeland, Manon, Luc J. W. Nieland, Frans C. S. Ramaekers, Bert Schutte, et Chris P. M. Reutelingsperger. 1998. « Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure ». *Cytometry* 31 (1) (janvier 1): 1-9.

Evans Jr., T.C., et G.L. Nelsestuen. 1994. « Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II ». *Biochemistry* 33 (45): 13231-13238.

Flaumenhaft, Robert, James R. Dilks, Jennifer Richardson, Eva Alden, Sunita R. Patel-Hett, Elisabeth Battinelli, Giannoula L. Klement, Martha Sola-Visner, et Joseph E. Italiano. 2009. « Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles ». *Blood* 113 (5): 1112-1121.

Freyssinet, J. M. 2003. « Cellular microparticles: what are they bad or good for? ». *J Thromb Haemost* 1 (7): 1655-62.

Frojmovic, M.M., et J.G. Milton. 1982. « Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. ». *Physiological Reviews* 62 (1): 185-261.

Funakoshi, T., R. L. Heimark, L. E. Hendrickson, B. A. McMullen, et K. Fujikawa. 1987. « Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization ». *Biochemistry* 26 (17): 5572-8.

Garnier, Boris, Anthony Bouter, Céline Gounou, Klaus G. Petry, et Alain R. Brisson. 2009. « Annexin A5-functionalized liposomes for targeting phosphatidylserine-exposing membranes ». *Bioconjugate Chemistry* 20 (11) (novembre): 2114-2122.

van Genderen, H., H. Kenis, P. Lux, L. Ungeth, C. Maassen, N. Deckers, J. Narula, L. Hofstra, et C. Reutelingsperger. 2006. « In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay ». *Nature protocols* 1 (1): 363-7.

Gerke, V., C. E. Creutz, et S. E. Moss. 2005. « Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics ». *Nature reviews* 6 (6): 449-61.

Gerke, V., et S. E. Moss. 2002. « Annexins: From structure to function ». *Physiological Reviews* 82 (2): 331-371.

Gilbert, G. E., D. Drinkwater, S. Barter, et S. B. Clouse. 1992. « Specificity of phosphatidylserine-containing membrane binding sites for factor VIII. Studies with model membranes supported by glass microspheres (lipospheres) ». *The Journal of biological chemistry* 267 (22): 15861-8.

Gilbert, Gary E. 2005. Use of Microsphere-Supported Phospholipid Membranes for Analysis of Protein-Lipid Interactions. Dans *Current Protocols in Cytometry*, éd par. J. Paul Robinson, Zbigniew Darzynkiewicz, Jurek Dobrucki, William C. Hyun, John P. Nolan, Alberto Orfao, et Peter S. Rabinovitch. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., novembre. <http://www.currentprotocols.com/protocol/cy1303>.

Givan, Alice. 2001. *Flow Cytometry: First Principles*. 2^e éd. John Wiley & Sons Inc, juillet 27.

Govorukhina, Natalia, Wilma Bergsma-Schutter, Christine Mazères-Dubut, Serge Mazères, Eugenia Drakopoulou, Leonid Bystrykh, Frank Oling, Anneke Mukhopadhyay, Joséphine Lai-Kee-Him et Alain Brisson. 2003. Self-Assembly of Annexin A5 on Lipid Membranes. Dans , 61-78. Landes Biosciences. Molecular Biology Intelligence Unit. Kluwer Academic/Plenum Publishers, juin 28.

Gucker, Frank T., Chester T. O'Konski, Hugh B. Pickard, et James N. Pitts. 1947. « A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles¹ ». *Journal of the American Chemical Society* 69 (10) (octobre 1): 2422-2431.

György, Bence, Károly Módos, Éva Pállinger, Krisztina Pálóczi, Mária Pásztói, Petra Misják, Mária A. Deli, et al. 2011. « Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters ». *Blood* 117 (4) (janvier 27): e39 -e48.

Hayes, Matthew J, Ursula Rescher, Volker Gerke, et Stephen E Moss. 2004. « Annexin-actin interactions ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5 (8) (août): 571-576.

Heijnen, H. F., A. E. Schiel, R. Fijnheer, H. J. Geuze, et J. J. Sixma. 1999. « Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules ». *Blood* 94 (11): 3791-9.

Huber, R., J. Romisch, et E. P. Paques. 1990. « The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes ». *EMBO Journal* 9 (12): 3867-3874.

Huber, Robert, Robert Berendes, Alexander Burger, Monika Schneider, Andrej Karshikov, Hartmut Luecke, Jürgen Römisch, et Eric Paques. 1992. « Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement: Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins ». *Journal of Molecular Biology* 223 (3) (février 5): 683-704.

Hugel, B., M. C. Martinez, C. Kunzelmann, et J. M. Freyssinet. 2005. « Membrane microparticles: two sides of the coin ». *Physiology (Bethesda, Md)* 20: 22-7.

Hugel, B., F. Zobairi, et J.M. Freyssinet. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (10) (octobre 1): 1846-1847.

Jimenez, J. J, W. Jy, L. L Horstman, et Y. S Ahn. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (10) (octobre 1): 1850-1851.

June, Carl H., Ryo Abe, et Peter S. Rabinovitch. 2001. Measurement of Intracellular Calcium Ions by Flow Cytometry. Dans *Current Protocols in Cytometry*, éd par. J. Paul Robinson, Zbigniew Darzynkiewicz, Jurek Dobrucki, William C. Hyun, John P. Nolan, Alberto Orfao, et Peter S. Rabinovitch. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., mai. <http://www.currentprotocols.com/protocol/cy0908>.

Jy, W., L. L. Horstman, J. J. Jimenez, Y. S. Ahn, E. Biro, R. Nieuwland, A. Sturk, et al. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *J Thromb Haemost* 2 (10): 1842-51.

- Kaetzel, M. A., Y. D. Mo, T. R. Mealy, B. Campos, W. Bergsma-Schutter, A. Brisson, J. R. Dedman, et B. A. Seaton. 2001. « Phosphorylation Mutants Elucidate the Mechanism of Annexin IV-Mediated Membrane Aggregation†,‡ ». *Biochemistry* 40 (13): 4192-4199.
- Keller, C. 1998. « Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance ». *Biophysical Journal* 75 (septembre): 1397-1402.
- Kettman, J. R., T. Davies, D. Chandler, K. G. Oliver, et R. J. Fulton. 1998. « Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets ». *Cytometry* 33 (2): 234-243.
- Lacroix, R., S. Robert, P. Poncelet, et F. Dignat-George. 2010. « Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 36 (8): 807-818.
- Laitinen, O. H., V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, et M. S. Kulomaa. 2006. « Genetically engineered avidins and streptavidins ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (novembre 3): 2992-3017.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3^e éd. Springer-Verlag New York Inc., août 21.
- Lambert, Olivier, Nükhet Cavusoglu, Jacques Gallay, Michel Vincent, Jean Louis Rigaud, Jean-Pierre Henry, et Jesus Ayala-Sanmartin. 2004. « Novel Organization and Properties of Annexin 2-Membrane Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (12) (mars 19): 10872 -10882.
- Lauer, S., B. Goldstein, R. L. Nolan, et J. P. Nolan. 2002. « Analysis of Cholera Toxin-Ganglioside Interactions by Flow Cytometry ». *Biochemistry* 41 (6): 1742-1751.
- Lemmon, Mark A. 2008. « Membrane recognition by phospholipid-binding domains ». *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2) (février): 99-111.
- Lennon, Niall J., Alvin Kho, Brian J. Bacsikai, Sarah L. Perlmutter, Bradley T. Hyman, et Robert H. Brown. 2003. « Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-healing ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (50) (décembre 12): 50466 -50473.
- Lu, Y., M. D. Bazzi, et G. L. Nelsestuen. 1995. « Kinetics of annexin VI, calcium, and phospholipid association and dissociation ». *Biochemistry* 34 (34): 10777-85.
- Lynch, S. F., et C. A. Ludlam. 2007. « Plasma microparticles and vascular disorders ». *British journal of haematology* 137 (1): 36-48.
- Mack, M., A. Kleinschmidt, H. Bruhl, C. Klier, P. J. Nelson, J. Cihak, J. Plachy, M. Stangassinger, V. Erfle, et D. Schlondorff. 2000. « Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection ». *Nature medicine* 6 (7): 769-75.
- Martin, JC, et DE Swartzendruber. 1980. « Time: a new parameter for kinetic measurements in flow cytometry ». *Science* 207 (4427) (janvier 11): 199 -201.

McNeil, Anna K., Ursula Rescher, Volker Gerke, et Paul L. McNeil. 2006. « Requirement for Annexin A1 in Plasma Membrane Repair ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (46) (novembre 17): 35202 -35207.

Meers, P., et T. Mealy. 1993. « Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding ». *Biochemistry* 32 (20): 5411-5418.

Meers, Paul. 1990. « Location of tryptophans in membrane-bound annexins ». *Biochemistry* 29 (13) (avril 1): 3325-3330.

Moran, T. A., et C. S. Viele. 2005. « Normal clotting ». *Seminars in oncology nursing* 21 (4 Suppl 1): 1-11.

Morel, O., F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George, et J. M. Freyssinet. 2006. « Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26 (12): 2594-604.

Morel, O., F. Toti, B. Hugel, et J. M. Freyssinet. 2004. « Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors ». *Current opinion in hematology* 11 (3): 156-64.

Mornet, S., O. Lambert, E. Duguet, et A. Brisson. 2005. « The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy ». *Nano letters* 5 (2): 281-5.

Mosser, G., C. Ravanat, J.-M. Freyssinet, et A. Brisson. 1991. « Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis ». *Journal of Molecular Biology* 217 (2): 241-245.

Mrvar-Brecko, Anita, Vid Sustar, Vid Jansa, Roman Stukelj, Rado Jansa, Emir Mujagic, Peter Kruljc, Ales Iglic, Henry Hägerstrand, et Veronika Kralj-Iglic. 2010 « Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 44 (4): 307-312.

Nieuwland, Rienk, Rene J. Berckmans, Reni C. Rotteveel-Eijkman, Kyra N. Maquelin, Klaas J. Roozendaal, Piet G. M. Jansen, Klaas ten Have, Leon Eijnsman, C. Erik Hack, et Auguste Sturk. 1997. « Cell-Derived Microparticles Generated in Patients During Cardiopulmonary Bypass Are Highly Procoagulant ». *Circulation* 96 (10): 3534-3541.

Nolan, J.P., et L.A. Sklar. 1998. « The emergence of flow cytometry for sensitive, real-time measurements of molecular interactions ». *Nature Biotechnology* 16 (7): 633-638.

Nomura, S. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (10) (octobre 1): 1847-1848.

