

**UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE**

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Immunologie

Présentée et publiquement soutenue le 14 Décembre 2010

Par **M. LACROIX Romaric**

Né le 02/11/80 à Toulon

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Aix-Marseille II

---oOo---

TITRE :

**MICROPARTICULES : DE LA GENERATION DE PLASMINE A
LA STANDARDISATION D'UN BIOMARQUEUR EMERGEANT.**

---oOo---

JURY

Président : M. le Professeur Pierre CAU

Rapporteur : M. le Professeur Jean-Baptiste MICHEL

Rapporteur : M. le Professeur Pierre SIE

Directeur de thèse: Mme le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

Examineur : M. Christophe DUBOIS

REMERCIEMENTS

En tête de cette liste, je remercie celle qui a subi avec patience ce travail, ma chère épouse Damaris avec une tendre pensée pour mes deux petits garçons Siméon et Noé.

Je remercie mon directeur de thèse, Françoise, pour m'avoir guidé dans ce travail et pour toute son attention quotidienne.

Je remercie les membres du jury de thèse d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur J. Sampol pour m'avoir accueilli dans son laboratoire

Je remercie le Professeur L. Camoin-Jau pour m'avoir donné le goût de l'hématologie.

Je remercie Florence pour son soutien constant.

Je remercie tous ceux avec qui je travaille au quotidien : la microparticule team (Stephane, Philippe, Coralie et Tarik), Christophe et Laurence, mes partenaires de bureau (Stephane et Lucas), Corine, mes co-assistantes (Stephanie, Magalie, Elise, Yaël et Maud), toute l'équipe de séniors et juniors de l'u608 et toute l'équipe de biologistes et de techniciens du service d'hématologie de la Conception, les secrétaires.

Je remercie ceux qui m'ont accueilli pendant cette thèse : Eduardo Angles-Cano, Bruce et Barbara Furie.

Je remercie mes parents et ma sœur Karine

Je remercie mes anciens co-internes : Sofiane, Boris et Anne-Catherine

Je remercie mes amis de toujours : Adrien et Natacha, Titi et Vincent, TomTom et Pauline, Kalou, Momo, Hélène et Fabien, Betty, TonTon, Marjorie et Franck, Sandra.

Je remercie ceux qui m'ont guidé : Tonton et Tata, M.Tafani, Guillaume, Père Host du Roure

Je remercie Dieu

« J'ai appliqué mon cœur à rechercher et à explorer par la sagesse tout ce qui se fait sous les cieux, c'est une occupation ingrate que Dieu a donnée aux fils des hommes afin qu'ils s'y fatiguent »

Ecclésiaste 1v 13

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
TABLE DES FIGURES	8
PRINCIPALES ABREVIATIONS	10

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . 12

CHAPITRE 1 : MICROPARTICULES, DEFINITION ET ORIGINE 13

A. MICROPARTICULES : ASPECT HISTORIQUE 13

1) Cellules hématopoïétiques et vasculaires 13

2) Cellules tumorales 15

3) Autres types cellulaires 15

B. DEFINITION DES MICROPARTICULES 17

1) Définition..... 17

2) Terminologie..... 17

C. FORMATION DES MICROPARTICULES 19

1) Mécanismes de formation des microparticules 19

a. Remaniement des phospholipides de la membrane plasmique..... 20

i. *Asymétrie de la membrane plasmique*..... 20

ii. *Activation cellulaire et externalisation de la phosphatidylsérine*..... 21

iii. *Lien entre l'exposition de la PS et la vésiculation cellulaire* 22

iv. *Limites du modèle actuel* 22

v. *Autres mécanismes de vésiculation dépendant de la composition en phospholipides*..... 23

b. Réarrangement du cytosquelette	23
<i>i. Rôle des calpaïnes</i>	<i>25</i>
<i>ii. Rôle de la Gelsoline.....</i>	<i>25</i>
<i>iii. Rôle de l'interaction phospholipides/cytosquelette.....</i>	<i>25</i>
<i>iv. Mécanismes moléculaires aboutissant au remodelage du cytosquelette</i>	<i>26</i>
2) Les inducteurs de la vésiculation	27
a. Activation cellulaire	28
<i>i. Les plaquettes</i>	<i>28</i>
<i>ii. Les globules rouges</i>	<i>29</i>
<i>iii. Les leucocytes.....</i>	<i>29</i>
<i>iv. Les cellules endothéliales</i>	<i>30</i>
b. Apoptose.....	32
c. Conclusion	33

CHAPITRE 2 : MICROPARTICULES : STRUCTURE ET FONCTION	34
A. COMPOSITION DES MICROPARTICULES	34
B. FONCTIONS DES MICROPARTICULES.....	36
1) Rôle des microparticules dans l'hémostase	36
2) Rôle des microparticules dans la modulation du tonus vasculaire.....	41
3) Rôle des microparticules dans l'inflammation.....	43
4) Rôle des microparticules dans l'angiogenèse.....	44
5) Rôle des microparticules dans la protéolyse matricielle.....	46
6) Rôle des microparticules dans la survie cellulaire	47
7) Rôle des microparticules dans la modulation de la réponse immunitaire	48
8) Rôle des microparticules dans la communication intercellulaire.....	49

CHAPITRE 3 : LA GENERATION DE PLASMINE	51
A. LE PLASMINOGENE	51
B. LES ACTIVATEURS DU PLASMINOGENE	53
1) L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)	53
2) L'urokinase (uPA).....	55
3) Le récepteur de l'urokinase (uPAR)	56
C. LA FORMATION DE PLASMINE.....	57
1) Formation de plasmine par le t-PA	57
2) Formation de plasmine par l'uPA	59
D. LA REGULATION DE LA GENERATION DE PLASMINE.	60
1) Les serpins.....	61
2) Les inhibiteurs de liaison du plasminogène	65
E. CONSEQUENCES DE L'ACTIVATION DU PLASMINOGENE	66
1) La fibrinolyse.....	66
2) Le remodelage matriciel	67
3) Autres conséquences de l'activation du plasminogène	69

CHAPITRE 4 : MICROPARTICULES : BIOMARQUEUR EN PATHOLOGIE HUMAINE 70

A. INTERET DU DOSAGE DE MICROPARTICULES CIRCULANTES EN PATHOLOGIE HUMAINE.....70

1) Signification biologique des microparticules en pathologie.70

2) Limites actuelles de l'utilisation des microparticules comme biomarqueur en pathologie humaine.....77

B. VARIABLES PRE-ANALYTIQUES POUVANT INFLUER SUR LES DOSAGES DE MICROPARTICULES.....77

C. METHODOLOGIES DISPONIBLES POUR L'ANALYSE DES MICROPARTICULES80

1) Diversité des méthodologies disponibles pour l'analyse des microparticules80

2) Avantages et limites des techniques de mesure des microparticules.....84

DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX PERSONNELS 88

INTRODUCTION88

ARTICLE 190

ARTICLE 293

ARTICLE 396

BREVET 198

ARTICLE 499

ARTICLE 5102

DISCUSSION-PERSPECTIVES104

ANNEXES.....111

BIBLIOGRAPHIE112

Table des figures

Figure 1 : Images historiques de microparticules par microscopie.	16
Figure 2 : Représentation schématique de la libération des différentes microvésicules par la cellule dans l'espace extracellulaire.	18
Figure 3 : Implication du cytosquelette dans le mécanisme de vésiculation.	24
Figure 4 : Place de l'activation de ROCK dans le phénomène de vésiculation.....	27
Figure 5 : Mécanisme de formation des MPE après stimulation par la thrombine	31
Figure 6 : Composition moléculaire fonctionnelle des microparticules endothéliales. ...	35
Figure 7 : Contribution de la génération des MPE à l'activité procoagulante.	39
Figure 8 : Contribution des MP tumorales à la formation du thrombus <i>in vivo</i>	40
Figure 9 : MPE et dysfonction endothéliale par diminution de la synthèse de NO.....	42
Figure 10 : Lien entre propriétés pro-thrombotique et inflammatoire des MP.	44
Figure 11 : Augmentation de l'angiogenèse par des concentrations croissantes de MPP dans un modèle d'anneaux aortiques de rat.....	46
Figure 12 : Différents modes d'interaction entre les MP et la cellule cible.....	50
Figure 13 : Structure du plasminogène.....	53
Figure 14 : Structure du t-PA	54
Figure 15 : Conversion de pro-urokinase en urokinase par la plasmine.....	56
Figure 16 : Formation de plasmine par le t-PA ou l'u-PA à la surface des cellules endothéliales.	59
Figure 17 : Inhibiteurs du système fibrinolytique.	60
Figure 18 : Inhibition du complexe u-PA/u-PAR par le PAI-1.	62
Figure 19 : Conséquences de la génération de plasmine par le système uPA/uPAR.....	68
Figure 20 : Balance définissant la vasculocompétence. (Sabatier F, JCMM 2009)	76
Figure 21 : Etapes du processus pré-analytiques pouvant influencer sur le dosage des MP.	80

Figure 22 : Exemple de mesure des MPP par cytométrie de flux	81
Figure 23 : Principe d'une méthode hybride combinant capture et test fonctionnel.	83
Figure 24 : Schéma du principe d'un appareil utilisant le single particle tracking	84
Tableau 1 : Caractéristiques différentielles des différentes vésicules.	19
Tableau 2 : Signification clinique de l'élévation des MPE en pathologie	73
Tableau 3 : Résumé des principales caractéristiques des techniques utilisées pour la mesure des MP	87

Principales abréviations

α 2-AP : α 2-antiplasmine
 ε -ACA : acide ε -amino caproïque
APCE : Enzyme de clivage de l'antiplasmine
ATF: Fragment aminoterminal de l'urokinase
CEC : Cellules endothéliales circulantes
CMF : Cytométrie en flux
CML : Cellules musculaires lisses
CpB : Carboxypeptidase B
CRP : Protéine C reactive
DLS : Dynamic light scattering
EGF : Epidermal growth factor
EMLT : Enhanced laser microscopy tracking
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
fMPL : N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FS : Forward Scatter
FT : Facteur tissulaire
GM-CSF : Facteur de croissance des monocytes et des granulocytes
GPI : Glycero-phospho-inositol
HTA : Hypertension artérielle
HUVEC : Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
IL : Interleukine
INF γ : Interferon gamma
ISTH : International Society on thrombosis and Haemostasis
LBS : Site de liaison des résidus lysine
Lp(a) : Lipoprotéine (a)
LPS : Lipopolysaccharide
Lys C term : Lysine C terminals
MDR : Multidrug resistance
MLC : Chaines légères de la myosine
MMP : Métalloprotéinase matricielle
MP : Microparticules
MPE : Microparticules endothéliales
MPGR : Microparticules érythrocytaires
MPP : Microparticules plaquettaires
MT-MMP : Métalloprotéase de type membranaire
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : Monoxyde d'azote
PAF/PMA : Platelet activation factor/ phorbol 12-myristate 13-acetate

PAI-1 : Inhibiteur du plasminogène type I
PBS : Phosphate Buffered Saline
PDGF : Platelet derived growth factor
PE : Phosphatidyléthanolamine
PEC : Progéniteurs endothéliaux
PECAM : Platelet endothelium cellular adhesion molecule
PFP : Platelet free plasma
PIP2 : Phosphatidyl inositol de type II
PS : Phosphatidylsérine
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand
PTAI : Purpura thrombopénique auto-immun
PTT : Purpura thrombotique thrombocytopénique
Scu-PA : Pro-urokinase
SPT : Single particle tracking
TAFI : Inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine
Tcu-PA : Urokinase
TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TGF β : Tumor growth factor β
TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TLR : Toll-like receptor
TM : Thrombomoduline
TNF : Tumor necrosis factor
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
uPA : Urokinase
uPAR : Récepteur de l'urokinase
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette première partie bibliographique nous nous attacherons après un bref rappel historique à définir les microparticules (MP) d'origine cellulaire et à résumer la connaissance actuelle sur leurs mécanismes de formation. Nous verrons ensuite en quoi une meilleure connaissance de leur composition permet de découvrir un spectre de fonctions biologiques de plus en plus large. Ceci inclura leurs propriétés protéolytiques qui mettent en jeu les molécules du système fibrinolytique. Nous consacreront donc le chapitre suivant aux acteurs et mécanismes de la génération de plasmine ainsi que ces conséquences. Enfin, nous feront le point sur l'intérêt d'utiliser les MP comme biomarqueur en pathologie en discutant les limites actuelles, essentiellement d'ordre méthodologique, qu'il reste à franchir.

CHAPITRE 1 : MICROPARTICULES, DEFINITION ET ORIGINE

A. MICROPARTICULES : ASPECT HISTORIQUE

Considérant les MP dans leur ensemble, il n'est pas vraiment possible de parler d'une découverte unique, source de l'avancée de la connaissance dans ce domaine. En effet, plusieurs voies indépendantes, focalisées chacune sur un sous-type cellulaire, ont caractérisé l'avancée scientifique sur les microparticules. Tantôt constatation d'une perte de matériel membranaire, tantôt découverte de la précipitabilité d'une activité supposée soluble ou simple observation microscopique (Figure 1), l'observation scientifique princeps fut très variable. Le lien entre toutes ces entités n'a finalement été fait qu'assez tardivement dans les années 1990. Cette prise de conscience de l'universalité du phénomène de vésiculation cellulaire a entraîné l'ouverture de cet axe de recherche à une multitude de milieux biologiques et de types cellulaires.

1) Cellules hématopoïétiques et vasculaires

La notion selon laquelle le vieillissement et la destruction des globules rouges sont associés à une perte de phospholipides et de cholestérol est très ancienne. La première mention a été faite par M. Schultze dans un surprenant article de la revue allemande *Archiv für Mikroskopische Anatomie* datant de 1861 dans lequel il rapporte une observation de fragments provenant de globules rouges à l'aide d'un nouvel objectif chauffant de microscope¹⁶. Plus d'un siècle plus tard, Weed et co proposent la fragmentation de la membrane du globule rouge comme mécanisme *in vivo* et *in vitro* de cette perte de phospholipides¹⁷⁻²¹. En 1964, Michel rapporte la présence de matériel spécifique de groupes sanguins dans le plasma de sang stocké²². En 1969, Cooper et Jandl²³ décrivent la perte de cholestérol et de phospholipides par des globules rouge incubés dans du sérum déprivé en glucose, sans toutefois suspecter le phénomène de vésiculation. Les premiers à utiliser ce terme et à décrire la production de vésicules incorporant des sialoglycoprotéines de

membrane de globules rouges sont les MacDonalds en collaboration avec Martin²⁴⁻²⁷. Dans le même temps, les français Bessis et Mandon, publient des photos de microscopie électronique montrant la formation de microsphérules (figure 1A)^{28,29}.

C'est en 1949 que Chargaff et co. constatent pour la première fois que le plasma déplaqueté contient un facteur précipitable qui a la capacité d'accélérer la génération de thrombine³⁰. Plus tard en 1967, Wolf rapporte que du matériel dérivé de membranes cellulaires riches en lipides sudanophiliques, obtenu par ultracentrifugation de plasma déplaqueté permet de générer de la thrombine³¹. Il démontre une corrélation linéaire entre le nombre de microparticules plaquettaire (MPP), alors appelées « platelet dusts », et la numération plaquettaire d'origine dans les échantillons sanguins. Par microscopie électronique il sera ensuite possible de confirmer que ces petites vésicules infra-micrométriques proviennent des plaquettes activées (Figure 1B)³².

En 1985, des vésicules issues de granulocytes, nommées ectosomes, sont identifiées. Elles sont associées alors à un mécanisme de réponses cellulaires aux attaques du complément (Figure 1C et D)³³⁻³⁵. En 1994, Satta et al. rapportent l'existence de MP circulantes dérivées de monocytes et de cellules THP-1³⁶, générées après stimulation des monocytes par le lipopolysaccharide (LPS). La même équipe décrira trois ans plus tard les MP dérivées de lymphocytes dans le contexte de l'infection au VIH (Virus de l'immunodéficience humaine)³⁷.

La première évidence de l'existence des microparticules endothéliales (MPE) est la démonstration par Hamilton et co en 1990 que le surnageant de culture des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) en présence du complément contient des éléments membranaires capables de générer de la thrombine³⁸. Leur véritable caractérisation morphologique, phénotypique et fonctionnelle est réalisée par Combes et co en 1999 (Figure 1E)³⁹.

2) Cellules tumorales

La description des MP d'origine tumorale est également assez ancienne. Les premiers éléments proviennent d'images de microscopie électronique sans pour autant que les observateurs n'aient particulièrement relevé la présence de ces éléments vésiculaires. Par exemples, des vésicules tumorales sont clairement visibles sur des images de tératocarcinome murin de 1962⁴⁰ ou de tumeur rénale induite chez le rat en 1967⁴¹. Le premier à noter leur importance est Tarin en 1967^{42,43} qui les nomment « structures vésiculaires » ou « matériel fragmenté ». Dans la décennie suivante, ces vésicules sont isolées de surnageant de culture de lignées tumorales murines, le liquide d'ascite de patients atteint de cancer ovariens, des sécrétions d'adénome villositaire entre autres (Figure 1F)^{44,45}. Très rapidement, l'intérêt se porte sur la relation entre ces fragments et les métastases cancéreuses^{46,47}.

3) Autres types cellulaires

Le phénomène de vésiculation est un processus commun à toutes les cellules eucaryotes. Ainsi, depuis les premières descriptions précédemment citées, différentes sous-populations de MP dérivées d'autres types cellulaires ont été décrites et étudiées comme par exemple et par ordre chronologiques les MP provenant des chondrocytes⁴⁸, oligodendrocytes⁴⁹, fibroblastes⁵⁰, syncytiotrophoblastes^{51,52}, podocytes⁵³, adipocytes⁵⁴, cellules musculaires lisses⁵⁵, mégacaryocytes^{56,57}, cellules neuro-épithéliales⁵⁸, cellules souches embryonnaires⁵⁹ et cellules souches mésenchymateuses⁶⁰.

Différents liquides biologiques ont été utilisés pour caractériser les MP. A la suite des surnageant de culture et du plasma, d'autres milieux comme les urines⁴⁴, les liquides d'ascite⁴⁴, le liquide cérébro-spinal⁴⁹, la plaque d'athérosclérose⁶¹, le liquide synovial⁶², le liquide broncho-alvéolaire⁶³, le muscle⁶⁴, l'humeur vitrée⁶⁵ ont permis leur mise en évidence.

Ces nombreuses études, initialement purement descriptives, aussi bien *in vitro* dans des modèles cellulaires purifiés qu'*in vivo* dans différents contextes cliniques, ont permis de dévoiler progressivement les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de ces MP.

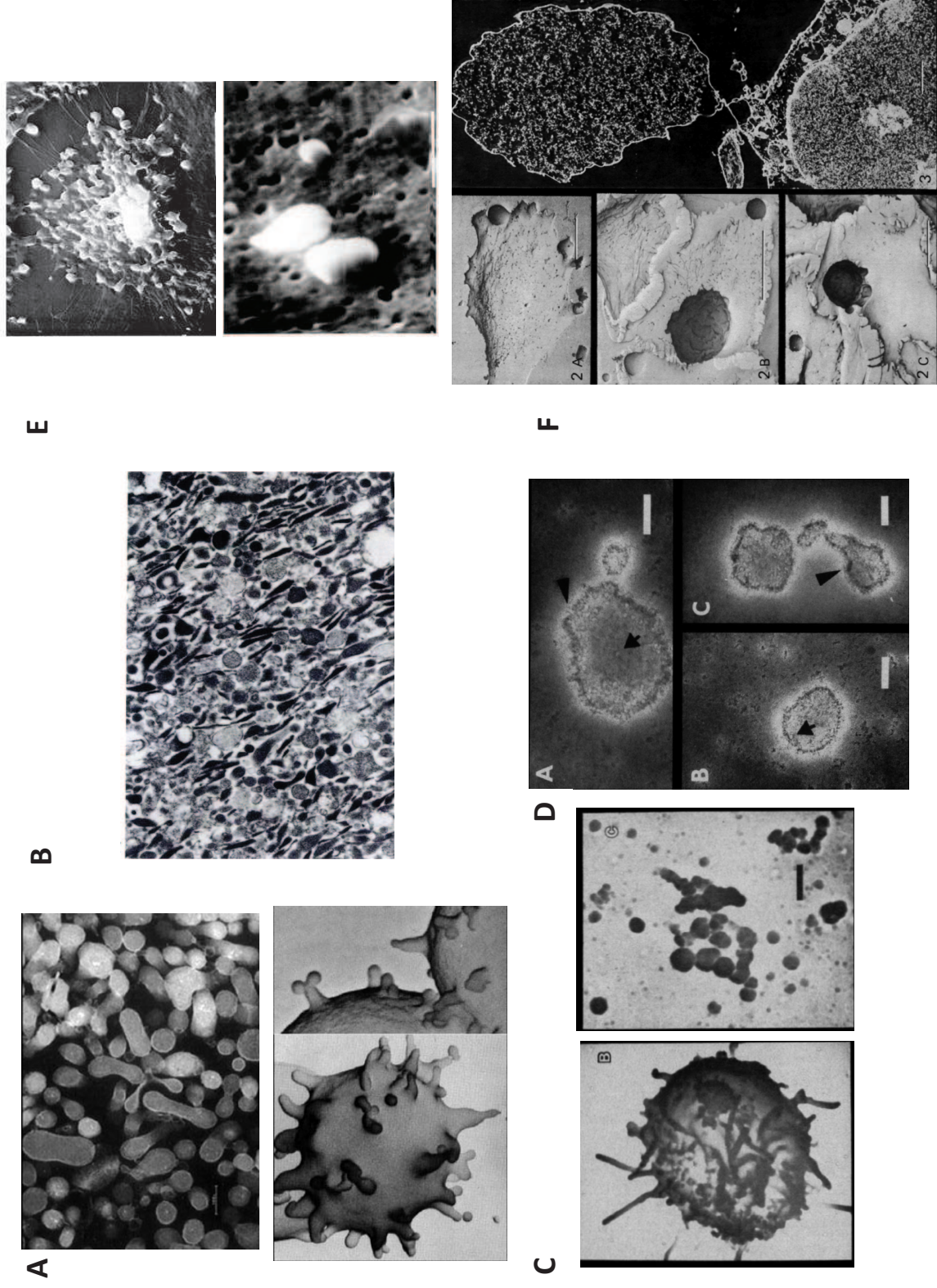


Figure 1 : Images historiques de microparticules par microscopie. A. Microparticules érythrocytaires (Bessis, Springer-Verlag, 1973 et Greenwald R. Liss 1980) B. Microparticules plaquettaires (George JN et co. Blood 1982) C. et D. Microparticules leucocytaires (Morgan et co. J Immunol 1987) E. Microparticules endothéliales (Combes et co. J Clin Invest 1999). F. Microparticules tumorales (Scott et co. J Cell Sci 1979).

B. DEFINITION DES MICROPARTICULES

1) Définition

Même si quelques points de discussion persistent, le sous comité de standardisation en biologie vasculaire de la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) définit les MP comme des vésicules de taille hétérogène, comprise entre 0.1 et 1 μm , résultant du bourgeonnement de la membrane cellulaire de la plupart si n'est toutes les cellules activées ou apoptotiques. Elles sont retrouvées dans le culot d'une centrifugation rapide d'un plasma déplaqué ou d'un surnageant de culture. Elles expriment généralement de la phosphatidylsérine (PS) et différentes molécules de la cellule d'origine permettant leur identification et contribuant à leurs multiples fonctions. Les critères de définition concernant leur taille précise et l'expression de PS restent débattus⁶⁶⁻⁶⁸.

2) Terminologie

Il faut rapporter ici une absence de consensus de la nomenclature des petites vésicules parfois source de confusion. En effet, suivant les auteurs, le même terme est employé pour désigner différentes entités spécifiques ou un ensemble de vésicules. Ainsi le terme « microvésicules » est tantôt employé comme synonyme de microparticules ou pour désigner l'ensemble des types de vésicules émises par une cellule quelque soit leur mécanisme de formation ou leur composition (Figure 2). Les MP sont donc à distinguer d'autres petites vésicules libérées par les cellules comme les exosomes ou les corps apoptotiques (Tableau 1). Les termes « argosomes »⁶⁹ et « ectosomes »^{70,71} employés pour désigner des vésicules d'origine spécifique dans la littérature sont à assimiler à des microparticules.

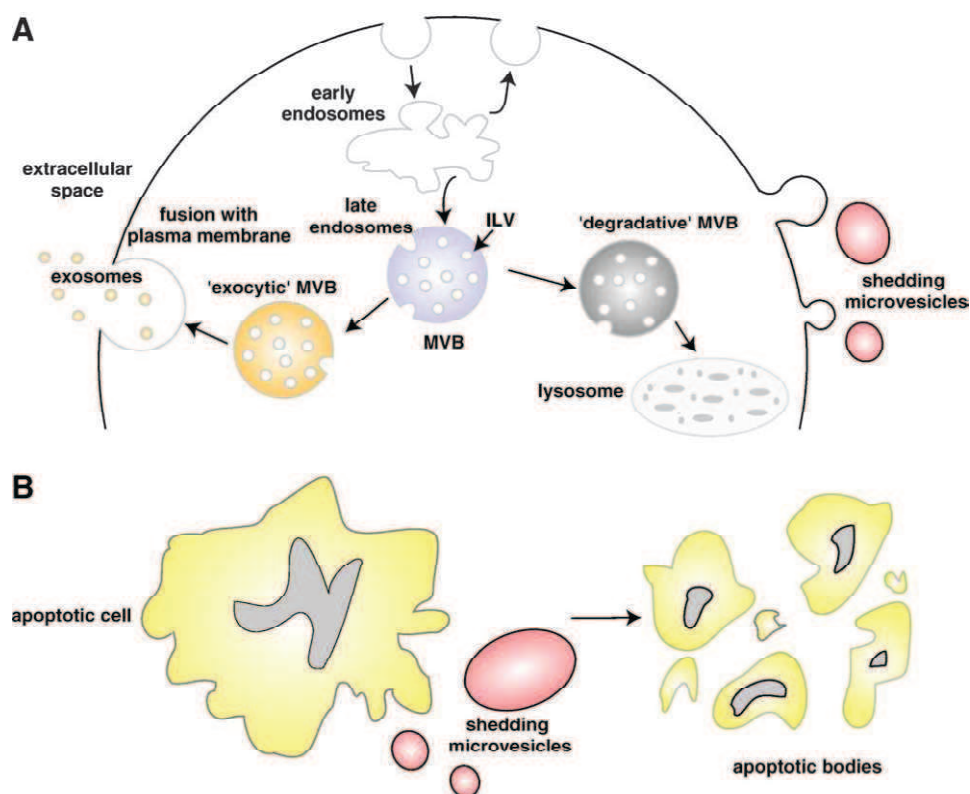


Figure 2 : Représentation schématique de la libération des différentes microvésicules par la cellule dans l'espace extracellulaire. A. exosomes et microparticules (shedding microvesicles) B. corps apoptotiques et microparticules (shedding microvesicles). MVB ; Multivesicular bodies (Mathivanan S. J. Proteomics 2010)

Les exosomes sont définis comme de petites vésicules d'origine endocytaire d'un diamètre assez homogène de 40–100 nm. Ils sont délivrés par la plupart des types cellulaires après fusion des corps multivésiculaires de l'appareil de Golgi avec la membrane plasmique^{72,73}. Ils ont été rapportés pour la première fois en 1983 par Johnstone et co. à partir de culture de réticulocytes⁷⁴. Ils diffèrent des MP non seulement par leur taille et leur origine mais aussi par leur composition. Ils ne contiennent pas de la PS à leur surface et ne supportent pas les réactions de la coagulation. Ils sont enrichies en tétraspanines comme le CD63, CD81 et CD9, en molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et d'autres protéines spécifiques comme Alix, TSG101 et HSP70⁷⁵. Une ultracentrifugation supérieure ou égale à 100000g est nécessaire pour les isoler. Leur forme régulière et arrondie permet de

les isoler dans un gradient de sucrose dans une zone à faible densité de 1.10–1.21 g/mL, ce qui les différencie des autres vésicules à forme plus irrégulière qui sont retrouvées dans des zones de plus haute densité (>1.23 g/mL)⁷⁶.

Les corps apoptotiques, de taille souvent plus importante que les microparticules (0.5-4 µm) représentent le stade terminal des cellules en apoptose. Ils sont générés par fragmentation de la cellule apoptotique et contiennent des résidus de matériel nucléaire comme les histones^{77,78}. Il n'est pas toujours aisé de les distinguer méthodologiquement des microparticules *sensu stricto*, le phénomène d'apoptose étant également source de microparticules.

	Exosomes	Microparticules	Corps apoptotiques
Taille (diamètre)	30-100 nm	100-1000 nm	500-4000 nm
Densité de flottaison	1.10-1.21 g/mL	NA	1.16-1.28 g/mL
Morphologie	Arrondies	Hétérogène	Hétérogène
Composition lipidique	ALBP, PS faible, cholestérol, céramide, shingomyéline	PS fort, Cholestérol	PS fort
Marqueurs protéiques	Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9	Sélectines, intégrines, CD40, MMP	Histones
Origine	Exocytose des MVB	Vésiculation de la membrane plasmique	Contraction et mort cellulaire
Composition	Protéines, ARNm, miARN	Protéines, ARNm, miARN	Protéines, ARNm, miARN, ADN

Tableau 1 : Caractéristiques différentielles des différentes vésicules. (Modifié de Mathivanan S. J. Proteomics 2010)

C. FORMATION DES MICROPARTICULES

1) Mécanismes de formation des microparticules

Les mécanismes de formation des microparticules ne sont pas parfaitement élucidés. La compréhension actuelle de ce phénomène fait intervenir au moins deux types d'événement : un remaniement des phospholipides de la membrane plasmique et un réarrangement du cytosquelette qui conduisent au bourgeonnement cellulaire.

a. Remaniement des phospholipides de la membrane plasmique

i. Asymétrie de la membrane plasmique

Les phospholipides ne sont pas repartis au hasard au sein de la membrane plasmique mais de manière asymétrique⁷⁹. Les phospholipides cationiques contenant de la choline (phosphatidylcholine et sphingomyéline) sont localisés de façon prépondérante au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. A l'inverse, les aminophospholipides (phosphatidyléthanolamine (PE) et PS) sont concentrés au niveau du feuillet interne.

Cette asymétrie phospholipidique qui caractérise les cellules quiescentes est maintenue par des activités enzymatiques transmembranaires. Ces enzymes sont regroupées en trois groupes selon leur spécificité lipidique, la direction du transport et leur dépendance ou non en énergie⁸⁰. En 1984, les travaux de Seigneuret et Devaux puis de Daleke ont montré l'importance de l'activité aminophospholipides translocase dans le maintien de l'asymétrie phospholipidique⁸¹⁻⁸³. Cette translocase ATP-dépendante permet le transport de la PE et de la PS du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique contre le gradient de concentration. Une molécule d'ATP est nécessaire pour chaque molécule de PS transporté. Cette activité est inhibée lorsque les taux de calcium intra-cytoplasmique atteignent des concentrations élevées de l'ordre du micromolaire.

Une autre enzyme ATP-dépendante a été décrite. Il s'agit de la floppase qui elle, transporte les phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique de manière non spécifique⁸⁴. Sa fonction n'est pas bien comprise. Elle fonctionne probablement en conjonction avec l'aminophospholipide translocase. Leurs activités combinées permettent de répondre aux altérations lipidiques de la membrane plasmique⁸⁵. Dans les globules rouges, l'activité floppase est portée par la protéine MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1) appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette)⁸⁶. Par ailleurs, dans cette superfamille, la p-glycoprotéine (MDR2/3), a été caractérisée au niveau des cellules des canaux biliaires comme transporteur de phosphatidylcholine du feuillet interne vers le feuillet externe⁸⁷. Enfin, la scramblase, permet un transport aspécifique bidirectionnel des phospholipides⁸⁸. Elle est fortement présente dans la membrane des plaquettes et des globules rouges.

ii. Activation cellulaire et externalisation de la phosphatidylsérine

L'activation cellulaire ou l'apoptose sont associées à une élévation du taux de calcium intracellulaire. Celle-ci inhibe d'une part l'activité de l'aminophospholipide translocase et d'autre part active les activités floppase et scramblase. Ainsi, un taux cytoplasmique de calcium élevé induit l'externalisation de la PS et un équilibre des phospholipides négatifs entre les deux feuillettes de la membrane plasmique⁸⁹.

Le gène ABCA1, impliqué dans le transport inverse du cholestérol, a été également proposé comme élément clé de l'externalisation de PS dans la cellule activée ou apoptotique. En effet, les cellules de souris ABCA1-KO externalisent la PS avec une efficacité très réduite après activation cellulaire^{90,91}.

D'autres mécanismes peuvent conduire à l'externalisation de la PS et à la libération de MP comme, l'enrichissement de la membrane en cholestérol sur les monocytes qui entraîne alors la libération de MP monocytaires porteuses de facteur tissulaire⁹². Il faut sans doute rapprocher de ce mécanisme le rôle important joué par les radeaux lipidiques « rafts » dans la vésiculation érythrocytaire⁹³. Ces structures membranaires sont des domaines enrichis en cholestérol, capables de s'assembler ou de se dissocier en réponse à différents stimuli, de séquestrer certaines protéines et de recruter des molécules impliquées dans la signalisation. Kunzelmann et co. ont démontré que l'intégrité de ces microdomaines est nécessaire à la mobilisation du calcium intracellulaire et à l'externalisation de la phosphatidylsérine⁹⁴. Ils permettent le fonctionnement du canal calcique TRCP-1. De plus l'externalisation de la PS dépend de l'activation de la voie des kinases ERK associée à ces microdomaines. Enfin, ces zones de la membrane sont enrichies en protéines GPI (Glycéro-Phospho-Inositol) ancrées qui sont retrouvées majoritairement sur les MP⁹⁵.

Certaines études soulignent également l'importance du mécanisme de recapture du calcium comme modulateur de l'exposition de PS après activation cellulaire : SOCE (store-operated calcium entry)⁹⁶. L'importance de SOCE a été illustrée récemment dans un modèle animal. Les plaquettes des souris exprimant une forme mutée de Orai1 (une partie d'un canal SOCE) montrent un défaut d'exposition de PS après stimulation⁹⁷.

iii. Lien entre l'exposition de la PS et la vésiculation cellulaire

L'exposition de la PS et la vésiculation cellulaire ou émission de microparticules sont des évènements fortement associés. Un modèle pathologique illustre bien cette association. Le Scott syndrome est une maladie rare autosomale récessive avec tendance hémorragique sévère, due à un défaut d'activité pro-coagulante des plaquettes⁹⁸. L'anomalie sous jacente est un défaut activité scramblase qui conduit à la réduction de l'expression de la PS et de la production de MP⁹⁹. L'agrégation plaquettaire à l'adrénaline, l'ADP (Adénosine diphosphate), au collagène, à la ristocétine et l'acide arachidonique reste normale tandis que la génération de thrombine est anormale^{100,101}. Un défaut similaire avec activité pro-thrombinasique normale a aussi été rapporté par Castaman¹⁰².

D'autre part l'inhibition de la randomisation des phospholipides supprime la vésiculation des globules rouges induite par le calcium¹⁰³.

iv. Limites du modèle actuel

A ce niveau, il faut reconnaître que tous les acteurs impliqués dans le maintien ou la rupture de l'asymétrie de la membrane n'ont pas été identifiés avec précision¹⁰⁴. Ceci peut être expliqué en partie par les difficultés techniques qui accompagnent les expériences de modulation de la composition des membranes phospholipidiques. A l'heure actuelle, aucun défaut d'internalisation de la PS n'a été rapporté, rendant incertaine l'identité de l'aminophospholipide translocase. Comme nous l'avons vu, plusieurs candidats pour l'activité floppase ont été proposés mais aucun n'a été confirmé par manque de tests spécifiques. Il est également probable que plusieurs mécanismes existent en fonction du mode d'induction. Le Scott syndrome est apparu comme bonne opportunité d'identifier la floppase ou la scramblase. Si ABCA1 semble impliqué dans la vésiculation des globules rouges murins et qu'une mutation non sens (ABCA1 R1925Q) a été trouvée dans un cas de Scott syndrome anglais¹⁰⁵, ABCA1 a été clairement exclue comme candidat au défaut de floppase dans le Scott syndrome canin¹⁰⁶. La protéine scramblase codée par le gène PLSCR1 a été initialement avancée comme potentiel candidat⁸⁸. Cependant des récentes études montrent que la famille de protéines initialement pressentie ne parait pas avoir la fonction

attendue. En effet, un modèle animal de souris PLSCR1 KO une hémostasie normale et aucune anomalie de l'externalisation de la PS¹⁰⁷. Il a été montré récemment que cette protéine appartient à une famille de facteurs de transcription attaché à la membrane¹⁰⁸. Très récemment une nouvelle protéine nommée TMEM16F été identifiée par une équipe japonaise comme potentiellement la scramblase recherchée¹⁰⁹.

v. Autres mécanismes de vésiculation dépendant de la composition en phospholipides

D'autres mécanismes ont été proposés, liés à la composition en phospholipides de la membrane. Il a été montré par exemple que le taux de vésiculation dépend de la concentration en phosphatidyl inositol de type II (PIP2) dans la membrane des plaquettes¹¹⁰. Le PIP2 inhibe la formation de PMP tandis qu'une diminution de sa concentration y contribue. De manière intéressante, les PIP kinases de type I et II, de qui dépend la formation de PIP2, sont clivées lors de l'activation cellulaire par la calpaïne. L'incubation des plaquettes avec un inhibiteur de la calpaïne, la calpeptine, bloque la dégradation des PIP kinases, augmente la concentration en PIP2 et diminue la génération de MP. Ceci souligne l'importance de la composition de la membrane et des relations membrane-cytosquelette, qui seront détaillées plus loin, dans le mécanisme de formation des MP.

b. Réarrangement du cytosquelette

Si l'externalisation de la PS est donc un pré-requis pour la formation de MP, elle n'est pas suffisante : différents travaux ont montré que la vésiculation cellulaire est également dépendante de la protéolyse du cytosquelette (Figure 3). Cette notion a été initialement suggérée par la présence de protéines contractiles dans les MPP, puis par les travaux de Fox et al. démontrant que le cytosquelette membranaire stabilise les plaquettes au repos et prévient la vésiculation¹¹¹. Dans d'autres types cellulaires, le détachement de la membrane plasmique du cytosquelette d'actine corticale est associé à la formation de protrusions au niveau de la membrane et à la vésiculation¹¹²⁻¹¹⁵.

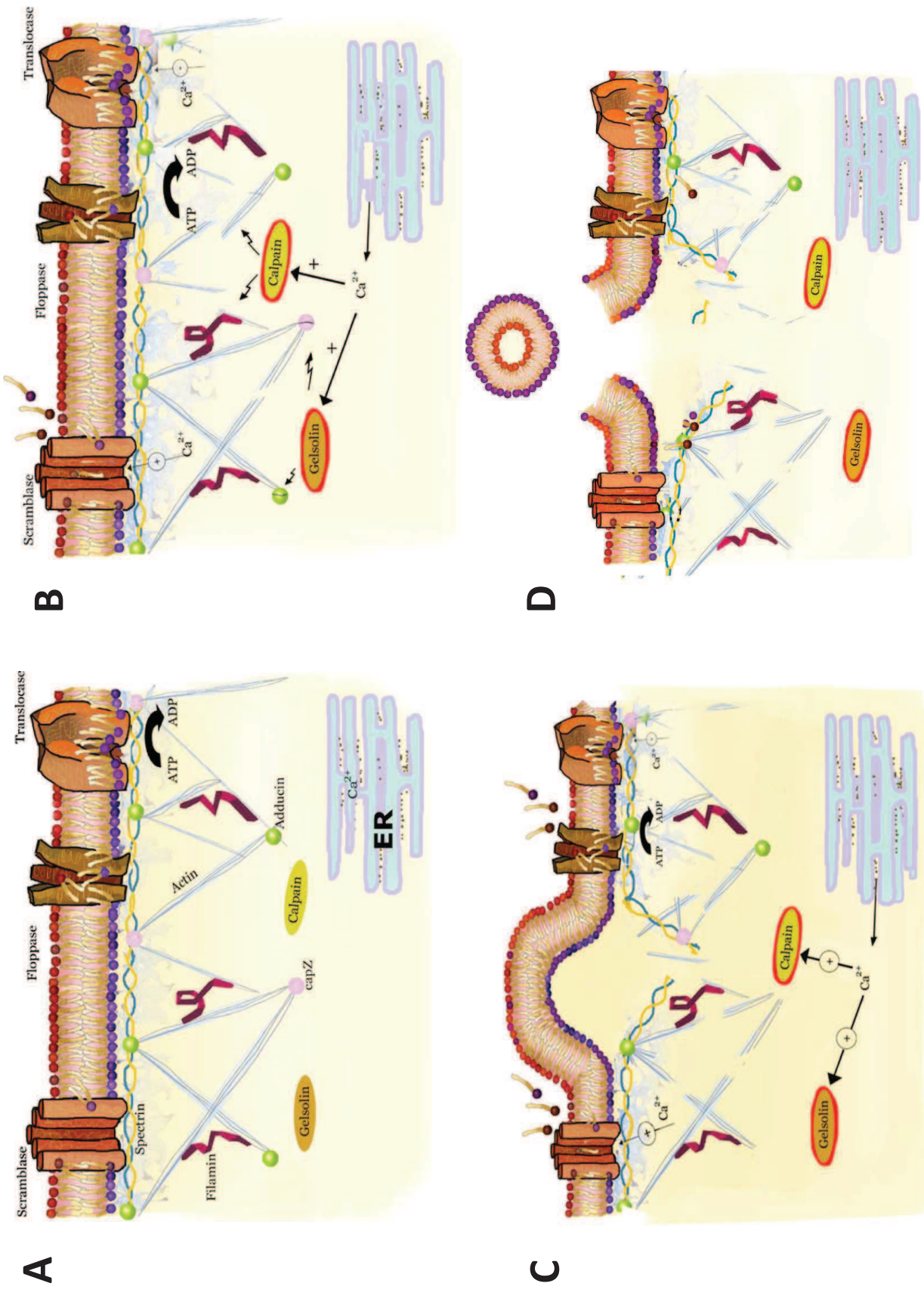


Figure 3 : Implication du cytosquelette dans le mécanisme de vésiculation. A. Cellule au repos. B. Activation cellulaire. C. Clivage du cytosquelette et détachement de la membrane plasmique D. Emission de la microparticule (Piccin et co. Blood Rev. 2007)

i. Rôle des calpaïnes

Le rôle de cystéine protéases calcium dépendantes de la famille de papaïnases, les calpaïnes, a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs, comme la calpeptine, capable d'empêcher au moins partiellement la formation des MP¹¹⁶. De plus, la présence de calpaïnes actives a été mise en évidence par western blot dans les MP issues de plaquettes activées¹¹⁷. L'activité calpaïne circulante est fortement associée aux MPP chez les patients souffrant de purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT)^{118,119}. Leur activation se produit à des concentrations de calcium cytosoliques élevées, supérieures à celles capables d'induire l'externalisation de la PS et nécessitant un apport de calcium extracellulaire. Elles dégradent les constituants du cytosquelette comme la filamine, la taline et la chaîne lourde de la myosine. Elles activent aussi l'apoptose par la pro-caspase3 et BclxL⁶⁶. Cependant le fait que les MP puissent être formées par incubation avec le complément en présence d'inhibiteurs de calpaïnes suggère qu'il existe aussi des mécanismes indépendants des calpaïnes¹²⁰.

ii. Rôle de la Gelsoline

La gelsoline est spécifique de la formation des MPP. Elle est induite par le calcium et enlève les protéines chaperonnes comme l'adducine et la cap Z au bout des filaments d'actine du cytosquelette plaquettaire lors de l'activation plaquettaire permettant ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine¹²¹.

iii. Rôle de l'interaction phospholipides/cytosquelette

Nous avons déjà évoqué la relation existant entre la calpaïne et les phospholipides comme le PIP2. La relation entre le PIP2 et le cytosquelette est plus étroite encore. En effet, sa concentration dans la membrane plasmique est directement liée aux forces de liaison membrane-cytosquelette¹²² PIP2 se lie en fait à de nombreuses protéines liant l'actine comme la β spectrine¹²³, l' α -actinine, l'eitrine, la radixine, et la moesine^{124,125}.

L'interaction des aminophospholipides comme la PS avec les protéines du cytosquelette comme la spectrine¹²⁶ et la taline¹²⁷ a aussi été impliquée dans d'adhésion

membrane/cytosquelette. Par exemple, la spectrine et l'actine sont plus difficile à extraire lorsque les membranes sont enrichies en PS¹²⁷. Ces résultats concordent avec le rôle des calpaïnes dans la dégradation du cytosquelette aboutissant à la formation des microparticules. L'élément essentiel de la vésiculation apparaît ainsi la perte de l'adhésion entre le cytosquelette et la membrane plasmique.

iv. Mécanismes moléculaires aboutissant au remodelage du cytosquelette

Les mécanismes moléculaires de ce remodelage aboutissant à la perte de l'adhésion entre le cytosquelette et la membrane plasmique ont été précisés. Les interactions actine-myosine ainsi que le maintien d'un cytosquelette souple en réponse à des stimuli externes sont assurés par la protéine ROCK-I. ROCK-I est une kinase activée par la protéine Rho ; elle appartient à la superfamille des Ras. ROCK-1 agit en phosphorylant les chaînes légères de la myosine (MLC) ce qui conduit à l'établissement de forces contractiles par les microfilaments du cytosquelette¹²⁸. Quand la cellule entre en apoptose, il y a, entre autres, une activation de la caspase 3. La caspase 3 clive ROCK-1 et libère ainsi son domaine inhibiteur. ROCK-1 n'est donc plus régulée mais elle reste active et phosphoryle davantage les MLC¹²⁹. En conséquence, les filaments d'actomyosine se contractent et se détachent de la membrane, ce qui permet le bourgeonnement de la membrane (figure 4).

ROCK-1 n'est pas la seule molécule de la signalisation à être impliquée dans la vésiculation consécutive à la phosphorylation des MLC. Récemment dans un modèle de cellule tumorale, Muralisharan-chari et co. ont montré que la GTP-binding protéine ARF6 active ERK qui induit la phosphorylation de MLCK et donc la phosphorylation de MLC. Ceci facilite la contraction actine-myosine au niveau du site de vésiculation et conduit à la formation de MP¹³⁰.

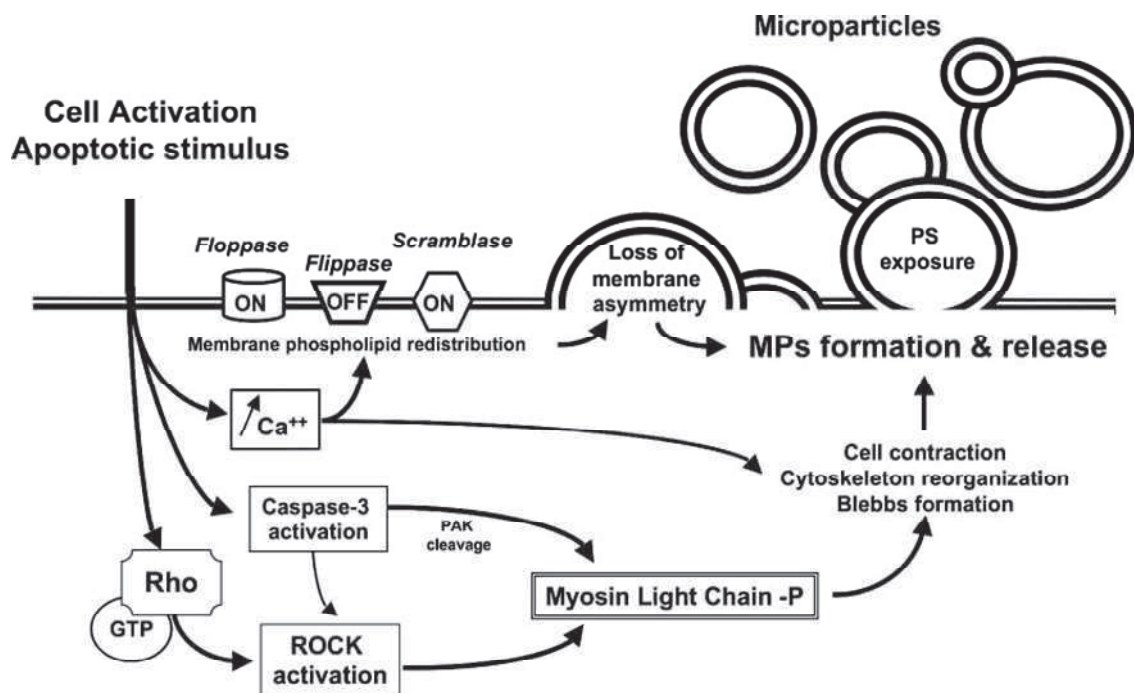


Figure 4 : Place de l'activation de ROCK dans le phénomène de vésiculation (Boulanger C., Hypertension 2006)

2) Les inducteurs de la vésiculation

De très nombreux inducteurs capables *in vitro* d'engendrer la formation de MP sont rapportés, et ces travaux, pour la plupart, concernent la vésiculation plaquettaire. Plus récemment, la littérature décrit des circonstances associées à la vésiculation d'autres types cellulaires, comme les globules rouges, les leucocytes, les cellules endothéliales et autres. De façon schématique, la production de MP est observée dans deux grands types de situations : l'activation cellulaire ou l'apoptose. Dans cette section, nous allons détailler les différents inducteurs impliqués dans la vésiculation, les propriétés et les mécanismes spécifiques qui en ressortent pour les MP en fonction de leur origine cellulaire.

a. Activation cellulaire

i. Les plaquettes

La plupart des agonistes activateurs des plaquettes sont capables, à des degrés divers, d'induire la formation des MP¹³¹. L'effet est particulièrement marqué lorsque les plaquettes sont activées par les calciums ionophores (A23187, ionomycine) et l'association thrombine/collagène. Il est plus modéré en réponse au collagène, à la thrombine, à l'ADP ou à l'épinéphrine. De plus, certains de ces agonistes peuvent avoir des effets additifs ou synergiques. Le mécanisme de vésiculation induit par le collagène est sous la dépendance de la phosphorylation de p38¹³².

Le complexe terminal d'attaque membranaire est un puissant inducteur de la vésiculation plaquettaire *in vitro*. Les travaux de Sims et co.¹³³ et Wiedner et co.¹²⁰ ont montré que la stimulation de plaquettes par des concentrations infra-lytiques de C5b9 induit une activation plaquettaire avec sécrétion des granules denses et des granules alpha, associée à la libération de vésicules membranaires. Ces MP semblent spécifiquement détachées des sites membranaires dans lesquels s'insère le complexe d'attaque. *In vivo*, l'activation du complément est vraisemblablement impliquée dans la vésiculation plaquettaire au cours de pathologies auto-immunes comme le purpura thrombocytopénique auto-immun (PTAI). En effet Horstman et co. ont montré que des plaquettes opsonisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre la GpIIb/IIIa libèrent des MP en présence de sérum comme source de complément. Cet effet est inhibé par le chauffage du sérum 30 min à 65°C et par incubation avec alpha C1q confirmant le rôle du complément¹³⁴.

Outre l'histamine et la thrombine, différents médiateurs de l'inflammation sont capables d'induire la vésiculation cellulaire. Partant de l'observation que les cytokines inflammatoires modulent l'activation cellulaire, Nomura et al ont étudié l'effet de ces molécules sur la vésiculation de plaquettes normales en condition de flux. Ces auteurs ont montré que l'Il-6, la thrombopoïétine et le GM-CSF sont des inducteurs de la vésiculation plaquettaire *in vitro*¹³⁵.

L'agrégation plaquettaire induite par des anticorps monoclonaux peut s'accompagner de la formation de MP. Cette action est indépendante du complément, et a été observée avec des anticorps dirigés contre le CD9, le récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines

(FcγRII) ou le CD41. Ces observations ont conduit à impliquer les anticorps dans les mécanismes à l'origine de taux élevés de MP plaquettaires circulantes chez les patients présentant une thrombopénie immune. La quantité de MP libérées par les plaquettes en présence de sérum de patients présentant une thrombopénie induite par l'héparine est directement corrélée à la présence d'anticorps anti-PF4/héparine d'isotype IgG¹³⁶. Des observations similaires relient la vésiculation plaquettaire induite par le sérum de patient présentant un PTAI à la présence d'auto-anticorps dirigés contre les glycoprotéines plaquettaires¹³⁷. Le rôle des anticorps est conforté par les modèles animaux de thrombopénie immune, puisque l'injection d'anticorps anti-plaquettes induit chez la souris une thrombopénie associée à une augmentation des microparticules plaquettaires circulantes^{138,139}.

ii. Les globules rouges

En dehors du calcium ionophore, A23187¹⁴⁰ et du calcium chloride utilisés *in vitro*, les globules rouges vésiculent lors de leur maturation de réticulocyte à globule rouge mature et lors du vieillissement que ce soit pendant le stockage ou *in vivo*¹⁴¹. Il a été montré qu'environ 20% de l'hémoglobine des érythrocytes était perdu par ce phénomène de vésiculation durant leur durée de vie¹⁴². La vésiculation durant le vieillissement du globule rouge *in vivo* est associée à des changements structuraux et le clivage protéolytique de la protéine band 3. De plus, des études anciennes rapportent, la formation des vésicules érythrocytaires *in vitro* par déplétion du milieu en glucose ou en ATP^{143,144}.

iii. Les leucocytes

L'incubation en présence de cytokine inflammatoire comme l'interféron-gamma (INFγ), l'interleukine 2 (IL-2), l'IL-6 ou de facteur de croissance des granulocytes et des monocytes (GM-CSF) accroît la libération de MP CD68+ par la lignée monocyttaire U937¹⁴⁵. Par ailleurs, la stimulation de monocytes par du lipopolysaccharide (LPS), connue pour sa capacité à induire dans ces cellules un double potentiel pro-coagulant et pro-adhésif, s'accompagne d'une production de MP capables de disséminer ces deux activités³⁶. Le LPS est un ligand du récepteur toll-like 3 (TLR3). Une étude récente montre que non seulement

le LPS mais aussi le poly(I:C), un ligand du récepteur TLR3 induisent efficacement la formation de MP dans un modèle macrophage. De plus ce phénomène dépend du monoxyde d'azote (NO), lui-même pouvant induire la vésiculation¹⁴⁶.

Le phénomène de vésiculation des granulocytes a été initialement observé suite à une activation par les molécules du complément³³. Le fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) est souvent utilisé pour faire vésiculer les granulocytes¹⁴⁷. De façon similaire les associations PAF/PMA (Platelet activation factor/ phorbol 12-myristate 13-acetate) ou PHA (phytohémagglutinine A)/PMA permettent d'induire une vésiculation efficace sur les lymphocytes¹⁴⁸. Dans certaines expériences, les lymphocytes T ont été activés par des billes couplés à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28¹⁴⁹.

iv. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales en culture peuvent générer des MPE, après plusieurs heures de stimulation, en réponse à divers stimuli. L'assemblage du C5b-9 sur la membrane de cellules endothéliales en culture induit, outre la sécrétion de facteur Von Willebrand, la libération dans le surnageant de culture de microvésicules. Cette effet est plus marqué que celui de la thrombine ou du A23187³⁸. Les autres facteurs décrits pour induire de phénomène de vésiculation endothéliale sont : l'absence de facteurs de croissance, les cytokines telles que le TNF^{39,150,151}, le PAI (inhibiteur de l'activation du plasminogène)¹⁵², la thrombine¹⁵³, l'irradiation¹⁵⁰, la camphothécine (un inhibiteur de topoiomérase I)¹⁵¹, l'acide gras n-3 docosahexaénoïque¹⁵⁴, les toxines urémiques¹⁵⁵, la CRP¹⁵⁶ et les radicaux libres dérivés de l'oxygène¹⁵⁰. Il apparaît dans certaines conditions, que le découplage de la NO synthase endothéliale participe à la production de MP endothéliales¹⁵⁶.

Les inducteurs *in vivo* de vésiculation des MPE sont beaucoup moins bien connus. Amabile et co ont montré que les faibles forces de cisaillement étaient associées aux MPE dans l'insuffisance rénale terminale⁹.

Récemment quelques études ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires induit par ces activateurs dans les cellules endothéliales et aboutissant à la formation de MP¹⁵⁷. La vésiculation induite par le TNF-alpha dépend de la voie p38MAP kinase¹⁵⁸. L'activation par la thrombine comme montrée sur la figure 5 induit l'activation de de la Rho kinase ROCKII par la caspase 2 à l'absence de mort cellulaire¹⁵³ et

de la voie TRAIL/TRAIL-R2. TRAIL/Apo2L est une cytokine qui appartient à la famille du TNF alpha qui est sécrétée par la cellule endothéliale stimulée. Cette forme soluble de TRAIL va se lier au récepteur TRAIL-R2, recrutant des protéines adaptatrices à domaine de mort (TRADD) puis TRAF2, RIP1 and NF- κ B qui participent à une boucle d'amplification pour la formation de MP. La stimulation des cellules endothéliales par la thrombine dans un modèle HMEC-1, conduit également à une surexpression de IL-1R1. L'engagement de ce récepteur induit un recrutement des protéines adaptatrices TRAF6 et IRAQ1 qui conduit à une amplification du phénomène de vésiculation¹⁵⁹ (Figure 5).

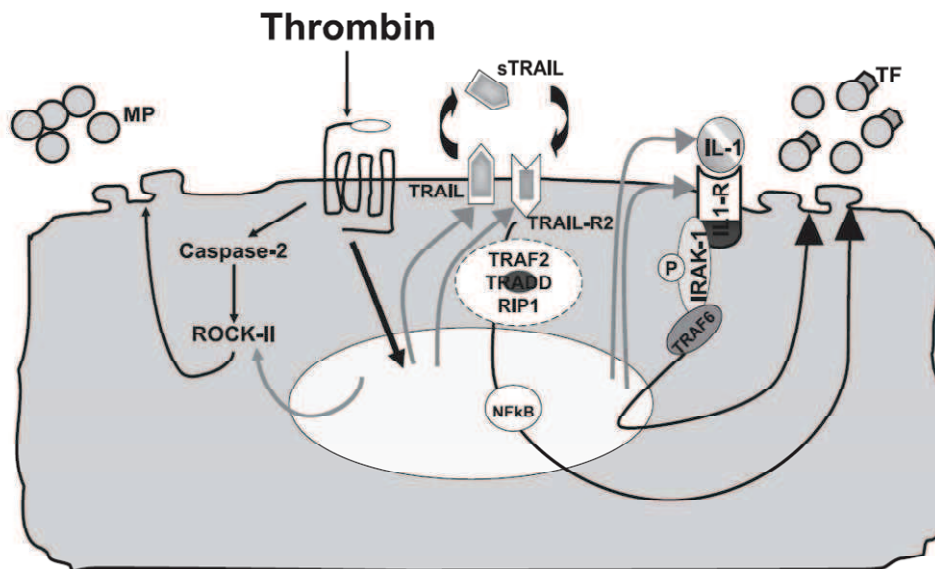


Figure 5 : Mécanisme de formation des MPE après stimulation par la thrombine. (Leroyer et al. Thromb Haemost. 2010)

b. Apoptose

L'exposition de PS à la surface externe de la membrane cellulaire et le relargage de MP font partie des altérations morphologiques précoces au cours du processus d'apoptose. Des observations sur des lignées monocytaires THP-1 ou U937 ont montré qu'il existe une relation entre la formation des MP et le degré d'apoptose, évalué par la proportion de cellules hypodiploïdes, induit par les oxystérols, l'étoposide ou l'association cycloheximide/actinomycine D^{37,160}. De même, des cellules endothéliales en culture incubées en présence de camptothécine, inhibiteur de la topoisomérase I, libèrent des MP. La lignée leucémique Jurkat T génèrent plus efficacement des MP après induction par la staurosporine ou son analogue 7-hydroxylé avec d'autres inhibiteurs de PKC (proteïn kinase C) ou de CDK (cyclin dependent kinase)¹⁶¹. Cette vésiculation précède la fragmentation de l'ADN¹⁵¹. Le lien entre apoptose et vésiculation a également été mis en évidence *in vivo*. Dans la plaque d'athérosclérose, les cellules en apoptose, positives pour le marquage TUNEL, colocalisent avec une expression de facteur tissulaire extracellulaire portée par des MP PS⁺⁶¹. Par ailleurs, l'activation de la caspase-3, effecteur principal de l'apoptose, induit la vésiculation plaquettaire *in vitro*, et les inhibiteurs des caspases réduisent la formation de MP plaquettaires induite par le TNF chez la souris¹⁶². Comme nous l'avons déjà souligné, la caspase 3 est induite par l'activation de Rho Kinase I et II^{128,129,153}. Cette activation est nécessaire à la relocalisation des fragments d'ADN de la région nucléaire. Ceci suggère que les MP générées à partir de cellules en apoptose peuvent contenir du matériel nucléaire^{163,164}. La distinction avec les corps apoptotiques devient dans ce cas subtile. Un certain nombre d'études vont dans le sens d'une composition spécifique des MP générées par un mécanisme apoptotique comparé à un mécanisme inflammatoire. Les MPE générés par apoptose semblent plus exprimer le marqueur constitutif PECAM-1 alors que le mécanisme d'activation cellulaire aboutit à une expression de molécule inductible comme le CD62E¹⁶⁵. Ce dernier point est toutefois en contradiction avec des données qui montrent que à certaines doses, le TNF induit une activation sans apoptose des cellules endothéliales conduisant à la génération de MPE PECAM-1+ et CD62E+.

c. Conclusion

Les inducteurs de vésiculation agissant sur les multiples types cellulaires sont couplés à des mécanismes de formation variés. Ceci aboutit à la génération de MP spécifiques dans leur composition. Cette structure et cette composition sont étroitement liées au panel de fonctions porté par les MP.

CHAPITRE 2 : MICROPARTICULES : STRUCTURE ET FONCTION

A. COMPOSITION DES MICROPARTICULES

De part leur mécanisme de formation, les MP sont composées d'une membrane phospholipidique qui porte des caractéristiques antigéniques spécifiques de la cellule émettrice (cytoadhésines, glycoprotéines...). Néanmoins, la représentation relative des antigènes entre la cellule mère et la MP sont susceptibles d'être différents¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. La présence de glycoprotéines membranaires représentatives de la cellule parentale^{169,170} permet d'identifier l'origine des MP (plaquettaire, endothéliale, leucocytaire et érythrocytaire). Par exemple, les MPP expriment GpIb (CD42b), platelet endothelium adhesion molecule (PECAM-1; CD31)¹⁷¹, l'intégrine α IIb β 3 (GpIIb-IIIa)¹⁷², la P-sélectine (CD62P)¹⁷³, CD 63¹⁷⁴, CD41a et CD 61¹⁷⁵. Les MPE expriment les CD 31, 34, 51, 54, 62E (E-sélectine), 62 P (P-sélectine), CD 105 (endogline) et CD146 (S-endo1)⁶⁶. Les MP transportent également d'autres composants bioactifs comme de l'information génétique (ARNm) dérivé de la cellule parentale¹⁷⁶. Un exemple de composition de MPE est montré sur la figure 6.

Le spectre protéique porté par les MP a pu récemment être enrichi par les données d'analyse protéomique. Ainsi des centaines de protéines vectorisées par les MP ont été identifiées sur différentes sous populations: MP plasmatiques¹⁷⁷, MPE^{178,179}, MPP¹⁸⁰, MP lymphocytaire¹⁸¹, MP adipocytaires⁵⁴ et MP de globules rouges¹⁸². Ces études ont permis de montrer la présence dans les MP de protéines tels que des enzymes métaboliques, des protéines impliquées dans les processus d'adhésion et de fusion, des protéines de la signalisation, des protéines associées au cytosquelette ou appartenant au nucléosome. Des profils protéiques comparatifs ont été réalisés entre différentes conditions de stimulation ou d'origine¹⁸³⁻¹⁸⁵ et entre différentes tailles de MP¹⁸⁶. Nous disposons ainsi de données importantes permettant d'associer au profil protéique des différentes MP un profil fonctionnel potentiel. Ainsi les MP dérivées de cellules tumorales comme le cancer du colon possède un panel de molécules qui sont impliquées dans la tumorigénèse en induisant la migration, l'invasion, la croissance des cellules tumorale, la modulation du système immunitaire, le processus métastatique et l'angiogenèse¹⁸⁷. Des molécules comme la basigine et la métalloprotéinase matricielle (MMP-14) ont récemment été identifiées sur des

MP issues de l'épithélium pigmentaire rétinien humain. Ces molécules peuvent être impliquées dans le remodelage matriciel et donc peuvent participer au processus pathologique de dégénération maculaire lié à l'âge¹⁸⁸. Ces données peuvent également faciliter l'identification de marqueurs d'une condition pathologique¹⁸⁹. Cette stratégie a été appliquée à la thrombose veineuse^{190,191}. Une analyse récente par Miguet et co. sur des MP dérivées de cellules B malignes a identifié le CD148 comme potentiel biomarqueur du lymphome du manteau¹⁹².

Comme signalé précédemment la nature du stimulus conditionne la composition des MP tant au niveau lipidique¹⁹³ que protéique^{184,185}. Ainsi, la composition phospholipidique des MP du liquide synovial de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde est différente de celle des MP plasmatique de sujets sains^{194,195}. Le degré d'oxydation des phospholipides dépend également du stimulus utilisé pour induire la vésiculation¹⁹⁶.

Ces différences de composition, fortement dépendantes des conditions de stimulation cellulaire initiale déterminent ainsi le profil fonctionnel des différentes sous-populations de MP.

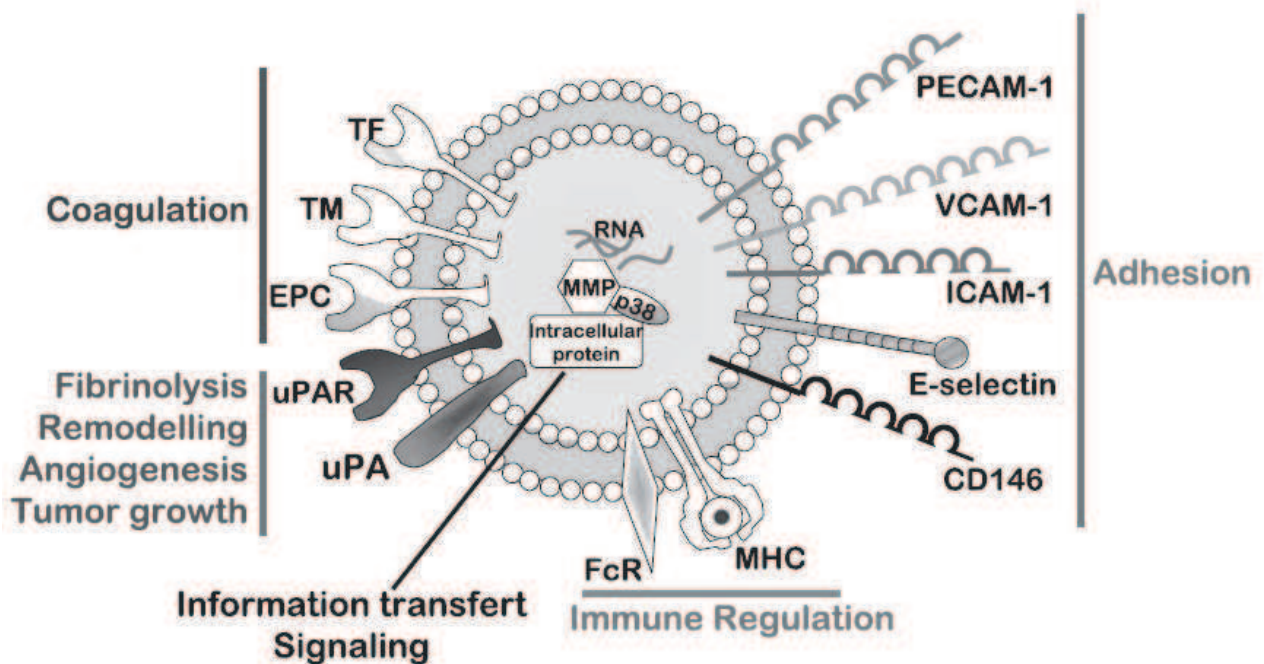


Figure 6 : Composition moléculaire fonctionnelle des microparticules endothéliales. TF : Facteur tissulaire, TM : Thrombomoduline ; EPC : Récepteur de la protéine C ; uPA : Urokinase ; uPAR : Récepteur de l'urokinase ; FcR : Récepteur du fragment Fc des immunoglobulines, MHC ; Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité ; CAM : Molécules d'adhésion cellulaire. MMP : Métalloprotéases matricielles (Leroy et co Thromb Haemost 2010)

B. FONCTIONS DES MICROPARTICULES

Loin de la perception initiale de débris cellulaires inactifs, les MP sont de véritables effecteurs bioactifs jouant un rôle physiopathologique important dans de nombreuses réponses de l'organisme comme l'hémostase, la thrombose, l'inflammation, le tonus vasculaire, la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale. Grâce à leur petite taille, les MP circulent tout le long de l'arbre vasculaire ce qui leur permet de participer à la fois à des phénomènes locaux ou distants. Outre leurs fonctions propres, ces éléments apparaissent véritablement comme un moyen de communication intercellulaire important par interaction avec des récepteurs, transfert de molécules de surfaces ou de contenu cytoplasmique protéique ou génétique^{197,198}.

1) Rôle des microparticules dans l'hémostase

a. Fonction pro-coagulante et pro-thrombotique des microparticules

Toutes les MP montrent à des degrés variables une activité de génération de thrombine *in vitro* qui peut être significativement réduite en modifiant leur composition phospholipidique. La PS est un phospholipide anionique qui lie les protéines de la coagulation par leur domaine "gla" permettant l'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation « tenase » et « prothrombinase » et la génération de thrombine. Ainsi, les MP circulantes, fournissent dans le compartiment vasculaire des surfaces phospholipidiques additionnelles, riches en PS. Cette activité contribue au potentiel procoagulant du plasma. Un certain nombre de données suggère que ce pouvoir pro-coagulant des MP joue un rôle dans l'hémostase. En utilisant un test de génération de thrombine, Pereira et co., ont montré que le PFP de patients avec un syndrome des antiphospholipides avait une capacité de génération de thrombine augmentée comparé aux sujets sains. Cette différence était dépendante de la présence des MPP¹⁹⁹.

Cette question du rôle des MP dans l'équilibre hémostatique repose donc sur le profil lipidique mais aussi protéique de la membrane particulaire. Une partie de ce pouvoir

procoagulant provient en effet de la vectorisation par les MP de facteur tissulaire (FT)^{200,201}. Ce récepteur transmembranaire est un puissant activateur de la cascade de la coagulation exprimé par les monocytes, l'endothélium activé et les cellules tumorales. Cette activité FT est proportionnelle à son taux d'exposition particulaire, le FT réellement soluble (non liée aux MP) étant, quant à lui, inactif²⁰². Les cellules monocytaires humaines stimulées par les LPS émettent des MP enrichies en FT et en P-selectin glycoprotein ligand (PSGL)-1²⁰³. Les MPE contribuent également au pool des MP FT+. Ceci a été prouvé dans différentes situations pathologiques comme la drépanocytose⁴. Aucun ARNm de FT n'ayant pu être détecté dans les mégacaryocytes²⁰¹, l'acquisition de FT par les plaquettes et les MPP résulte d'un transfert intercellulaire^{166,167}. Plusieurs modalités de transferts intercellulaires ont été décrites; les MP endothéliales générées après une stimulation proinflammatoire, particulièrement riches en FT sont capables d'augmenter l'expression membranaire du FT à la surface des monocytes²⁰⁴ (Figure 7). Les monocytes activés sont également une source importante de FT capables de transférer le FT biologiquement actif aux plaquettes. Des transports inverses de FT plaquettes-monocytes ont également été démontrés¹⁶⁷. Ainsi, après exposition au collagène, les plaquettes génèrent des MP riches en FT, qui vont se lier aux macrophages²⁰⁵, aux granulocytes²⁰⁶ et à d'autres plaquettes par leurs ligands comme la P-sélectine.

D'autres mécanismes contribuent à la propriété pro-coagulante de MP. Les granulocytes génèrent des MP enrichies en Mac-1 capables d'induire une activation plaquettaire²⁰⁷. Les MPE transportent des multimères de facteurs von Willebrand de haut poids moléculaire qui induisent plus efficacement que la forme soluble l'agrégation plaquettaire²⁰⁸.

En pathologie humaine, de nombreux exemples soulignent le rôle des MP dans l'hémostase. Le défaut de génération de MP est associé à des syndromes hémorragiques (syndrome de Scott, syndrome de dysvésiculation)¹⁰¹. À l'inverse, des taux élevés de MP pourraient s'accompagner d'un rétablissement d'une hémostase efficace. De manière intéressante, la stimulation de monocytes avec de la P-sélectine et des immunoglobulines chimériques augmente le nombre de MP monocytaires circulantes et restaure l'hémostase dans un modèle de souris hémophile A²⁰⁹. Ce gain de fonction est également retrouvé chez les patients présentant des thrombopénies auto-immunes ou induites par des thérapeutiques (anti-GPIIb/IIIa, héparine)^{210,211}.

Les conséquences thrombotiques de cette propriété des MP sont importantes sur les versants veineux et artériels du compartiment vasculaire.

Au niveau artériel, les MP contenues dans la plaque d'athérome, sont particulièrement riches en FT et constituent l'acteur majeur de la thrombogénicité de la plaque⁶¹. Ces MP sont issues de cellules musculaires lisses ou de monocytes/macrophages activés ou apoptotiques^{212,213}. La rupture de plaque met en contact les plaquettes et les facteurs de la coagulation circulants avec les MP hautement thrombogènes initialement séquestrées dans la paroi, favorisant ainsi la formation d'un thrombus artériel²¹⁴.