Oling, F., J. S. D. O. Santos, N. Govorukhina, C. Mazères-Dubut, W. Bergsma-Schutter, G. Oostergetel, W. Keegstra, O. Lambert, A. Lewit-Bentley, et A. Brisson. 2000. « Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: A hybrid Cryo-EM - X-ray crystallography study ». *Journal of Molecular Biology* 304 (4): 561-573.

- Oling, Frank, Wilma Bergsma-Schutter, et Alain Brisson. 2001. « Trimers, Dimers of Trimers, and Trimers of Trimers Are Common Building Blocks of Annexin A5 Two-Dimensional Crystals ». *Journal of Structural Biology* 133 (1) (janvier): 55-63.
- Owens, A.P., et N. Mackman. 2011. « Microparticles in hemostasis and thrombosis ». *Circulation Research* 108 (10): 1284-1297.
- Piccin, A., W. G. Murphy, et O. P. Smith. 2007. « Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications ». *Blood reviews* 21 (3): 157-71.
- Pigault, Claire, Anny Follenius-Wund, Marc Schmutz, Jean-Marie Freyssinet, et Alain Brisson. 1994. « Formation of Two-dimensional Arrays of Annexin V on Phosphatidylserine-containing Liposomes ». *Journal of Molecular Biology* 236 (1) (février 10): 199-208.
- van der Pol, E, A G Hoekstra, A Sturk, C Otto, T G van Leeuwen, et R Nieuwland. 2010. « Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 8 (12) (décembre): 2596-2607.
- Reutelingsperger, C P, G Hornstra, et H C Hemker. 1985. « Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 151 (3) (septembre 16): 625-629.
- Reviakine, Ilya, Wilma Bergsma-Schutter, et Alain Brisson. 1998. « Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM ». *Journal of Structural Biology* 121 (3): 356-361.
- Reviakine, Ilya, Wilma Bergsma-Schutter, Christine Mazères-Dubut, Natalia Govorukhina, et Alain Brisson. 2000. « Surface Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force Microscopy ». *Journal of Structural Biology* 131 (3) (septembre): 234-239.
- Reviakine, Ilya, et Alain Brisson. 2000. « Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy ». *Langmuir* 16 (4): 1806-1815.
- Richter, R. P., R. Berat, et A. R. Brisson. 2006. « Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View ». *Langmuir* 22 (8): 3497-3505.
- Richter, R. P., J. L. Him, B. Tessier, C. Tessier, et A. R. Brisson. 2005. « On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers ». *Biophysical journal* 89 (5): 3372-85.
- Richter, Ralf P. 2004. *Formation de membranes lipidiques sur support solide et assemblage bidimensionnel de protéines*. octobre 26.
- Richter, Ralf P., et Alain R. Brisson. 2005. « Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry ». *Biophys. J.* 88 (5): 3422-3433.

- Richter, Ralf, Anneke Mukhopadhyay, et Alain Brisson. 2003. « Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study ». *Biophys. J.* 85 (5): 3035-3047.
- Roberts, G. Seth, Darby Kozak, Will Anderson, Murray F Broom, Robert Vogel, et Matt Trau. 2010. « Tunable Nano/Micropores for Particle Detection and Discrimination: Scanning Ion Occlusion Spectroscopy ». *Small* 6 (23) (décembre 6): 2653-2658.
- Rodahl, M., F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, et B. Kasemo. 1995. « Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments ». *Review of Scientific Instruments* 66 (7): 3924-3930.
- Ross, Michaela, Volker Gerke, et Claudia Steinem. 2003. « Membrane Composition Affects the Reversibility of Annexin A2t Binding to Solid Supported Membranes: A QCM Study† ». *Biochemistry* 42 (10): 3131-3141.
- Rouser, George, Sidney Fleischer, et Akira Yamamoto. 1970. « Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots ». *Lipids* 5 (mai): 494-496.
- Sauerbrey, Günter. 1959. « Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung ». *Zeitschrift für Physik* 155 (avril): 206-222.
- Seaton, B. A., et J. R. Dedman. 1998. « Annexins ». *Biometals* 11 (4): 399-404.
- Seaton, Barbara Ann. 1995. *Annexins: Molecular Structure to Cell Function*. Chapman & Hall, décembre.
- Shapiro, Howard M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4^e éd. John Wiley & Sons Inc, août 8.
- Shet, A. S, N. S Key, et R. P Hebbel. 2004. « Measuring circulating cell-derived microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (10) (octobre 1): 1848-1850.
- Sklar, L. A. 1987. « Real-Time Spectroscopic Analysis of Ligand-Receptor Dynamics ». *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 16 (1) (juin): 479-506.
- Sklar, L.A., et D.A. Finney. 1982. « Analysis of ligand-receptor interactions with the fluorescence activated cell sorter ». *Cytometry* 3 (3): 161-165.
- Sklar, Larry A. 2005. *Flow Cytometry for Biotechnology*. First Edition. OUP USA, septembre 29.
- Smalley, David M., Nicholas E. Sheman, Kristina Nelson, et Dan Theodorescu. 2008. « Isolation and Identification of Potential Urinary Microparticle Biomarkers of Bladder Cancer ». *Journal of Proteome Research* 7 (5) (mai 2): 2088-2096.
- Smoluchowski, M. 1917. « Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. » *Z. Phys. Chem.* 92: 129-168.

- Stuart, M. C., C. P. Reutelingsperger, et P. M. Frederik. 1998. « Binding of annexin V to bilayers with various phospholipid compositions using glass beads in a flow cytometer ». *Cytometry* 33 (4): 414-9.
- Swairjo, M. A., N. O. Concha, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, et B. A. Seaton. 1995. « Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V ». *Nature structural biology* 2 (11): 968-74.
- Tait, J. F., S. Engelhardt, C. Smith, et K. Fujikawa. 1995. « Prourokinase-annexin V chimeras. Construction, expression, and characterization of recombinant proteins ». *The Journal of biological chemistry* 270 (37): 21594-9.
- Tait, J. F., D. F. Gibson, et C. Smith. 2004. « Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy ». *Analytical biochemistry* 329 (1): 112-9.
- Tait, J. F., D. Gibson, et K. Fujikawa. 1989. « Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family ». *J. Biol. Chem.* 264 (14): 7944-7949.
- Tamm, L. K., et H. M. McConnell. 1985. « Supported phospholipid bilayers ». *Biophysical Journal* 47 (1): 105-113.
- Tesselaar, M.E.T., F.P.H.T.M. Romijn, I.K. Van Der Linden, F.A. Prins, R.M. Bertina, et S. Osanto. 2007. « Microparticle-associated tissue factor activity: A link between cancer and thrombosis? ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (3): 520-527.
- Théry, C., L. Zitvogel, et S. Amigorena. 2002. « Exosomes: Composition, biogenesis and function ». *Nature Reviews Immunology* 2 (8): 569-579.
- Thiagarajan, P., et J. F. Tait. 1990. « Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets ». *The Journal of biological chemistry* 265 (29): 17420-3.
- Troutier, A.-L., et C. Ladavière. 2007. « An overview of lipid membrane supported by colloidal particles ». *Advances in Colloid and Interface Science* 133 (1): 1-21.
- VanWijk, M. J., E. VanBavel, A. Sturk, et R. Nieuwland. 2003. « Microparticles in cardiovascular diseases ». *Cardiovascular research* 59 (2): 277-87.
- Viratelle, Odile. 1997. *Protéines et enzymes: TD [Travaux dirigés]*. Hermann, octobre 21.
- Warkentin, T. E., et J. I. Sheppard. 1999. « Generation of platelet-derived microparticles and procoagulant activity by heparin-induced thrombocytopenia IgG/serum and other IgG platelet agonists: a comparison with standard platelet agonists ». *Platelets* 10 (5): 319-26.
- Weber, M., et J. P. Changeux. 1974. « Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. I. Binding of the tritiated alpha-neurotoxin in the absence of effector ». *Molecular pharmacology* 10 (1): 1-14.

Weng, Xiangwei, Hartmut Luecke, In Sung Song, Doe Sun Kang, Sung-Hou Kim, et Robert Huber. 1993. « Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution ». *Protein Science* 2 (3) (mars 1): 448-458.

Wolf, Peter. 1967. « The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma ». *British Journal of Haematology* 13 (3): 269-288.

Yuana, Y., T. H. Oosterkamp, S. Bahatyrova, B. Ashcroft, P. Garcia Rodriguez, R. M. Bertina, et S. Osanto. 2009 « Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8 (2): 315-323.

Zachowski, A. 1993. « Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement ». *Biochemical Journal* 294 (1): 1-14.

Zwaal, R. F. A., et A. J. Schroit. 1997. « Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells ». *Blood* 89 (4): 1121-1132.

Zwaal, R. F., P. Comfurius, et E. M. Bevers. 1998. « Lipid-protein interactions in blood coagulation ». *Biochimica et biophysica acta* 1376 (3): 433-53.

Zwaal, Robert F. A., Paul Comfurius, et Edouard M. Bevers. 2004. « Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1636 (2-3) (mars 22): 119-128.

Article :

Nicolas Arraud, Sisareuth Tan, Céline Gounou, Jean-Max Pasquet, Stéphane Mornet, Alain R. Brisson

Characterization of Microparticles from Blood Plasma and Activated Platelets,
by Cryo-Electron Microscopy and Annexin-A5 Gold Labeling

Manuscrit soumis à Blood.

Characterization of Microparticles from Blood Plasma and Activated Platelets, by Cryo-Electron Microscopy and Annexin-A5 Gold Labeling

Nicolas Arraud¹, Sisareuth Tan¹, Céline Gounou¹, Jean-Max Pasquet², Stéphane Mornet³,
Alain R. Brisson¹

¹Molecular Imaging and NanoBioTechnology, IECB, UMR-5248 CBMN CNRS-University
Bordeaux1-ENITAB, Allée Geoffroy de Saint Hilaire, F-33600 Pessac, France

²Hématopoïèse Leucémique et Cibles Thérapeutiques, UMR-U876, INSERM-University
Bordeaux Segalen, Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

³Chimie des Nanomatériaux, UPR-9048 ICMCB, CNRS, F-33608 Pessac, France

*corresponding author : a.brisson@iecb.u-bordeaux.fr

Tel: +33 (0)5 40003458

Fax: +33 (0)5 40002201

Running title: Morphology and size histogram of platelet microparticles

BLOOD - Regular Articles

Primary Scientific Category: Platelets and Thrombopoiesis

Secondary Scientific Category: Thrombosis and Hemostasis

Word count for text: 3338

Word count for abstract: 199

Figure number: 6

Reference number: 47

ABSTRACT

Microparticles are membrane fragments that derive from activated or apoptotic cells and are found in plasma and other biological fluids. In plasma, a majority of microparticles originate from platelets. A fraction of plasmatic microparticles expose at their surface the procoagulant lipid phosphatidylserine (PS) and participate in physiological processes of hemostasis or inflammation. Elevated levels of plasmatic microparticles are found in various pathological disorders, which explains efforts to use microparticles as disease biomarkers. However, the detection and quantification of microparticles is hampered by their small size, which ranges from 50 nm to 1 μm , and the limitations of current analytical methods. Here, we used cryo-Electron Microscopy and PS-specific gold labeling and provide a comprehensive structural description of the whole population of microparticles and the sub-population of PS-exposing microparticles present in plasma or derived from activated platelets. The morphology of plasmatic microparticles is described and size histograms are presented. Platelet-derived microparticles range in size from 50 nm to 3 μm , 75% of them being smaller than 500 nm. PS-exposing microparticles constitute 70% of the total population. This study provides novel structural information on platelet-derived microparticles and opens avenues for characterizing microparticles from different cell origins or associated with various physiopathological situations.