Au niveau veineux, il est maintenant relativement bien établi que les MP circulantes porteuses de FT contribuent à la génération de fibrine lors de la formation du thrombus²¹⁵. L'adhésion de MP en plus de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes au site de lésion ou d'activation de l'endothélium est un mécanisme précocement associé à la formation d'un thrombus veineux. Il a été montré que les MPL peuvent se lier au fibrinogène soluble ou immobilisé au sein d'agrégats leuco-plaquettaires permettant de concentrer au site de formation du thrombus l'activité FT. Celle-ci peut être transférée sur les plaquettes par les MPL contribuant ainsi à la propagation du thrombus²⁰³. Cette propriété n'est pas exclusive des MPL. Il a été montré que les MPP, les MPGR, les MP dérivées de cellules hématopoïétiques contribuaient à la propagation du thrombus *in vivo*^{202,216}. Les interactions P-sélectine/MP sont particulièrement importantes dans l'initiation du processus thrombotique. La P-sélectine permet en effet de recruter des MP porteuses de PSGL1, particulièrement riches en FT. L'importance de ces mécanismes a été démontrée à l'aide de modèles murins associant invalidation du gène de la P-sélectine et un suivi dynamique de la croissance du thrombus par microscopie intravitale^{209,217-219}. Ce phénomène possède de nombreuses boucles d'amplifications. En effet, la thrombine générée *in situ*, le collagène exposé par un sous-endothélium dénudé, le CD40 ligand soluble libéré par les plaquettes ou les lymphocytes activés, la P-sélectine, les cytokines, le stress oxydatif favorisent au site de la lésion vasculaire, la génération de nouvelles MP procoagulantes²²⁰.

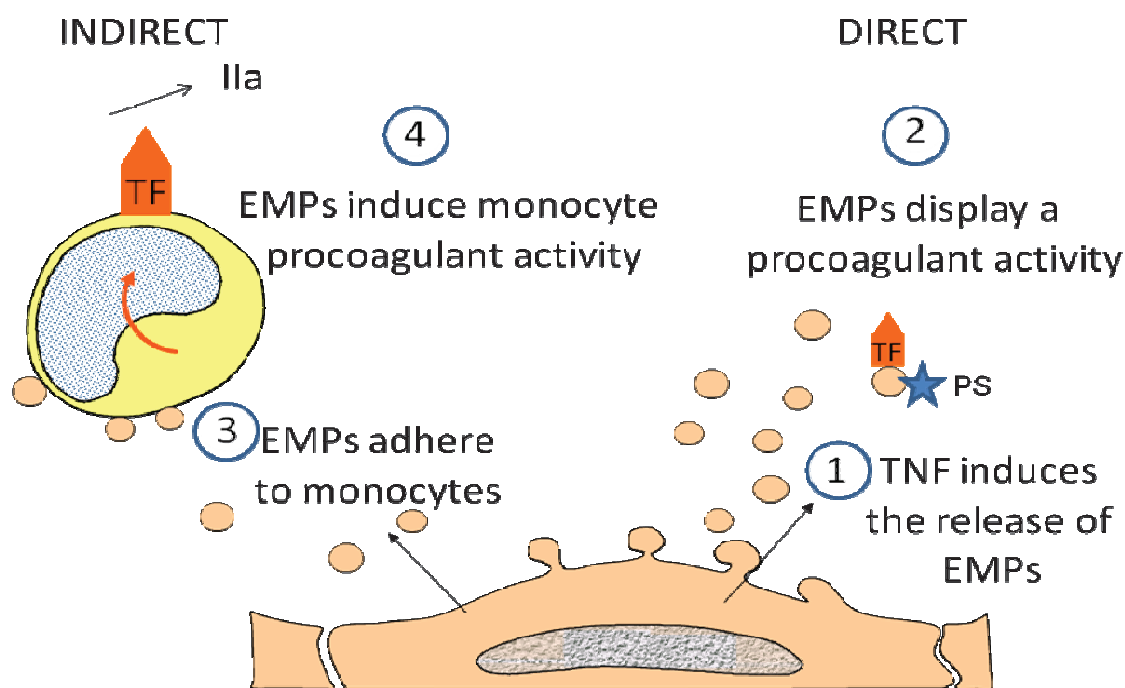


Figure 7 : Contribution de la génération des MPE à l'activité procoagulante. EMPs : Microparticules endothéliales. TNF : Tumor necrosis factor (Sabatier et co. Blood 2002)

Les MP d'origine cancéreuse montrent également une activité procoagulante dépendante du facteur tissulaire. Ainsi la problématique du lien entre les MP et les thromboses associées aux cancers est un sujet important dans la littérature²²¹. Bien qu'un nombre important de données existe pour supporter l'implication physiopathologique des MP dérivées de cellules cancéreuses dans les thromboses liées aux cancers^{222,223} (*Annexe 1*), le lien de causalité n'est pas encore totalement établi. Davila et co. ont montrés que l'injection de MP dérivées de cellules cancéreuses portant une activité FT très élevée chez la souris, provoque un syndrome proche d'une coagulation intravasculaire disséminée *in vivo*. De manière intéressante, cette étude démontre également qu'un taux minimal de MP injectées est nécessaire pour dépasser les mécanismes protecteurs anti-thrombotiques²²⁴. Ces conclusions concordent avec celles de Thomas et co. qui montrent que l'injection de MP de lignées tumorales pancréatiques humaines et murines induit dans un modèle de thrombus chez la souris un raccourcissement du temps d'occlusion veineux et artériel. Ce même travail démontre par microscopie intravitale que les MP spécifiquement dérivées de la tumeur se lie au thrombus de manière dépendante de la PSGL-1²²⁵ (Figure 8 et *Annexe 2*).

La contribution relative des MP dérivées de la tumeur ou des MP dérivées des cellules de l'hôte dans la formation du thrombus *in vivo* ainsi que la démonstration formelle du rôle du FT reste cependant des questions ouvertes.

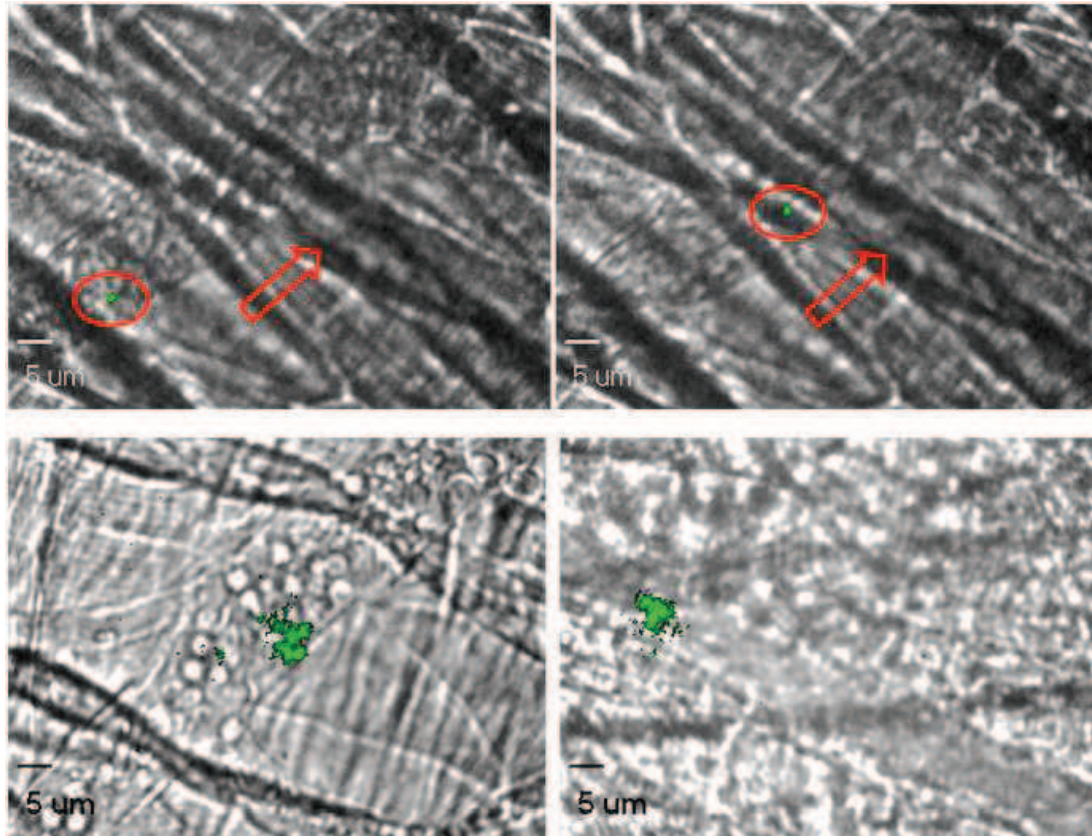


Figure 8 : Contribution des MP tumorales à la formation du thrombus *in vivo* (Thomas G. J. Exp. Med 2009). Détection de MP provenant d'une tumeur pancréatique marquée au GFP (vert) dans la circulation (images du haut) et dans le thrombus (images du bas) par microscopie intravitale.

b. Fonction anticoagulante des microparticules

Si la résultante des activités des MP sur l'équilibre hémostatique semble clairement pro-coagulante, des protéines anticoagulantes ont été également mises en évidence à leur surface. Ainsi les MP dérivées de monocytes sont porteuses de thrombomoduline²²⁶ et d'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)²²⁷. Le récepteur à la protéine C activée a été montré à la surface des MPE. Ce récepteur endothélial de la protéine C est présent sous une forme fonctionnelle dans la MP différente de sa forme clivée qui ne peut plus lier la

protéine C activée²²⁸. En physiopathologie il paraît donc nécessaire de vérifier la résultante de l'expression concomitante des récepteurs anti- et pro-coagulants à la surface des MP sur l'équilibre hémostatique, particulièrement dans les lignées cellulaires capables d'exhiber les deux types d'activité (cellules endothéliales et monocytes-macrophages). L'activité fibrinolytique des MP, récemment mise en évidence peut aussi impacter sur cette balance hémostatique (cf *infra*).

2) Rôle des microparticules dans la modulation du tonus vasculaire

Les MP participent à la régulation du tonus vasculaire, notamment en diminuant la production du NO par les cellules endothéliales^{229,230}. Une diminution du NO endothélial à pour conséquence de limiter les propriétés vasculoprotectrices et antiathérogènes de l'endothélium vasculaire (Figure 9). Cet effet a été observé sur des artères exposées *in vitro* à des concentrations circulantes de MP isolées à partir de sang de patients coronariens, insuffisants rénaux, prééclampsiques, ou insuffisants pulmonaires^{9,11,231-233}. Il est à noter que dans ce même test, les MP issues de volontaires sains n'ont aucun effet. La dysfonction endothéliale induite par les MP plasmatiques humaines dont essentiellement la sous-population d'origine endothéliale, est associée à une diminution de la production de NO mais pas à une altération de l'expression de la NO synthase endothéliale. Des résultats similaires ont été observés avec des MP générées *in vitro* à partir de cellules musculaires lisses ou d'une lignée lymphocytaire²³⁴⁻²³⁶.

D'autres mécanismes impliqués dans la réactivité vasculaire ont été décrit. Les MP plaquettaires, source de thromboxane A₂, induisent une contraction vasculaire²³⁷. Les MP issues d'une lignée lymphocytaire T ou isolées à partir de plasma de patients diabétiques induisent une hyporéactivité vasculaire, sur des artères murines isolées, associée à une production de NO et de prostacycline^{238,239}. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les MP induisent la NO synthase inductible et la cyclooxygénase de type 2 en activant le facteur de transcription NFκB. L'ensemble de ces mécanismes peut contribuer à la dysfonction endothéliale induite par les MP.

Par ailleurs, de manière surprenante, certaines MPE générées *in vitro* et portant sonic hedgehog semblent stimuler la production de NO endothélial et diminuent celle de radicaux libres oxygénés dans les vaisseaux^{240,241}. Aucune information n'est encore disponible quant

à la présence de ce morphogène sur les MP plasmatiques ni sur l'évolution de son expression sur les MP au cours des pathologies cardiovasculaires. D'autres MP pourraient avoir également un effet favorable sur la fonction endothéliale. Le transfert d'acide arachidonique par les MPP pourrait ainsi induire l'expression de la cyclooxygénase-2 et la production de prostacycline impliquée dans l'inhibition de l'activation plaquettaire et la vasodilatation²⁴². L'importance de ce dernier mécanisme n'est pas clairement établie en clinique humaine.

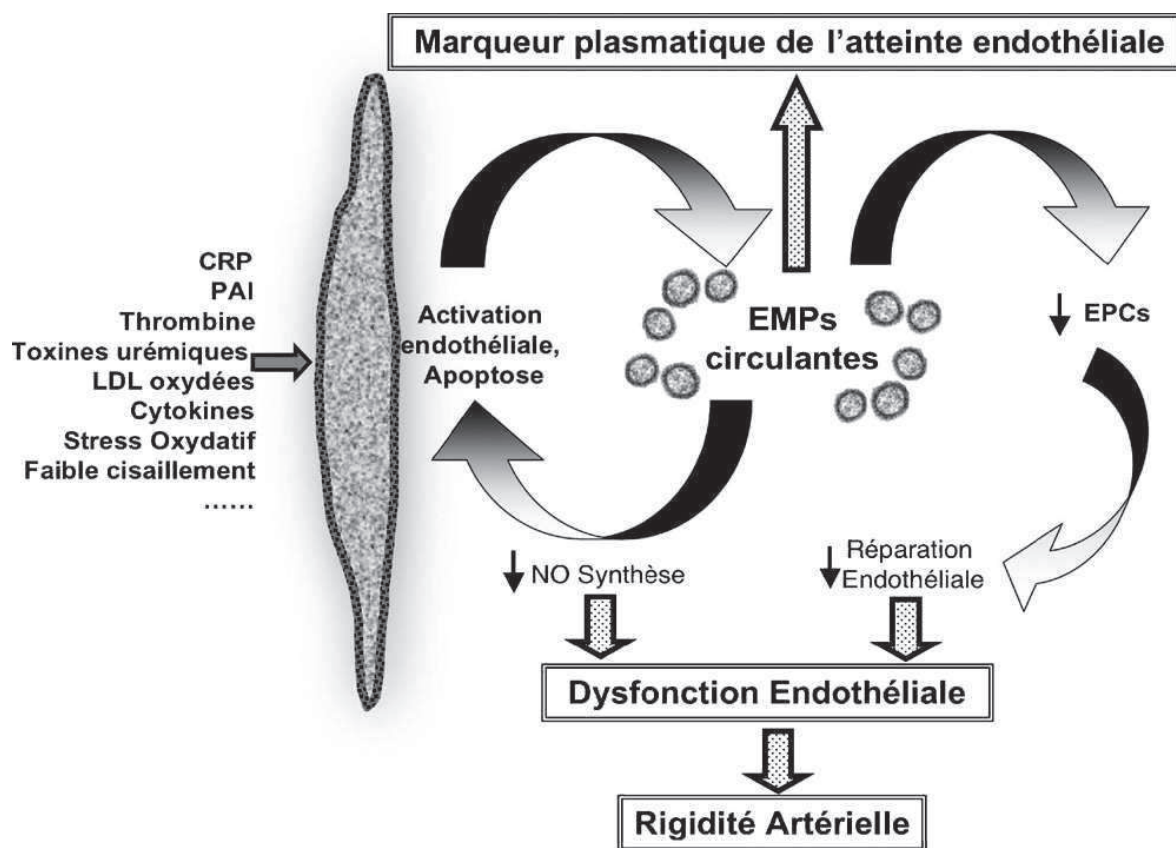


Figure 9 : MPE et dysfonction endothéliale par diminution de la synthèse de NO.
(Amabile et co. Ann Cardiol Angeol 2008)

3) Rôle des microparticules dans l'inflammation

De nombreux travaux ont démontré, le rôle des MP dans la modulation de l'inflammation dans le compartiment vasculaire. L'effet pro-inflammatoire des MP implique par exemple les phospholipides oxydés capables d'activer les récepteurs du PAF (facteur d'activation plaquettaire) présents sur les cellules endothéliales et les leucocytes²⁴³. Les MP constituent également une source importante de substrat aminophospholipidique pour la phospholipase A2 sécrétoire, massivement libérée au cours du sepsis, conduisant à la génération d'acide lysophosphatidique, un puissant médiateur pro-inflammatoire et agoniste plaquettaire²³⁶. L'acide arachidonique transporté par les MP induit une augmentation de l'expression membranaire d'ICAM-1 sur l'endothélium^{198,244,245}. Ces MP induisent également la néosynthèse de contre-récepteurs (CD11a/CD18, CD11b/CD18) monocytaires favorisant les interactions leuco-endothéliales. Les MP d'origine plaquettaire ou leucocytaire induisent la libération de plusieurs cytokines endothéliales (Il-1b, Il-6, Il-8, MCP-1) ou monocytaires (Il-1b, TNFa, Il-8)²⁴⁶⁻²⁴⁸ renforçant ainsi la réponse inflammatoire²⁴⁹. Les MP plaquettaires peuvent par ailleurs faciliter le recrutement de nombreuses cellules immunes (monocytes, lymphocytes T et B, cellules NK)²⁵⁰⁻²⁵². Les plaquettes interagissent directement avec l'endothélium vasculaire activé en augmentant l'arrêt des leucocytes/monocytes après transfert par les MP de la chimiokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)²⁵³.

A l'inverse, les MP libérées par des neutrophiles activés semble limiter la réponse inflammatoire aux stades précoces et participer aux défenses antimicrobiennes en se liant aux bactéries opsonisées, aux monocytes et aux cellules endothéliales⁷¹ focalisant ainsi l'activité anti-microbienne. Ces MPL moduleraient l'équilibre entre cytokines pro et anti-inflammatoires sécrétées par les macrophages (Il-8 et TNFa vs TGFβ et Il-10)^{254,255}. Les MP dérivées de lymphocytes T peuvent aussi induire l'apoptose des macrophages provoquant en retour leur vésiculation²⁵⁶. Bien que ces dernières observations nécessitent une confirmation dans d'autres modèles cellulaires et *in vivo*, elles posent la question du rôle des MP comme acteurs potentiels de « limitation » et/ou de « résolution » de la réponse inflammatoire.

Le lien entre les activités inflammatoires, pro-thrombotiques et angiogénique des MP est très fort (figure 10). Les mécanismes permettant de montrer clairement ce lien dans le contexte endothélial ont été récemment résumés dans une revue¹⁵⁷ (annexe 3).

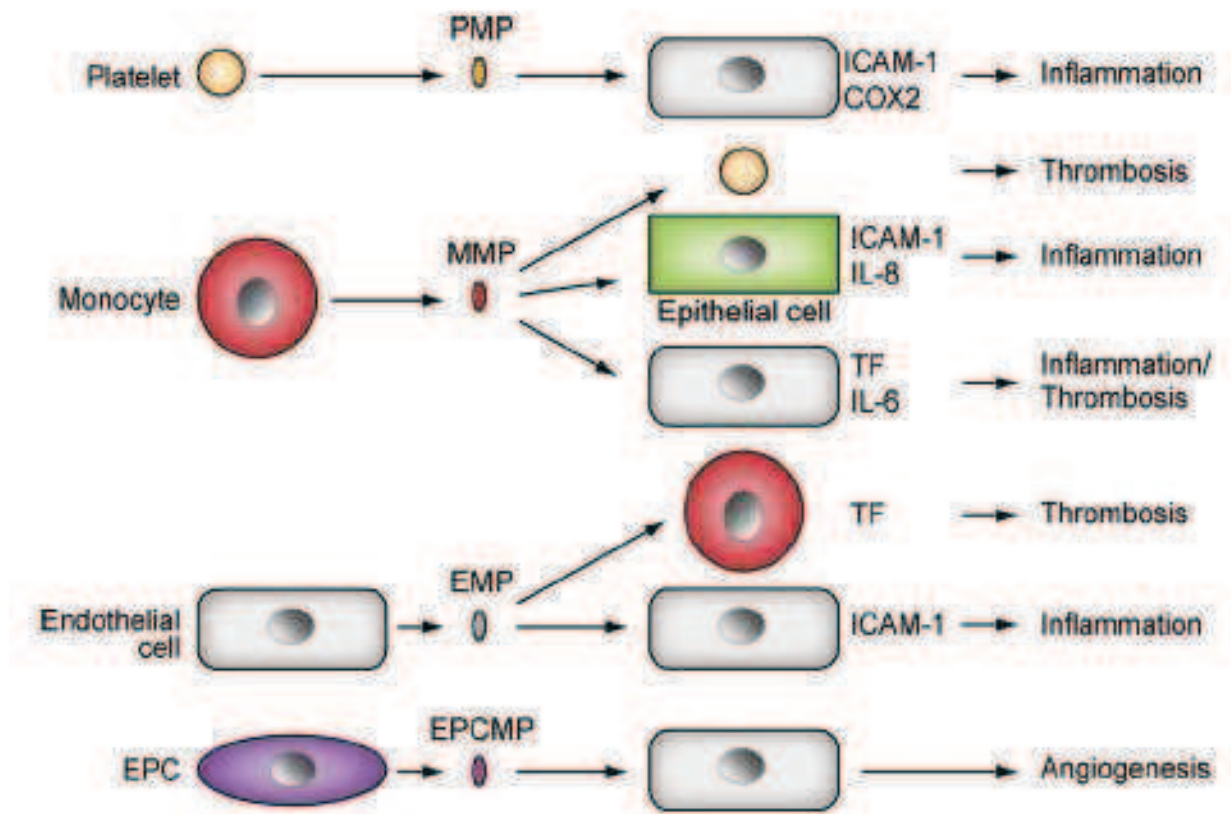


Figure 10 : Lien entre propriétés pro-thrombotique et inflammatoire des MP. PMP : Microparticules plaquettaires, MMP : Microparticules monocytaires, EMP : Microparticules endothéliales : EPC : Progéniteurs endothéliaux, EPCMP : Microparticules de progéniteurs endothéliaux, COX2 : Cycloxygénase 2, ICAM-1 : Molécule adhésion intercellulaire 1, IL : Interleukine, TF : Facteur tissulaire (N.Mackman, Circ Res 2009)

4) Rôle des microparticules dans l'angiogénèse

L'angiogénèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un phénomène biologique très important et généralisé au cours de l'organogénèse embryonnaire alors qu'au stade adulte, ce processus ne sera activé que dans des conditions limitées ou pathologiques. Des travaux ont montré que les MP interviennent à trois étapes cruciales de l'angiogénèse : la dégradation matricielle, le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux et la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Le rôle des MP dans la protéolyse et la dégradation matricielle est développé dans le paragraphe suivant.

Concernant les deux autres étapes, plusieurs mécanismes ont été décrits. La sphingomyéline portée par les MP tumorales pourrait être un composant actif de ces processus d'angiogenèse en favorisant la migration de cellules endothéliales, l'invasion et la formation de tubes²⁵⁷. De même, le FT porté par les MP est un puissant régulateur de l'angiogenèse²⁵⁸. En particulier, il augmente la synthèse du VEGF (vascular endothelial growth factor). De nombreux agonistes vasculaires comme le VEGF, le PAI-1 et le fibroblast growth factor (FGF) sont par ailleurs impliqués dans la formation des MPE porteuses de métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9). Plus récemment, il a été montré que les MP issues de cellules progénitrices endothéliales stimulaient l'angiogenèse par transfert horizontal de microARN¹⁷⁶. De plus les MPE stimulent les mécanismes de réparation tissulaire. Ceci a été montré dans le tissu musculaire. Cet effet est dépendant d'une augmentation de la différenciation des progéniteurs endothéliaux par un mécanisme impliquant la génération de radicaux libres oxygénés⁶⁴.

Les MPP également sont capables d'induire l'angiogenèse *in vitro* (figure 11) et de stimuler la revascularisation post-ischémique *in vivo*²⁵⁹⁻²⁶¹. Un mécanisme avancé est la vectorisation de récepteurs membranaires tels que Flt-1 (VEGF-R1)²⁶². Les MP qui portent le Sonic Hedgehog favorisent l'angiogenèse en régulant positivement les molécules d'adhésion et les facteurs proangiogéniques²⁶³. *In vivo*, dans un modèle de souris, elles favorisent la néovascularisation par l'activation de la voie du NO²⁶⁴.

La promotion de l'angiogenèse par les MP peut avoir des effets délétères comme dans l'invasion tumorale, la rétinopathie diabétique⁶⁵ ou la déstabilisation de la plaque d'athérosclérose²⁶⁵.

Inversement, dans certaines conditions, les MP libérées par les cellules endothéliales en culture altèrent l'angiogenèse *in vitro*²⁶⁶. Il a aussi été montré que les MP plasmatiques isolées de sujets hypercholestérolémiques diminuent la formation de progéniteurs endothéliaux²⁶⁷.

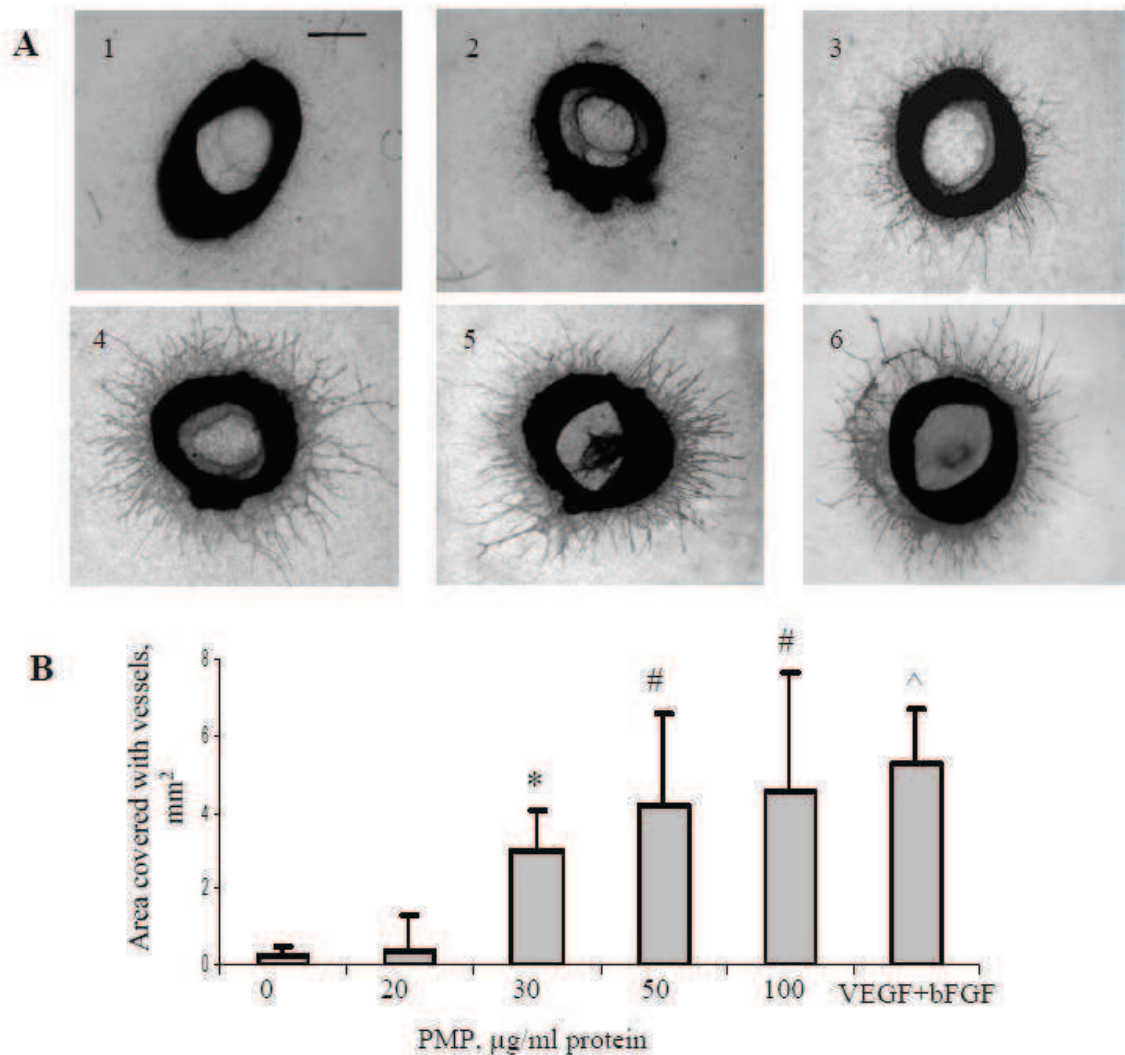


Figure 11 : Augmentation de l'angiogenèse par des concentrations croissantes de MPP dans un modèle d'anneaux aortiques de rat (Brill et co. Cardiovasc. Res. 2005)

5) Rôle des microparticules dans la protéolyse matricielle

Les cellules tumorales malignes possèdent un potentiel protéolytique important, caractérisé par la production de MMP et d'uPA, nécessaire à leur dissémination et à l'invasion tissulaire. Dans une série d'études publiées depuis 1994, la présence de ces enzymes protéolytiques a été identifiée, *in vitro* et *in vivo*²⁶⁸⁻²⁷⁵, sur la membrane de MP tumorales isolées de surnageants de culture de lignées tumorales humaines ou de liquides d'ascite obtenus chez des patientes atteintes de cancer ovarien^{268,273}. La détection de

l'activité enzymatique par zymographie et de la protéine support par immuno-empreinte a permis d'identifier sur ces MP, l'uPA et son récepteur uPAR, la proMMP-2, la proMMP-9 et leurs formes actives, ainsi que des complexes entre les MMP et leur inhibiteur TIMP-1. Une bande protéolytique ayant la masse moléculaire du tPA a été également détectée par zymographie dans des MP provenant d'une lignée de carcinome de la prostate²⁷⁶. Un modèle de matrice extracellulaire en trois dimensions (Matrigel) a permis de mettre en évidence une action concertée entre l'uPA et les pro-MMP des MP dans la dégradation de protéines matricielles en présence de plasminogène. Le mécanisme proposé suggère que la membrane des MP fonctionnerait en offrant une large surface d'activation de MMP *via* la formation de plasmine par l'uPA^{268,274,275}. Ces résultats ont été confirmés plus récemment par l'étude des MP isolées d'ascites prélevées chez des sujets atteints de cancer de l'ovaire²⁷⁷.

Les MMP sont également portées par des MP non tumorales, provenant de cellules endothéliales humaines. En effet, la présence de proMMP-2, proMMP-9, de leurs formes actives ainsi que celle de la MT1-MMP et des inhibiteurs TIMP-1 et TIMP-2 sur des MP obtenues de surnageants de culture de ces cellules a été démontrée par Taraboletti *et al.*²⁷⁸. Ces MP favorisent la migration de cellules endothéliales et modulent leur capacité angiogénique dans le Matrigel : l'effet stimulateur sur la formation de tubes, observé à de faibles concentrations de MP, se transforme en effet inhibiteur à des concentrations plus fortes, suggérant un défaut d'implantation cellulaire sur la matrice dégradée par l'activité protéolytique des MP. Brodsky *et al.* ont également rapporté la présence de l'uPAR sur des MP obtenues par stimulation de cellules endothéliales avec des concentrations élevées de PAI-1¹⁵².

Enfin, certaines MP peuvent stimuler la production de MMP par des fibroblastes²⁷⁹, des cellules endothéliales²⁸⁰, ou des cellules malignes²⁸¹ et contribuer ainsi de manière indirecte à la protéolyse péricellulaire.

6) Rôle des microparticules dans la survie cellulaire

Les MP peuvent être considérées comme un moyen pour la cellule parente d'éliminer de sa surface des molécules potentiellement délétères. Ceci a été montré il y a déjà plus de 20 ans comme un mécanisme de défense des granulocytes contre le complexe d'attaque membranaire du complément³³⁻³⁵. Plus récemment un mécanisme similaire a été observé sur

un modèle de cellules érythroleucémique K562²⁸². D'autres molécules sont ainsi expulsées de la surface cellulaire comme Fas ligand par des cellules tumorales ovariennes²⁸³ ou la caspase-3 par les cellules endothéliales induisant ainsi une protection contre l'apoptose²⁸⁴. Les MP pourraient également être impliquées dans la résistance aux chimiothérapies. La doxorubicine par exemple est accumulée dans des MP émises par des cellules tumorales. La génération de MP, enrichies en drogues cytotoxiques pourrait ainsi fournir à la cellule tumorale un mécanisme supplémentaire de résistance²⁸⁵. De manière intéressante, la survie des cellules hématopoïétiques est favorisée par les MPP²⁵². Une étude récente montre également que les statines améliorent la survie des cellules endothéliales vasculaires en facilitant leur vésiculation *in vitro*²⁸⁶. Il faut toutefois souligner que l'effet des statines reste débattu^{287,288}.

7) Rôle des microparticules dans la modulation de la réponse immunitaire

Plusieurs travaux ont suggéré un rôle pour les MP dans l'induction d'une tolérance immune. Ainsi, au cours du premier trimestre de la grossesse, les cellules trophoblastiques génèrent des MP porteuses de Fas-ligand capables d'induire l'apoptose de lymphocytes T par l'intermédiaire d'interactions Fas/Fas-ligand²⁸⁹. L'apoptose induite par ce type de MP pourrait aussi constituer un processus d'échappement des cellules cancéreuses à la réponse immune en ciblant les cellules du système immunitaire porteuses de Fas et en diminuant le taux d'expression de Fas-ligand disponible à la surface tumorale. Dans ce sens, il a été démontré que des cellules épithéliales ovariennes cancéreuses étaient capables d'exporter du Fas ligand fonctionnel à la surface des MP alors que leurs homologues non néoplasiques exprimaient Fas-ligand sans le sécréter²⁸³.

À l'inverse, la réponse immune exacerbée pourrait résulter d'une production soutenue de MP ou d'une diminution de leur clairance. La pérennisation de complexes antigéniques phospholipides–protéines colocalisés par la membrane particulaire pourrait faciliter la reconnaissance par le système immunitaire et contribuer à la pathogénie du syndrome des anticorps antiphospholipides. Des taux élevés de MP endothéliales riches en FT sont ainsi rapportés chez les patients présentant un anticoagulant lupique³⁹. Il n'est actuellement pas établi dans ce type de situation, si les MP participent à la formation de néoantigènes ou si elles ne reflètent qu'une stimulation endothéliale particulière.

Enfin, il faut noter, comme pour les exosomes, la présence sur des microparticules de molécules du CMH. Ces molécules peuvent être transférées à des cellules dendritiques receveuses permettant l'activation allogénique des lymphocytes T²⁹⁰. Ces vecteurs sont probablement responsables du transfert de molécules de CMH II déjà observé en culture il y a 10 ans²⁹¹. Les MPP contribuent également la réponse humorale par activation des lymphocytes B dépendante du CD40 ligand²⁹². D'autre part les MPE favorisent la maturation des cellules dendritiques plasmocytoïdes avec expression de molécules de costimulation pouvant induire une réponse immune T²⁹³.

8) Rôle des microparticules dans la communication intercellulaire

Initialement décrite sur les exosomes, cette propriété de transfert horizontal de protéine, de lipides et d'information génétique d'une cellule à une autre est aussi démontrée pour les MP²⁹⁴. Les mécanismes impliqués dans ces interactions sont mal connus. Certaines études montrent un mode de transfert direct de protéines à la surface des cellules endothéliales^{253,295}. D'autres suggèrent des mécanismes proches de la phagocytose impliquant des récepteurs scavangers ou des récepteurs à la PS²⁹⁶. Une fusion des membranes entre les MP et les cellules cibles a aussi été avancée²⁹⁷⁻³⁰⁰ (figure 12). Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'interaction est importante car cette étape est potentiellement pharmacologiquement modulable.

Les MP d'origine monocytaires sont ainsi capables de transférer le récepteur de la chimiokine CCR5, un corécepteur du virus VIH, à des cellules ne l'exprimant pas comme les cellules endothéliales³⁰¹. L'acquisition de ce corécepteur par les cellules cibles pourrait les rendre sensibles à l'infection par le VIH. Plus récemment, la fonctionnalité d'un tel transfert particulière a été démontré à partir de MP dérivés des plaquettes ou des mégacaryocytes porteuses du récepteur CXCR4⁵⁷. De même, les lymphocytes T recevant la molécule Fas ligand par des MP de cellules tumorales peuvent subir l'apoptose³⁰². Plus récemment, ce mécanisme a permis d'expliquer l'acquisition par des cellules de gliome humain de la forme tronquée du récepteur au facteur de croissance épidermique EGFRvIII alors qu'elles ne l'exprimaient pas initialement³⁰³. De plus, les PMP vectorisent des facteurs de transcriptions fonctionnels capables de maintenir un état d'activation des monocytes

élevé après endocytose³⁰⁴. Ce type de transfert explique également le risque de contamination de progéniteurs humains destinés à la thérapie cellulaire par des protéines animales apportées par des MP¹⁶⁸ et les discordances de phénotypes parfois observées après culture cellulaire comme la contamination par des protéines plaquettaires de progéniteurs endothéliaux précoces³⁰⁵. Ces transferts moléculaires complexifient l'identification des cellules sources d'une protéine particulière comme par exemple le FT.

Lors des interactions avec leurs cellules cibles, les MP peuvent libérer dans le cytoplasme de la cellule réceptrice tout leur contenu cytosolique. Celui-ci peut inclure non seulement des protéines mais également des acides nucléiques comme des ARN messagers ou des microARN²⁹⁸. Ces derniers ont pour fonction de contrôler l'expression des gènes en régulant la production d'ARN messagers. Ainsi, il a été montré que les MP de progéniteurs de cellules différenciées et de cellules tumorales transfèrent des ARNm^{59,176,252}. Un transfert similaire a également été observé entre les cellules de Schwann et les axones des nerfs périphériques au niveau des nœuds de Ranvier^{306,307}. Les conséquences de ce mécanisme sont diverses en fonction du matériel transmis. Par exemple, il peut aboutir à la maturation et à la différenciation des cellules cibles ou un effet inverse³⁰⁸.

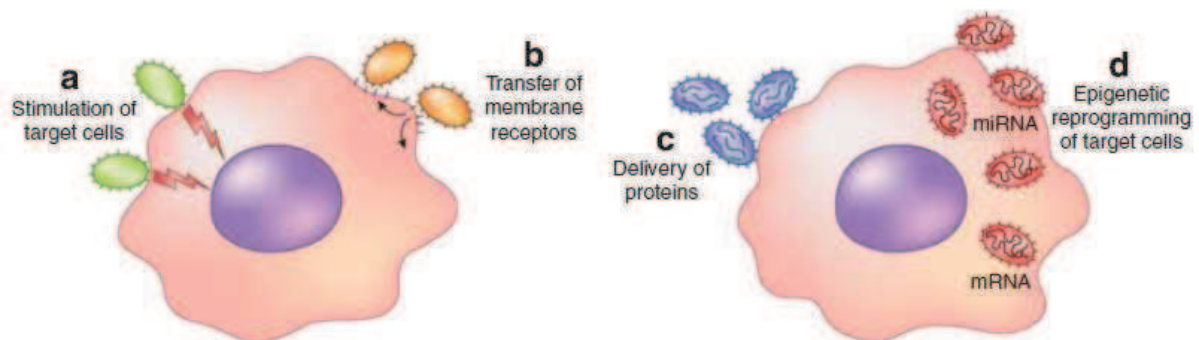


Figure 12 : Différents modes d'interaction entre les MP et la cellule cible. (Camussi et co. *Kidney International* 2010)

CHAPITRE 3 : LA GENERATION DE PLASMINE

Le système d'activation du plasminogène joue un rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire en contrôlant la dissolution du caillot et le maintien d'un système vasculaire fonctionnel. L'activation du plasminogène permet de générer l'enzyme clé de ce système : la plasmine. Ce système est hautement régulé par de nombreux inhibiteurs qui permettent de limiter la diffusion de ses activités protéolytiques. Un jeu subtil d'interactions moléculaires où les surfaces supports (fibrine, membranes cellulaires ou matrice extracellulaire) ont un rôle essentiel, permet son équilibre.

A. LE PLASMINOGENE

Le plasminogène humain, précurseur de la plasmine, est une glycoprotéine plasmatique monocaténaire de 92 kDa, synthétisée par le foie et circulant à une concentration comprise entre 1,5 et 2 μM . Sa demi-vie plasmatique est de 2,2 jours.

La forme native du plasminogène a été baptisée Glu-plasminogène en raison de la présence d'un acide glutamique à son extrémité N-terminale. Deux formes plasmatiques existent en fonction de leur degré de glycosylation, qui peut se situer au niveau de Asn₂₈₉ et de la Thr₃₄₆ (type I), ou au niveau de la Thr₃₄₆ seulement (type II). Sept cent quatre-vingt onze acides aminés et 24 ponts disulfures s'organisent en sept domaines structurels (figure 13): une chaîne peptidique N terminale appelée peptide de préactivation, correspondant aux acides aminés 1 à 77, puis cinq séquences homologues d'environ 80 acides aminés chacune, appelées « kringles » K1 à K5, nommées ainsi par analogie avec un biscuit danois et enfin, au niveau de l'extrémité C terminale, le site responsable de l'activité protéolytique sérine protéase, formé des acides aminés 562 à 791³⁰⁹ contenant la triade catalytique caractéristique des sérines protéases : His603, Asp646 et Ser741³¹⁰.

Chacun de ces différents domaines confère au plasminogène des propriétés spécifiques. Ainsi, le peptide N-terminal et les domaines 'kringles' définissent la conformation spatiale du plasminogène. Ces derniers possèdent trois ponts disulfures intra-

domaines qui leur confèrent une très grande stabilité de conformation. Des sites de liaison dépendant de la lysine (LBS : Lysin Binding Site) sont présents sur les K1 et K4. Ils permettent la fixation du plasminogène sur la fibrine ou sur les surfaces cellulaires et l'interaction de la plasmine avec l' α 2-antiplasmine, jouant ainsi un rôle majeur dans la régulation de la fibrinolyse³¹¹.

Un LBS de faible affinité est présent sur le K5. Il présente une affinité particulière pour les analogues de la lysine et il est impliqué dans une interaction inter-domaine avec le peptide N terminal du glu-plasminogène qui favorise une conformation compacte^{312,313}. Des études physico-chimiques indiquent que cette forme fermée du glu-plasminogène est prédominante dans la circulation et qu'elle est en équilibre avec une forme ouverte de très courte demi-vie^{314,315}. La rupture chimique de cette interaction par clivage protéolytique du peptide N-terminal par la plasmine (clivage soit de Lys 62, Arg 68 ou Lys 77) conduit à une forme tronquée ouverte, connue sous le nom de lys-plasminogène, incapable d'adopter une conformation compacte, qui constitue le substrat préférentiel pour les activateurs du plasminogène³¹⁶. De la même manière, la saturation avec l' ϵ -ACA (acide ϵ -amino caproïque) du LBS de faible affinité du glu-plasminogène K5 gêne son interaction avec le peptide N-terminal et entraîne une transition du glu-plasminogène de sa forme compacte fermée à une conformation ouverte caractéristique du lys-plasminogène^{312,317}.

Le clivage, dans le domaine sérine protéase, du pont peptidique Arg₅₆₁-Val₅₆₂ par les activateurs du plasminogène génère la plasmine, une sérine protéase à large spectre qui clive ses substrats au niveau des résidus lysyl et arginyl. La plasmine est donc une molécule bicaténaire composée d'une chaîne lourde N-terminale (la chaîne A, 58kDa) et d'une chaîne légère C-terminale (la chaîne B, 25 kDa) reliées par deux ponts disulfures.

Il existe également des formes variantes de bas poids moléculaire comme le miniplasmin(ogène) et le microplasmin(ogène), avec respectivement seulement un kringle ou pas de kringle du tout attaché à la chaîne légère.

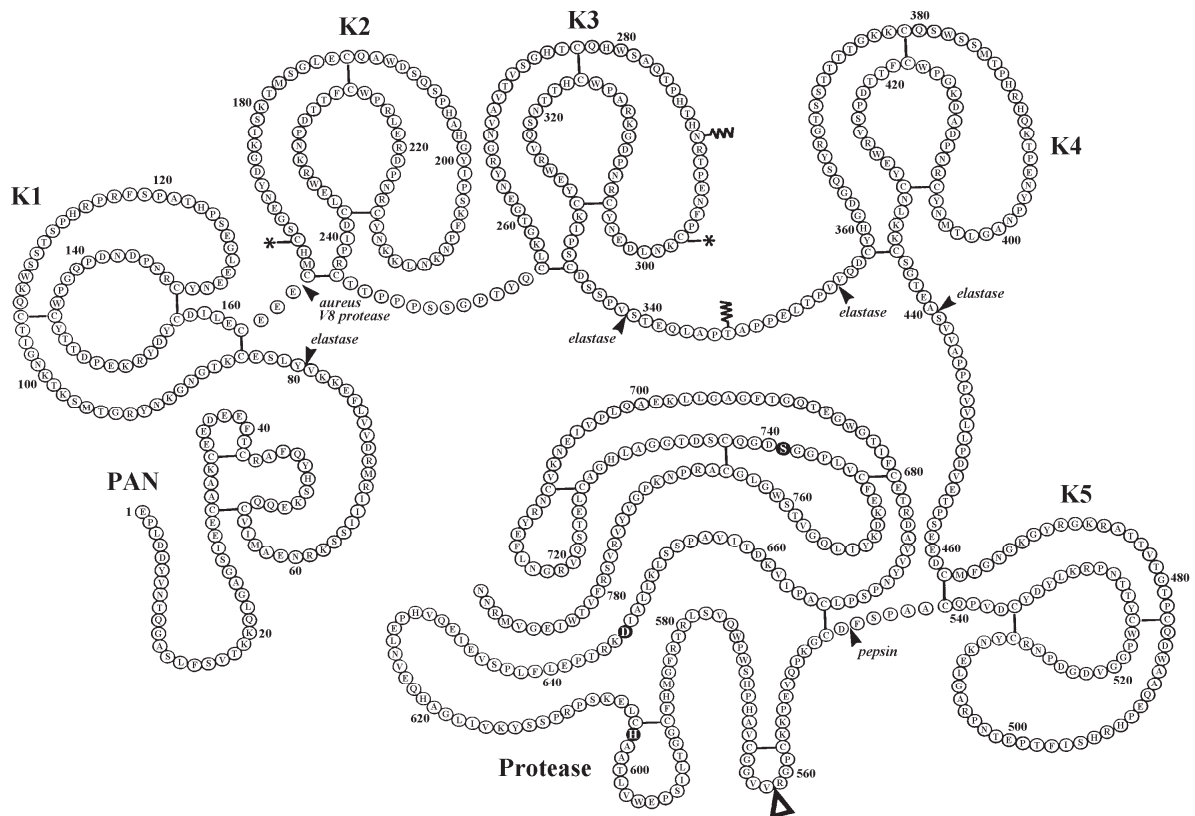


Figure 13 : Structure du plasminogène. (D'après Rejante et Llinas, Eur J Biochem 1994)

B. LES ACTIVATEURS DU PLASMINOGENE

1) L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)

Le t-PA est une glycoprotéine monocaténaire de 527 acides aminés et de masse moléculaire 70kDa synthétisée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML) ^{318,319}. La forme native contient au niveau de l'extrémité N-terminale une extension de 3 acides aminés (Gly-Ala-Arg). Le t-PA est composé de 5 domaines structuraux (figure 14) : un domaine « finger » (4-50), un domaine « epidermal growth factor-like » (EGF-like) (51-87), deux domaines « kringle » (88-176 et 177-262) et un domaine sérine-protéase (276-527) à l'extrémité C-terminale, comprenant la triade catalytique His₃₂₂, Asp₃₇₁ et Ser₄₇₈. Le clivage du pont peptidique Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ par la plasmine convertit le t-PA simple chaîne (sct-PA) en une forme double chaîne (tct-PA). Mais au contraire de la plupart des enzymes de cette famille, il faut noter que la forme précurseur monocaténaire est déjà active³²⁰. Chacun

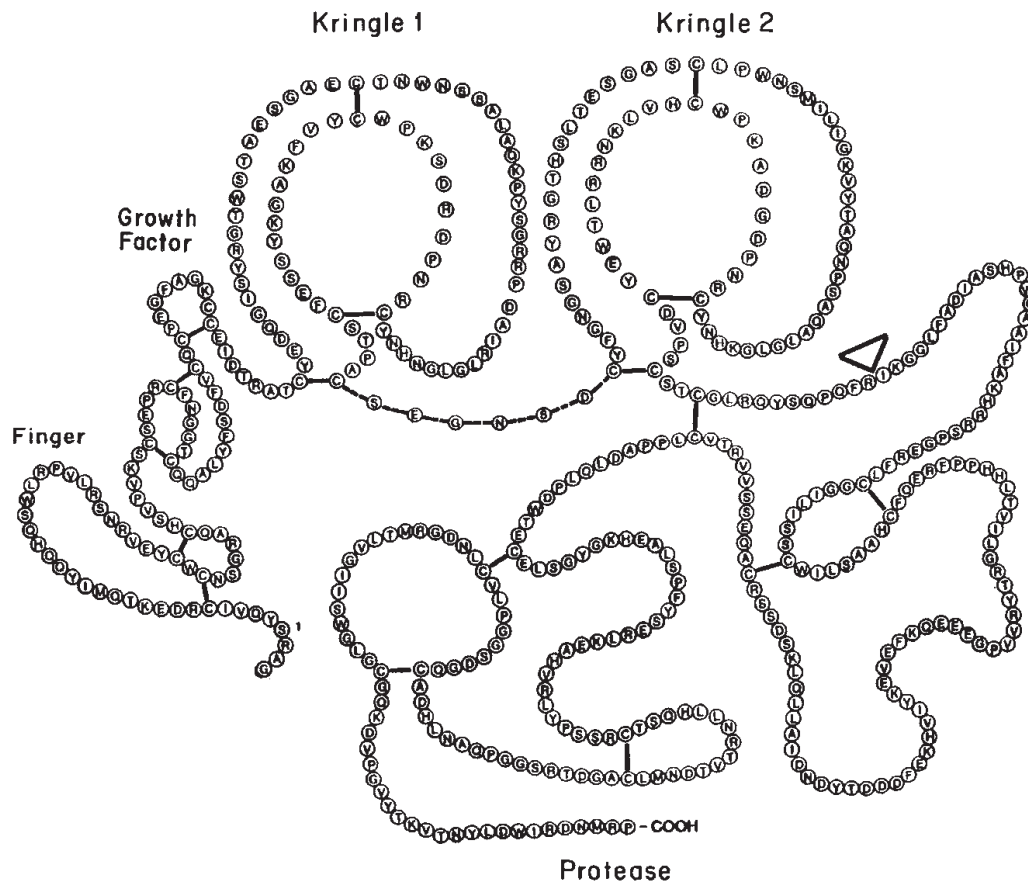


Figure 14 : Structure du t-PA (D'après Gething et co. Embo J 1988)

des domaines du t-PA assure une fonction spécifique telle que l'activité enzymatique, la liaison à la fibrine et à des récepteurs cellulaires ou encore l'interaction avec les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI). La liaison à la fibrine se fait par l'intermédiaire du domaine finger et du kringle 2^{321,322}. En solution, le t-PA présente une faible affinité pour le plasminogène. Mais celle-ci est fortement augmentée en présence de fibrine (x1000 à 1500) sur laquelle les deux molécules sont concentrées et prennent une conformation favorable³¹⁶.

En plus de son rôle fibrinolytique dans les vaisseaux, le t-PA semble être un acteur important dans le système nerveux central³²³. Il est exprimé par les neurones et les cellules de la microglie. Il induit localement une génération de plasmine responsable de la dégradation de substrats différents de la fibrine comme par exemple la protéine β -amyloïde³²⁴. Il peut agir également directement sur certain substrat comme le PDGF-CC

(Platelet derived growth factor)³²⁵ ou remplir des fonctions non protéolytiques comme la modulation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA)³²⁶.

2) L'urokinase (uPA)

L'uPA est également une sérine-protéase produite sous forme monocaténaire (scuPA ou pro-urokinase), de 54kDa et composée de 411 acides aminés³²⁷. Elle est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales, endothéliales, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les cellules tumorales. L'urokinase possède 3 domaines : un domaine présentant des homologies avec l'EGF dans la partie N-terminale (5-49), un domaine kringle (50-131) et un domaine sérine protéase comprenant la triade catalytique His₂₀₄, Asp₂₅₅ et Ser₃₅₆ à l'extrémité C-terminale. Le domaine kringle ne contient pas de site de liaison aux résidus lysines, ce qui explique qu'à la différence du tPA, l'uPA ne se lie pas à la fibrine. Sous sa forme monocaténaire, l'uPA est insensible aux inhibiteurs PAI-1 et PAI-2. La pro-urokinase a la capacité d'activer le plasminogène mais ce potentiel activateur demeure très faible (inférieur à 1% de celui de l'urokinase)³²⁸.

Le clivage de la liaison peptidique Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ par la plasmine, la kallikréine plasmatique ou la cathepsine B, convertit la pro-urokinase en une forme bicaténaire considérée comme l'enzyme active, l'urokinase ou tcuPA (Figure 15). Les deux chaînes sont liées par un pont disulfure (Cys₁₉₄-Cys₂₂₂). La chaîne légère (20kDa), composée de 158 acides aminés, contient le fragment amino-terminal (ATF) incluant les domaines EGF et kringle et donc le site de liaison au récepteur de l'urokinase, uPAR. La chaîne lourde (34kDa) est composée de 253 acides aminés comprenant le domaine sérine-protéase.

En présence d'une forte concentration de plasmine, celle-ci clive la liaison peptidique Lys₁₃₅-Lys₁₃₆, de la tcuPA qui génère une forme courte d'urokinase (33kDa) ne possédant pas ATF. Cette forme d'urokinase appelée urokinase de bas poids moléculaire, conserve l'intégrité de son activité mais perd sa capacité à interagir avec l'uPAR. Une autre forme de bas poids moléculaire (32Kd) est générée par clivage de la liaison Glu₁₄₃-Leu₁₄₄ par des métalloprotéinases spécifiques. La thrombine peut également cliver la pro-urokinase au niveau de la liaison peptidique Arg₁₅₆-Phe₁₅₇ ce qui aboutit cette fois à une protéine bicaténaire inactive. Cette réaction est fortement accélérée en présence de thrombomoduline³²⁹.

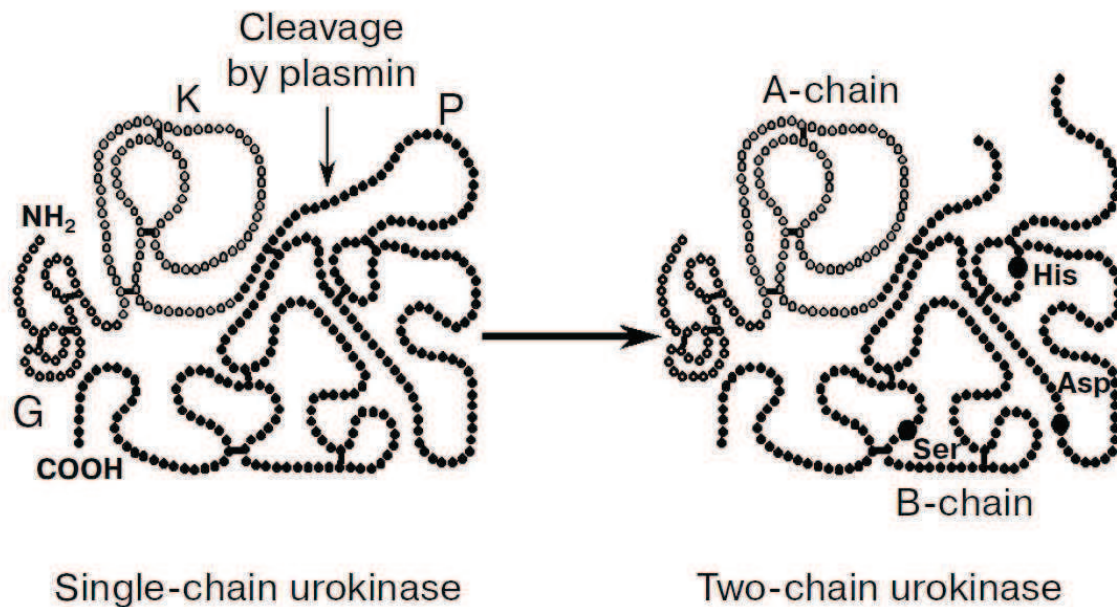


Figure 15 : Conversion de pro-urokinase en urokinase par la plasmine

Il est important de noter que la conversion de la pro-urokinase en urokinase n'est pas requise pour l'initiation de l'activation du plasminogène au niveau de la surface de fibrine et de la membrane cellulaire. En effet, la liaison du plasminogène au caillot de fibrine induit des changements de conformation qui stimulent l'activité intrinsèque de la pro-urokinase et lui permettent ainsi d'initier l'activation du plasminogène lié aux résidus lysines carboxyterminaux³³⁰. La conversion par la plasmine de la pro-urokinase en urokinase, plus active, conduit à une accélération de ce processus, d'autant plus que l'urokinase active le plasminogène tant en solution qu'au niveau du caillot de fibrine et des membranes cellulaires.

3) Le récepteur de l'urokinase (uPAR)

Le récepteur spécifique de la pro-uPA /uPA, uPAR (CD87), est exprimé à la surface des monocytes, les lymphocytes T, dans les granules des neutrophiles, sur l'endothélium, les épithéliums, les CML et les fibroblastes. Son expression à la membrane est régulée positivement en cas d'infection bactérienne et en réponse aux cytokines inflammatoires telles que le TNF α , l'IFN γ , et IL-1³²⁷.

L'uPAR est une protéine dont la masse moléculaire varie de 55 à 60 kDa en raison de glycosylations hétérogènes. La forme exprimée à la membrane contient une chaîne peptidique de 283 résidus et une ancre glycérophosphoinositol (GPI) à sa partie C-terminale. Trois modules homologues, les domaines D1 (domaine aminoterminal), D2 (domaine central) et D3 (domaine carboxyterminal) sont impliqués dans l'interaction avec la séquence Asp₁₂-Asn₃₂ du domaine EGF-like de la pro-urokinase³³¹. La résolution des structures cristallines de l'uPAR en complexe avec un peptide antagoniste³³² ou avec le fragment ATF de l'uPA a permis de montrer que les 3 domaines de l'uPAR étaient impliqués dans la constitution du site de liaison de haute affinité pour l'u-PA³³³. Cette liaison induit un changement conformationnel de l'uPAR qui va ainsi interagir avec d'autres composants cellulaires comme la vitronectine et certaines intégrines par la partie externe du récepteur³³⁴.

Enfin, l'uPAR peut être clivé par l'urokinase, la plasmine ou les MMPs libérant diverses formes solubles qui possèdent des effets propres indépendants de l'urokinase comme la stimulation de la migration des monocytes³³⁵.

C. LA FORMATION DE PLASMINE

1) Formation de plasmine par le t-PA

L'efficacité de la génération de plasmine par le t-PA est dépendante de la formation d'un complexe ternaire entre le t-PA, le plasminogène et la fibrine dans lequel les deux premiers partenaires sont fixés à la surface commune que représente le troisième³³⁶. La fibrine est donc cofacteur de la génération de plasmine avant d'en devenir le substrat terminal.

Deux phases peuvent être distinguées dans la lyse du caillot induite par le t-PA³³⁷.

Dans la première phase, le t-PA et le plasminogène se lient à des sites de faible affinité (Kd d'environ 1 μ M) situés dans chaque région D de la fibrine (résidus γ 312–324 et A α 148–160, respectivement)³³⁸. La structure cristallographique de cette région indique que ces sites sont très proches l'un de l'autre (environ 45 Å) ce qui facilite l'activation du plasminogène par le t-PA. D'autres études suggèrent l'implication dans ce mécanisme d'une autre région dans le domaine α C (A α 221-610) qui a une affinité importante pour le plasminogène et le t-PA³³⁸. Tous ces sites sont au départ masqués sur la molécule de

fibrinogène et ne sont révélés que lors de la formation du réseau de fibrine par des modifications conformationnelles³³⁹. Le t-PA active ainsi lentement le plasminogène sur une surface de fibrine intacte.

Lors de la deuxième phase, la fibrine est partiellement dégradée par la plasmine formée exposant ainsi de nouveaux sites de liaison (lysines C terminale) pour le plasminogène et potentiellement pour le t-PA. La concentration en plasminogène à la surface de la fibrine et donc le taux de lyse peuvent ainsi être multipliés par trente³⁴⁰. Cette lyse est dépendante des caractéristiques du réseau de fibrine. Il a été montré qu'un caillot constitué de fibres plus fines avec de nombreux nœuds de branchement était lysé plus lentement qu'un caillot à fibres épaisses³⁴¹.

Au niveau de la surface cellulaire, le mécanisme est très proche. De nombreux types cellulaires lient le plasminogène et ses activateurs pour générer de la plasmine et la protéger de l' α 2-antiplasmine (α 2-AP). Les sites de liaison sont nombreux mais de faible affinité. Les gangliosides ainsi que les protéines de membrane qui possèdent des lysines C-terminale comme l' α -énolase joue un rôle important dans cette interaction³⁴². Les autres récepteurs du plasminogène comprennent le TIP49a³⁴³, des intégrines comme l' α M β 2³⁴⁴ et l'histone H2B³⁴⁵, ce dernier jouant un rôle important sur les macrophages³⁴⁶. Le clivage par le t-PA du plasminogène lié à une surface cellulaire est environ 10 fois plus important qu'en solution, du au changement de conformation du plasminogène vers une forme plus facilement activable proche du lys-plasminogène^{347,348}.

L'annexine A2, une protéine membranaire de 36-kd a été proposée comme le récepteur fonctionnel du t-PA sur les HUVEC³⁴⁹ (figure 16). Ce récepteur accélère 6 fois l'activation du plasminogène par le t-PA dans un système purifié. Dans un modèle de thrombus carotidien chez le rat, l'injection d'annexine A2 recombinante diminue la formation du thrombus³⁵⁰. De plus, les souris KO pour cette protéine, montrent des dépôts de fibrine dans les petits vaisseaux et une clairance incomplète des thrombi artériels générés par blessure³⁵¹. Chez l'homme, des anticorps anti-annexine A2 sont associés aux thromboses dans le syndrome des anti-phospholipides³⁵². Les travaux d'autres équipes suggèrent qu'une autre protéine proche de l'annexine A2, la S100A10 serait en fait le récepteur attendu^{353,354}.

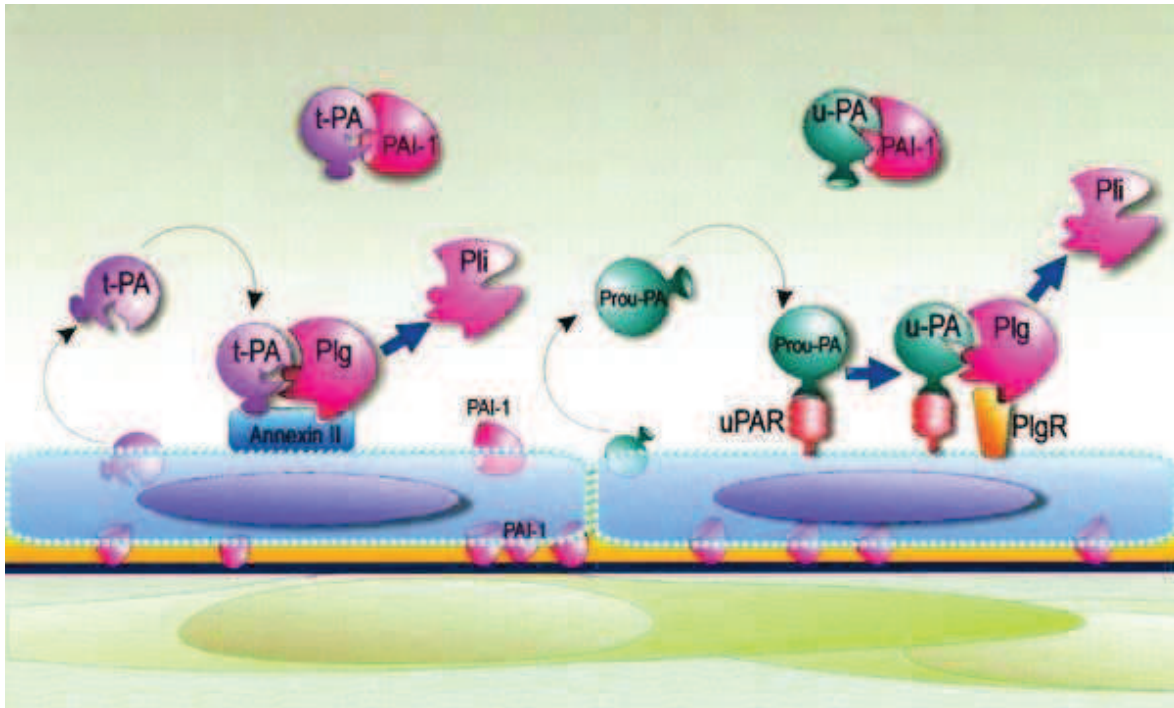


Figure 16 : Formation de plasmine par le t-PA ou l'u-PA à la surface des cellules endothéliales. Plg : Plasminogène, Pli : Plasmine, Plg-R : Récepteur du plasminogène, t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène, PAI-1 : Inhibiteur des activateurs du plasminogène type 1, u-PA : urokinase, Prou-PA : Pro-urokinase (N. Semeraro and M. Colucci, M. Curie Bioscience Database)

2) Formation de plasmine par l'uPA

Dans le plasma, en l'absence de fibrine, la scu-PA est stable et n'active pas le plasminogène. C'est en présence d'un caillot de fibrine, que la scu-PA (mais pas la tcu-PA) induit une lyse spécifique du caillot³⁵⁵. Cette enzyme est inefficace pour activer le plasminogène lié aux résidus lysine interne sur la fibrine intacte mais présente une plus grande activité envers le plasminogène lié aux lysine C-terminales de la fibrine partiellement dégradée³³⁰.

Au niveau des membranes cellulaires, la liaison de la scu-PA à son récepteur u-PAR augmente son activité de génération de plasmine³⁵⁶ (Figure 16). La plasmine générée peut en retour activer la scu-PA en tcu-PA, augmentant ainsi l'efficacité de la réaction. Ces interactions sont strictement dépendantes de la liaison du plasminogène à la surface

cellulaire. La plasmine formée qui reste liée à la surface cellulaire est efficacement protégée d'une rapide inhibition par l' α_2 -AP.

L'initiation de l'activation du plasminogène peut impliquer d'autres enzymes qui permettent d'activer la scu-PA en tcu-PA : des métalloprotéases matricielles, comme la MMP-2³⁵⁷, des sérines protéases transmembranaires de type II (TTSPs) comme la matriptase³⁵⁸, la sérase-1B³⁵⁹ et l'hepsine³⁶⁰ ainsi que la kallikréine ou la cathepsine G.

Bien que l'u-PAR soit le récepteur cellulaire principal de l'uPA, celle-ci peut être activée à la surface cellulaire de manière indépendante de l'uPAR. Par exemple, l'intégrine α MB2 présente sur les neutrophiles peut lier l'u-PA et induire de façon efficace une génération de plasmine³⁴⁴.

D. LA REGULATION DE LA GENERATION DE PLASMINE.

Les différents inhibiteurs du système fibrinolytique agissent soit en inhibant directement les acteurs de la fibrinolyse (tPA, uPA, plasminogène/plasmine), ce qui est le cas des PAI et de l' α_2 -anti-plasmine (α_2 -AP), ou alors de façon indirecte en interagissant sur les sites de liaison du plasminogène, ce qui est le cas de la lipoprotéine(a) et de l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI)³⁶¹ (Figure 17). Tous ces inhibiteurs n'agissent pas chacun de leur côté mais il existe une synergie d'action du TAFIa, α_2 -AP et du PAI-1 pour mener de façon optimale la lyse du thrombus³⁶².

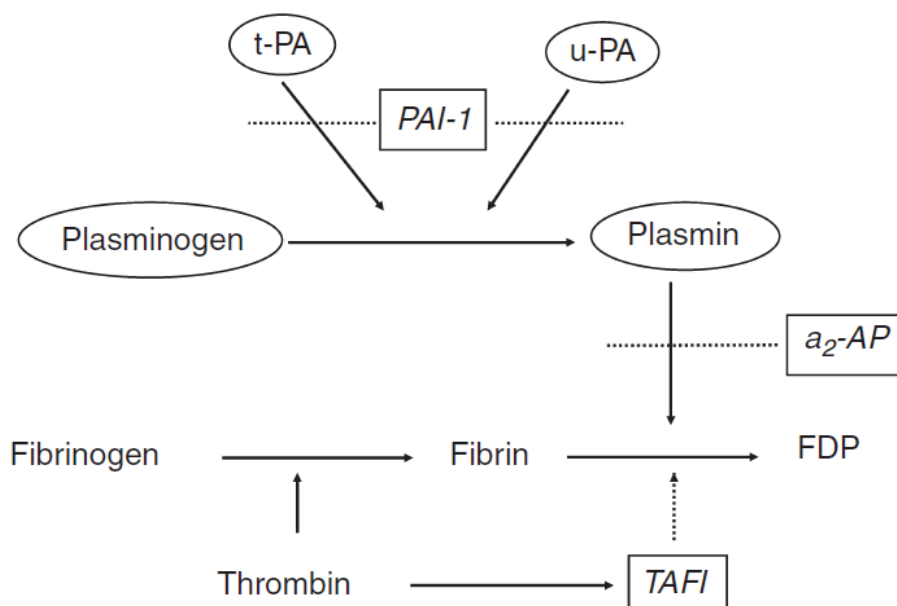


Figure 17 : **Inhibiteurs du système fibrinolytique.** T-PA : Activateur tissulaire du plasminogène, u-PA : Urokinase, a₂AP : α_2 -antiplasmine, TAFI : Inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine, PAI-1 : Inhibiteur des activateurs du plasminogène type I, FDP : Fragments de dégradation de la fibrine. (Rijken et co. J.Thromb Haemost 2009)

1) Les serpinés

Le premier groupe d'inhibiteurs appartient à la superfamille des serpinés (serine protease inhibitors). Elles ont en commun une boucle réactive dans la région C terminale qui contient une liaison peptidique clivée par leurs enzymes cibles. Ceci entraîne la libération d'un peptide et la formation d'un complexe inactif enzyme/inhibiteur. Le site actif de l'enzyme cible est bloqué par le complexe³⁶³.

a. Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1)

Le PAI-1 est l'inhibiteur majeur des activateurs du plasminogène, uPA et tPA. Plus précisément, il réagit avec la sct-PA, la tct-PA, la tcu-PA mais pas avec la scu-PA³⁶⁴. Il est constitué d'une simple chaîne glycoprotéique de 52-kd, contenant 379 acides aminés³⁶⁵. Sa structure cristallographique est très semblable aux autres serpinés avec 3 feuillets β (A, B et C), 9 hélices α (A à I) et une boucle réactive contenant la liaison peptidique piège^{270,366,367}.

La forme active se transforme spontanément en une forme latente inactive³⁶⁸. Cette forme peut être réactivée en forme active qui se trouve stabilisée après liaison avec la protéine S ou la vitronectine par son domaine somatomedine B³⁶⁹. Il existe également une forme clivée du PAI-1 au niveau de la liaison peptidique³⁷⁰. Comme pour la forme latente, la boucle réactive n'est pas accessible dans cette conformation. Il ne peut donc pas y avoir de formation de complexe stable avec le tPA ou l'uPA³⁷¹. La stabilisation de ces formes de transition par la liaison avec les ligands module le comportement du PAI-1³⁷².

La concentration plasmatique du PAI-1 est faible, de l'ordre 0.4 nM mais augmente dans de nombreuses conditions pathologiques³⁷³ et dans le thrombus plaquettaire en raison de sa sécrétion et d'une synthèse *de novo* par les plaquettes³⁷⁴. Le PAI-1 peut également s'accumuler au site du thrombus par son interaction étroite avec la vitronectine³⁷⁵. L'accumulation de PAI-1 dans le thrombus prévient la lyse prématurée du thrombus en cours de formation. Cependant, une fois que le thrombus s'est formé et que la fibrinolyse s'amorce, le tPA et le plasminogène se lient à la fibrine et échappent au contrôle du PAI-1. Il s'en suit une importante génération de plasmine et la dissolution de la fibrine.

Au niveau cellulaire, les complexes formés entre uPAR, uPA et PAI-1 sont rapidement internalisés via le récepteur membranaire LRP (récepteur des LDL). Ce processus d'internalisation est important, car il permet la dégradation de l'uPA et du PAI-1 et le recyclage d'uPAR à la surface cellulaire, où il peut reprendre ses fonctions (Figure 18).