CONFIDENTIAL

INTRODUCTION

Microparticles are sub-cellular membrane fragments that are found in plasma or other biological fluids, including synovial liquid, urine, saliva or tears^{1,2}. Microparticles are released by cells during activation or apoptosis and present at their surface receptors that allow identifying their cellular origin. After being considered initially as cellular dust³, microparticles are now recognized as involved in physiological processes like hemostasis and inflammation, while elevated levels of microparticles are observed in various pathological disorders, including cardiovascular and inflammatory diseases, pre-eclampsia and cancer⁴⁻⁷. Microparticles mediate their actions via bioactive effectors present at their surface or contained within their interior, and may activate cellular processes either locally or at distance from their site of production after dissemination through the circulation^{8,9}. In the bloodstream, the most abundant microparticle population originates from platelets¹⁰. Platelet-derived microparticles participate in physiological coagulation processes via the presence at their surface of the procoagulant lipid phosphatidylserine (PS)¹¹. Defects of PS exposure or microparticle formation by blood platelets are responsible for bleeding disorders^{12,13}. Moreover, elevated levels of PS-exposing microparticles have been observed in various pathological situations, including thrombotic and inflammatory diseases, cancer and diabetes^{5,10,14}. Given their potential role in physiopathological processes, active research aims at developing diagnosis or prognosis assays based on microparticle detection and quantification¹⁵⁻¹⁷.

The characterization of microparticles faces however important experimental difficulties. The term microparticle itself is still poorly defined. Microparticles originate not only from different cell groups but also from different cellular compartments. The term microparticle, or microvesicle, is mostly used for vesicles generated at the plasma membrane, while the term exosome is used for vesicles originating from multivesicular bodies^{9,18}. In this paper, the term microparticle is used with a broad definition, describing any particulate material observed in plasma samples, with a size larger than 20 nm. The main source of difficulty in the characterization of microparticles comes from their small size and their broad size distribution, which ranges from 50 nm to 1 μ m according to current consensus^{19,20}. The most widely used method for identifying and quantitating microparticles is flow cytometry^{21,22}, which detects objects on the basis of their size and/or their antigenic content. However, most flow cytometers are only able to detect objects larger than about 400 nm, due to light scattering limitations^{20,23}. This explains why flow cytometry is often referred to as

“detecting only the peak of the iceberg of microparticles”. Alternative methods have been, and are, introduced for detecting the whole microparticle population. Freyssinet and coworkers have proposed an original method for detecting the sub-population of PS-exposing microparticles based on their capture on a solid support functionalized with annexin-A5 (Anx5), a high-affinity ligand of PS molecules²⁴, and their quantification by a prothrombinase assay²⁵. Furthermore, methods used in colloid science for characterizing small objects start being applied to the study of microparticles, including dynamic light scattering, single particle tracking, or atomic force microscopy^{20,23,26–29}. One additional challenge in microparticle studies is that experimental conditions used for sample collection, handling and storage may lead to cell activation and microparticle formation^{22,30}. In addition, methods used for their isolation and purification involve often centrifugation and/or filtration procedures, which may result in the generation of microparticles or oppositely in the undesired selection of microparticle populations depending of their size or hydrodynamical properties³⁰. These difficulties explain efforts developed for standardizing pre-analytical preparation conditions and analytical steps in microparticle analysis²².

The aim of this study was to provide a comprehensive structural description of the morphology and size of the entire population of microparticles, as well as the sub-population of PS-exposing microparticles, present in plasma or obtained after platelet activation. Our approach consisted in combining cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-EM) with the use of specific markers of PS molecules made of gold nanoparticles functionalized with Anx5. The rationale was as follows: i) cryo-EM is the least invasive EM preparation technique³¹. In cryo-EM, particles or molecules are quickly frozen and observed unstained, in their hydrated state. By comparison, most other EM techniques involve steps of drying, fixation or staining, which are prone to alter the structure of membrane-based particles; ii) cryo-EM is particularly well adapted for the analysis of particulate material like membrane fragments with size ranging from few tens of nm to several hundred nms, which is precisely the range of microparticle sizes; iii) cryo-EM is applicable in principle to samples present in complex media, like plasma, avoiding the need for separation or purification procedures; iv) cryo-EM combined with specific gold labeling should allow the identification of PS-exposing microparticles, thanks to the high electron scattering properties of gold nanoparticles³²; v) we have synthesized original gold nanoparticles coupled to Anx5 (Anx5-gold-NPs)³³, which allow labeling of PS-exposing microparticles in a single step procedure, as shown in the Results section.

We present here a structural description and size histograms of microparticles and PS-exposing microparticles from platelet-poor plasma (PPP) and activated platelet samples. This study provides novel information on plasmatic microparticles, which is discussed in the context of previous studies.

CONFIDENTIEL

MATERIAL and METHODS

1- Material

Human α -thrombin and PPACK (Phe-Pro-Arg-chloromethylketone) were obtained from Cryopep (Montpellier, France). Collagen (bovine tendon) was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Favallier, France). Thrombin receptor agonist peptide (TRAP) was a gift from Dr. Paquita Nurden. All other chemicals were of ultrapure grade. Water was purified with a RiOs system (Millipore, France). A HEPES-buffered saline (HBS) containing 150 mM NaCl, 2 mM NaN₃ and 10 mM HEPES, pH 7.4, supplemented or not with 2 mM CaCl₂ as indicated in the text, was used throughout this study.

2- Anx5-functionalized gold nanoparticles

The synthesis and characterization of Anx5-gold nanoparticles (Anx5-gold-NPs) (Supplementary Figure 1) is described in³³ and will be published elsewhere. Anx5-gold-NPs used in this study consisted of either 4 or 10 nm gold particles and presented, on average, one Anx5 molecule per particle.

3- Human plasma samples

Venous blood was collected from five healthy adult donors using a 21-Gauge needle and 3 mL S-Monovette tubes (Sarstedt GmbH, Germany) containing 0.1 volume of 106 mM trisodium citrate, without applying a tourniquet. Blood samples were obtained after written informed consent in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki and the experiments were approved by the Research Ethics Committee. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) samples were prepared immediately after blood collection, after discarding the first tube of collected blood. For preparing PRP samples, whole blood tubes were centrifuged at 200 g for 5 min at 22°C. The upper half of the supernatant was harvested and pooled, giving PRP samples. For preparing PPP samples, whole blood tubes were first centrifuged at 1,500 g for 15 min at 22°C. The upper part of the supernatant was harvested, pooled into Ependorf tubes and centrifuged at 13,000 g for 2 min at 22°C, in order to eliminate most remaining platelets³⁴. The upper part of the supernatant was harvested and pooled, giving PPP samples.

4- Preparation of activated platelets and Anx5-gold labeling

Platelets from PRP samples were activated as follows³⁵. First, 10 μL PRP were mixed with 5 μL PPACK (10 μM final concentration) and 85 μL HBS supplemented with 2 mM CaCl_2 (HBS-Ca). Secondly, either 1 μL thrombin (0.5 U/mL final), or a mixture of 1 μL thrombin (0.5 U/mL final) and 1 μL collagen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final), or 1 μL TRAP (12.5 μM final) were added and incubated for 10 min. Finally, 1 μL Anx5-gold-NP at 3×10^{17} P/L was added and incubated for 15 min before processing for cryo-EM.

5- Sample preparation for cryo-EM

PPP or activated platelet samples were prepared for cryo-EM, between 2h and 4h after blood collection, as follows. A 4- μL aliquot was deposited on an EM grid coated with a perforated carbon film and quickly frozen in liquid ethane. EM grids were transferred and maintained under liquid nitrogen prior to EM observation.

For cryo-EM, the grids were mounted in a Gatan 626 cryoholder and transferred into a Tecnai F20 (FEI) microscope operated at 200 kV. Images were recorded with an USC1000-SSCCD camera (Gatan, USA).

6- Size histogram determination

EM grids were scanned over their entire surface using Digital Micrograph software (Gatan), and images were recorded for every particulate material present in the sample. Less than 5% of the recorded images were discarded because they corresponded either to ill-defined material, like fibers, or to ethane deposits that are easily recognizable. None of the discarded objects was labeled with Anx5-gold particles.

RESULTS

1- Cryo-EM images of microparticles in freshly prepared, undiluted PPP samples

The first questions we asked were: Is it possible to obtain reliable images of the material contained in undiluted, unprocessed PPP samples, by cryo-EM? and Which type of particulate material is contained in pure PPP samples? As illustrated in Figure 1, cryo-EM enables to image the particulate material present in pure PPP sample, with high resolution. The major type of particulate material observed in PPP consists of isolated vesicles of spherical shape (Figure 1 A,B). These vesicles have a diameter ranging from about 50 to 500 nm, with few vesicles larger than 500 nm. The vesicles are limited by a lipid membrane, as revealed by the presence at their periphery of two darker lines distant by about 4 nm (arrow in Figure 1A)³⁶. These isolated membrane vesicles correspond by definition to microparticles and will be referred hereafter as microparticles of type-1. Although type-1 microparticles constitute the majority of particulate material found in PPP, it is noticeable that they are rare, even in pure, undiluted plasma samples.

The second type of particulate material present in PPP consisted of clusters of vesicles (Figure 1C). These clusters, referred to as type-2 microparticles, are about ten times less numerous than type-1 microparticles. Given the rarity of type-1 microparticles in PPP, it is logical to consider that type-2 microparticles pre-exist in PPP samples, and therefore that vesicles forming a cluster are associated by some sort of stable interaction.