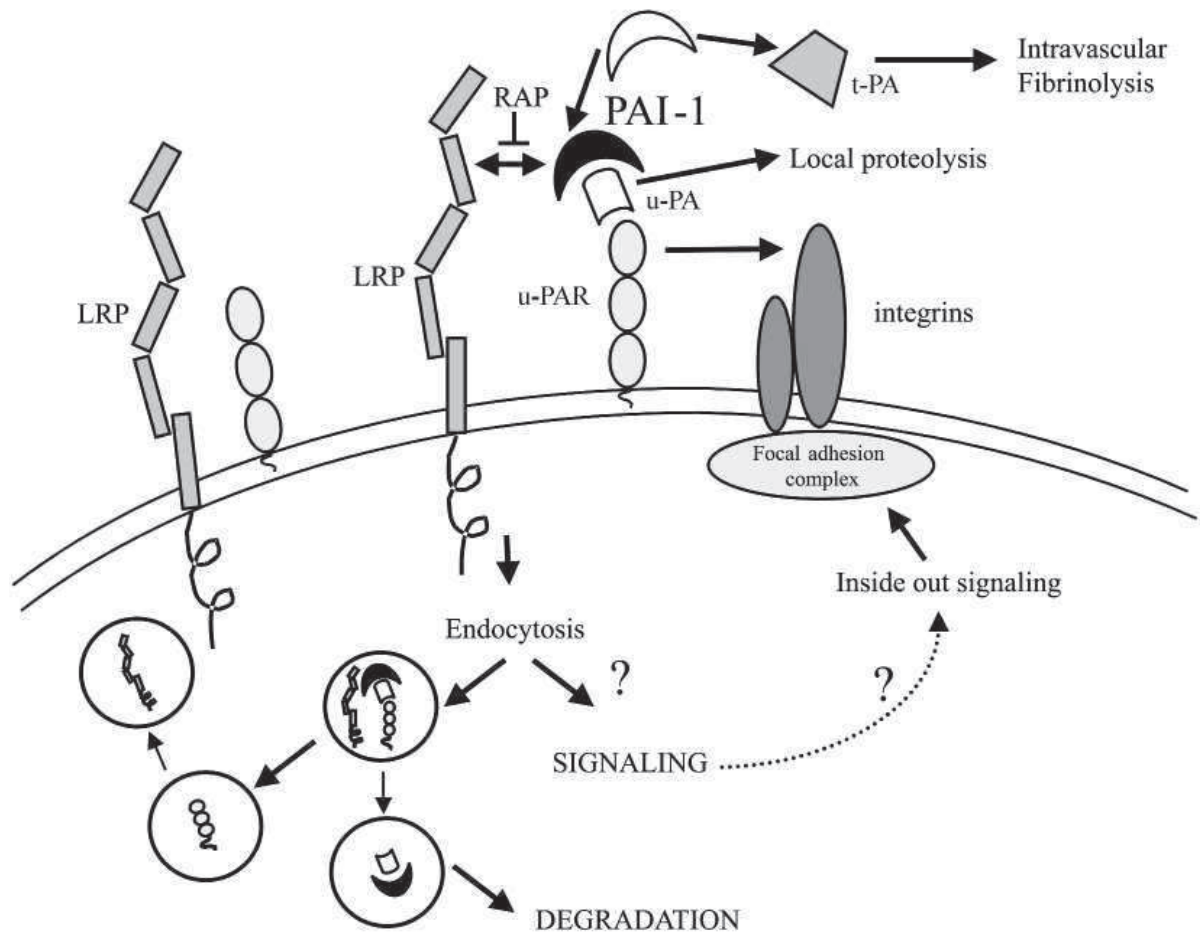


Figure 18 : Inhibition du complexe u-PA/u-PAR par le PAI-1. LRP : Récepteur des LDL, u-PA : urokinase, uPAR : Récepteur de l'urokinase, t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène, PAI-1 : Inhibiteur des activateurs du plasminogène (Binder et co. News Physiol Sci 2002)

b. Inhibiteur des activateurs de plasminogène de type 2 (PAI-2)

Le PAI-2 inhibe l'uPA et le tPA, mais avec une efficacité 10 à 50 fois moindre que le PAI-1³⁶⁴. Le PAI-2 est produit par les monocytes et les cellules trophoblastiques placentaires. Dans le plasma, sa concentration est très faible voire indétectable. La majorité du PAI-2 est stockée dans la cellule sous forme d'une protéine de 43 kDa non glycosylée et n'ayant pas de séquence signal à la membrane³⁷⁶. Néanmoins, le PAI-2 peut être sécrété après stimulation par la thrombine. Il contient une séquence unique riche en glutamine faisant de lui un substrat des transglutaminases dont le facteur XIIIa. Le facteur XIIIa permet donc la liaison du PAI-2 aux résidus lysines de la fibrine et du fibrinogène. Des effets du PAI-2 en dehors de la fibrinolyse ont été rapportés dont notamment une activité protéolytique intracellulaire³⁷⁷.

c. L' α 2-antiplasmine

L' α 2-AP est aussi un membre de la superfamille des serpinines. Il est le principal inhibiteur de la plasmine. Il est synthétisé par le foie et circule à une concentration de 70 μ g/ml (7 μ M) avec une demi-vie de 3 jours. Il est formé par une simple chaîne de 70 kDa avec 464 acides aminés dont 4 cystéines³⁷⁸. Seulement deux d'entre elles forment un pont disulfure³⁷⁹.

L' α 2-AP est synthétisée sous une forme active qui est partiellement convertie dans la circulation en une forme moins active par perte de sa partie C-terminale. De multiples résidus lysines dans cette partie de la molécule contribuent à sa liaison avec les kringles du plasmin(ogène)^{380,381}. La structure cristallographique de l' α 2-AP révèle que cette partie C-terminale est très proche de la boucle réactive et qu'elle doit accélérer l'interaction avec la plasmine³⁸². L' α 2-AP exerce son activité anti-fibrinolytique selon 2 mécanismes : elle inhibe de façon stable la plasmine en formant un complexe α 2-AP-plasmine avec une constante d'association de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et elle se lie à la fibrine de façon covalente rendant ainsi la fibrinolyse par la plasmine plus difficile³⁸³. Cette dernière réaction a lieu en présence de calcium et de facteur XIIIa. Dans la circulation, l' α 2-AP subit un clivage protéolytique au niveau de la liaison peptidique Pro12–Asn13 par un enzyme découverte récemment appelée

enzyme de clivage de l'antiplasmine (APCE) qui est une forme soluble d'une sérine protéase agissant au niveau des prolines, la protéine d'activation des fibroblastes³⁸⁴. Cette forme clivée se lie 13 fois plus rapidement à la fibrine pendant la formation du thrombus que la forme native et protège le caillot contre la fibrinolyse plus efficacement. Toujours en rapport avec cette forme clivée, il existe un polymorphisme au niveau du 6^{ième} acide aminé qui est soit Arg soit Trp. La forme Arg6 est clivée 8 fois plus vite par l'APCE que la forme Trp6 et donc mieux incorporée à la fibrine³⁸⁵.

L'inhibition de la plasmine par l' α 2-AP se fait par 2 réactions successives : une réaction rapide aboutissant à un complexe inactif réversible suivie par une réaction plus lente qui aboutit à un complexe inactif de façon irréversible. La vitesse d'inhibition dépend de disponibilité des LBS et du site actif sur la molécule de plasmine. Ainsi la demi-vie des molécules de plasmine générée à la surface de fibrine ou de cellules et qui ont donc leur LBS et site actif occupés est d'un ordre de grandeur 2 à 3 fois plus long que la plasmine libre³⁸⁶. De même, l'inhibition de la miniplasmine et de la microplasmine par l' α 2-AP est plus lente de la plasmine intacte.

d. Autres serpinés

D'autres serpinés sont impliqués dans l'inhibition des activateurs du plasminogène à un degré moindre ou moins bien connu. Une neuro-serpine régule l'activité du t-PA dans le système nerveux central³⁸⁷. Dans le plasma, le t-PA et la t-PA sont également lentement inhibés par l' α 2-antiplasmine, l' α 1-antitrypsine, le C1-inhibitor et le plasminogen activator inhibitor-3 (PAI-3).

La protéase nexine 1 pourrait aussi jouer un rôle dans certaines conditions. C'est une glycoprotéine de 43-50 kDa, présente en faible quantité dans le plasma qui inhibe de nombreuses protéases à sérine : trypsine, thrombine, uPA, plasmine, tPA, facteurs XIa et Xa et protéine C activée. Cette protéase est à peine détectable dans le plasma mais exprimée par les plaquettes. Une étude récente montre que la formation du thrombus est significativement augmentée chez la souris déficiente en PN-1 dans un modèle de blessure au chlorure de fer³⁸⁸. Ceci démontre que les propriétés anti-thrombotiques de cette molécule ont été sans doute sous-estimées jusque là.

2) Les inhibiteurs de liaison du plasminogène

a. L'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI)

Le TAFI appartient à la famille des carboxypeptidases plasmatiques. Il est synthétisé par le foie sous la forme d'un propeptide monocaténaire de 60 kDa comprenant 401 acides aminés³⁸⁹. Il contient 4 sites de N-glycosylation (Asn22, Asn51, Asn63 et Asn86) contre un seulement pour le domaine catalytique (Asn219)³⁹⁰. La structure cristallographique du TAFI est disponible depuis peu pour les formes humaine³⁹¹, bovine³⁹² et bovine activée³⁹³. Elles fournissent une base structurale de l'activité intrinsèque de la pro-enzyme³⁹² bien que son rôle anti-fibrinolytique soit mis en doute^{394,395}. Elles mettent également en évidence l'existence de 1 ou 2 sites de liaison à l'héparine sur le TAFI et le TAFIa^{392,393}. Son activité protéolytique est exercée par sa forme activée TAFIa³⁹⁶. Le zymogène est activé par clivage protéolytique en TAFIa dont l'activité enzymatique est très instable avec une demi-vie de l'ordre de la minute à 37°C. Après clivage, le peptide d'activation reste lié de façon non covalente au domaine catalytique au zinc³⁹⁷.

Il existe 2 variants naturels du TAFI (Thr325 et Ile325) dont l'activité diffère sensiblement après activation de la forme principale en termes de stabilité thermique et d'activité antifibrinolytique³⁹⁸.

Le TAFI est l'inhibiteur de la fibrinolyse découvert le plus récemment montrant un lien entre la coagulation et la fibrinolyse³⁹⁹. En effet son activation en TAFIa se fait par la thrombine ou la plasmine par clivage au niveau de l'Arg92⁴⁰⁰. La thrombine est un activateur faible du TAFI mais en présence de la thrombomoduline, l'activation du TAFI augmente plus de mille fois^{401,402}. Ce mécanisme d'activation du TAFI est un phénomène calcium-dépendant⁴⁰³ au contraire de celui par la plasmine⁴⁰⁴.

L'activité antifibrinolytique du TAFIa passe par plusieurs mécanismes. Le TAFIa élimine les résidus lysines C-terminaux à la surface de la fibrine et à la surface des cellules empêchant ainsi le plasminogène de s'y lier⁴⁰⁵. Il participe à la clairance de la plasmine en éliminant les résidus lysines et complète ainsi l'action de l' α 2-AP. Il freine la conversion du Glu-plasminogène en Lys-plasminogène qui est un meilleur substrat pour ses activateurs. Et

enfin, de forte concentration de TAFIa inhibent directement la plasmine. Secondairement le TAFIa inhibe les processus cellulaires de migration *in vivo*⁴⁰⁶ et d'angiogenèse *in vitro*⁴⁰⁷.

b. La lipoprotéine (a)

L'apolipoprotéine (a) est la glycoprotéine spécifique de la lipoprotéine(a) (Lp(a)), un facteur majeur de risque d'athéro-thrombose. La Lp(a) est constituée par l'association, via un pont disulfure, d'une lipoprotéine de faible densité (LDL) donc un cœur lipidique et une molécule d'apolipoprotéine B-100 avec une molécule d'apo(a). La Lp(a) présente une forte homologie structurale avec le plasminogène avec un enchaînement de nombreux motifs kringle. Par conséquent, la Lp(a) rentre en compétition avec le plasminogène pour la liaison aux résidus lysine de la fibrine. Elle est par ailleurs incapable d'exercer une activité protéolytique. Elle présente donc un effet anti-fibrinolytique expliquant en partie son effet athérogène. Cet effet se manifeste également à la surface des cellules endothéliales⁴⁰⁸ et des monocytes/macrophages⁴⁰⁹.

E. CONSEQUENCES DE L'ACTIVATION DU PLASMINOGENE

1) La fibrinolyse

La fibrine est un polymère insoluble issu de la conversion du fibrinogène sous l'action de la thrombine et stabilisé par le facteur XIIIa. Elle constitue le support physique du caillot sanguin. La fibrine est également le déclencheur de la fibrinolyse. La plasmine se forme selon un processus très précisément contrôlé, sa génération devant rester strictement localisée au niveau du thrombus. Comme nous l'avons vu, un certain nombre d'interactions moléculaires complexes sont responsables cette régulation. L'activation du plasminogène incorporé au thrombus est facilitée par la liaison du tPA à la fibrine. Les traces de plasmine formée vont amplifier l'activité fibrinolytique locale ; la fibrine partiellement digérée libère des sites lysine qui vont permettre de fixer un nombre plus important de molécules de

plasminogène. La pro-urokinase va être localement transformée en urokinase. Une lyse prématurée du caillot est prévenue par l'incorporation dans le caillot d'une certaine quantité d'inhibiteur. Les inhibiteurs de la phase soluble (α 2-AP et PAI) vont éviter la dissémination systémique du processus en inhibant rapidement la plasmine ou les activateurs du plasminogène libérés du thrombus³⁶¹.

2) Le remodelage matriciel

L'activation du plasminogène est conditionnée par une interaction entre ses sites de liaison et les résidus lysine en position carboxy-terminale présents sur les glycoprotéines de la membrane cellulaire, mais aussi de la matrice extracellulaire⁴¹⁰. La plasmine générée *in situ* est capable de cliver des glycoprotéines membranaires, de dégrader directement certaines protéines de la matrice extracellulaire et la fibrine, mais aussi d'activer des précurseurs inactifs dont la pro-urokinase, des facteurs de croissance, ainsi que des MMP. Le système d'activation du plasminogène, en étroite interaction avec le système des MMP, constitue ainsi la plus importante source d'activité protéolytique péricellulaire (dégradation de protéines matricielles, libération de facteurs de croissance de la cellule ou de la matrice extracellulaire, génération de molécules bioactives) au cours de l'inflammation, de l'angiogenèse⁴¹¹ et de processus pathologiques comme le cancer^{412,413} et l'athérosclérose⁴¹⁴. Une défaillance de ce système peut conduire à des accidents ischémiques vasculaires.

Le système d'activation du plasminogène exerce la plupart de ces effets matriciels par l'activation des MMPs⁴¹⁵ (figure 19). Ce sont des endopeptidases sécrétées sous la forme de pro-enzymes (pro-MMP), dont l'activité dépend de leur activation et de l'incorporation du zinc dans le site catalytique⁴¹⁶. Les pro-MMPs peuvent être activées en MMPs par la plasmine, la thrombine⁴¹⁷, d'autres MMPs comme les MT-MMPs (membrane-type MMPs) et par les espèces réactives à l'oxygène. Les 23 MMP actuellement décrites chez l'homme ont été initialement classifiées en fonction de leur spécificité pour un substrat (collagénase, gélatinase, stromelysine, matrilysine, métallo-élastase) et de leur localisation sur la membrane cellulaire (les MT-MMP)⁴¹⁸. Cependant, la multiplicité des substrats pour un même type de MMP a conduit à leur classification numérique (MMP-1, MMP-2 etc.). La fonction des MMP activées est régulée par 4 types d'inhibiteurs de type tissulaire (TIMP-1 à TIMP-4).

Bien que la protéolyse de la matrice extracellulaire apparaisse comme la fonction principale des MMPs, elles régulent également l'activité biologique d'autres substrats. A titre d'exemple, elles clivent l'uPA dont elles abolissent l'interaction avec l'uPAR⁴¹⁹, le plasminogène en générant ainsi de l'angiostatine⁴²⁰, le tumor growth factor β (TGF β) qu'elles activent⁴²¹. A travers toutes ces actions et en association avec d'autres protéases dont celles impliquées dans le système d'activation du plasminogène, les MMPs participent à de nombreux phénomènes physiologiques tels que le remodelage tissulaire, l'inflammation, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaires⁴²², la plasticité neuronale, l'angiogenèse⁴²³, la croissance et la dissémination tumorale⁴²⁴ et la mort cellulaire⁴²⁵.

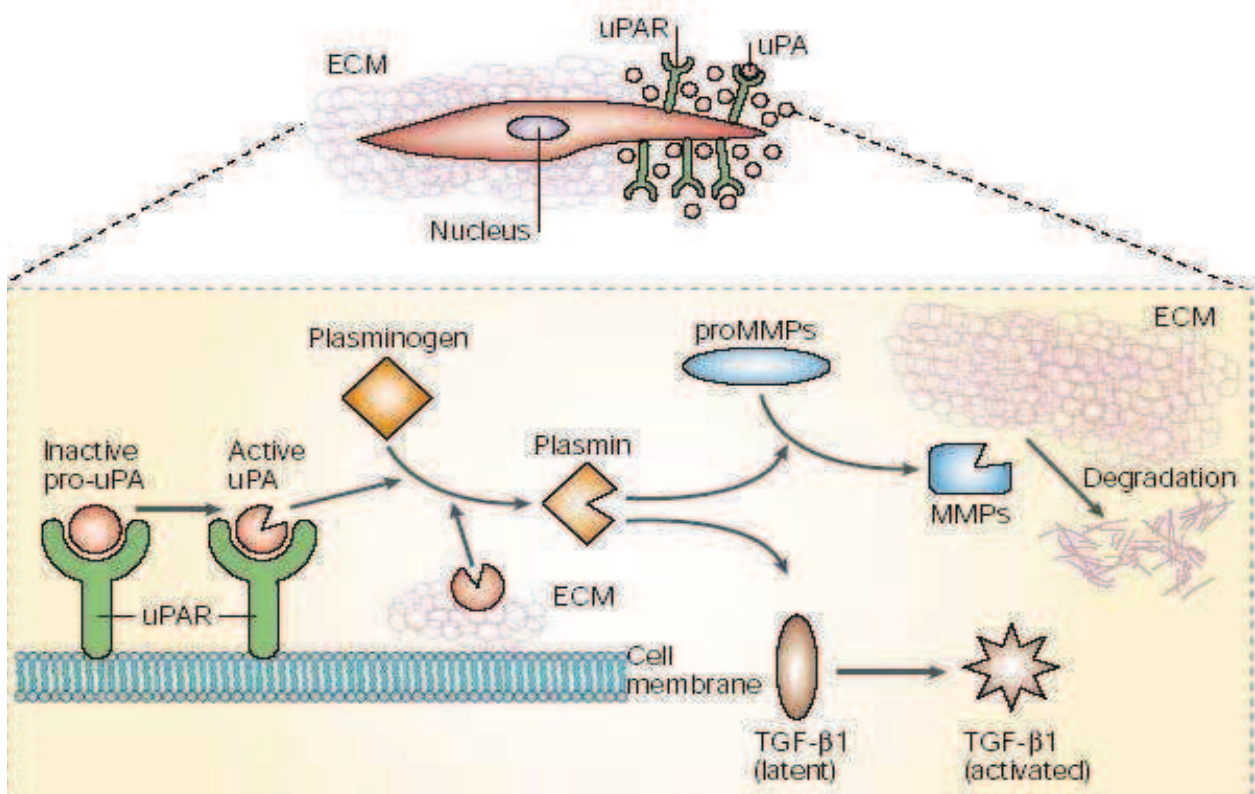


Figure 19 : Conséquences de la génération de plasmine par le système uPA/uPAR. ECM : Matrice extracellulaire, MMPs : Métalloprotéases, TGF- β 1 : Tumor growth factor β 1, uPA : urokinase, uPAR : Récepteur de l'urokinase. (Blasi et co. Nature review 2002)

3) Autres conséquences de l'activation du plasminogène

La plasmine participe directement à l'activation de facteurs de croissance comme l'HGF⁴²⁶ ou le TGFβ⁴²⁷. L'activation du TGFβ tissulaire par protéolyse de son domaine protéique latent associé (LAP) ou de sa protéine de liaison, la LTBP, a particulièrement été étudiée^{428,429}. Cette activation peut se faire par l'intermédiaire de la thrombospondine 1 qui est connu pour lier le fibrinogène et faciliter sa conversion en plasmine par le t-PA sur les macrophages⁴³⁰. L'affinité particulière de la LTBP pour des molécules matricielles comme la fibrilline 1, adresse rapidement le TGFβ libéré par les cellules sur la matrice⁴³¹. L'action protéolytique de la plasmine permet de séparer le TGFβ de son complexe protéique et de le libérer de la matrice extracellulaire. La mise à disposition de TGFβ actif est essentielle dans la mise en route des phénomènes de cicatrisation physiologique, voir de fibrose pathologique. Dans un modèle animal de fibrose rénale chez la souris KO pour le PAI-1, des niveaux élevés de TGFβ ont été détectés suggérant une implication de cette voie d'activation *in vivo*⁴³².

La plasmine joue également un rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire. Différentes études montrent les conséquences dramatiques d'une protéolyse péricellulaire exacerbée sur l'adhérence, l'organisation et la survie cellulaires, pouvant aboutir au détachement de cellules de la matrice extracellulaire et à la mort cellulaire par apoptose⁴³³. En effet, en dégradant les protéines d'adhésion extracellulaire, la plasmine induit une perte des interactions cellule/matrice extracellulaire avec pour conséquence une rétraction cellulaire et un détachement conduisant à l'apoptose des cellules mésenchymateuses adhérentes dans un processus appelé anoïkis⁴³⁴⁻⁴³⁶. L'apoptose des cellules mésenchymateuses est un processus qui peut être impliqué dans l'initiation des phénomènes de calcification⁴³⁷. Récemment, il a été montré que la plasmine pouvait induire l'apoptose des myofibroblastes de valves aortiques⁴³⁸.

CHAPITRE 4 : MICROPARTICULES : BIOMARQUEUR EN PATHOLOGIE HUMAINE

Selon le NIH Biomarkers Definitions Working Group, un biomarqueur se définit comme une caractéristique biologique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux, pathogènes, ou pharmacologiques en réponse à une intervention thérapeutique. Le biomarqueur doit subir un processus de développement précis permettant de valider sa capacité d'indicateur de facteur pronostique. Si une telle démarche est largement engagée pour les MP par une accumulation d'argument en faveur de l'intérêt de leur dosage en pathologie humaine, elle reste pénalisée par un manque de standardisation méthodologique. Ce manque de standardisation représente à ce jour une limite importante affectant le critère d'objectivité de la mesure définissant un biomarqueur.

A. INTERET DU DOSAGE DE MICROPARTICULES CIRCULANTES EN PATHOLOGIE HUMAINE

L'objectif de ce premier sous-chapitre est de montrer l'avancement des données dans le processus de développement du dosage des MP comme biomarqueur en pathologie humaine. Les études citées le sont donc à titre d'exemples sans l'objectif d'être exhaustif ni de développer l'intérêt des MP dans une pathologie particulière.

1) Signification biologique des microparticules en pathologie.

a. Elévation des microparticules en situations pathologiques

Les MP sont présentes dans le plasma de sujets sains et sont élevées dans de nombreuses circonstances pathologiques : maladies cardiovasculaires, thrombotiques, auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses^{220,439}. A titre d'exemples, la vésiculation des érythrocytes est importante dans les désordres hémolytiques. Des augmentations de MPE

sont rapportées dans les syndromes coronariens aigus^{214,440,441}, les accidents vasculaires cérébraux^{2,442}, le syndrome métabolique⁴⁴³, le purpura thrombotique thrombocytopenique³, le syndrome des anti-phospholipides^{5,39,444}, les vascularites⁴⁴⁵, l'insuffisance veineuse chronique⁴⁴⁶, les phlébites⁴⁴⁷, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne⁴⁴⁸. Toutes ces circonstances ont comme point commun une dérégulation des réponses inflammatoires et hémostatiques⁴⁴⁹. De plus, les facteurs de risque associées aux maladies cardiovasculaires tels que le diabète^{12,450,451}, l'obésité, l'hypertension artérielle (HTA)^{13,452,453}, les dyslipidémies ou l'insuffisance rénale s'accompagnent d'une élévation des taux plasmatiques de MP et plus spécifiquement de leur contingent endothélial.

Ces observations ont conduit à rechercher un lien entre l'élévation de ce paramètre avec l'activation cellulaire et l'activité de la maladie.

b. Microparticules : Marqueur d'activation cellulaire et de dysfonction endothéliale

Une élévation d'un sous-type de MP dans la circulation sanguine reflète une activation de la population cellulaire d'origine. Ainsi l'élévation des MPP est corrélée au facteur 4 plaquettaire et à la P-sélectine. De nombreuses études se sont concentrées sur les MPE comme biomarqueur de l'activation endothéliale et secondairement de la dysfonction endothéliale dans les pathologies cardiovasculaires. Par exemple, chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale, les niveaux circulants de MPE corrélaient avec la rigidité artérielle et la détérioration de la dilatation vasculaire induite par le flux. Une telle relation n'est pas observée avec les MPP ou les MP annexine V⁹. Des résultats similaires ont été retrouvés dans les syndromes coronariens aigus^{214,454}, chez des patients diabétiques⁴⁵⁵, chez des femmes obèses¹⁵, dans la prééclampsie⁴⁵⁶ et dans la sclérose en plaques⁴⁵⁷ où il existe une corrélation entre les MPE et la dysfonction endothéliale mesurée par l'angiographie ou la vasodilatation induite par le flux. Les MPE augmentent de manière concomitante avec la dysfonction endothéliale chez les patients exposés au tabac. Ceci indique que la vésiculation endothéliale est un phénomène rapide *in vivo*, dynamique et réversible qui est indicateur d'une lésion endothéliale au moment du prélèvement⁴⁵⁸.

c. Microparticules : Marqueur d'activité d'un état pathologique

Le tableau 2 résume les données de la littérature montrant une relation entre l'élévation des MPE et l'activité d'un état pathologique. Dans les syndromes coronariens, les MPE corrélerent avec l'étendue et la sévérité de la sténose après angiographie¹. Dans l'hypertension pulmonaire, les niveaux de MPE sont positivement corrélés aux pressions pulmonaires et donc à la sévérité de la maladie et inversement corrélés à l'index cardiaque⁸.

D'autres sous types de MP ont été reliés à la sévérité de la maladie. Par exemple, chez les patients avec une hypertension sévère non traitée, les MPE et les MPP corrélerent avec les pressions systoliques et diastoliques¹³. Les niveaux plasmatiques de MPL sont reliés à la sévérité de l'athérosclérose chez les sujets asymptomatiques⁴⁵⁹. Plusieurs études ont démontré également que le nombre et l'activité pro-coagulante dépendante du FT des MP sont augmentés dans différents types de cancer où ils sont corrélés à la survenue de thromboses^{222,460-462}.

Bien qu'une association entre MP et l'activité de la maladie ou la survenue d'un évènement collatéral comme la thrombose soit établi, le lien de causalité ou la signification pronostique de ce paramètre reste souvent à démontrer.

Pathologie/Circonstance	Variations	Signification clinique
<i>Pathologies cardiovasculaires</i>		
Syndromes coronariens aigus	↑	Corrélation avec les lésions à haut-risque 1
Accident vasculaire cérébral	↑	Relation avec la sévérité des lésions et le pronostic 2
Hypertension	↑	Corrélation avec les pressions sanguines diastoliques et systoliques 13
Hypertension pulmonaire	↑	Prédiction de la sévérité de l'hypertension pulmonaire 8
<i>Facteurs de risques cardiovasculaires</i>		
Diabète de type 2	↑	Corrélation à l'atteinte des artères coronaires 11
Diabète de type 1	↑	Corrélation à l'HbA1c 12
Insuffisance rénale terminale	↑	Corrélation à la dysfonction vasculaire 9
Hyper-triglycéridémie post-prandiale	↑	Corrélation à la teneur lipidique postprandiale 10
Obésité	↑	Corrélation avec la dilatation induite par le flux 15
<i>Pathologies hématologiques</i>		
Purpura thrombotique thrombocytopénique	↑	Corrélation à l'activation endothéliale 3
Hémoglobinurie paroxystique nocturne	↑	Corrélation avec le statut inflammatoire des cellules endothéliales 14
Drépanocytose	↑	Relation avec les crises drépanocytaires 4
<i>Pathologies auto-immunes</i>		
Syndrome des anti-phospholipides	↑	Corrélation avec la présence d'un anticoagulant de type lupique 5
Vasculaites	↑	Corrélation à l'activité de la maladie 6
<i>Transplantation</i>		
Rein	↑	Corrélation avec l'histoire cardiovasculaire des patients et diminution un an après la transplantation 7

Tableau 2 : Signification clinique de l'élévation des MPE en pathologie (Sabatier et co, Rev Med Int 2010)

d. Microparticules : Marqueur pronostique et indicateur du risque vasculaire.

i. Utilisation des MP comme marqueur isolé

Elément clé pour l'intérêt clinique d'un biomarqueur, le rôle pronostique des taux initiaux de MP a été montré dans plusieurs études cliniques. En effet, les niveaux élevés de MPE sont associés à un pronostic défavorable chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire⁴⁵². La mesure des MPE prédit également la survenue d'évènements cardiovasculaires chez les patients avec une pathologie cardiaque chronique sévère⁴⁴¹. Les MPE sont aussi pronostiques d'une récurrence d'accidents vasculaires cérébraux, d'évènements cardiaques aigus et de la survenue de complications vasculaires chez les patients diabétiques^{2,11}. Des données très récentes montrent que chez les patients en insuffisance rénale terminale, des niveaux élevés de MPE sont un facteur prédictif robuste et indépendant de mortalité, plus puissant que les autres facteurs de risque classique comme le score de Framingham⁴⁶³. Un tel potentiel n'a pas été retrouvé pour les autres sous types de MP jusqu'à présent. De nombreuses études prospectives sont en cours pour essayer de démontrer que l'activité ou le nombre des MP procoagulantes est prédictif du risque thrombotique dans des cohortes de patients bien définies, en cancérologie principalement⁴⁶⁴.

ii. Utilisation des MP dans des approches combinées

Le dosage des MPE comme outil d'identification des patients à risques de complications vasculaires peut également s'envisager dans le cadre de stratégies combinées associant des marqueurs de lésions (MP et cellules endothéliales circulantes) et de régénération de l'endothélium (progéniteurs endothéliaux circulants) (Annexe 4). La balance entre ces marqueurs montre un profil de « vasculocompétence » du patient définit comme le résultat net de l'équilibre entre la lésion et la réparation de l'endothélium (figure 20). En faveur de cette hypothèse, une mobilisation des progéniteurs endothéliaux (PEC), au cours de l'ischémie myocardique ou cérébrale, a été associée à un pronostic fonctionnel favorable.

À l'inverse, une réponse régénérative insuffisante, associée ou non à une élévation persistante des marqueurs de lésions, suggère une réponse inadaptée de l'endothélium ou « vasculo-incompétence » conduisant à un état pathologique à risque vasculaire. Une étude, menée chez des patients subissant une angioplastie coronaire avec implantation de stent, a montré une élévation simultanée des cellules endothéliales circulantes (CEC) et des PEC au cours de la procédure⁴⁶⁵. L'amplitude de mobilisation était inversement corrélée à l'étendue de la lésion reflétée par les CEC. Cela suggère que des dommages endothéliaux importants associés à une réparation endothéliale insuffisante pourraient caractériser les patients à risque de complications post-procédure. À l'inverse des situations aiguës, les lésions endothéliales résultant de l'exposition chronique à des stimuli pathogènes sont associées à une réduction en précurseurs efficaces pour la réparation. Ce déséquilibre, objectivé par une augmentation des MPE et/ou CEC associée à une réduction du nombre et/ou de la fonctionnalité des PEC, met en évidence un déficit de réparation compensatoire qui contribue au développement et à la progression de l'athérosclérose. Par exemple, chez des patients présentant une insuffisance ventriculaire gauche post-ischémique⁴⁶⁶, ou chez des patients dyslipidémiques²⁶⁷, un index vasculaire combinant la mesure des PEC et des marqueurs de lésion tel que les MPE, offre une meilleure appréciation du risque vasculaire.

d. Microparticules : cible thérapeutique et indicateur de réponse pharmacologique.

La reconnaissance des MP comme un vecteur d'information pathogénique en fait une nouvelle cible pharmacologique et un indicateur de réponse thérapeutique. En effet, il a été montré que plusieurs médicaments bénéfiques dans les pathologies cardiovasculaires réduisent les niveaux circulants de MP. Par exemple, dans le diabète de type 2, le traitement par nifédipine (inhibiteur calcique) réduit les concentrations circulantes de MPP, MPE et MP monocytaires⁴⁶⁷. L'administration de benidipine, un autre inhibiteur des canaux calciques, diminue les concentrations de MPE chez les patients hypertendus avec diabète de type 2⁴⁶⁸. Dans la même population de patients, le traitement par l'acide eicosapentanoïque réduit également les concentrations de MPE⁴⁶⁹. Les MPE sont aussi diminuées par d'administration de pioglitazone dans le syndrome métabolique⁴⁷⁰. L'injection intravitréenne d'anti-VEGF dans la rétinopathie diabétique proliférative diminue les taux de MPE dans

l'humeur vitrée⁶⁵. De même, dans certaines pathologies inflammatoires (maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémorragique), l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TNF (influximab) s'accompagne d'une réduction marquée des taux de MP procoagulantes⁴⁷¹. De nombreux autres traitements sont accompagnés d'une réduction des taux circulants de MP : thienopyridine, abciximab, losartan, simvastatine, bézafibrate⁴⁷²⁻⁴⁷⁶. Il est tentant de supposer qu'une partie au moins de l'effet bénéfique de ces traitements puisse résulter d'une diminution du pouvoir pathogène des MP. L'intérêt de l'utilisation des MP dans le suivi thérapeutique est conditionné par la démonstration claire de son rôle pronostique dans une situation clinique et population précise.

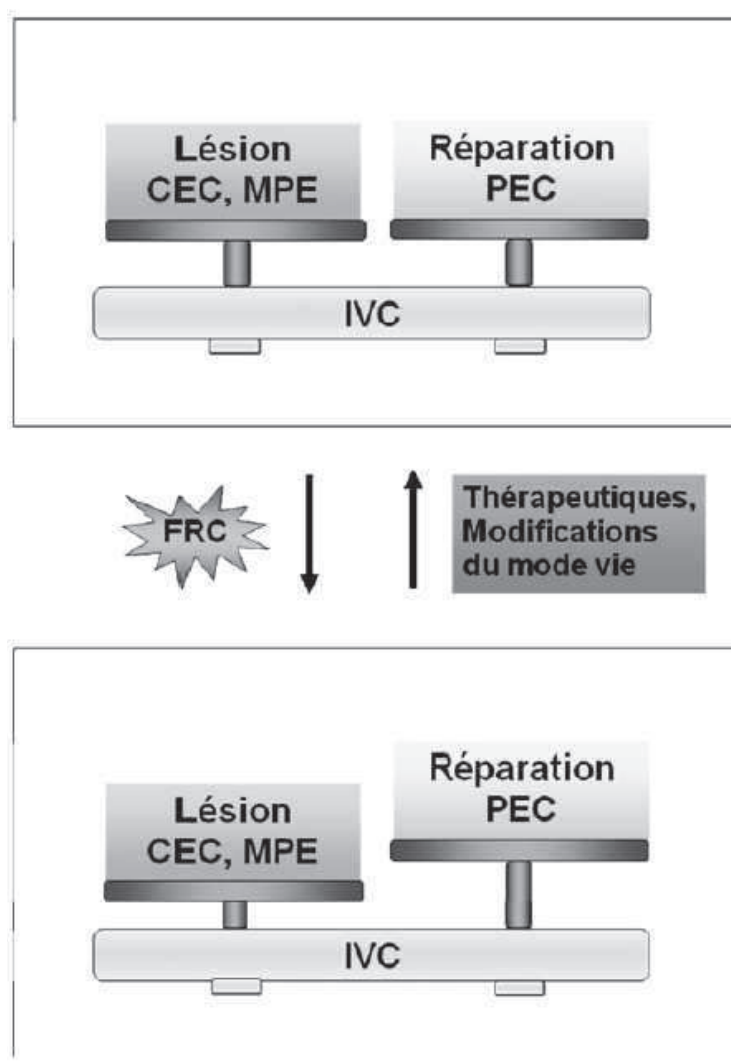


Figure 20 : Balance définissant la vasculocompétence. (Sabatier F, JCMM 2009)
 L'équilibre entre les lésions de l'endothélium, reflétées par les cellules endothéliales circulantes (CEC), les microparticules endothéliales (MPE) et la capacité de réparation endogène, attestée par les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), conditionne l'intégrité de l'endothélium. IVC : Index de vasculocompétence.

2) Limites actuelles de l'utilisation des microparticules comme biomarqueur en pathologie humaine.

A l'heure actuelle, l'interprétation et la comparaison des résultats des études cliniques menées sur les MP sont limitées par au moins deux points critiques qui conditionnent l'avenir de ce marqueur : 1/ un défaut de connaissance sur les mécanismes et les facteurs agissant sur la vésiculation cellulaire entraînant une méconnaissance des paramètres pré-analytiques influant sur la mesure des microparticules et la persistance de zones d'ombre pour l'interprétation des variations inter-individuelles, 2/ des limites techniques dues aux caractéristiques propres des microparticules comme leur petite taille qui constitue un challenge méthodologique encore non parfaitement résolu. En conséquence, les protocoles pré-analytiques et les méthodologies sont en constantes évolutions limitant fortement les démarches de standardisation pourtant indispensables à la réalisation d'études multicentriques. Ces limites rendent l'interprétation des résultats des études cliniques sur les MP difficiles. Elle doit être effectuée à la lumière d'une expertise technique importante. La réalisation d'études cliniques de qualité permettant de convaincre de l'intérêt des MP en pathologie humaine passe donc par une meilleure connaissance du phénomène de vésiculation *in vivo* et *in vitro* et des progrès technologiques permettant de mettre en place d'une démarche de standardisation. C'est une des missions que s'est fixé le sous-comité de standardisation pour la biologie vasculaire de l'ISTH.

B. VARIABLES PRE-ANALYTIQUES POUVANT INFLUER SUR LES DOSAGES DE MICROPARTICULES

Les données de la littérature sur les variables pré-analytiques qui peuvent influencer sur les dosages de MP sont parcellaires et insuffisantes pour émettre des recommandations consensuelles. Elles proviennent généralement de revues qui effectuent une synthèse des protocoles appliqués dans les études, les données justifiant le choix d'un protocole restant généralement non publiées^{66,477-480}. Un forum paru en 2004 dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, présente la méthodologie employée par six laboratoires experts dans le

domaine⁴⁸¹. Quelques grands principes peuvent en être retirés. L'objectif principal des étapes pré-analytiques est d'éviter toute génération artéfactuelle de MP *in vitro* tout en préservant au maximum les MP d'intérêt. Les méthodes présentent donc comme point commun un prélèvement fait avec précautions et une étape de séparation du plasma contenant les MP, des cellules circulantes par centrifugation. Le sang total a été utilisé dans des méthodologies plus anciennes⁴⁸²⁻⁴⁸⁶. Les résultats ainsi obtenus ne sont pas comparables avec ceux obtenus sur plasma. Cette alternative ne devrait plus être retenue pour le dosage des MP circulantes.