The third type of object observed in PPP samples consisted of blood platelets (Supplementary Figure 2). Platelets observed in PPP samples presented morphological features characteristic of intact platelets. This indicates that the procedures used in cryo-EM do not induce platelet activation, and therefore that the microparticles described above were present in PPP samples before processing. Platelets were rare in PPP samples, yet unambiguously recognized and reproducibly observed³⁷. Complementary flow cytometry experiments performed on the same PPP samples indicated a maximum number of about 10,000 platelets per mL of PPP (data not shown).

2- Microparticles from activated platelets, by cryo-EM and Anx5-gold labeling

As the total amount of microparticles in undiluted PPP was too low for performing a reliable statistical analysis, and as platelet-derived microparticles form the main population of plasmatic microparticles³⁸, we decided to continue our analysis on microparticles obtained after platelet activation. Platelet activation of freshly prepared PRP samples was induced with

either thrombin, a combination of thrombin and collagen, or TRAP; the results obtained with these three agonists were very similar and combined in subsequent analysis.

In order to identify the sub-population of microparticles that expose the procoagulant lipid PS, we used gold nanoparticles covalently functionalized with Anx5 (Anx5-gold-NPs)³³. Most microparticles present in activated platelet samples consisted of type-1 microparticles. Two types of microparticles were clearly distinguished, which consisted of microparticles either densely covered with Anx5-gold-NPs or entirely free of Anx5-gold-NPs (Figure 2). This all-or-none labeling situation demonstrates the high binding specificity of Anx5-gold-NPs for PS-exposing membrane surfaces. Furthermore, this indicates that, when exposed, PS molecules are homogeneously distributed over the microparticle surface. Most type-1 microparticles vary in size from 50 nm to 500 nm.

In addition to isolated microparticles, type-2 microparticles were also present in activated platelet samples (Figure 3). Most vesicles forming these clusters were labeled with Anx5-gold-NPs. The number of vesicles per cluster ranged from three (value chosen as minimal for being classified as a cluster) to fifty. The overall size of type-2 microparticles ranged from 300 nm to near 2 μ m.

A third type of particulate material was observed in activated platelet samples, which consisted in large aggregate-like structures (Figure 4). These objects, referred to as type-3 microparticles, were rare, yet reproducibly observed in all samples analyzed so far. Type-3 microparticles consisted of a core made of the assembly of small particulate material associated with circular particles at the periphery. These circular particles presented a uniform grey density, indicating that they have most likely a similar composition and a common origin. The overall size of type-3 microparticles ranged from 900 nm to about 3 μ m. None of type-3 microparticles was labeled with Anx5-gold-NP. It is noticeable that these structures do not seem to be surrounded by a lipid membrane.

In addition to the three types of microparticles, numerous blood platelets were also observed in activated platelet samples, as expected. Different states of platelet activation were clearly distinguished by cryo-EM (Supplementary Figure 3).

3- Size histograms of microparticles and PS-exposing microparticles from activated platelet samples

Size histograms of microparticles and PS-exposing microparticles were determined over a total number of 1,000 microparticles from five different samples (Figure 5). The size histogram of the whole population of microparticles (Figure 5A,B, blue bars) indicates that

about 75% of microparticles range in size from 50 to 500 nm, with a broad maximum between 100 and 400 nm. From the remaining 25% of microparticles that are larger than 500 nm, 30% are comprised between 1 and 3 μm . The repartition of microparticles in type-1, type-2 and type-3 is presented in Figure 5B. Type-1 microparticles (pink) represent about 90% of the total population. Type-2 microparticles (green) represent about 10% of all the microparticles. About 60% of them are larger than 1 μm . There are on average ten vesicles per type-2 microparticle, so that the total number of vesicles forming type-2 microparticles is equivalent to the total number of isolated, or type-1, microparticles. Type-3 microparticles (red) represent only 1 to 2% of the total microparticle population and range in size from about 1 to 3 μm .

The size histogram of PS-exposing microparticles (orange bars in Figure 3A) closely matches the histogram of the whole microparticle population. About 70% of the total population of platelet-derived microparticles bind Anx5. PS-negative microparticles correspond principally to type-1 microparticles smaller than 400 nm (see also Figure 2), and to a minor extent to type-3 microparticles.

CONFIDENTIAL

DISCUSSION

The objective of this study was twofold: 1) to provide a comprehensive structural description of plasmatic microparticles from healthy donors, and 2) to determine the size histograms of the entire population of microparticles and the sub-population of procoagulant PS-exposing microparticles. The results obtained by the selected strategy, which combines cryo-EM and PS-specific gold labeling, are discussed in the context of previously published studies.

The fact that microparticles could be observed unambiguously in pure PPP samples and that different morphological types of microparticles could be identified demonstrates the power of cryo-EM for microparticle analysis. In comparison, the most commonly used EM preparation techniques, namely negative staining and thin section EM, while they have proven useful for imaging sub-cellular particles such as type-1 microparticles^{29,39-41}, present intrinsic limitations in characterizing objects with complex morphologies, like type-2 or type-3 microparticles. Negative staining involves a step of drying, which induces a collapse of vesicular structures as well as artefactual concentration effects, and is hardly compatible with samples containing high protein amounts, like plasma (Supplementary Figure 4). An additional keypoint of our strategy is that labeling with the Anx5-gold-NPs is a simple one-step labeling process. In comparison, most immuno-gold labeling techniques like those use in thin section EM, involve a multi-step process, consisting firstly of labeling antigens with primary antibodies, secondly of removing unbound primary antibodies by centrifugation and thirdly of labeling bound primary antibodies with gold-conjugated secondary antibodies. Such a procedure is not feasible with small volume (few μLs) samples like pure PPP, and in addition, treatments like centrifugation may induce platelet activation or result in undesired selection of microparticles.

A major achievement of this study was to provide a structural description of the entire population of plasmatic microparticles, for the first time to our knowledge. Every particulate material observed in the investigated samples was included in the analysis, because there was no objective reason to discard any object. The smallest objects observed in plasma samples were small microparticles, like those shown in Figure 1B. On the other hand, microparticles with a size larger than $1\ \mu\text{m}$ could also be unambiguously distinguished from blood platelets and classified as type-2 or type-3 microparticles. Therefore, all particulate material with a size comprised between $50\ \text{nm}$ and $3\ \mu\text{m}$ was included in this analysis.

The main results from the size distribution analysis are presented as a scheme in Figure 6. Microparticles from activated platelets can be classified into three main groups,

based on their morphological characteristics: 1) isolated microparticles, or type-1 microparticles, form the major population, about 90%, of all the microparticles. Most (80%) type-1 microparticles range in size from 50 to 500 nm, among which about half of them expose PS. The majority of type-1 microparticles larger than 500 nm expose PS; 2) clusters of vesicles, or type-2 microparticles, represent about 10% of the total population and contain almost exclusively PS-exposing vesicles. Most (>50%) of them are larger than 1 μm . It is important to note that, as the total number of vesicles forming type-2 microparticles is similar to the total number of type-1 microparticles, the membrane surfaces exposed by type-1 and type-2 microparticles are equivalent, and hence their associated biological effect may also be equivalent; 3) type-3 microparticles have a non-vesicular morphology and an aggregate-like aspect. They do not expose PS and range in size from 1 to 3 μm . They are rare, about 2% of the total, yet reproducibly observed. It is worth noting that these three types of microparticles were also found in microparticles from pellets of PPPs, with a similar size distribution (data not shown).

What is the relevance of these findings in the context of previous flow cytometry studies on plasmatic microparticles? In flow cytometry, microparticles are detected on the basis of size criteria through a size window. In most studies, beads of calibrated size are used to set the lower limit of this gate, near 500 nm^{30,42}, while the higher limit is often defined by reference to the size of the smallest platelets or by means of calibrated beads, near 1 μm ^{29,30,34,43}. In fact, the actual size window used for microparticle detection is not known with precision, because the refractive index of polymer beads used to set these limits is different from that of microparticles. Considering the size histogram presented here, most plasmatic microparticles fall outside a window ranging from 500 nm to 1 μm . Such a window covers only a minor part of type-1 microparticles and a fraction, difficult to estimate, of type-2 and type-3 microparticles. This may explain some contrasting results from the literature, particularly concerning the amount of PS-exposing microparticles⁴⁴⁻⁴⁶. We show here that PS-exposing microparticles constitute about 70% of all the platelet-derived microparticles, and 80% of the microparticles larger than 500 nm. Therefore, a size window comprised between 500 nm and 1 μm would correspond to less than 20% of all the microparticles, including only a quarter of type-2 microparticles, which all bind Anx5, and type-3 microparticles, which do not bind Anx5. If the actual size window is shifted towards larger dimensions, mostly type-3 microparticles, which are the largest microparticles, would be detected, leading to the erroneous conclusion that most microparticles fail to bind Anx5. Another important result from this study is that setting an upper limit at or near 1 μm excludes most microparticles of

type-2 and type-3. Although these microparticles are rare, they present large membrane areas, so that their integrated effect may be equivalent to the effect produced by a large number of smaller microparticles.

This study demonstrates that cryo-EM combined with specific gold-labeling constitutes a powerful approach for characterizing the morphology and the size distribution of microparticles. This approach, applied here to the case of PS-exposing plasmatic microparticles, is in principle applicable to other types of microparticles, provided molecular tools equivalent to the Anx5-gold-NPs are developed for other antigens. Labeling microparticles with gold labels may also find interesting application in detection studies, thanks to gold high refractive index or plasmonic properties⁴⁷.

CONFIDENTIEL

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge helpful discussions with Alan Nurden and Paquita Nurden throughout this study. We thank Mrs Guillonet and Dr. Le Provost for their help with the collection of blood samples. This study was supported in part by ANR-EMPB (grant 2007-021-01 MP-NPAuA5 to AB).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

NA has contributed to the supervision of the project and has performed the preparation of the blood samples and the flow cytometry studies; ST has performed the EM experiments; CG has produced the Anx5 proteins; SM has synthesized the Anx5-gold-NPs; JMP has contributed to the initial phase of elaboration of the project; ABB has coordinated the entire project.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors state that they have no conflict of interest.

CONFIDENTIAL

REFERENCES

1. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*. 2007;21(3):157-71.
2. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Microparticles in health and disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008;34(7):683-691.
3. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*. 1967;13(3):269-288.
4. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 2003;59(2):277-287.
5. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1655-62.
6. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb. Res.* 2008;123(1):8-23.
7. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):441-454.
8. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Current opinion in hematology*. 2004;11(3):156-64.
9. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(8):581-593.
10. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999;30(2):111-142.
11. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85(4):639-46.
12. Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, et al. Defective ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of scott syndrome. *Blood*. 1992;79(2):380-388.
13. 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. *British Journal of Haematology*. 1997;96(3):458-463.
14. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research*. 2003;59(2):277-87.
15. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial microparticles (emp) as vascular disease markers. *Adv Clin Chem.* 2005;39:131-157.
16. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):180-186.
17. Roberson CD, Atay S, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Tumor-derived exosomes as mediators of disease and potential diagnostic biomarkers. *Cancer Biomark.* 2010;8(4):281-291.
18. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009;21(4):575-581.
19. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51.
20. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(12):2596-2607.
21. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 2004;2(10):1842-1851.

22. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al. 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(11):2571-2574.
23. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2011;
24. Tait JF, Gibson DF, Smith C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin v-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Analytical biochemistry.* 2004;329(1):112-9.
25. Aupeix K, Hugel B, Martin T, et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in hiv-1 infection. *J. Clin. Invest.* 1997;99(7):1546-1554.
26. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2009;96(3):206-212.
27. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(2):315-323.
28. Braeckmans K, Buyens K, Bouquet W, et al. Sizing nanomatter in biological fluids by fluorescence single particle tracking. *Nano Lett.* 2010;10(11):4435-4442.
29. György B, Módos K, Pállinger E, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood.* 2011;117(4):e39-48.
30. Ayers L, Kohler M, Harrison P, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb. Res.* 2011;127(4):370-377.
31. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 1988;21(2):129-228.
32. Stuart MC, Bevers EM, Comfurius P, et al. Ultrastructural detection of surface exposed phosphatidylserine on activated blood platelets. *Thromb. Haemost.* 1995;74(4):1145-1151.
33. Mornet S, Brisson A. Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins. Application to the high-density labeling of cell membranes. Patent WO2007122259
34. Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004;2(10):1844-1845.
35. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin v as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood.* 1993;81(10):2554-65.
36. Lambert O, Gerke V, Bader M-F, Porte F, Brisson A. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology.* 1997;272(1):42-55.
37. White JG, Krumwiede M. Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thromb. Haemost.* 2007;98(1):69-72.
38. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood.* 2009;113(5):1112-1121.
39. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J. Cell Biol.* 1990;111(2):483-493.
40. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release

two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-9.

41. Mrvar-Brecko A, Sustar V, Jansa V, et al. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 44(4):307-312.

42. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a cytomics fc500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(1):190-197.

43. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *British journal of haematology*. 2007;137(1):36-48.

44. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis research*. 2003;109(4):175-80.

45. Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A*. 2007;71(1):38-45.

46. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin v, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein ii_b. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010;103(5):1044-1052.

47. Nam J-M, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. 2003;301(5641):1884-1886.

CONFIDENTIAL

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Plasmatic microparticles in undiluted PPP, by cryo-EM.

(A,B), Examples of isolated type-1 microparticles embedded in a thin film of frozen plasma. The resolution of cryo-EM images is about 2 nm, as demonstrated by the clear resolution of the two lipid leaflets from the surrounding membrane (arrow in A). The granular aspect of the background is due to the high protein content of the plasma. The size of the microparticles is 190 nm in (A), and 50 nm and 65 nm in (B).

(C), Type-2 microparticle, made of a cluster of about twenty vesicles. The homogeneity in morphology, size and overall aspect (presence of small internal dark granulations) of the vesicles suggests that they have a common origin.

The white asterisks point to the support carbon films. Scale bars: 100 nm.

Figure 2. Gallery of type-1 microparticles from activated platelets, by cryo-EM and Anx5-gold-NP labeling.

(A-D), Typical images of type-1 microparticles. Some microparticles are densely covered with gold particles, while other microparticles are entirely devoid of labeling. Note the high specificity of Anx5-gold-NP labeling, particularly striking in (C,D) where two microparticles, one densely labeled, the other unlabeled, are at close distance. In (D), the few gold particles present over the small microparticle on the right are likely to have been displaced from the large microparticle by shearing effects occurring during the few tens of millisecond of the plunging step. The almost total absence of gold particles in the background reflects the high affinity of Anx5 for PS. Gold nanoparticles of 4-nm and 10-nm were used in (A) and (D), and (B) and (C), respectively. Scale bars: 100 nm.

Figure 3. Type-2 microparticles, by cryo-EM and Anx5-gold-NP labeling.

(A,B), Examples of clusters of vesicles. Most vesicles are densely covered with Anx5-gold-NPs. In (B), one single vesicle is devoid of gold particle (arrow). Scale bars: 200 nm.

Figure 4. Type-3 microparticle.

Typical image of a type-3 microparticle, of about 3 μm in size. Scale bar: 1 μm .

Figure 5. Size histograms of microparticles from activated platelet samples.

Color code: (A), blue, whole microparticle population; orange, Anx5-binding microparticles. (B), pink, type-1 microparticles; green, type-2 microparticles; red, type-3 microparticles.

Figure 6. Scheme of the size distribution of plasmatic microparticles.

Type-1 Microparticles are mostly comprised between 50 and 500 nm and are distributed about equally between Anx5-positive (red contour) and Anx5-negative (blue contour) microparticles. Type-2 and type-3 microparticles are comprised between about 500 nm and 1.5 μm , and between 1 and 3 μm , respectively.

CONFIDENTIEL

FIGURES

FIGURE-1

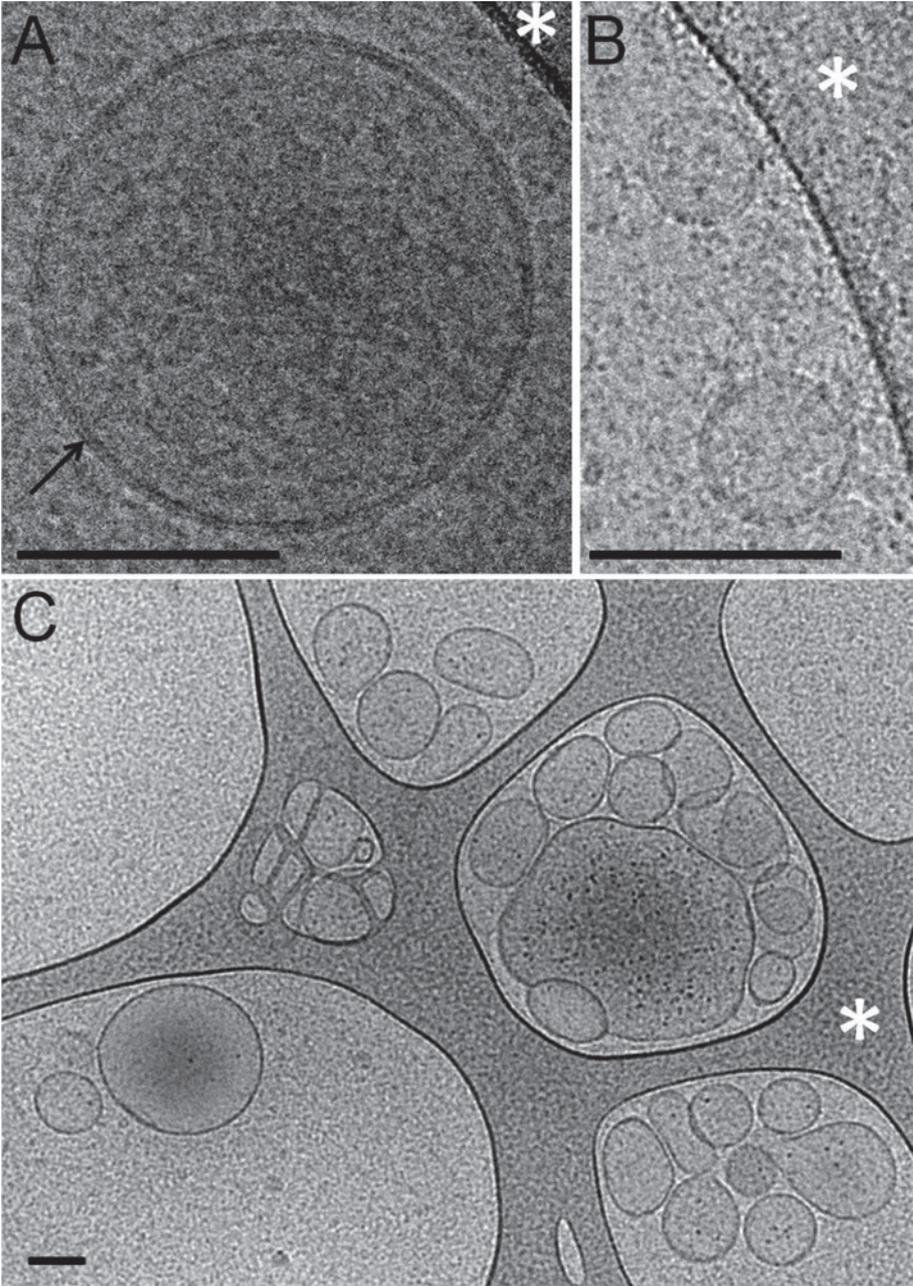
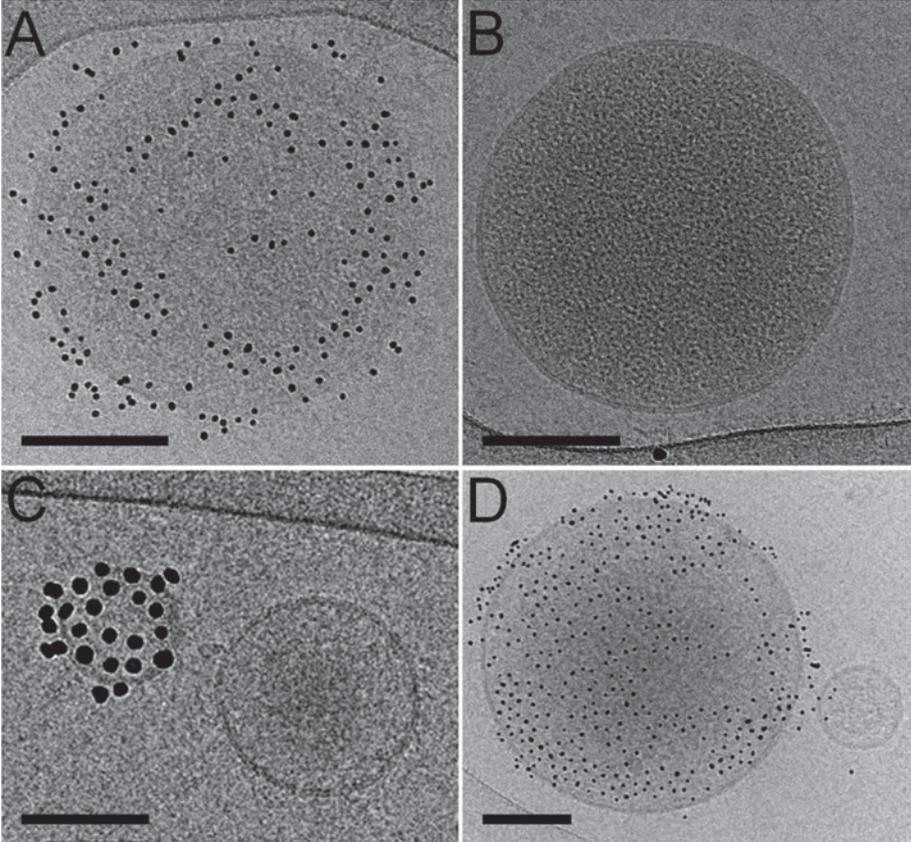


FIGURE-2



CONFIDENTIAL

FIGURE-3

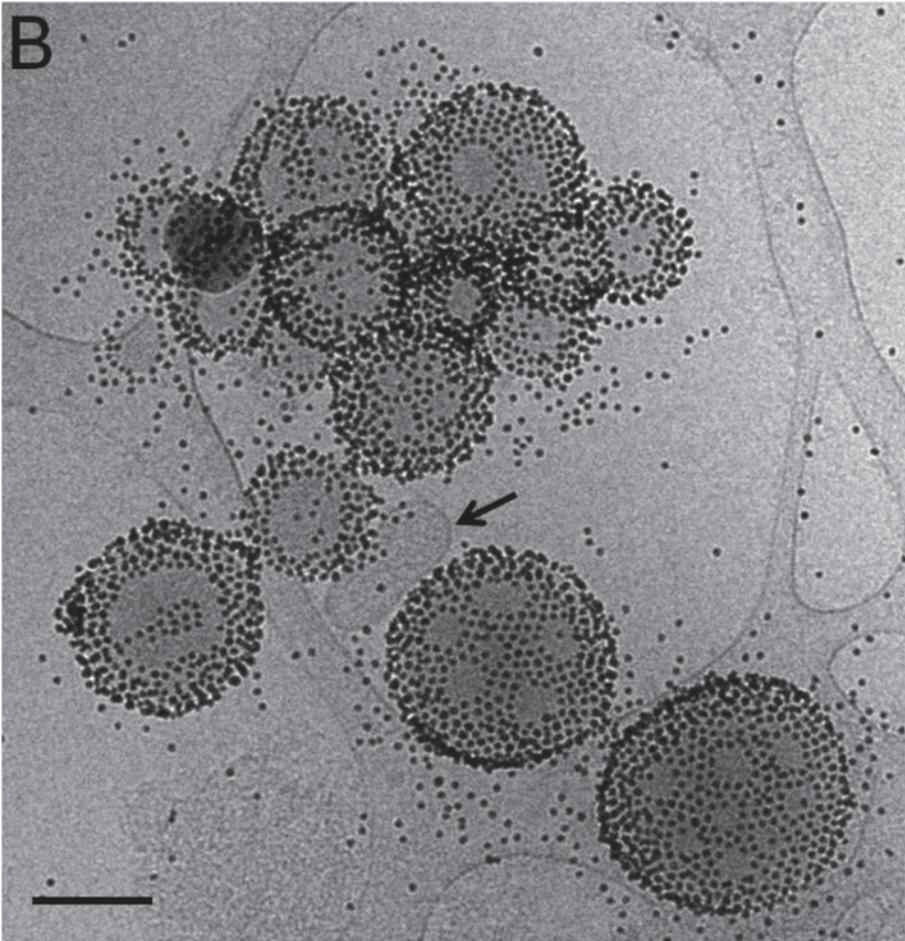
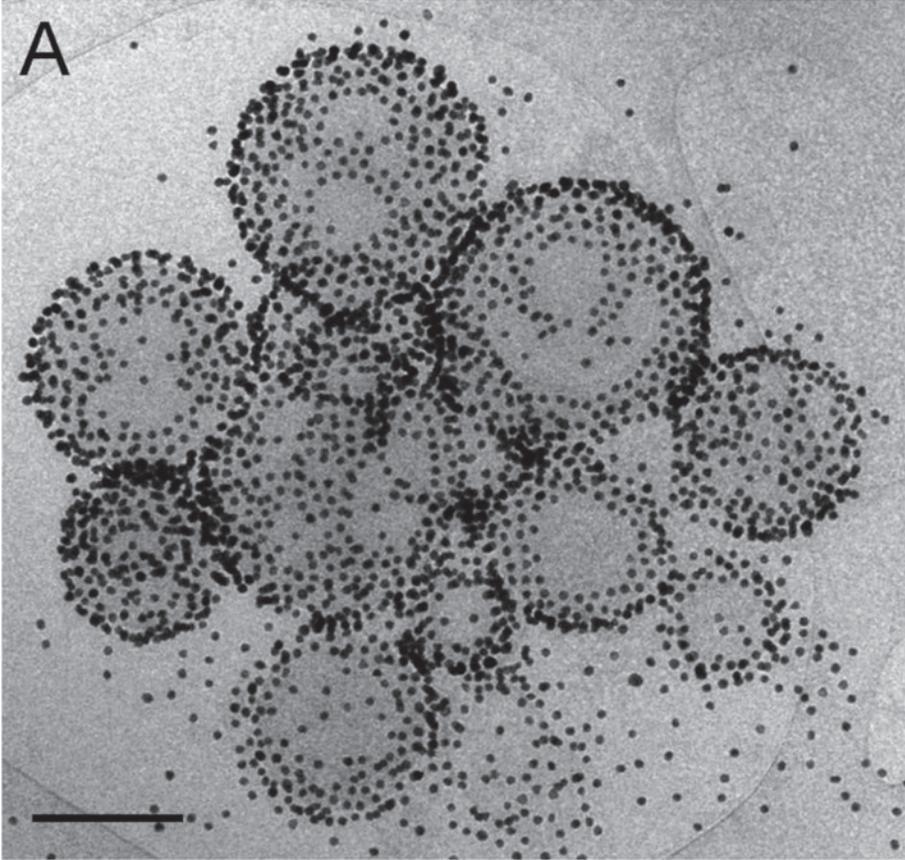
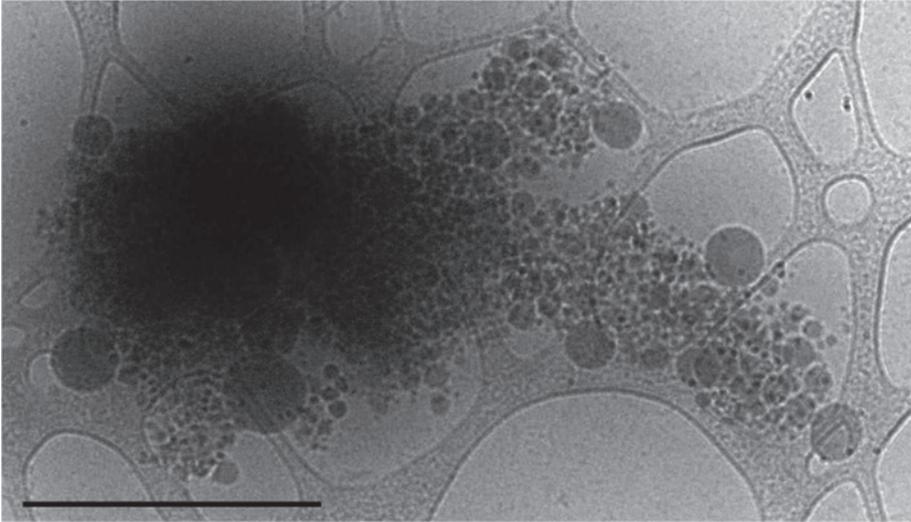


FIGURE-4



TEL

FIGURE-5

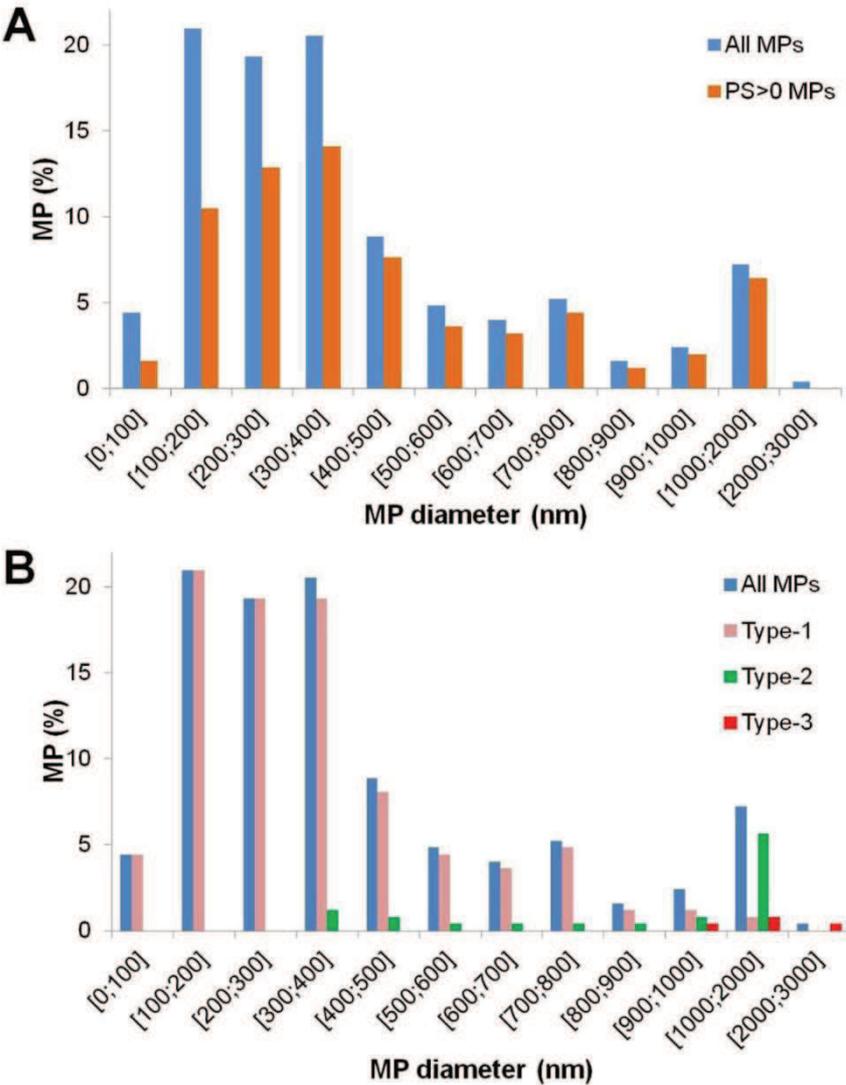
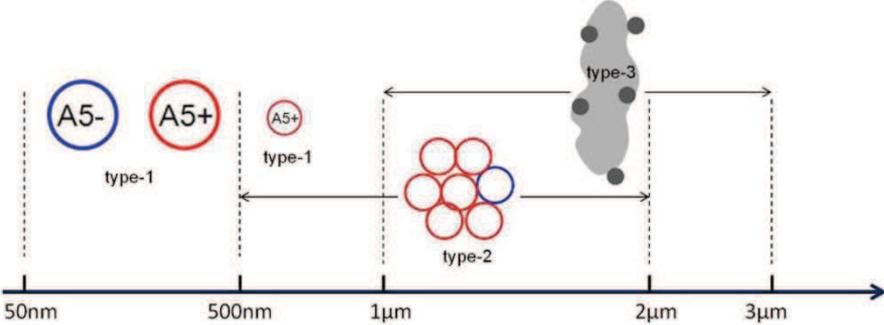