Prenant en compte le schéma de traitement du prélèvement défini précédemment, de nombreux facteurs sont potentiellement sources de variabilité (figure 21): le choix de l'anticoagulant, la nature du tube de prélèvement, le mode de prélèvement, la taille de la seringue utilisée, le transport, le délai entre le prélèvement et la première centrifugation, le nombre, les vitesses et durées de centrifugation, la congélation avec sa température et sa durée et le mode de décongélation, etc.... L'importance relative de chacun de ces paramètres sur la mesure des MP est inconnue à l'heure actuelle et de ce fait aucune standardisation ne peut être proposée.

Des données permettent cependant d'avancer certaines règles générales. Le prélèvement doit être effectué avec une aiguille assez large de gauge 21 au minimum en rejetant les premiers millilitres. Les tubes en plastique semblent moins activer les plaquettes que les tubes en verre⁶⁶. Il y a consensus général sur le fait d'utiliser le citrate comme anticoagulant avec des arguments tirés de l'hémostase plasmatique et des études sur les plaquettes. Il chélate le calcium et prévient ainsi la dégranulation leucocytaire et plaquettaire et dans une certaine mesure la vésiculation⁴⁸⁷. Il faut noter que dans une étude sur la réactivité plaquettaire, des niveaux différents de marqueurs d'activation enzymatique, de β -thromboglobuline et de facteur 4 plaquettaire ont été notés en fonction de la nature du tube et du fournisseur⁴⁸⁸. L'utilisation des tubes CTAD (Citrate-Théophylline-Adénosine-Dipyridamole) contenant un antiagrégant plaquettaire est sujet à discussion, les résultats de la littérature étant contradictoires⁴⁸⁹. L'EDTA semble moins adapté à la mesure des MP. En effet il provoque une activation plaquettaire dépendante de la P-sélectine⁴⁷⁸ et induit une dissociation de certaines molécules dépendantes du calcium comme l'intégrine $\alpha 2\beta 3$, antigène potentiellement cible pour le dosage des MPP⁴⁹⁰.

Une étude sur l'impact de l'agitation sur des concentrés de globules rouges montre un fort retentissement sur la vésiculation¹⁸².

Les étapes de centrifugation ont pour objectif de séparer le plasma des cellules en éliminant toutes les plaquettes pour obtenir un « platelet free plasma » PFP. En effet les plaquettes résiduelles sont responsables d'une génération artéfactuelle de MP principalement après un cycle de congélation/décongélation. Pour éliminer les plaquettes une seule centrifugation est insuffisante. Un protocole d'une centrifugation de 1500g 15 min suivie par une deuxième centrifugation de 13000g 2 min, a été particulièrement recommandé^{491,492}. D'autres alternatives ont été présentées comme une double centrifugation de 1500g-2500g 15min⁴⁹³.

La réalisation d'études cliniques nécessite dans la plupart des cas une étape de congélation. Les expériences évaluant l'effet d'un cycle de congélation à -80°C ont abouti à des résultats variables. Dans les conditions où les plaquettes ont été adéquatement éliminées, l'effet semble cependant modéré. Toutefois les cycles répétés de congélation/décongélation sont à éviter. Une étude, réalisée sur des surnageants de concentrées de globules rouges, n'a pas montré de variation significative entre aliquotes frais et congelés¹⁸². Shet et al. ne trouvent pas de différence avant et après congélation pour des MPP plasmatiques⁴. Les données sur les MPE sont contradictoires. Simak et al. n'observent pas de variation des comptes de MPE après congélation¹⁴, alors que des fluctuations importantes sont observées par Van Ierssel et al.⁴⁹⁴. Pour limiter ces variations, certaines équipes pratiquent une congélation rapide dans l'azote liquide⁴⁹⁵. D'autres recommandent une décongélation lente des PFP dans la glace pour assurer une meilleure préservation de la structure et la fonction des MP²⁰². Ceci est en contradiction avec une étude récente montrant l'impact majeur d'une telle pratique comparée à une décongélation rapide à 37°C au bain marie⁴⁹⁶.

Après décongélation, les MP sont soit directement mesurées dans le plasma soit isolées et lavées par centrifugation rapide avant d'être reprises dans un tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)⁴⁹⁵. Cette deuxième méthode présente l'avantage de limiter l'interférence avec les protéines plasmatiques lors du dosage et de concentrer les MP permettant une identification plus aisée des sous-populations faiblement représentées. Cependant, la reproductibilité du rendement de cette étape de lavage n'a jamais été démontrée.

En conclusion, les données de la littérature sont insuffisantes pour établir des recommandations suffisamment complètes pour permettre d'initier une démarche de standardisation des étapes pré-analytiques du dosage des MP.

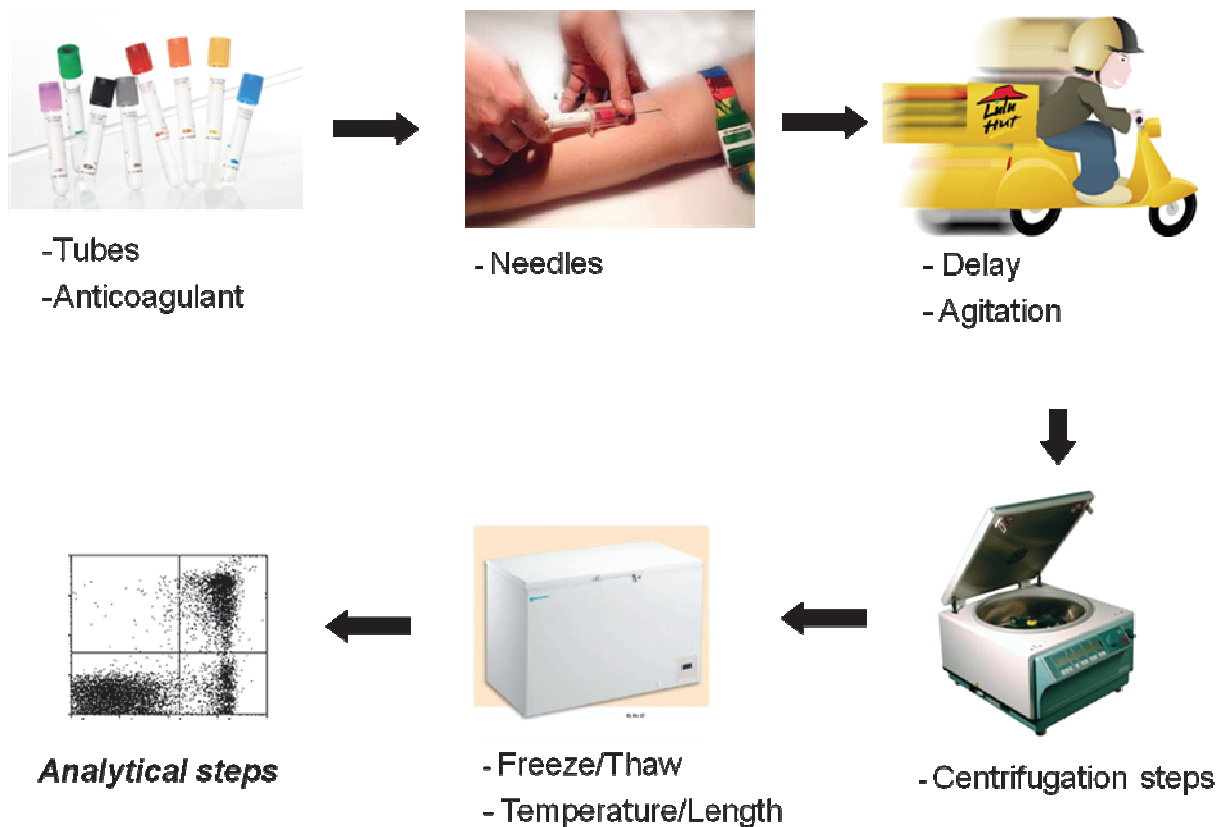


Figure 21 : Etapes du processus pré-analytiques pouvant influencer sur le dosage des MP.

C. METHODOLOGIES DISPONIBLES POUR L'ANALYSE DES MICROPARTICULES

1) Diversité des méthodologies disponibles pour l'analyse des microparticules

La cytométrie en flux (CMF) est la technique la plus largement utilisée pour la numération et la caractérisation des MP^{4,39,482,497-499}. Cette technique permet une analyse des cellules et des particules en suspension dans un flux de liquide les entraînant vers une cellule (flow cell) où elles interagissent une à une avec un faisceau laser. La détection de la dispersion de la lumière (scattering) et de la fluorescence émise permet une analyse multiparamétrique simultanée des caractéristiques physiques et de la composition antigénique de plus de 1000 événements par seconde (Figure 22).

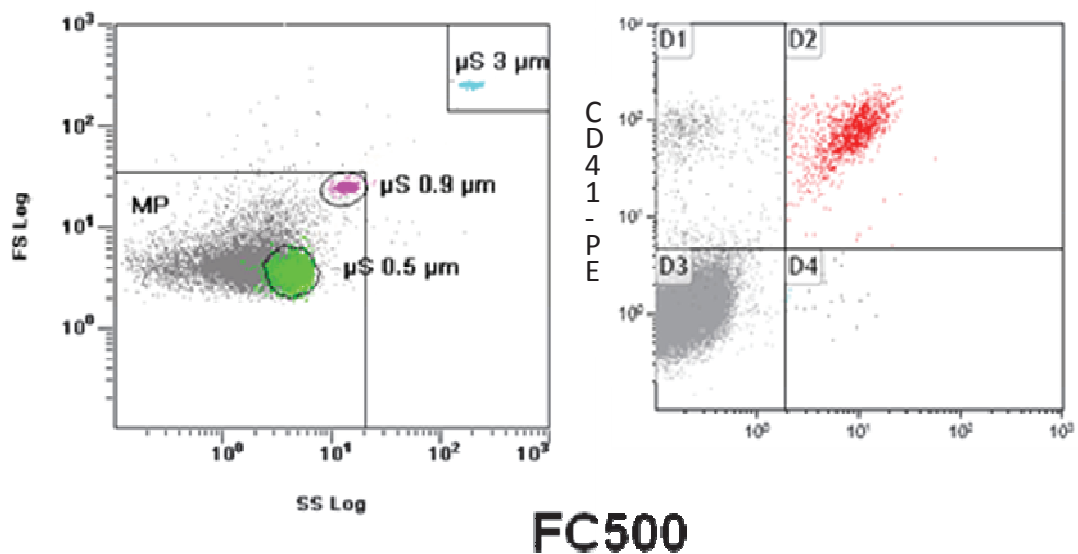


Figure 22 : Exemple de mesure des MPP par cytométrie de flux

Graphique de gauche : Scattergram FS/SS permettant de définir la fenêtre d'analyse des MP sur des paramètres dépendant de leur taille et de leur structure. Graphique de droite : Dot plot montrant une population de MPP doublement marquées AnnV-FITC/CD41-PE. Analyse réalisée sur Cytomics FC500 (Beckman Coulter)

A côté de la cytométrie de flux, plusieurs autres méthodologies ont été développées ou adaptées pour la mesure des MP. Elles peuvent être regroupées en deux catégories principales. Dans la première, comme pour la CMF, les techniques fournissent des informations sur les particules individuelles. Elles comprennent des techniques de microscopie à haute sensibilité⁵⁰⁰, comme la « confocal laser microscopy », la « Differential Interference Contrast (DIC) microscopy », la « Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) », et la microscopie électronique⁵⁰¹. Récemment, la microscopie à force atomique (AFM) a été proposée par Yuana et al. comme méthode permettant d'étudier la taille, les propriétés antigéniques et la numération de sous-types de MP⁵⁰². Dans cette technique, les MP sont capturées par des sondes immobilisées sur une surface parfaitement lisse de mica. Le déplacement d'une microsonde sur cette surface permet d'enregistrer un signal électrique proportionnel aux « accidents » de surface rencontrés (les MP).

L'autre catégorie est composée d'un ensemble de techniques fournissant une information globale sur l'échantillon. Il s'agit de tests immunologiques, fonctionnels ou hybrides qui associent une étape de capture immunologique et une révélation fonctionnelle.

Les premiers utilisent une capture des MP par anticorps ou par l'annexine V dirigée contre des antigènes spécifiques ou la PS respectivement. Les MP sont ainsi mesurées en fonction de leur origine cellulaire et/ou de leur contenu en PS⁵⁰³⁻⁵⁰⁷. A titre d'exemple, un kit ELISA pour MPP a été commercialisé par la société japonaise JIMRO Co. Ltd (Gunma, Japan). Michelsen et al. ont décrit une méthode qui quantifie les MPP ciblées par l'antigène GPIIb par time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA)⁵⁰⁸. La bonne sensibilité de cette méthode repose sur les propriétés du rapporteur fluorescent utilisé, un lanthanide (europium chelate).

Les tests fonctionnels sont exclusivement basés sur l'activité pro-coagulante des MP soit dépendante de la PS, soit du FT^{509,510}. La génération de thrombine par les MP peut être réalisée en microplaque avec un substrat fluorescent sur le Calibrated Automated Thrombogram® system (Thrombinoscope BV, Maastricht, NL and Diagnostica Stago, Asnieres, F)⁵¹¹. Très récemment, un nouveau test a été commercialisé par Diagnostica Stago, le STA®-procoag PPL®. Il mesure un temps de coagulation dépendant des phospholipides dans un PFP⁵¹².

Enfin, il existe des tests hybrides comme le test Zymuphen-MP®, commercialisé par la société Hyphen Biomed (Andresy, F). Il combine une capture en phase solide des MP par de l'annexine V ou un anticorps et mesure l'activité prothrombinasique des MP^{214,513}.

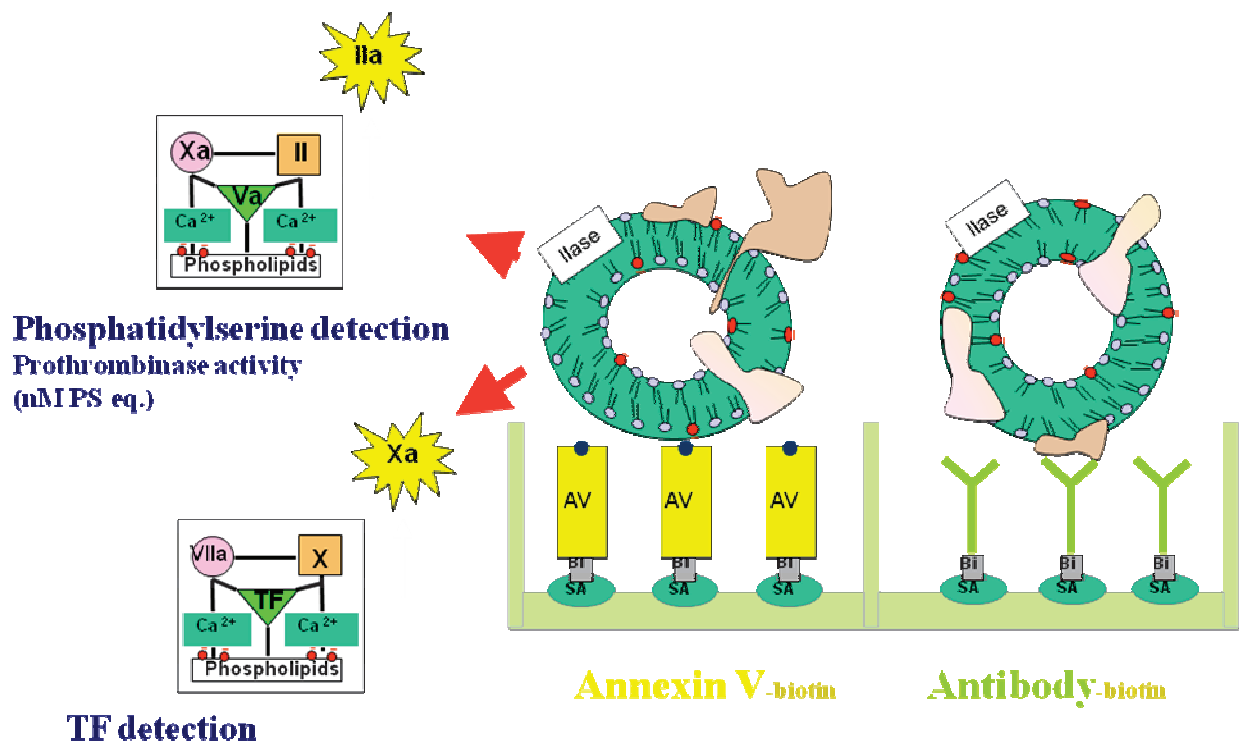


Figure 23 : Principe d'une méthode hybride combinant capture et test fonctionnel. TF : Facteur tissulaire, AV : Annexine V, BI : Biotine, SA : Streptavidine, PS : Phosphatidylsérine. (Zymuphen*, Hyphen Biomed). D'après J. M. freyssinet.

A la frontière entre ces deux grandes catégories, le Dynamic Light Scattering (DLS) permet de déterminer la taille et la concentration des MP par la mesure des fluctuations de la lumière dispersée produites par les mouvements browniens à différents angles⁵¹⁴. Récemment deux instruments, basés sur le principe du DLS, ont été commercialisés : le Zetasizer Nano S de Malvern Instruments Ltd., et le N5 submicron particle Size Analyser de Beckman Coulter. Cette technique a été adaptée au suivi des particules individuelles par Harrison et al. : le « single particle tracking » (SPT)⁵¹⁵ (Figure 24). L'origine cellulaire peut être déterminée par l'utilisation de sondes fluorescentes adaptées comme dans le « enhanced laser microscopy tracking » (ELMT)⁵¹⁶.

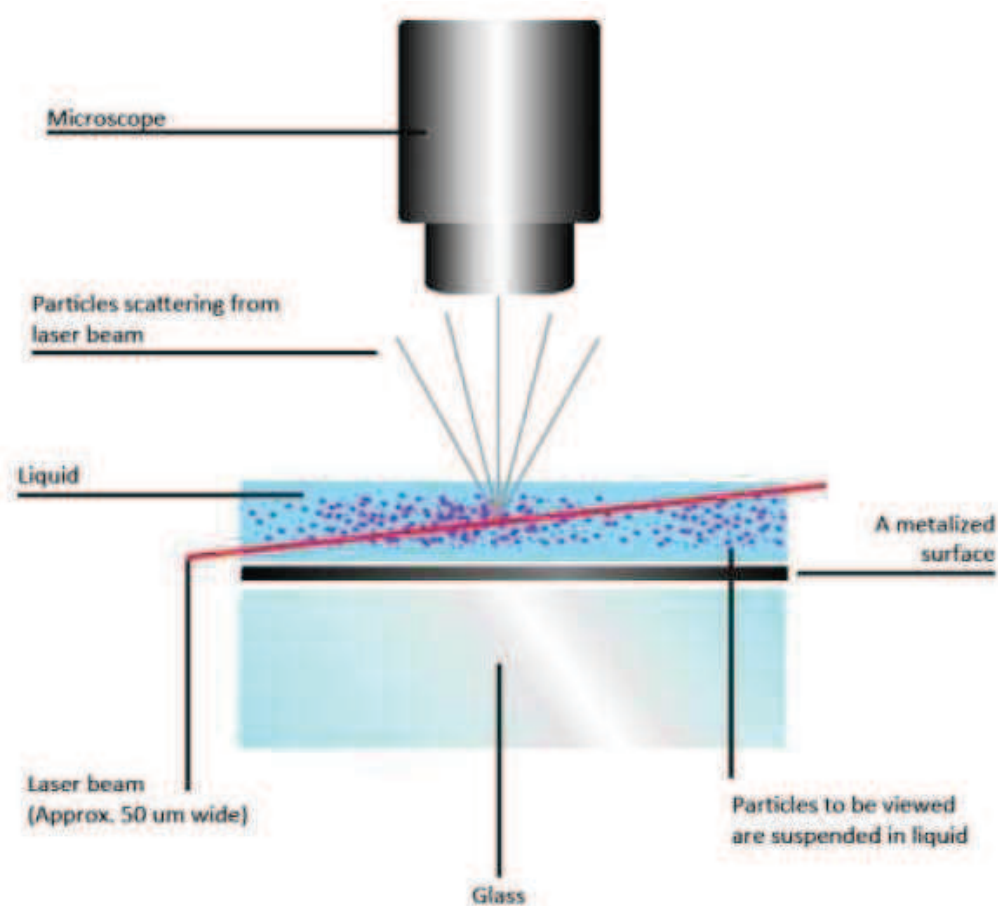


Figure 24 : Shéma du principe d'un appareil utilisant le single particle tracking (Nanosight* web site)

2) Avantages et limites des techniques de mesure des microparticules

Le tableau 3 résume les principaux avantages et limites des techniques de mesure des MP. Les techniques de microscopie à haute sensibilité apportent des informations précises sur les MP de petites tailles. Mais elles sont très lourdes à mettre en œuvre tant au niveau de l'instrumentation que de leur utilisation. Elles ne sont pas adaptées à une utilisation à grande échelle. Compte tenu de sa résolution de quelques nanomètres, l'AFM permet une détection et une numération précise des MP quelque soit leur taille. La taille des MP peut être automatiquement déterminée par l'interprétation de la hauteur mesurée par la sonde et le volume occupé sur la surface de mica. Mais là encore, cette technique ne peut être envisagée que comme référence à cause de sa lenteur d'exécution (quelques échantillons par jour) dans sa forme actuelle.

Les tests ELISA ou apparentés offrent au contraire une possibilité d'analyse à plus haut débit de nombreux échantillons. Ils sont assez sensibles pour détecter des antigènes faiblement présents et sont plus faciles d'utilisation que l'immunophénotypage par CMF. Cependant, ces tests ne fournissent aucune information sur la taille des MP mesurée ni aucun compte absolu de particules. Une quantification indirecte est cependant possible⁵⁰⁴. La quantification globale est dépendante d'un seul biomarqueur mesuré. Des interférences avec les antigènes solubles sont possibles et peuvent conduire à une surestimation des niveaux de MP⁴⁹¹. Les tests fonctionnels mesurent la contribution générale des MP à une activité spécifique, non nécessairement reliée à leur nombre. Ceci est particulièrement vrai quand ce sont les sous-populations minoritaires qui portent le plus d'activité.

La technique DLS est bien adaptée à la fourchette théorique de taille des MP. Cependant dans sa configuration standard, cette méthodologie paraît plus adaptée à la détermination de la taille de population homogène. La distribution hétérogène de la taille des MP plasmatiques entraîne souvent des résultats ininterprétables. Ainsi, les instruments commercialisés sur le principe du SPT, déterminent avec précision la taille de billes de calibration. Les résultats obtenus avec du plasma restent plus difficile à interpréter. De plus, cette technique mesure tous les types de particules dans la fenêtre de taille d'analyse comprenant par exemple les lipoprotéines et les débris. L'introduction de sondes fluorescentes dans les techniques dérivées de type SPT ou ELMT ont pour but de palier à cette limite.

Comparée à ces diverses techniques, la CMF présente l'avantage d'une analyse multiparamétrique de très haut débit de chaque MP individuelle. Cependant, les limites cette technique sont de plusieurs niveaux : une difficulté à détecter les événements à faible antigénicité, un comptage absolu des MP coûteux et délicat et une difficulté à détecter des événements de faible taille (inférieure à 0.5 μ m). Ainsi, les cytomètres utilisés jusqu'à présent ne mesurent qu'une partie des MP (celle de grosse taille). Cependant de récentes améliorations technologiques permettent de dépasser dans une certaine mesure ces limites et de maintenir la compétitivité de cette technique pour la numération des MP. La diversité des performances des cytomètres ainsi que la multiplicité des protocoles appliqués et des marqueurs choisis empêche une comparaison directe des résultats d'une équipe à l'autre.

Actuellement, aucune de ces techniques ne remplit tous les critères désirés pour la mesure des MP plasmatique. En absence de méthode idéale, cette diversité doit être comprise et utilisée dans un sens de complémentarité. Une comparaison directe entre ces techniques est nécessaire afin de déterminer objectivement la place relative de chacune d'elles.

La réalisation d'études cliniques multicentriques afin de confirmer l'intérêt de MP en pathologie humaine rend indispensable une démarche de standardisation de ces méthodologies.

Main features	Methods	Accuracy & sensitivity	Specificity (cellular origin and/or function(s))	Advantages	Drawbacks	Practicability & cost
Based on physical parameters, size*, electronic volume†, hydrodynamic radius‡, and immunological determinants. <i>Ab</i>	Flow cytometry*	(+)	++ <i>Ab</i>	Small sample volumes	Size limits Sensitivity to (lipid) aggregates Indirect functions (<i>Ab</i>)	+(+)
	Impedance-based flow cytometry†	++(+)	+(+) <i>Ab</i>	Small sample volumes Lower size limit	Indirect functions (<i>Ab</i>) Only prototype instruments	(+)
	Atomic force microscopy* (AFM)	+++	+(+) <i>Ab</i>	Objective measurements Size distribution	Indirect functional determinations (<i>Ab</i>)	- Highly specialized
	Dynamic light scattering† (DLS)	+++	0	Small sample volumes Objective measurements in solution. Size distribution	Indirect functions (<i>Ab</i>) Sensitivity to polydispersity	- Highly specialized
Purely biological/immunological. <i>Ab</i>	Capture + functional read out	++(+)	++(+) Procoagulant activity <i>A5</i> , <i>Ab</i>	Procoagulant function(s) Versatility (other functions)	Indirect quantification. Indirect functions other than procoagulant (<i>Ab</i>)	+++
	Elisa	+(+)	+(+)	Versatility	Indirect quantification Indirect functions (<i>Ab</i>)	+++
	Thrombin generation tests	(+)	++ Procoagulant activity	Global assay	Indirect quantification. No other function than procoagulant	+(+)
Biochemical and <i>in silico</i>	Proteomics & lipidomics	--	±	Shotgun method Qualitative variations	Sample size	- Highly specialized

Ab stands for antibody(ies) to particular immunological determinant(s), and *A5* for annexin *A5* (new nomenclature for annexin *V*). +, indicates a positive trend; -, a negative trend; parentheses indicate possible improvement. 0, means not applicable to this purpose.

Tableau 3 : Résumé des principales caractéristiques des techniques utilisées pour la mesure des MP (Freyyssinet et co. J Thromb Haemost 2010)

DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Les microparticules sont des vésicules qui résultent du bourgeonnement des membranes des cellules activées ou apoptotiques. Leur intérêt est double. Elles sont tout à la fois des vecteurs actifs d'effecteurs biologiques ayant de multiples conséquences sur l'homéostasie de différents systèmes et également des biomarqueurs dosables dans le sang périphérique d'un état cellulaire activé ou d'une lésion d'un tissu particulier.

Ce travail sur les microparticules comprend ces deux aspects. Les trois premiers articles constituent un ensemble plus fondamental qui met en évidence une activité de génération de plasmine à leur surface. Les deux articles suivants traitent un aspect plus appliqué sur les microparticules visant à franchir les limites méthodologiques pour une meilleure évaluation de ce biomarqueur émergeant en pratique clinique. Une stratégie de standardisation de leur mesure par cytométrie de flux est proposée. Cette association entre travail fondamental et appliqué se justifie par une mission mixte universitaire et hospitalière menée en parallèle pendant ces années de thèse.

Leur capacité à vectoriser des systèmes fonctionnels exprimés par leurs cellules d'origine nous a conduit à explorer, la génération de plasmine à leur surface. Dans un premier travail, nous montrons que les MP dérivées de cellules endothéliales (MPE) sont des surfaces catalytiques capables d'activer le plasminogène par le système de l'urokinase et de son récepteur (uPA/uPAR). Les MPE agissent comme des vecteurs de plasmine constituant une nouvelle voie dans la régulation des activités protéolytiques de l'endothélium (**Article 1**). Dans un second travail, nous avons montré que l'uPA portée par les cellules ou par les MPE est spécifiquement impliquée dans un mécanisme reconnaissance du plasminogène lié à une

autre surface biologique générant de la plasmine *in situ* avec une grande efficacité (**Article 2**).

Dans un troisième travail, nous montrons que cette activité fibrinolytique est détectable sur les MP extraites de la circulation sanguine, où elle est plus spécifiquement portée par les sous populations endothéliales et leucocytaires. Cette activité qui est dépendante de l'uPA mais aussi de l'activateur tissulaire du plasminogène, est modulée dans des pathologies cardiovasculaires et auto-immunes (**Article 3**). La détection de cette activité dans le sang périphérique de patient a conduit à un dépôt de brevet sur une méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon de fluide biologique et utilisation de dosage approprié (**Brevet 1**).

Dans une seconde partie, la pertinence de la mesure des MP comme biomarqueur en pratique clinique nous a amené à nous focaliser sur leurs méthodes d'analyse. En effet, à l'heure actuelle, l'évaluation du bénéfice apporté par les MP est limitée par un manque de standardisation des méthodologies. Dans ce travail, nous présentons une nouvelle stratégie de standardisation de la cytométrie en flux (CMF) (**Annexe 5**) et son évaluation dans le cadre d'une étude multicentrique utilisant des micro-billes fluorescentes calibrées en taille (**Article 4**). Enfin, nous discutons dans une revue les limites actuelles de la CMF et les stratégies ou améliorations technologiques permettant de les dépasser (**Article 5**).

Pendant cette période de travail de thèse, nous avons également apporté notre contribution à des travaux majeurs soit clinique (**Annexe 1**), soit fondamental (**Annexe 2**) sur l'implication des MP tumorales dans la thrombose.

Notre implication dans le domaine des MPE s'est également traduite par la co-rédaction d'articles de revue sur le sujet (**Annexes 3 et 4**).

ARTICLE 1

Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro.

Romarc Lacroix¹, Florence Sabatier¹, Agnès Mialhe¹, Agnès Basire¹, Ralph Pannell², Hélène Borghi³, Stéphane Robert¹, Edouard Lamy¹, Laurent Plawinski⁴, Laurence Camoin-Jau¹, Victor Gurewich², Eduardo Angles-Cano⁴, and Françoise Dignat-George¹.

¹Unité Mixte de Recherche S 608 (UMR-S 608), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de la Méditerranée, Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Pharmacie, Marseille, France; ²Vascular Research Laboratory, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA; ³Service de Microscopie Electronique, UFR de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France; ⁴INSERM, Cyceron, Université de Caen, Caen, France.

Blood. 2007;110:2432-2439

Les microparticules (MP) sont des vésicules qui résultent du bourgeonnement des membranes des cellules activées ou apoptotiques. Elles ont été décrites dans de nombreux modèles cellulaires et dans différentes conditions pathologiques où elles sont le signe d'une activation ou d'une apoptose cellulaire. Parce qu'elles vectorisent diverses molécules provenant de la cellule d'origine, les MP peuvent exercer un spectre d'activité biologique : elles propagent des réponses biologiques impliquées dans la balance hémostatique, participent aux réponses inflammatoires et à l'angiogenèse. La capacité de l'endothélium à libérer des MP après une stimulation inflammatoire a été démontrée. Des niveaux élevés de MPE ont été rapportés dans des conditions pathologiques variées comme les syndromes coronariens, l'insuffisance rénale, le diabète, le syndrome des antiphospholipides, le purpura thrombotique thrombocytopénique, et la drépanocytose, situations dans lesquelles ces valeurs élevées de MP reflètent la dysfonction endothéliale et sont associées à un mauvais pronostic.

Les MPE fournissent une surface phospholipidique procoagulante pour l'assemblage et l'activation des facteurs de la coagulation. Ceci est dû à l'expression de la phosphatidylsérine sur la couche externe de la membrane cellulaire. Leur implication dans la génération de thrombine résulte aussi de leur capacité à porter, délivrer ou induire une activité facteur tissulaire. Toutefois, une contribution plus complexe des MPE à la balance

hémostatique est suggérée par l'expression à leur surface de molécules anticoagulante comme la thrombomoduline, le TFPI et le récepteur endothélial à la protéine C.

Le système d'activation du plasminogène constitue un autre régulateur clé de l'homéostasie vasculaire. Il repose sur 2 sérines protéases ; le t-PA qui est principalement impliqué dans la fibrinolyse et l'uPA qui joue un rôle majeur dans la protéolyse péricellulaire du à son affinité élevée pour son récepteur cellulaire, uPAR. La génération de plasmine induite par l'uPA et l'activation secondaire de MMP favorise la migration cellulaire à travers la matrice interstitielle et participe à des processus tels que le remodelage tissulaire, l'invasion métastatique et l'angiogenèse. Il faut également noter qu'une activation incontrôlée du plasminogène peut avoir des conséquences délétères en induisant un détachement cellulaire et une apoptose. La régulation de la génération de plasmine à la surface endothéliale est donc d'une haute importance dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire.

La capacité des MP à vectoriser des protéines et systèmes fonctionnels exprimés par les cellules d'origine, nous a amené à poser l'hypothèse que les MPE pouvaient représenter des surfaces catalytiques susceptibles d'interagir avec le plasminogène et de former de la plasmine.

L'objectif de ce premier travail a donc été d'étudier la capacité des MPE à lier le plasminogène et de la convertir en plasmine active et de définir l'impact de cette génération de plasmine sur la capacité des MPE à réguler les réponses angiogéniques des PEC *in vitro*.

Ce travail a permis de montrer que des MPE dérivées d'HMEC stimulées au TNF- α représentent des surfaces catalytiques capables de générer de la de plasmine. Cette génération implique l'expression d'uPA et de son récepteur uPAR à la surface des MPE. Celle-ci est amplifiée par leur capacité à lier de l'uPA exogène sur des molécules d'uPAR restées libres. Le plasminogène est activé à la surface des MPE de manière dose dépendante, saturable et spécifique comme l'indique l'inhibition par l'acide ϵ -amino-caproïque et la carboxypeptidase B.

La génération de plasmine dépendante des MPE modifie la formation des tubes vasculaires par les PEC. Alors que les faibles concentrations de MPE augmentent la formation des tubes, les fortes concentrations la diminuent. Le blocage de ces effets par des

inhibiteurs d'uPA ou de plasmine souligne le rôle clé de la génération de plasmine induite par les MPE.

En conclusion, nous avons démontré que les MPE agissent comme des vecteurs supportant la génération de plasmine et sa dissémination. Ceci constitue une nouvelle voie dans la régulation des activités protéolytiques de l'endothélium avec des implications potentielles dans l'inflammation, l'angiogenèse et l'athérosclérose.

Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro

Romarc Lacroix,¹ Florence Sabatier,¹ Agnès Mialhe,¹ Agnès Basire,¹ Ralph Pannell,² Hélène Borghi,³ Stephane Robert,¹ Edouard Lamy,¹ Laurent Plawinski,⁴ Laurence Camoin-Jau,¹ Victor Gurewich,² Eduardo Angles-Cano,⁴ and Françoise Dignat-George¹

¹Unité Mixte de Recherche S 608 (UMR-S 608), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de la Méditerranée, Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Pharmacie, Marseille, France; ²Vascular Research Laboratory, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA; ³Service de Microscopie Electronique, UFR de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France; ⁴INSERM, Cyceron, Université de Caen, Caen, France

The regulation of plasmin generation on cell surfaces is of critical importance in the control of vascular homeostasis. Cell-derived microparticles participate in the dissemination of biological activities. However, their capacity to promote plasmin generation has not been documented. In this study, we show that endothelial microparticles (EMPs) from tumor necrosis factor α (TNF α)–stimulated endothelial cells served as a surface for the generation of plasmin. The generation of plasmin involved expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its

receptor (uPAR) at the surface of EMPs and was further increased by their ability to bind exogenous uPA on uPAR. Plasminogen was activated at the surface of EMPs in a dose-dependent, saturable, and specific manner as indicated by the inhibition of plasmin formation by ϵ -amino-caproic acid (ϵ -ACA) and carboxypeptidase B. EMP-induced plasmin generation affects tube formation mediated by endothelial progenitor cells. However, low amounts of EMPs increased tube formation, whereas higher concentrations inhibited it. Prevention of these effects by inhibi-

tors of either uPA or plasmin underscore the key role of EMP-induced plasmin generation. In conclusion, we demonstrated that EMPs act as vectors supporting efficient plasmin generation and dissemination, a new pathway in the regulation of endothelial proteolytic activities with potential involvement in inflammation, angiogenesis, and atherosclerosis. (Blood. 2007;110:2432-2439)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

Microparticles (MPs) are vesicles resulting from the blebbing of the cellular membrane of most activated or apoptotic cells.¹ These microvesicles have been described in various cellular models and in different pathological conditions as reliable hallmarks of cell damage.² Because they convey various bioactive effectors originating from the parent cells, MPs may exhibit a spectrum of biological activities: they regulate endothelial or blood cell functions, participate in inflammatory responses or angiogenesis, and propagate biological responses involved in hemostatic balance.³ We previously reported the capacity of endothelial cells to release microparticles after inflammatory stimulation and the presence of increased levels of circulating endothelial microparticles (EMPs) in patients with thrombotic disorders.⁴ Since this initial report, elevated levels of EMPs have been documented in various pathological conditions including coronary syndromes,⁵ renal failure,⁶ diabetes,⁷ antiphospholipid syndrome,⁸ thrombotic thrombocytopenic purpura,⁹ and sickle cell disease,¹⁰ in which they reflect endothelial dysfunction and are associated with a poor clinical outcome.