FIGURE-6



CONFIDENTIEL

SUPPLEMENTAL FILE

Characterization of Microparticles from Blood Plasma and Activated Platelets, by Cryo-Electron Microscopy and Annexin-A5 Gold Labeling

Nicolas Arraud¹, Sisareuth Tan¹, Céline Gounou¹, Jean-Max Pasquet², Stéphane Mornet³,
Alain R. Brisson¹

¹Molecular Imaging and NanoBioTechnology, IECB, UMR-5248 CBMN CNRS-University
Bordeaux1-ENITAB, Allée Geoffroy de Saint Hilaire, F-33600 Pessac, France

²Hématopoïèse Leucémique et Cibles Thérapeutiques, UMR-U876, INSERM-University
Bordeaux Segalen, Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

³Chimie des Nanomatériaux, UPR-9048 ICMCB, CNRS, F-33608 Pessac, France

*corresponding author : a.brisson@iecb.u-bordeaux.fr

Tel: +33 (0)5 40003458

Fax: +33 (0)5 40002201

BLOOD - Regular Articles

Running title: Morphology and size histogram of platelet microparticles

SUPPLEMENTARY METHOD

Flow cytometric analysis of residual platelets in PPP

Flow cytometry experiments were performed on a Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Villepinte, France) running CXP Cytometer version 2.2 and analyzed with CXP Analysis 2.1. Forward scatter (FS), side scatter (SS) and PE fluorescence were set on a logarithmic scale and discriminator was set to a FS value of 1. Samples were analyzed at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 1 minute for platelets and 5 minutes for PPP. For platelet analysis, platelets were labeled with an anti-human CD41 antibody coupled to phycoerythrin (anti-CD41-PE Ab) (Invitrogen, Molecular probes). A non-labeled monoclonal anti-CD41 antibody (Abcam, Paris, France) was used in control experiments. Platelets from PRP and diluted PRP samples were identified according to their light scattering properties and their ability to bind anti-CD41-PE antibody. Residual platelets in PPP were identified according to the same parameters. Their concentration was determined by taking into account the volume of analysis.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. Scheme of a gold nanoparticle functionalized with Anx5

Top: Gold nanoparticle (NP) coated with a layer of poly-ethylene-glycol (PEG) molecules and functionalized with one Anx5 molecule (blue). Bottom: scheme of an Anx5 molecule with Ca^{2+} ions (red dots) bound to its membrane binding face (adapted from¹).

Supplementary Figure 2. Intact blood platelet in PPP, by cryo-EM

Typical image of a platelet observed in PPP samples. For sake of clarity, the platelet contour has been marked with a dashed line. This platelet presents a smooth contour and many internal granules homogeneously distributed through the cytoplasm, with no sign of activation. The asterisks point to the thin meshwork from the carbon support film.

Scale bar: 1 μm .

Supplementary Figure 3: Flow cytometry analysis of residual platelets in PPP.

(A) Flow cytometry analysis of diluted PRP containing 10^5 platelets / mL. Platelets were identified according to their forward and side scattering properties and a gate named “platelets” was created. (B) CD41-PE fluorescence analysis within the platelet gate. The white histogram shows that 85 % of the platelets are labeled with anti-CD41-PE Ab. The black

histogram corresponds to a control experiment in which platelets are first incubated with an excess of monoclonal anti-CD41 antibody and then with anti-CD41-PE Ab; 1 % of the platelets are labeled with anti-CD41-PE Ab. (C and D) Flow cytometry analysis of two independent PPP samples diluted 100 fold with HBS. According to light scattering data, very few events fall within the platelet gate. Analysis of PE-fluorescence within the platelet gate (not shown) gives 10 ± 5 events CD41 positive for 5 minutes of analysis. The platelet concentration in PPP was estimated to $20,000 \pm 10,000$ platelets/mL.

Supplementary Figure 4. Activated blood platelets at various stages of activation

(A), Platelet at an early stage of activation. The cell has lost its discoid shape and shows pseudopod extensions. Note the total absence of Anx5-gold labeling.

(B-D), Platelet at a more advanced stage of activation, with an area (the white box in (B) is enlarged in (C) and further enlarged in (D)) showing microparticles in the process of being emitted or just emitted. One single microparticle, indicated by an arrow in (B) and (C) and presented at higher magnification in (D), is labeled with Anx5-gold-NPs.

(E-G), Example of a platelet totally activated and transformed into an assembly of associated vesicles. The vesicles are entirely covered with Anx5-gold-NPs, as it is visible in (G). The area marked by a white box in (E) is enlarged in (F), and the area marked by a white box in (F) is enlarged in (G).

Scale bars: 1 μm (A,B,C,E,F); 200 nm (D,G).

Supplementary Figure 5. Negative staining EM of PPP

EM image of a microparticle from PPP negatively stained with 1% uranyl acetate. This microparticle presents an extensive labeling with 10-nm Anx5-gold-NPs. Drying has caused the collapse of the microparticle, together with an accumulation of stain into collapsed parts and the precipitation of surrounding proteins, particularly visible in the upper right corner. These conditions do not permit an accurate analysis of the morphology and size of microparticles.

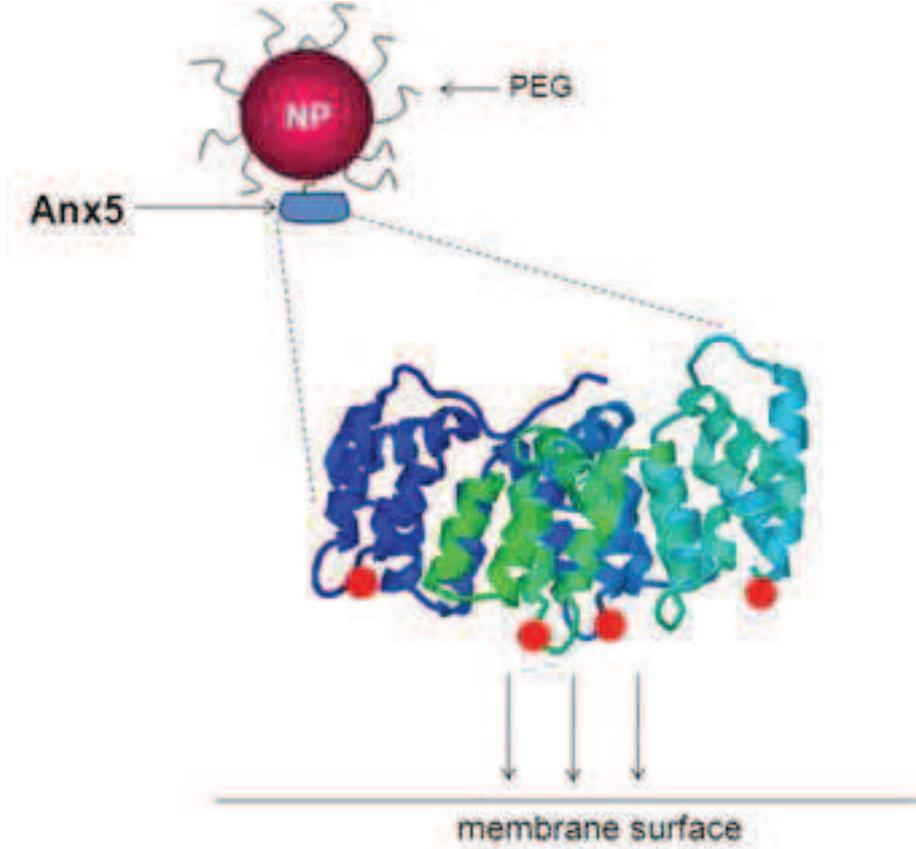
Scale bar: 200 nm.

SUPPLEMENTARY REREFERENCE

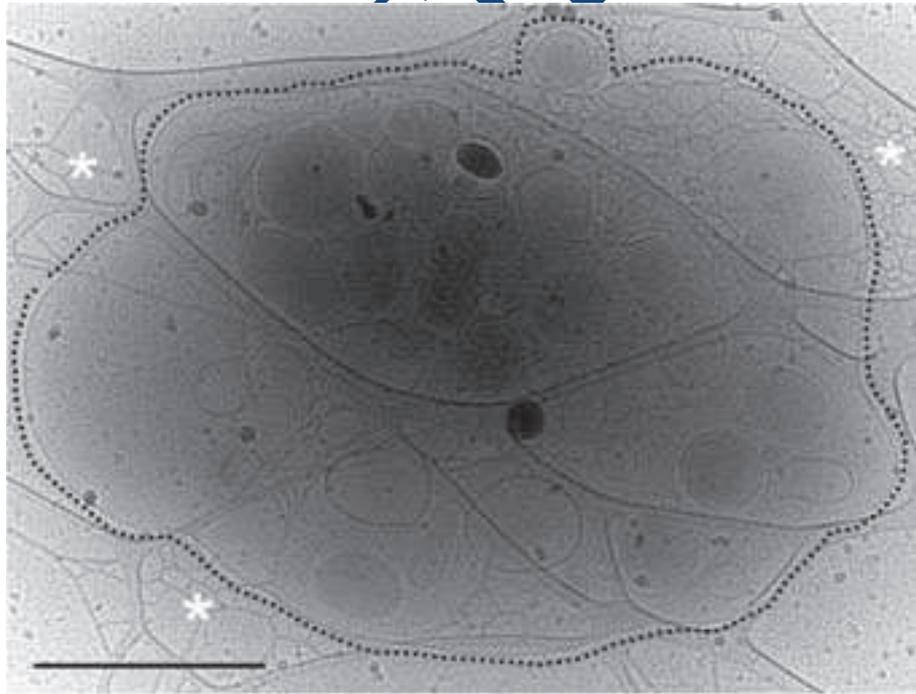
1. Huber R, Römisch J, Paques EP. The crystal and molecular structure of human annexin v, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* 1990;9(12):3867-3874.