EMPs provide procoagulant phospholipid surfaces for the assembly and activation of coagulation factors, mainly through phosphatidylserine translocation to the exoplasmic leaflet as a result of membrane remodeling. Their involvement in thrombin

generation also results from their capacity to harbor, deliver, or induce tissue factor activity.¹¹⁻¹³ However, a more complex contribution to the hemostatic balance is suggested by their expression of thrombomodulin, tissue factor pathway inhibitor, and endothelial protein C receptor, thus providing a possible antithrombotic counterbalance.^{14,15}

Another key regulator of the vascular homeostasis is the plasminogen activation system. Plasminogen activation is mediated by 2 serine proteases: tissue-type plasminogen activator (tPA), which is mainly implicated in fibrinolysis, and urokinase-type plasminogen activator (uPA), which is critically involved in pericellular proteolysis due to its high affinity cell-surface receptor uPAR.¹⁶ Plasmin generation induced by uPA and subsequent activation of matrix metalloproteinases (MMPs) promote cell migration through interstitial matrix and participate in processes such as tissue remodeling, cancer invasion, and angiogenesis.¹⁷⁻¹⁹ Importantly, we have shown that uncontrolled plasminogen activation can have deleterious consequences by inducing cell detachment and apoptosis.^{20,21} The regulation of plasmin generation at the endothelial surface is therefore of critical importance in the control of vascular homeostasis.

Submitted February 1, 2007; accepted June 22, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 2, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-02-069997.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

Because MPs convey protein and functional systems expressed by the parent cell, we hypothesized that EMPs may serve as active surfaces for interaction with plasminogen and plasmin formation, a hitherto undescribed function. The objective of this study was therefore to analyze the capacity of EMPs to bind and convert plasminogen into active plasmin and to define the impact of plasmin generation on EMP capacity to regulate angiogenic responses mediated by endothelial progenitor cells (EPCs) *in vitro*.

Materials and methods

Preparation of plasminogen and plasminogen-free fetal calf serum

Plasminogen was purified by lysine-affinity chromatography and molecular sieving as reported previously.²² Plasminogen-free fetal calf serum (FCS) was obtained by 3 cycles of affinity adsorption on lysine-Sepharose (4 FCS vol/1 gel vol) and was subsequently checked and found to contain less than 0.1 nM plasmin(ogen) activity.

Cell culture

The human microvascular endothelial cell line (HMEC-1), obtained from Dr Ades²³ (Centers for Disease Control, Atlanta, GA), was cultured in MCDB 131 medium (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% MP-free FCS, 10 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY), and 1 μ g/mL hydrocortisone (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Human vein endothelial cells (HUVECs) were obtained by collagenase digestion as previously described,²⁴ cultured into 0.2% gelatin-coated flasks in EGM2 medium and used at passage 2. Human saphenous vein endothelial cells were purchased from Clonetics (Grand Island, NY) and cultured into 0.2% gelatin-coated flasks in EGM2-MV medium and used at passage 6.

Generation, harvesting, and flow cytometry enumeration of EMPs

For most experiments, EMPs were from HMEC-1 origin, as this cell line is well characterized and considered representative of the microcirculation, the core of the vascular tree.^{23,25} EMPs were purified from culture medium conditioned by subconfluent HMEC-1 stimulated for 48 hours with 100 ng/mL TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) as previously described, with minor modifications.⁴ Culture supernatants from flasks were collected and cleared from detached cells or large cell fragments by centrifugation at 4300g for 5 minutes. The supernatants were then centrifuged at 20 000g for 120 minutes at 4°C. Pelleted EMPs were washed 2 times and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The absence of residual TNF- α in this EMP sample was verified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay (R&D Systems, Minneapolis, MN). Aliquots of 10 μ L EMP suspension, 1/100 diluted, were labeled using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (Abcys, Paris, France), and EMPs were enumerated by flow cytometry as previously described.²⁶ The same protocol was used to obtain EMPs from quiescent HMEC-1, saphenous endothelial cells, and endothelial progenitor-derived cells (EPDCs).

Isolation and culture of endothelial progenitor cells from cord blood

Human umbilical cord blood samples (30-50 mL) were collected from donors, in compliance with French legislation, in a sterile tube containing heparin (200 UI/mL). Mononuclear cells (MNCs) were isolated by density gradient centrifugation. Briefly, blood was diluted 1:1 in PBS containing 2 mM ethylenediaminetetraacetic (PBS/EDTA) and layered over lymphocyte separation medium (Eurobio, Les Ulis, France). After a 30-minute centrifugation at 400g, MNCs were washed 3 times in PBS/EDTA. Cord blood MNCs were preplated in RPMI/10% FCS for 24 hours in plastic flasks. Nonadherent cells were plated onto 0.2% gelatin-coated 24-well

plates (5.10⁶ cells per well) and maintained in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM-2 SingleQuots (EGM-2 medium; Clonetics, Walkersville, MD). The medium was changed every 4 days. The appearance of well-circumscribed colonies with a cobblestone morphology was monitored daily. For expansion of EPDCs, colonies were trypsinized and cells were replated on a 6-well plate (passage 1). Subsequently, confluent cells were trypsinized and replated in T75 flasks for further passages. Cells were maintained under standard conditions (humidified atmosphere, 5% CO₂, 37°C).

Progenitor endothelial-cell tube formation in matrigel

Flat-bottom 96-well plates were precoated with 1:1 mixture of cold matrigel basement membrane (10 mg/mL, BD Biosciences, Bedford, MA) and RPMI-10% FCS medium. After 45 minutes of polymerization at 37°C, EPDCs were plated at 2.10⁵ cells/well in RPMI/10% FCS with increasing concentrations of EMP from TNF- α -stimulated HMEC-1 or an identical volume of the supernatant from the last EMP washing. To test the role of FCS plasminogen in this system, native FCS was replaced by plasminogen-free FCS supplemented or not with 1 μ M human plasminogen. For inhibition experiments, EMPs were pre-incubated with either an anti-uPA antibody (3940, American Diagnostica, Greenwich, CT, 25 μ g/mL) or an irrelevant control IgG1 (25 μ g/mL) or with serine-protease inhibitors (aprotinine, 100 kiu/mL or α 2-antiplasmin, 1 μ M). After 24 hours, capillary tube formation was evaluated by measuring the number of polygons formed in a well under an inverted light microscope (Olympus) at 400 \times magnification. This time point was chosen following previous kinetics experiments indicating that it is optimum to analyze tube formation in the presence of EMPs. All experiments were performed in triplicate.

EMP immobilization

A physico-chemical adsorption principle was used to immobilize negatively charged EMPs on a polycation surface. For that purpose, round-bottom PVC plates were activated with 25 μ g/mL poly-L-lysine, and various concentrations of EMP in PBS were then incubated overnight at 4°C with the activated surface. The plate was then washed, and the immobilized EMPs were tested.

Plasmin generation test

In round-bottom 96-well PVC plates, various concentrations of EMPs, either in suspension in PBS supplemented with 0.8% bovine serum albumin (PBSA) or immobilized on poly-L-lysine-coated plates, were incubated with 50 μ L of 1 μ M plasminogen and 0.75 mM of a chromogenic substrate selective for plasmin (methyl-malonyl)-hydroxypropylarginine-p-nitroanilide (CBS0065; Stago, Asnières, France). An identical volume of supernatant from the last EMP washing was used as control. In order to determine the Michaelis constant of plasmin generation by EMPs, a fixed number (2.10⁵) of EMPs and varying concentrations of plasminogen (0 to 5 μ M) were used. Kinetics of plasmin generation were followed during 9 hours in a multiwell plate counter (MX5000, Dynex) at 37°C by measuring the change in absorbance at 405 nm produced by the release of p-nitroaniline. In the case of activation experiments performed on immobilized EMPs, the plate was washed with PBSA to eliminate unbound reactants, and the plasmin bound to the immobilized EMPs was detected by adding 50 μ L/well of 0.75 mM CBS0065 and measuring the change in absorbance at 405 nm. When indicated, the following inhibitors were pre-incubated with the EMPs: 1 μ g/mL goat antihuman tPA (Biopool, Uppsala, Sweden), 50 μ g/mL mouse antihuman uPA (3940), 50 μ g/mL rabbit anti- α v β 3 (gift of J.C. Lissitzky), 100 μ g/mL anti- α -enolase (gift of R. Lopez Alemany), and the respective irrelevant control IgGs (Biocytex, Marseille, France); the uPA inhibitor, amiloride, was used at 100 μ M and carboxypeptidase B (CpB) at 50 μ g/mL, final concentrations. In separate experiments, the inhibitors α 2-antiplasmin, aprotinin, and ϵ -amino-caproic acid (ϵ -ACA) were added to the plasminogen activation solutions at 100 nM, 100 kiu/mL and 0.1 M final concentrations, respectively.

Characterization of uPA and uPAR in cell and EMP extracts

HMEC-1 and pelleted MPs were lysed in 100 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl buffer pH 8.1, containing 0.5% Triton X-100 and supplemented with complete protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) except for zymography samples. Lysates were clarified and protein concentrations were determined using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL). uPA and uPAR total antigen levels were assayed by ELISA (894 and 893 IMUBIND ELISA kits, American Diagnostica) according to the manufacturer's instruction. The results were expressed as ng of uPA or uPAR per mg of total proteins. For zymography, protein extracts (5 μ g), molecular weight markers, and purified scuPA were electrophoresed under nonreducing conditions in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel copolymerised with 1 mg/mL α -casein from bovine milk (Sigma) and 20 μ g/mL human plasminogen. After electrophoresis, SDS was eluted from the gel by washing for 1 hour in 2.5% Triton X-100 buffer. The gels were then incubated for 40 hours at 37°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 5 mM CaCl₂, 138 mM NaCl, and 0.03% Brij 35. Zymograms were developed by staining with Coomassie Brilliant Blue Dye and destained to reveal clear bands of casein lysis, indicative of enzymatic activity. Samples run on casein gels without plasminogen or gels incubated in lysis buffer supplemented with 1 mM amiloride (Sigma) served as controls of uPA activity. For Western blot analysis, protein extracts and purified human uPAR (American Diagnostica) used as positive control (20 μ g/lane) were separated under nonreducing conditions by 8% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking, the membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit antihuman uPAR (399R, American Diagnostica, 0.5 μ g/mL) antibodies, followed by the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunocomplexes were visualized with the Supersignal West Pico chemiluminescence kit (Pierce).

Immunoelectron microscopy of EMPs

For uPA/uPAR immunogold labeling of EMPs, droplets of MP isolated from TNF α -stimulated HMEC-1 were applied to 300 mesh nickel Formvar-carbon-coated grids (Agar Scientific, Essex, United Kingdom) for 10 minutes. Samples were immunolabeled with either anti-uPA (3689, American Diagnostica, 10 μ g/mL) or anti-uPAR (3932, American Diagnostica, 10 μ g/mL) antibodies for 1 hour, washed with PBS, and then reacted with the 15-nm beads gold-labeled secondary antibody (BBInternational, Cardiff, United Kingdom) for 1 hour. Grids were rinsed and negatively stained with 0.3% phosphotungstic acid (pH 7) before observation with a JEOL 1220 electron microscope. Specificity of immunolabeling was determined in comparison to results obtained with an irrelevant control antibody or with gold-labeled secondary antibody alone.

Flow cytometry for uPA and uPAR on EMPs

EMPs (10 μ L) were labeled with either anti-uPA (3940, 25 μ g/mL) or anti-uPAR (3932, 25 μ g/mL) antibodies for 1 hour, then FITC-labeled secondary antibody was added and incubated for 30 minutes before samples were analyzed on a Cytomics FC500* flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). MPs were analyzed according to the FSC/SSC characteristic in a gate with the upper limit defined by beads of 0.9 μ m and the lower limit defined by 0.3 μ m. Specificity of labeling was determined in comparison to results obtained with an irrelevant control antibody or with the secondary antibody alone.

Binding of uPA to EMPs

A fixed concentration of EMPs was immobilized on poly-L-lysine-coated 96-well plates. Increasing concentrations (0 to 18.5 nM) of scuPA (a kind gift of Dr H.R. Lijnen, University of Leuven) were incubated during 1 hour at 37°C with the immobilized microparticles in the presence of 4 μ g/mL of poly-L-lysine in order to eliminate nonspecific binding of scuPA to the poly-L-lysine surface. To verify the specificity of the binding, a fixed concentration of native scuPA (0.1 nM) was mixed with a 10 molar excess (1 nM) of a recombinant inactive form "rsc-uPA Ile 159→Gly" (H.R. Lijnen, University of Leuven, Leuven, Belgium). The native scuPA, specifically bound to EMPs, was detected by measuring plasmin generation as described above.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) and with KaleidaGraph software (Synergy Software, Reading, PA). Significant differences were determined using nonparametric Mann-Whitney test. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

EMPs are able to activate plasminogen into plasmin

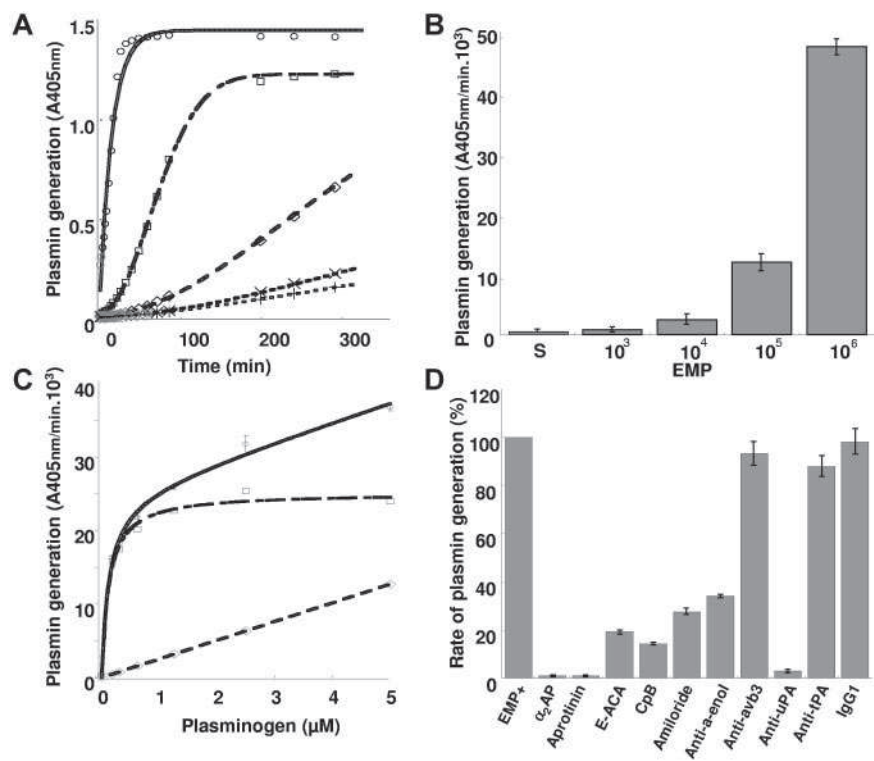
To investigate the ability of EMPs to generate plasmin, the microparticles were incubated with plasminogen and a plasmin-selective chromogenic substrate. As shown in Figure 1A, plasmin generation occurred as a function of time and was proportional to the number of EMPs. At 10⁶ EMP/well the plasmin generation rate was $47.6 \pm 1.1 A_{405\text{nm}} \times 10^{-3}/\text{min}$, 53-fold higher than at 10³ EMP/well ($0.9 \pm 0.3 A_{405\text{nm}} \times 10^{-3}/\text{min}$) (Figure 1B). At identical EMP concentrations (2 $10^5/50 \mu\text{L}$) comparable results were obtained using EMP derived from quiescent or TNF α -stimulated HMEC-1. In contrast, the level of plasmin generated by EMPs was shown to vary according to their endothelial cell origin (Table 1). Thus, a more pronounced activity was produced by HMEC-1-derived MPs as compared with MPs of macrovascular origin (saphenous vein, HUVEC), whereas intermediate values were obtained for EPDC-derived MPs. Plasminogen incubated with EMPs was activated in a dose-dependent, saturable, and specific manner (Figure 1C, $K_m = 0.122 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 25.2 A_{405 \text{ nm}}/\text{min } 10^3$). As expected, plasmin activity was completely blocked in the presence of α_2 -antiplasmin or aprotinin (Figure 1D).

Plasminogen is activated by uPA at the surface of EMPs

Supernatants from EMP washing failed to generate plasmin, ruling out the contribution of soluble factors and suggesting that the activation of plasminogen was dependent on factors associated with the EMP surface. To test this hypothesis, plasminogen activation experiments were performed on immobilized microparticles. In this system, plasmin generation was a function of the number of immobilized EMPs (Figure 2A). Plasmin was already detected on immobilized EMPs at a concentration of 25 000 EMP/well and increased progressively in a dose-dependent manner. At the end of the activation experiments the immobilized EMPs were washed, and bound plasmin was detected using a plasmin-selective chromogenic substrate. The amount of EMP-bound plasmin increased as a function of the number of immobilized EMPs (Figure 2B). Since some plasmin was released into the medium during its generation, the amount bound after washing was lower than the total amount of plasmin formed.

In parallel experiments using EMP in suspension, plasmin generation was inhibited by the lysine analog ϵ -ACA, suggesting a lysine-dependent mechanism for plasminogen binding and activation that was confirmed by abrogation of plasmin formation upon cleavage of C-terminal lysine residues on EMPs by CpB (Figure 1D). Among proteins bearing C-terminal lysine residues, α -enolase was identified as a major binding protein as indicated by 65% inhibition of plasmin formation with the specific antibody 11G1 (Figure 1D). The integrin $\alpha v \beta 3$ that may influence plasminogen activation, mainly through interactions with the uPA/uPAR system, was shown not to be involved in plasmin generation by EMPs as

Figure 1. EMPs are able to activate plasminogen into plasmin. (A) Plot of plasmin generated versus time at varying EMP amounts per 50 μ L/well (\circ = 10^6 ; \square = 10^5 ; \diamond = 10^4 ; \times = 10^3 ; $+$ = control without EMPs) and fixed final concentrations of plasminogen (1 μ M) and a plasmin-selective chromogenic substrate (0.75 mM). Representative graph of 4 independent experiments. (B) Similar experiment as in panel A expressed as change in absorbance at 405 nm per minute versus EMP amount per well (S: EMP last washing supernatant used as control). (C) Plasmin generated at varying plasminogen concentrations (0–5 μ M) and a fixed amount ($2 \cdot 10^5/50$ uL) of EMPs was detected with a chromogenic substrate as in panel A. Raw data (\circ) were fitted to the Michaelis-Menten equation allowing calculation of nonspecific activity (\diamond) and a K_m = 0.122 μ M for specific plasmin generation (\square). (D) Effect of various inhibitors on the generation of plasmin by EMPs ($2 \cdot 10^5/50$ uL) at 0.5 μ M plasminogen (α_2 AP = α_2 -antiplasmin; ϵ -ACA = ϵ -amino-caproic acid; CPB = carboxypeptidase B; antibodies to uPA and tPA $\alpha v\beta 3$ and α -enolase as compared with an isotype control IgG1). Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments.



indicated by the absence of effect of a specific neutralizing antibody (Figure 1D).

The uPA/uPAR complex is present on EMPs

The value determined for the apparent K_m of plasminogen activation on EMPs was within the range determined for the uPA/uPAR system on endothelial cells and a variety of other cell types.^{27,28} The plasminogen activator conveyed by EMPs was identified as uPA as indicated by the inhibition of plasmin generation by (1) amiloride, a specific inhibitor of uPA, and by (2) an antibody specific for uPA (> 95% inhibition) (Figure 1D). By contrast, an antibody directed against tPA had no significant effect on plasmin generation. The presence of uPA activity on EMPs was further confirmed by a lytic band on casein zymography corresponding to the molecular mass of uPA (Figure 2C), which was also absent in gels into which amiloride (1 mM) was incorporated (data not shown). Comparison of the lytic bands from the EMPs and the parent cells, normalized for protein content, showed a 3- to 4-fold increase of uPA in the EMPs (representative experiment in Figure 2C). Similarly, when uPA antigen in EMPs and cells were measured by ELISA, a 3-fold increase in uPA was found in the EMPs (23.9 ± 12.6 versus 8.3 ± 3.17 ng uPA/mg protein, respectively, $P < .05$). uPAR was identified in EMPs and cell lysates by Western blot and was found to comigrate with mammalian uPAR. As for uPA,

the EMPs had more uPAR than the cells when normalized for equivalent total protein concentrations (Figure 2D). The uPAR antigen level measured by ELISA was 4-fold higher in the EMPs than in the parent HMEC-1 (57.7 ± 14.54 versus 4.4 ± 1.17 ng/mg protein, respectively, $P < .05$). The presence of uPA or uPAR on the EMP surface also was analyzed by flow cytometry (Figure 3A,B). The shift of fluorescence histogram after specific labeling of EMPs with uPA and uPAR antibody compared with the irrelevant staining confirmed the presence of uPA and uPAR at the EMP surface.

EMPs also were analyzed by electron microscopy. Negative staining of the pellet revealed intact irregular-shaped EMPs ranging from 100 to 500 nm in size. Molecules of uPA and uPAR were detected on the outer surface after immunogold labeling with specific antibodies (Figure 3C). No labeling was observed in experiments using control antibodies.

Binding of sc-uPA to EMP-uPAR

Since the amount of uPAR measured by ELISA was higher on EMPs than on cells, we tested the capacity of immobilized EMPs to bind exogenous scuPA specifically. A range of concentrations of scuPA was incubated with the immobilized EMPs, washed, and then tested in a plasminogen activation assay. Figure 3D shows that scuPA binding was dose-dependent, saturable, and specific, as indicated by the inhibition of the binding by a modified form of scuPA that resists activation (Figure 3D, insert). Analysis of raw data with the Langmuir equation for single-site binding allowed calculation of a very low dissociation constant ($K_d = 0.1$ nM), indicating a very high affinity of scuPA for its EMP anchored receptor, in agreement with previous published data for the uPA/uPAR system.²⁸ Since elution of intrinsic uPA could not be performed before the binding experiments, these results indicate that the amount of uPA originally bound is relatively small compared with the high uPAR binding capacity of EMPs.

Table 1. Plasmin generation by endothelial microparticles

Source from which EMPs were derived	Plasmin generation, mean % plus or minus SD
TNF α -stimulated HMEC-1	100
Quiescent HMEC-1	98.0 \pm 6.3
EPDC	27.7 \pm 5.5
Saphenous vein endothelial cells	13.0 \pm 2.6
HUVEC	7.6 \pm 3.3

* 2×10^5 /well.

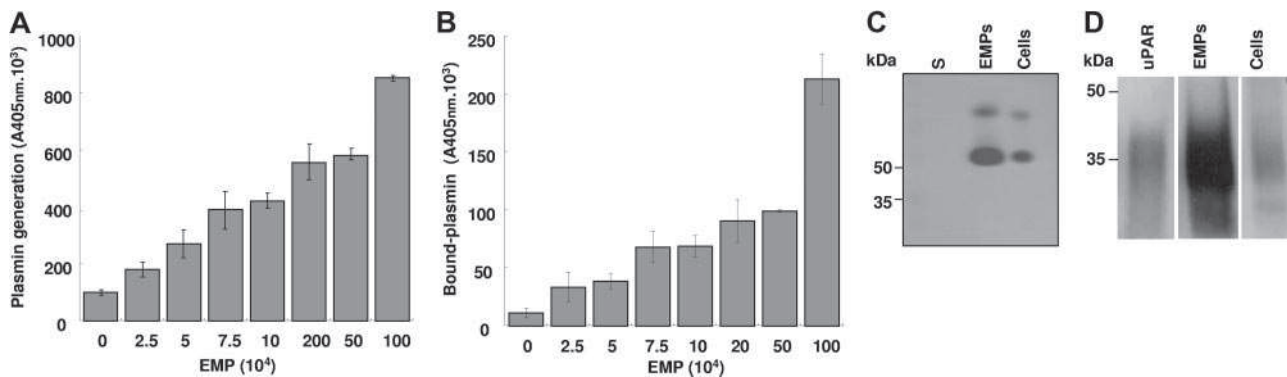


Figure 2. Plasminogen is activated at the surface of EMPs by uPA. (A,B) A variable number of EMPs immobilized on poly-L-lysine surfaces were incubated with fixed concentrations of plasminogen (0.5 μ M) and the plasmin-selective chromogenic substrate (0.75 mM). The graph in panel A shows an increase in the formation of plasmin as a function of the number of immobilized microparticles. Unbound reagents were then washed off and the chromogenic substrate added to detect plasmin that remained bound to the immobilized EMPs; the graph (B) shows an increase in bound plasmin as a function of the number of immobilized EMPs. Representative graphs (mean \pm SD) of 3 independent experiments. (C,D) Protein extracts from HMEC-1 and its derived EMPs were processed for zymography (panel C) to detect plasminogen activator activity (5 μ g protein/lane; S: EMP last washing supernatant) and for immunoblot (panel D) using rabbit antibodies against uPAR and purified uPAR as reference (20 μ g protein/lane). The \sim 50 kDa and upper bands in panel C were inhibited by antibodies to urokinase (not shown). A space has been inserted to indicate where a gel lane was cut. These gels came from different experiments as indicated by the space between the gels.

EMPs affect tube formation by endothelial progenitor cells in vitro

EPCs were supplemented with increasing amounts of EMPs (2.10^3 to 8.10^5), and tube formation in matrigel was evaluated using the supernatant from the last EMP washing as control (100% tube formation). As shown on Figure 4A, a biphasic effect was observed: at low EMP concentrations ($\leq 2.10^3$ /well), polygon number and tube formation increased by 20% over control ($P = .012$), whereas higher amounts of EMP ($\geq 2.10^5$ EMPs/well) had the reverse effect. Thus, tube formation decreased progressively with the increase in the number of EMPs reaching 55% decrease below control ($P < .001$) at 8.10^5 EMPs/well. Concomitant with the decrease in tube formation, morphologic cell changes were observed (rounded cells and retracted cell clusters) (Figure 4B). The moderate pro-angiogenic effect of MP seems to be less potent as compared with vascular endothelial growth factor (VEGF)

(see the Supplemental Materials link at the top of the online article available on the *Blood* website).

Plasmin is involved in the EMP effects on tube formation

An anti-uPA antibody and α_2 -antiplasmin were used to determine whether the observed effects of EMPs on EPC tube formation were related to plasmin generation. As illustrated in Figure 4C, in the presence of these inhibitors, EMPs had no more effect on tube formation.

We also considered the presence of plasmin in the matrigel medium, because the gel itself and the culture medium (RPMI/10% FCS) contain plasminogen,²⁹ and the EMPs are a source of uPA. The plasmin chromogenic substrate was added with the EMPs in matrigel, allowing detection of increased plasmin generation from 10^5 EMP ($P < .001$) at 2 hours of incubation (Figure 5A). The contribution of FCS plasminogen to plasmin

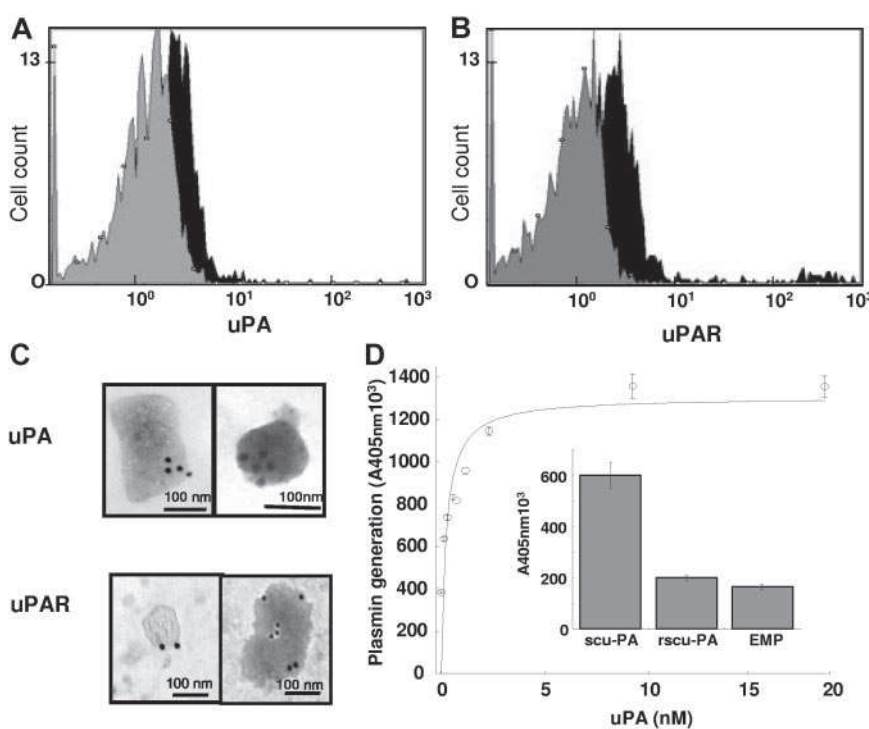


Figure 3. Identification of uPA, uPAR, and uPA/uPAR complex on EMP. (A,B) Measured fluorescence intensity by flow cytometry analysis of EMPs with anti-uPA (A) and anti-uPAR (B) antibodies (black) and the corresponding isotype controls (gray). (C) Representative images of immunogold labeling of uPA (top) and uPAR (bottom) analysis on EMPs by transmission electron microscopy. Slides were viewed with a JEOL 1220 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). Images were acquired using a MegaView III camera (Soft Imaging System, Munster, Germany) and were processed with Analysis software (Soft Imaging System) and Adobe Photoshop version 7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA). The dimension of the bars indicate the relative small size of these EMPs, and the clusters of 15-nm gold particles (black dots) indicate the presence of uPA and uPAR at the surface of EMPs. (D) Main graph: isotherm of the binding of varying amounts of scuPA incubated with EMPs immobilized on a poly-L-lysine surface. The amount of bound scuPA was detected by its ability to activate plasminogen using a chromogenic substrate selective for plasmin. Data fitted to the Langmuir equation as indicated in "Materials and methods" allowed calculation of a dissociation constant, $K_d = 0.1$ nM, for the interaction of scuPA with its receptor. Representative graph (mean \pm SD) of 3 independent experiments. Inset: specificity of the binding of native scuPA is demonstrated by its inhibition with a modified recombinant form of scuPA (r-scuPA, Ile159 \rightarrow Gly) that bind to its receptor but cannot be activated. The bars represent the mean (\pm SD) of 3 independent experiments.

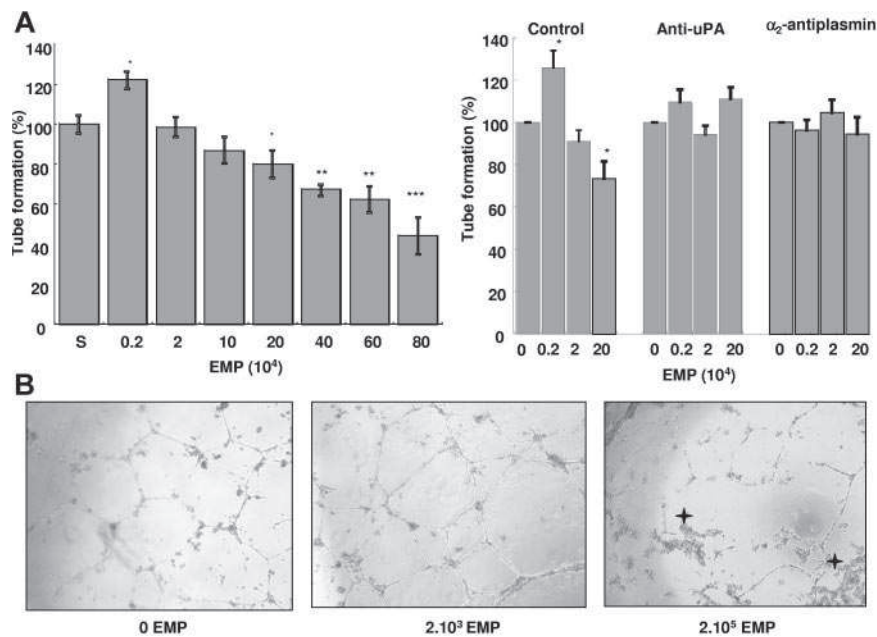


Figure 4. EMPs affect the angiogenic properties of endothelial progenitors in vitro: effects on tube formation in matrigel. EPDC in RPMI/10% FCS and varying amounts of EMPs were plated on matrigel, and tube formation was evaluated after 24 hours of incubation. (A) Biphasic effect of EMPs on tube formation: at low EMP concentrations ($\leq 2.10^3$ /well), polygon number and tube formation increased by 20% ($P = .012$, $n = 12$) over control (S: EMP last washing supernatant). However, higher amounts of EMPs ($\geq 2.10^5$ EMP/well) had the reverse effect and progressively decreased the number of tubes to 50% at 8.10^5 EMP/well. Stars indicate significant changes ($*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$). Results are the mean (\pm SD) of 12 independent experiments. (B) Inverted light microscope representative images ($400\times$ magnification) showing EPDC tube formation in matrigel in the absence and presence of 2.10^3 or 2.10^5 EMPs per well. Asterisks indicate retracted cell clusters. Slides were viewed with an inverted Nikon light microscope (Nikon, Melville, NY) using an Olympus lens ($40\times/0.60$; Olympus, Tokyo, Japan). Images were acquired using a Nikon model DXM 1200F camera and were processed with Lucia G software (both from Nikon) and Adobe Photoshop version 7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA). (C) Experiments were performed in the presence of inhibitors of either plasmin formation (anti-uPA antibody) or activity (α_2 -antiplasmin, α_2 -AP). The biphasic effect of EMPs on tube formation (left bar panel) was abolished by the anti-uPA antibody (middle) and by α_2 -AP (right). Asterisks indicate significant changes ($P < .05$). Results are the mean (\pm SD) of 3 independent experiments.

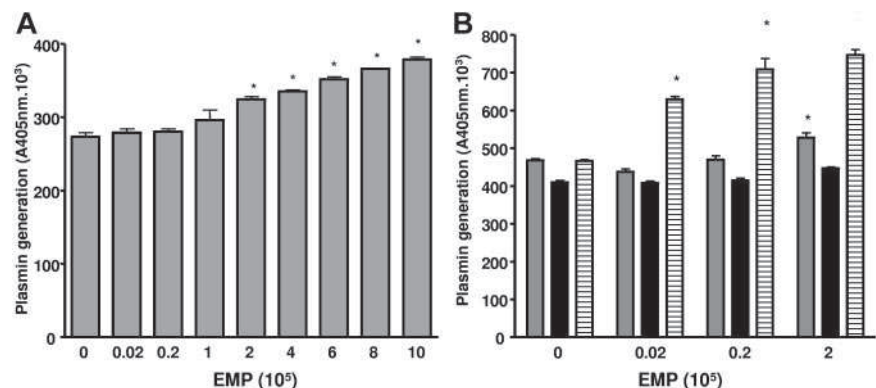
formation was estimated using plasminogen-free FCS (Figure 5B). Under these conditions plasmin generation was moderately reduced (-11.8% , $P = .001$) compared with native FCS and was not influenced by the amount of EMPs added, suggesting the presence of a basal plasmin generation in the matrigel. The addition of plasminogen to plasminogen-free FCS restored plasmin formation to the level observed with native FCS in the absence of EMPs and was again importantly increased as a function of the number of added EMPs (more than 75% increase at 2.10^5 EMP/well, Figure 5B). These data confirmed the role of matrigel and plasminogen from FCS in plasmin generation in the absence of EMPs, and the strong potential capacity of EMPs to enhance plasmin generation.

Altogether, these data indicate that the uPA/uPAR system of EMPs is responsible for plasmin generation and that plasmin proteolytic activity is involved in the EMP effects on tube formation by EPCs.

Discussion

The plasminogen activation system plays a pivotal role in maintaining vascular patency and facilitating cell migration and angiogenesis. Binding of plasminogen to fibrin or the cell surface is of critical importance to regulate and target the proteolytic activity. Although the presence of uPAR on endothelial microparticles previously has been described,³⁰ its functional consequences, to our knowledge, have not been investigated as yet. The present study is the first demonstration that EMPs provide a catalytic surface for the conversion of plasminogen into plasmin by expressing uPA and uPAR. Plasmin generation was EMP surface-dependent and could be augmented by binding of exogenous uPA to EMP-uPAR. As a result, EMPs were shown to modulate the angiogenic responses of endothelial progenitors in vitro.

Figure 5. EMPs are involved in plasmin generation in matrigel. (A) Plasmin generation in matrigel is dependent on the amount of EMPs. The chromogenic substrate CBS0065 was added to the matrigel with the EMPs, and under these conditions an increase in plasmin formation was detected from 10^5 EMPs ($P < .001$) after 2 hours of incubation. Asterisks indicate significant changes ($P < .05$). Results are the mean (\pm SD) of 3 independent experiments. (B) Plasmin generation in matrigel at different EMP amounts is dependent on the supply of plasminogen by FCS. The graph shows plasmin activity detected after 3 hours of incubation: ■, medium with 10% FCS; ▒, medium with plasminogen-free FCS; □, medium with plasminogen-free FCS supplemented with $1\ \mu\text{M}$ plasminogen. Activity in the absence of EMPs may represent low levels of plasmin and/or limited amounts of activators in matrigel. Asterisks indicate significant changes ($P < .05$). Results are the mean (\pm SD) of 3 independent experiments.