SUPPLEMENTARY FIGURES

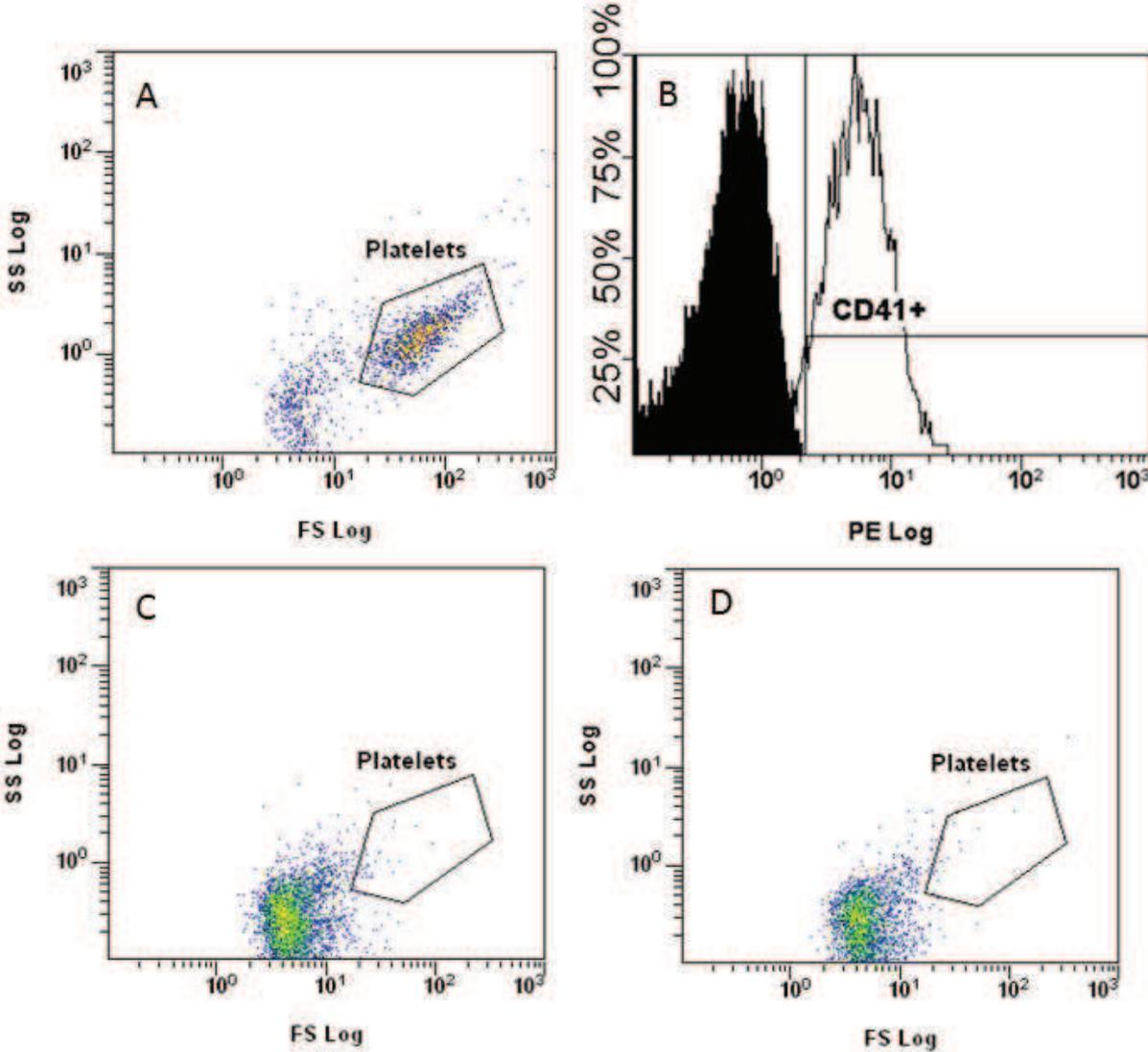
SUPPLEMENTARY FIGURE-1



SUPPLEMENTARY FIGURE 2

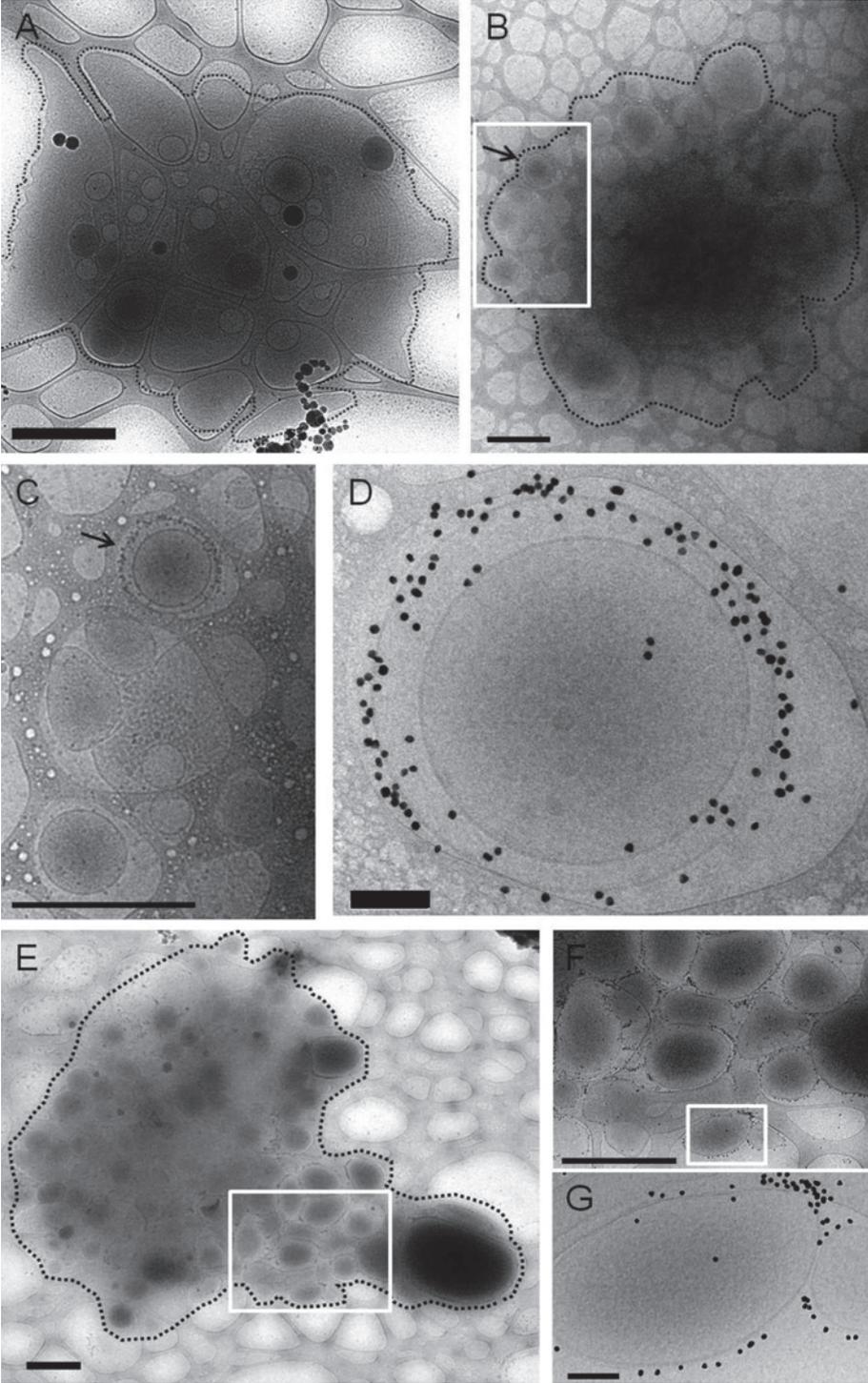


SUPPLEMENTARY FIGURE-3

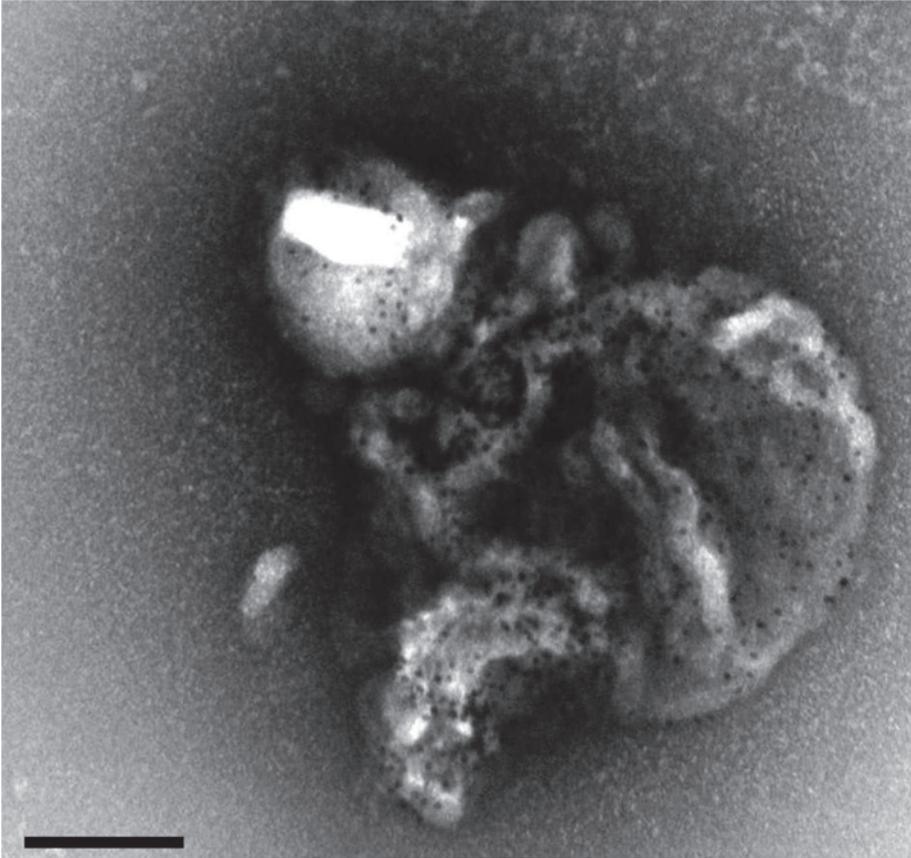


CON

SUPPLEMENTARY FIGURE-4



SUPPLEMENTARY FIGURE-5



CONFIDENTIAL