The generation of plasmin at the EMP surface was supported by inhibition experiments using the lysine analog ϵ -ACA and CpB. The inhibitory effect of ϵ -ACA, which occupies the lysine-binding site of plasminogen kringles 1 and 4, indicated lysine-dependent binding of plasminogen to the activation surface. The inhibition of plasmin formation by CpB confirmed that plasminogen activation was dependent on its cell-surface binding to C-terminal lysine residues. This mechanism was further confirmed by inhibition of plasmin generation with a monoclonal antibody directed against α -enolase, a major plasminogen binding protein on cell surfaces.³¹ Taken together, these data demonstrated that EMPs bind plasminogen and provide a catalytic surface for plasmin generation. The kinetics of plasminogen activation by the EMPs were similar to those described for cells expressing uPA and uPAR.^{27,28,32} Accordingly, ELISA and zymography experiments revealed that EMPs express uPA and uPAR. Part of this uPA and uPAR expression was located on the EMP surface as evidenced by electron microscopy and flow cytometry.

The major contribution of EMP-bound uPA to the plasmin generation was further demonstrated by the following observations: (1) plasmin generation was blocked by the uPA inhibitor amiloride and by a uPA-neutralizing monoclonal antibody, and (2) tPA-dependent lytic activity was absent on zymograms, and neutralizing tPA antibodies did not affect plasmin generation.

EMPs also were shown to bind exogenous sc-uPA. Both the affinity of sc-uPA binding and the competitive effect of a recombinant form of uPA (rsc-uPA Ile159→Gly), consistent with uPA/uPAR interaction, demonstrate that the EMP surface bears uPAR molecules devoid of uPA, allowing the specific binding of exogenous uPA. These data, together with the expression of uPAR in excess of uPA, suggest that plasmin generation by EMPs can be amplified by uPA transferred from the local environment to the EMP surface. This mechanism may have implications in tumor angiogenesis, where uPA secretion is promoted. Thus, MPs from tumor cells and EMPs could participate in amplification of proteolytic processes.³³

Several reports have demonstrated that cell surface-bound plasmin is responsible for pericellular proteolysis and matrix degradation as compared with the soluble form.^{27,34} This efficient activity results from protection against inactivation by physiological inhibitors, a direct contact with its matrix substrates, and the existence of amplification loops for plasminogen activation.¹⁶ Interestingly, plasmin once formed remains partly bound to the EMP surface. Collectively, these data show that EMPs act as vectors of efficient plasmin generation.

This proteolytic activity is not the hallmark of cell activation by TNF α since it was similarly observed on EMPs derived from quiescent endothelial cells. The substantial differences in plasmin generation observed among various endothelial cell types is consistent with the heterogeneous expression level of uPA/uPAR system along the vascular tree.³⁵

Vascular homeostasis is the result of an equilibrium between injury and capacity for repair.³ Regeneration of damaged endothelium recently has been shown to involve not only angiogenesis but also vasculogenesis mediated by endothelial progenitors, both processes being largely dependent on proteolytic activities.³⁵ Thus, the capacity of EMPs to behave as vector of proteolytic activities raises the possibility that EMPs may modulate EPC-mediated repair processes. Consistently, apoptotic bodies from HUVECs have been shown to stimulate differentiation of endothelial progenitor, thereby representing a potential signaling pathway linking damaged cells to progenitors in the facilitation of the repair process.³⁶ In our study, coculture experiments showed that EMPs affect EPC angiogenesis in matrigel in a concentration-dependent manner. While low

amounts of EMPs increased tube formation, higher concentrations inhibited it. This dual effect involved EMP-associated plasmin since (i) in our coculture model, EMPs retained the capacity to increase plasmin concentration by activating the plasminogen of the culture medium, and (ii) EMP effect was abrogated in the presence of α_2 -antiplasmin and a uPA-blocking antibody. The proangiogenic effect of EMPs is consistent with plasmin-associated proteolytic activity that favors cell migration via extracellular matrix processing and direct interaction with $\alpha v \beta 3$ integrin.¹⁹ The latter, however, is not involved in the process of plasmin generation (Figure 1D). Although this proangiogenic effect was observed with EMPs present in a low number, plasmin was readily detected, indicating that the local concentration of plasminogen was sufficient to ensure efficient plasmin generation. Other mechanisms also may be involved. MPs from HUVECs stimulated with growth factors have been shown to stimulate angiogenic properties of mature endothelial cells, and this effect was related to their content in matrix metalloproteinases.³⁷ Consistently, we observed an increase in MMP-2 and MMP-9 activities in condition media of matrigel experiments in the presence of low dose of EMPs (data not shown). Plasmin also may affect angiogenesis indirectly through activation of these MMPs.¹⁸

In our study, high concentrations of EMPs produced high amounts of plasmin and a dose-dependent decrease in tube formation by EPCs. This inhibitory effect is in line with the role of an excessive plasmin generation leading to extracellular matrix degradation, alteration of cell anchorage, and apoptosis.^{20,38} Morphological changes in EPCs cocultured with high EMP amounts were indeed observed: accumulation of round and retracted cells evoking cell detachment, an effect that precedes apoptotic cell death.²¹ Protective and noxious effects of plasmin formation also have been observed in a cellular model of amyloid β degradation, suggesting that a similar effect may occur in vivo.³⁹ Our data add to the observations of Mezentsev et al (2005) that reported a major contribution of oxidative stress in the impairment of angiogenic behavior of mature endothelial cells.⁴⁰ Although, in this study no proangiogenic effect at low doses of EMPs was observed, this discrepancy may be related to the specific properties of endothelial progenitors. EPCs have been reported to display increased sensitivity to proangiogenic stimulation and reduced sensitivity to oxidative stress compared with mature endothelial cells.⁴¹ Hence, the magnitude of an MP angiogenic signal may be influenced not only by MP cellular origin and concentration but also by the nature of the target cells.

In conclusion, we have identified cell-derived MPs as new actors in the plasminogen activation system, an undescribed facet of the multiple biological processes involving EMPs in the control of vascular homeostasis. The role of EMP-bound plasmin in pathological settings involving inflammation, atherosclerosis, angiogenesis, and tumor growth remains to be investigated. The high concentration of MPs reported in atherosclerotic plaques suggests that EMP-induced plasmin generation could participate in the modulation of cell apoptosis/angiogenesis balance, influencing plaque vulnerability. In stroke, released EMPs could be actors linking inflammation, cell damage, and dysregulated repair processes.⁴²

Acknowledgments

This work was supported in part by Agence Nationale pour la Recherche: Programme ANR-05-PCOD-024.

We gratefully acknowledge the contribution of Dr H.R. Lijnen (Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium) for providing scu-PA and rsc-uPA Ile 159→Gly; Dr R. Lopez Alemany (Institut

Recerca Oncologica, Barcelona, Spain) for providing the monoclonal antibody 11G1 directed against α -enolase; and Dr J.C. Lisitzky (UFR Pharmacie, Marseille, France) for providing the anti- α v β 3 antibody. We also thank Prof Marc Gamarre and his staff (Department of Gynecology and Obstetrics, CHU Conception, Marseille, France) for collection of cord blood samples.

E.A.-C. and his team are funded by an Inserm-Avenir/Lower-Normandy Council grant.

Authorship

Contribution: R.L. performed research (plasmin generation by microparticles, angiogenesis assays), collected data, analysed and interpreted data, and participated in manuscript drafting; F.S. contributed to isolation and culture of endothelial progenitors and participated in data interpretation and in manuscript drafting; A.M. performed research (characterisation of uPA-uPAR expression by microparticles); A.B. performed research (flow cytometry experi-

ments, statistical analysis); R.P. performed research (zymography); H.B. contributed to electronical microscopy experiments; S.R. performed research (flow cytometry experiments); E.L. performed research (zymography); L.C.-J. contributed to research design and microparticle production; L.P. performed research (plasminogen preparations and fibrin-agar zymography); V.G. contributed to study design and editing of the manuscript; E.A.-C. designed research, contributed analytical tools, analyzed data, and participated in manuscript drafting; and F.D.-G. designed research, analyzed data, and participated in manuscript drafting.

F.D.-G. and E.A.-C. share senior authorship for this study.

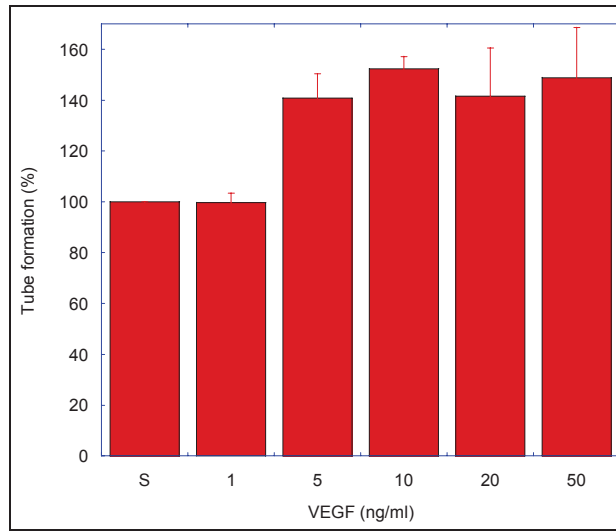
Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Françoise Dignat-George, Inserm UMR 608, UFR de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385-cdx Marseille 5, France; e-mail: dignat@pharmacie.univ-mrs.fr; or Eduardo Angles-Cano, Inserm/Cyceron/Université de Caen, Bd Henri Becquerel, 14074, Caen, France; e-mail: angles@cyceron.fr.

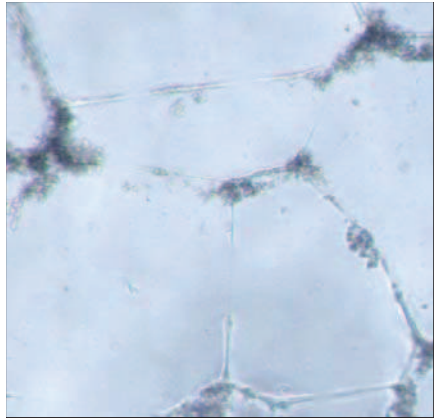
References

- Freysinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. 2003; 1:1655-1662.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21:157-171.
- Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:2594-2604.
- Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;104:93-102.
- Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2003;145:962-970.
- Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*. 2006;4: 566-573.
- Sabatier F, Damon P, Hugel B, et al. Type 1 and 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002;51:2840-2845.
- Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2004;91:667-673.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstmann LL, Soderland C, Ahn YS. Endothelial microparticles released in Thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol*. 2003;123:896-902.
- Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sickie blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;102:2678-2683.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2311-2315.
- Muller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*. 2003;17:476-478.
- Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, et al. Human-cell derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost*. 2003;3:1585-1598.
- Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schomig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2005;93:35-39.
- Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005;105:1515-1522.
- Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:226-236.
- Tkachuk V, Stepanova V, Little PJ, Bobik A. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodeling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:759-765.
- Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86:324-33.
- Tarui T, Majumdar M, Miles LA, Ruf W, Takada Y. Plasmin-induced migration of endothelial cells: a potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J Biol Chem*. 2002;277:33564-33570.
- Rossignol P, Ho-Tin-Noe B, Vranckx R, et al. Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells. *J Biol Chem*. 2004;279:10346-10356.
- Rossignol P, Lutun A, Martin-Ventura JL, et al. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. *J Thromb Haemost*. 2006;4:664-670.
- Fleury V, Angles-Cano E. Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry*. 1991; 30:7630-7638.
- Ades EW, Candal FJ, Swertlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. 1992;99:683-690.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-2756.
- Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*. 2001;4:91-102.
- Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002;99:3962-3970.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J*. 1995;9:939-945.
- Ellis V. Plasminogen activation at the cell surface. *Curr Top Dev Biol*. 2003;54:263-312.
- Farina AR, Tiberio A, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. Identification of plasminogen in Matrigel and its activation by reconstitution of this basement membrane extract. *Biotechniques*. 1996;21:904-909.
- Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*. 2002;106:2372-2378.
- Lopez-Alemay R, Longstaff C, Hawley S, et al. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am J Hematol*. 2003;72:234-242.
- Lamanuzzi LB, Mtairag el M, Pepe G, Angles-Cano E. Neutrophils stimulated by apolipoprotein(a) generate fragments that are stronger inhibitors of plasmin formation than apo(a). *Thromb Haemost*. 2004;92:1066-1075.
- Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18:163-170.
- Ellis V, Murphy G. Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett*. 2001;506:1-5.
- Basire A, Sabatier F, Ravet S, et al. High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thromb Haemost*. 2006;95:678-688.
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498-508.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, et al. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*. 2002;160:673-680.
- Meilhac O, Ho-Tin-Noé B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J*. 2003;17:1301-1303.
- Davis J, Wagner MR, Zhang W, Xu F, Van Nostrand WE. Amyloid beta-protein stimulates the expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in human cerebrovascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2003;278:19054-19061.
- Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1106-H1114.
- Bompais H, Chagraoui J, Cannon X, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103:2577-2584.
- Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1296-1302.

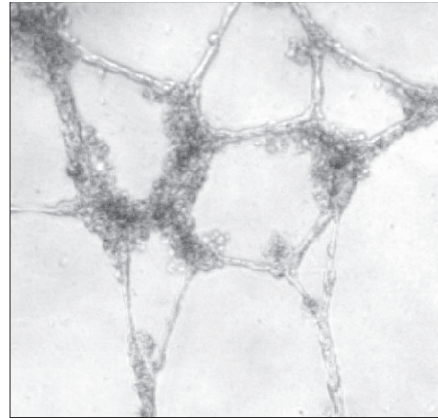
A



B



VEGF (1ng/ml)



VEGF (50ng/ml)

ARTICLE 2

Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation

*Tiphaine Dejouvencel,^{1,2} *Loïc Doeuvre,^{1,3} **Romarie Lacroix,**⁴ Laurent Plawinski,^{1,5} Françoise Dignat-George,⁴ H. Roger Lijnen,⁶ and Eduardo Anglès-Cano^{1,5}

* Ces 2 auteurs ont contribués de manière égale à ce travail.

¹Inserm, U919, Caen, France; ²Universite' Paris Diderot-Paris 7, Paris, France; ³Université de Caen, Caen, France; ⁴Inserm, UMR608, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ⁵Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR6232, Caen, France; and ⁶Center for Molecular and Vascular Biology, KU Leuven, Leuven, Belgium.

Blood. 2010 ; 115 : 2048-2056



La fibrinolyse et la protéolyse péricellulaire dépendent de l'activation du plasminogène sur la fibrine ou à la surface des cellules. Le plasminogène est une protéine de 92 kDa composé de 791 acides aminés répartis en une région sérine protéase, 5 structures à 3 boucles appelées domaines Kringle (K) et une séquence amino-terminale. Les domaines K1 et K4 contiennent des sites de liaison à la lysine (LBS) qui permettent la liaison du plasminogène aux cellules, aux MP, à la fibrine et aux composant de la matrice extracellulaire avec une affinité modérée ($K_d = 0.5-1 \mu M$). Cette interaction est inhibée par la carboxypeptidase B (CpB), une exopeptidase qui cible l'activation de surface en clivant les résidus lysines carboxy-terminaux exposés (Lys C-term) et par l' ϵ -ACA, un analogue de la lysine qui cible les LBS du plasminogène.

D'un point de vue structural, l'existence sur le domaine K5, d'un LBS de faible affinité, qui interagit avec le peptide amino-terminal du Glu-plasminogène, favorise une conformation « compacte » ou « fermée » du plasminogène majoritaire par rapport à une

forme « ouverte » de courte durée de vie. Le clivage protéolytique par la plasmine de la région amino-terminale du plasminogène, aboutit à une forme tronquée stable de conformation « ouverte », le Lys-plasminogène, incapable d'adopter la conformation « fermée ». D'une manière semblable, la saturation du LBS de faible affinité du Glu-plasminogène avec l' ϵ -ACA provoque une transition de la forme compacte « fermée » à une forme « ouverte » caractéristique de Lys-plasminogène. Ainsi, parce que l' ϵ -ACA est un analogue des Lys C-term, il est reconnu que le Glu-plasminogène adopte une conformation semblable au Lys-plasminogène lorsqu'il se lie aux Lys C term des surfaces biologiques. Ainsi, la liaison du plasminogène à ces récepteurs de surface est un pré-requis indispensable à une activation efficace en plasmine par ses activateurs (t-PA ou u-PA).

L'endothélium quiescent et les neurones expriment du t-PA, alors que l'u-PA est exprimée par les cellules endothéliales des capillaires ou les cellules inflammatoires. Nous avons montré dans le premier travail, qu'un mécanisme similaire de formation de plasmine était fonctionnel à la surface des MPE produites à partir d'une lignée endothéliale microvasculaire humaine. La plasmine formée sur ces membranes cellulaires est impliquée soit directement, soit par l'intermédiaire de MMP dans les processus protéolytiques aboutissant au remodelage tissulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse et le détachement entraînant l'apoptose.

Des études précédentes ont montré que l'uPA active le Lys-plasminogène et le Glu-plasminogène lié à de l' ϵ -ACA plus rapidement que le Glu-plasminogène natif. De plus, l'uPA simple chaîne active spécifiquement le plasminogène lié aux résidus Lys-C term de la fibrine. Ceci suggère une relation entre la conformation moléculaire du plasminogène et la génération de plasmine.

Nous avons donc formulé l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de formation de plasmine permettant d'outrepasser la nécessité prédéfinie d'un co-assemblage moléculaire sur la même surface entre l'u-PA et le plasminogène, par un « cross-talk » protéolytique entre surface des microparticules et surfaces cellulaires, fibrine ou matrice extracellulaire.

Dans ce second travail, nous montrons que malgré une inhibition de la liaison du Glu-plasminogène à la surface cellulaire par l' ϵ -ACA ou par des anticorps monoclonaux spécifiques des LBS, la plasmine est contre toute attente générée par l'u-PA cellulaire.

Ensuite nous montrons que l'uPA exprimée par les monocytes ou vectorisée par les MPE est capable d'activer le Glu-plasminogène lié aux résidus lys C term de la fibrine, des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine) mais aussi des plaquettes. Une telle activation n'est pas observée en présence de neurones exprimant le t-PA. Ce nouveau mécanisme d'activation du plasminogène semble plus efficace que lors d'une activation sur la même surface du plasminogène par l'u-PA. La vitesse de formation de plasmine est doublée. En résumé, ces résultats montrent que, à l'inverse du t-PA, l'uPA portée par les cellules ou par les MPE est spécifiquement impliquée dans la reconnaissance des changements conformationnels du Glu-plasminogène lié à une autre surface biologique, par un mécanisme dépendant des lys-C term. Ce mécanisme de « cross-talk » lié à l'uPA permet de générer de la plasmine *in situ* avec une grande efficacité, soulignant ainsi sa relevance physiopathologique dans la fibrinolyse et la protéolyse matricielle induites par les cellules inflammatoires ou les MP.

Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation

*Tiphaine Dejouvencel,^{1,2} *Loïc Dœuvre,^{1,3} Romaric Lacroix,⁴ Laurent Plawinski,^{1,5} Françoise Dignat-George,⁴ H. Roger Lijnen,⁶ and Eduardo Anglés-Cano^{1,5}

¹Inserm, U919, Caen, France; ²Université Paris Diderot-Paris 7, Paris, France; ³Université de Caen, Caen, France; ⁴Inserm, UMR608, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ⁵Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR6232, Caen, France; and ⁶Center for Molecular and Vascular Biology, KULeuven, Leuven, Belgium

Fibrinolysis and pericellular proteolysis depend on molecular coassembly of plasminogen and its activator on cell, fibrin, or matrix surfaces. We report here the existence of a fibrinolytic cross-talk mechanism bypassing the requirement for their molecular coassembly on the same surface. First, we demonstrate that, despite impaired binding of Glu-plasminogen to the cell membrane by ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA) or by a lysine-binding site-specific mAb, plasmin is unexpectedly formed by

cell-associated urokinase (uPA). Second, we show that Glu-plasminogen bound to carboxy-terminal lysine residues in platelets, fibrin, or extracellular matrix components (fibronectin, laminin) is transformed into plasmin by uPA expressed on monocytes or endothelial cell-derived microparticles but not by tissue-type plasminogen activator (tPA) expressed on neurons. A 2-fold increase in plasmin formation was observed over activation on the same surface. Altogether, these data indicate that cellular

uPA but not tPA expressed by distinct cells is specifically involved in the recognition of conformational changes and activation of Glu-plasminogen bound to other biologic surfaces via a lysine-dependent mechanism. This uPA-driven cross-talk mechanism generates plasmin in situ with a high efficiency, thus highlighting its potential physiologic relevance in fibrinolysis and matrix proteolysis induced by inflammatory cells or cell-derived microparticles. (Blood. 2010;115:2048-2056)

Introduction

Fibrinolysis and pericellular proteolysis depend on plasminogen activation at fibrin and cell surfaces, respectively. Plasminogen is a 92-kDa protein composed of 791 amino acids (Glu¹-Asn⁷⁹¹; Glu-plasminogen) arranged in a serine protease region, 5 triple-loop structures (approximately 80 amino acid residues constrained by 3 disulfide bridges) called kringle (K) domains and an amino-terminal sequence (Glu¹-Lys⁷⁷/Val⁷⁹).¹ Domains K1 and K4 contain lysine-binding sites (LBSs)² that allow binding of plasminogen to cells,³ fibrin,⁴ and extracellular matrix (ECM) components⁵ with a moderate affinity (overall dissociation constant, $K_d = 0.5$ - $1 \mu\text{M}$). This interaction is inhibited by carboxypeptidase B (CpB), an exopeptidase that targets the activation surface by cleaving exposed carboxy-terminal lysines (C-ter Lys), and by ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA), a lysine analog that targets the LBS of plasminogen.

Domain K5 of plasminogen contains a LBS of weak affinity that interacts with the amino-terminal peptide of Glu-plasminogen and favors a predominant compact "closed" conformation⁶⁻⁸ over a very short-lived extended "open" form.^{8,9} Proteolytic removal of the amino-terminal peptide by plasmin (cleavage at either Lys⁶², Arg⁶⁸, or Lys⁷⁷) yields a stable truncated open form (Lys-plasminogen), unable to adopt the compact conformation.¹⁰⁻¹² In a similar manner, saturation of the weak LBS in Glu-plasminogen with ϵ -ACA causes a transition from the compact closed form to the open extended conformation^{8,9} characteristic of Lys-plasminogen.¹²⁻¹⁴ Because ϵ -ACA is an analog of C-ter Lys, it has been accepted that Glu-plasminogen adopts an open Lys-like conformation on binding to C-ter Lys on surface biologic receptors.^{8,9} Plasminogen binding to these receptors is a prerequisite for its efficient transformation

into plasmin by a plasminogen activator localized on the same cell surface (either the tissue-type, tPA, or the urokinase-type, uPA, plasminogen activator). Quiescent endothelial cells and neurons characteristically express tPA,^{15,16} whereas uPA is expressed by migrating capillary endothelial cells¹⁷ and inflammatory cells.¹⁸ It has recently been shown that a similar mechanism of plasmin formation is also functional at the surface of microparticles (EMPs) derived from a human microvascular endothelial cell line.¹⁹ Plasmin formed on these cellular membranes is implicated either directly or by activation of matrix metalloproteinases, in proteolytic processing of ECM proteins,²⁰ cell migration, angiogenesis, and cell detachment-induced apoptosis.^{21,22}

Previous studies have shown that uPA activates Lys-plasminogen and ϵ -ACA-liganded Glu-plasminogen faster than native Glu-plasminogen.^{10,11,23-25} Furthermore, single-chain uPA (scuPA) specifically activates plasminogen bound to C-ter Lys in fibrin,²⁶ suggesting a relation between its molecular conformation and plasmin generation. We therefore hypothesized the existence of a new mechanism of plasmin formation bypassing the requirement for molecular coassembly on the same surface, by a proteolytic cross-talk. In this study, we show that conformational changes induced in Glu-plasminogen by either ϵ -ACA or its binding to fibrin, platelets, or matrix proteins are readily recognized by the uPA/uPA receptor (uPAR) system of either EMPs, monocytes or THP-1 cells but not by tPA-bearing cells. This cellular uPA-driven cross-talk mechanism results in a high efficiency in plasmin formation, thus highlighting its potential physiologic relevance in fibrinolysis and ECM degradation. This novel mechanism may be

Submitted June 19, 2009; accepted November 9, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 7, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-06-228817.

*T.D. and L.D. contributed equally to this study (alphabetical order).

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

an intermediary pathway in pathophysiologically relevant inflammatory processes such as atherothrombosis, angiogenesis, and cell migration.

Methods

Reagents

Human Glu- and Lys-plasminogens were purified as described²⁷ and were greater than 99% pure as assessed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and by amino-terminal sequence analysis. Recombinant inactive human plasminogen with Ser⁷⁴¹ mutagenized to Ala (r-Pg-Ala⁷⁴¹) and recombinant scuPA with Ile¹⁵⁹ mutagenized to Gly (r-scuPA-Gly¹⁵⁹) were obtained and characterized as described.^{28,29} uPA and tPA (both greater than 99% single-chain form), a sheep antibody directed against uPA, and an immunoglobulin G₁ mAb 34D3 were obtained as described.^{20,30} The mAb 34D3 reacts with plasminogen fragment K1 + 2 + 3, blocks the LBS function of K1, and shows no cross-reaction with plasminogen K4.³¹ The chromogenic substrate selective for plasmin (methylmalonyl)-hydroxypropylarginine-*para*-nitroaniline (CBS0065) was from Stago. The lysine analog ϵ -ACA, CpB (porcine pancreas), ZnCl₂, amiloride (A7410), and poly-L-lysine (P-9155) were from Sigma. D-Valyl-L-phenylalanyl-L-lysine chloro-methyl ketone (VFK) was from Calbiochem. Surfactant-free white aliphatic amine latex beads were from Interfacial Dynamics Corp.

Preparation of fibrin surfaces and immobilization of matrix proteins

Fibrin surfaces were generated on polyglutaraldehyde-activated aliphatic amine latex beads or microtiter plates as described previously.²⁷ The matrix proteins fibronectin and laminin (10 μ g/mL) were immobilized onto polyglutaraldehyde-activated microtiter plates with a similar procedure.

To generate C-ter Lys residues on fibrin for the binding of plasminogen, the surfaces were treated with 10nM plasmin for 15 minutes at 37°C. Plasmin was discarded, and the surfaces were treated with a 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, containing 1 μ M VFK and 0.1M ϵ -ACA to inhibit and elute the remaining bound plasmin. The surfaces were then stored at 4°C in 50mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 80mM NaCl, 0.2% bovine serum albumin, 0.05% Tween-20, 0.01% Azide, and 1 μ M VFK.

Cell culture

The human monocytic cell line THP-1 (ATCC) was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 4mM glutamine, 0.5mM sodium pyruvate, 0.5% nonessential amino acids, and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin). Cortical neurons were obtained from Swiss mice embryos at 16 days of gestation, seeded in 96-well plates coated with 25 μ g/mL poly-L-lysine, cultured with the use of neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Invitrogen) and 0.5mM L-glutamine as described.³² Neurons used for experiments 5 days after seeding contained less than 2.5% astrocytes.³³ The human microvascular endothelial cell line (HMEC-1)³⁴ (obtained from Dr Ades, Centers for Disease Control and Prevention) was cultured in MCDB 131 medium (Invitrogen) supplemented with 10% MP-free fetal calf serum, 10 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (Upstate Cell Signaling Solutions), and 1 μ g/mL hydrocortisone (Sigma). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Isolation of monocytes and platelets

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from citrated blood of healthy donors by Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS) separation at 600g for 20 minutes at room temperature. Monocytes were then purified by cell sorting with CD14-coupled magnetic beads (Miltenyi Biotec), following the supplier's instructions. The purified cell population contained more than 98% monocytes, as assessed by flow cytometry, with the use of CD14

monoclonal antibodies (Immunotech). Purified monocytes were allowed to adhere 2 hours onto 96-well plates (Techno Plastic Products AC).

Platelets were isolated from blood collected into acid-citrate-dextrose from healthy volunteers. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 200g for 15 minutes at room temperature, followed by a second centrifugation at 1200g for 12 minutes to pellet platelets. Platelets were then washed twice in 36mM citric acid buffer, pH 6.5, containing 100mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, and 5mM glucose.

Generation, harvesting, and flow cytometry of EMPs

EMPs were purified from culture medium conditioned by subconfluent HMEC-1 cells stimulated for 48 hours with 100 ng/mL tumor necrosis factor α (PeproTech Inc) as previously described with minor modifications.³⁵ Culture supernatants from flasks were collected and cleared from detached cells or large cell fragments by centrifugation at 4300g for 5 minutes. The supernatants were then centrifuged at 20 000g for 90 minutes at 4°C. Pelleted EMPs were washed twice and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Aliquots of 10 μ L of EMP suspension, 1/100 diluted, were labeled with the use of fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V (Abcys), and EMPs were quantitated by flow cytometry as previously described.³⁶

Characterization of plasminogen activators in cell and MP extracts

THP-1 cells, cortical neurons, HMEC-1 cells, pelleted EMPs, and platelets were lysed in 100mM Tris-HCl buffer, pH 8.1, containing 1% Triton X-100. Lysates were clarified by centrifugation, and their protein concentration was determined with the use of the BCA kit (Pierce Chemical). Fibrin autography-electrophoresis was performed as described previously.³⁷ Briefly, 10 μ g of proteins in cell lysates and 10 μ L of reference proteins (tPA 1 IU/mL, uPA 3 IU/mL, and plasmin 200nM) were electrophoresed in an 8% polyacrylamide gel under nonreducing conditions. SDS was then exchanged with 2.5% Triton X-100. After washing off excess Triton X-100 with distilled water, the gel was carefully overlaid on a 1% agarose support containing 1 mg/mL bovine fibrinogen, 100nM bovine plasminogen, and 0.2 NIH unit/mL bovine thrombin. Zymograms were allowed to develop at 37°C during 24 hours and were photographed at regular intervals using dark-ground illumination. Active proteins in cell lysates were identified by reference to the migration of known markers (uPA, tPA, plasmin), and inhibition of their activity with specific antibodies incorporated into the fibrin-agarose gel. The presence of uPA and uPAR on EMPs was further identified both by electron microscopy and by flow cytometry as described.¹⁹

Effects of LBS ligands on plasmin formation by cells

Glu- or Lys-plasminogen at various concentrations (0–3 μ M) was incubated at 37°C with uPA-bearing THP-1 cells or tPA-bearing cortical neurons, in the presence of 0.75mM CBS0065, a plasmin-selective chromogenic substrate. The effect of various inhibitors (mAb anti-K1-LBS; amiloride, an uPA inhibitor; ϵ -ACA; PMSF-treated CpB) on plasminogen binding and activation was determined with the use of a fixed final plasminogen concentration. Kinetics of plasmin formation was followed by measuring the release of *p*-nitroaniline from the chromogenic substrate, detected as a change in absorbance (ΔA_{405nm} /minute), using a multiwell plate reader (MX5000; Dynex) thermostated at 37°C. Rates of plasmin formation were calculated from the slopes of A_{405nm} versus time. After the activation reaction, the cells were washed in PBS, and residual bound plasmin was detected by adding 0.75mM CBS0065.

Activation of platelet-bound plasminogen by monocytes or neurons

Isolated platelets were treated with 5nM plasmin for 30 minutes at room temperature to generate plasminogen-binding sites (C-ter Lys residues) at their surface as reported previously.³⁸ Platelets were then washed, treated

with 1 μ M (final concentration) aprotinin (Trasylol; Bayer) to inhibit residual plasmin, and were finally incubated with 2 μ M plasminogen for 30 minutes at room temperature. Excess unbound plasminogen was removed by washing.

Isolated monocytes and neurons used as a source of distinct plasminogen activator, respectively uPA and tPA, were plated at 10^5 cells/well in 96-well plates and treated with 50 μ g/mL CpB for 30 minutes at 37°C. The cells were then washed and incubated with various amounts of plasminogen-bearing platelets (0 – 15×10^6 /well) in cell medium supplemented with 0.75mM of the plasmin substrate CBS0065. The kinetics of plasmin formation on platelets was followed during 12 hours by measuring the release of *p*-nitroaniline from the chromogenic substrate as a change in $A_{405\text{nm}}$ as a function of time. The cells were then carefully rinsed with PBS to discard platelets. A volume of 100 μ L of culture medium containing 0.75mM CBS0065 was then added to determine whether plasmin was present at the surface of monocytes or neurons.

Activation on plasminogen bound to fibrin-coated beads by monocytes, neurons, or EMPs

Fibrin-coated beads were incubated with 1 μ M plasminogen for 30 minutes at 37°C. Excess unbound plasminogen was removed by washing. Isolated monocytes, neurons, and EMPs were treated with 50 μ g/mL CpB for 30 minutes at 37°C. Cells were then washed and incubated with 2.5×10^5 beads/well in cell medium supplemented with 0.75mM of the plasmin substrate CBS0065. The kinetics of plasmin formation on fibrin-coated beads was followed during 12 hours at 37°C by measuring the release of *p*-nitroaniline.

In parallel experiments, fibrin-coated beads were incubated with 1 μ M native or r-Pg-Ala⁷⁴¹ for 30 minutes at 37°C. Fibrin-coated beads with bound plasminogen were then incubated with 10^6 EMPs in a final volume of 200 μ L. After overnight incubation at 22°C, the fibrin-coated beads were sedimented by centrifugation and resuspended in 10mM Tris-HCL, pH 6.8, containing 1% SDS to elute fibrin-bound plasminogen derivatives. The supernatant was electrophoresed under nonreducing conditions, proteins were transferred to PVDF membranes and revealed with a horseradish peroxidase-conjugated mAb (150 ng/mL) directed against plasminogen K1. Purified plasmin was used as reference.

Activation of plasminogen bound to fibrin surfaces and matrix proteins by monocytes or EMPs

Glu-plasminogen at 1 μ M was incubated with the fibrin surfaces or with immobilized fibronectin or laminin. In parallel experiments, fibronectin (50 μ g/mL) and plasminogen (1 μ M) were simultaneously incubated and allowed to bind to the surface of fibrin. Unbound proteins were discarded by washing, and plasminogen bound to fibrin surfaces or to immobilized fibronectin and laminin was incubated with various concentrations of either THP-1 cells or EMPs in the presence of CBS0065. The transformation of bound plasminogen into plasmin was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline as indicated in "Activation of platelet-bound plasminogen by monocytes or neurons." After the activation reaction, the supernatant was collected, the plates were washed with PBS, and matrix-bound plasmin was detected by adding 0.75mM CBS0065. To quantitate degradation of the fibrin surface, the plates were again washed and then incubated with a mAb (FDP-14) that specifically recognizes fibrin fragmentation, as described.³⁰ Degradation of fibronectin in the supernatant was detected by Western blot as described.²²

Statistical analysis

Data are expressed as mean plus or minus SEM. The statistics were performed with the use of nonparametric tests of Kruskal-Wallis and of Mann-Whitney (StatView 5 software; SAS Institute). Statistical significance was set at *P* less than .05.

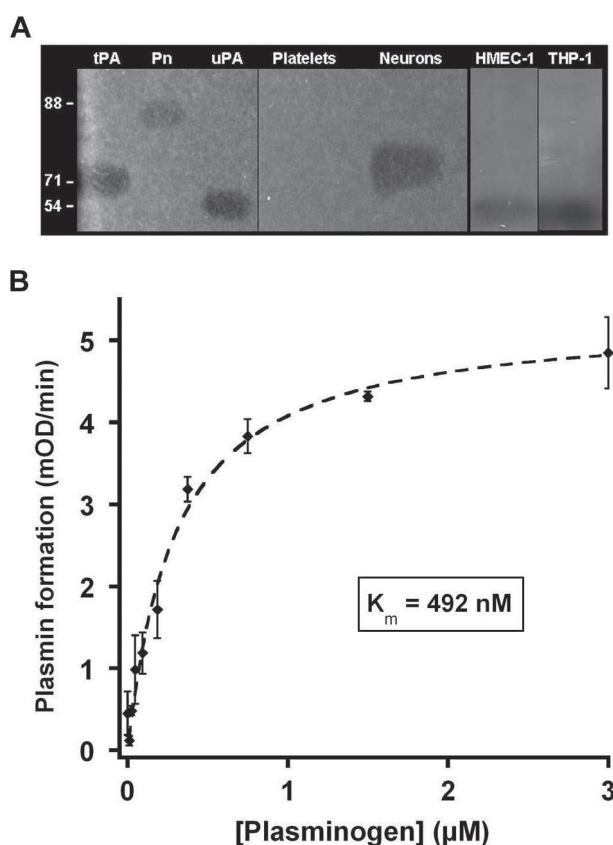


Figure 1. Identification of activators and cellular activation of plasminogen. (A) Fibrin zymography of platelets, cortical neurons, HMEC-1 cells, and THP-1 cells. The samples were electrophoresed on 8% (wt/vol) polyacrylamide, SDS was then exchanged with 2.5% (wt/vol) Triton X-100, and the gel was overlaid on a fibrin-agarose indicator gel. The picture was taken after 4 hours at 37°C. The position of purified controls (Pn indicates plasmin; tPA, and uPA) is indicated on top. The thin vertical line indicates assembly from the same gel. The thick vertical line separates 2 different gels. (B) THP-1 cells (10^5 cells/well) were incubated with various concentrations of plasminogen (0–3 μ M) and 0.75mM CBS0065. Kinetics of plasmin formation (mOD/minute) was followed by measuring the release of *p*-nitroaniline. Data were fitted according to the Michaelis-Menten equation ($K_m = 492\text{nM}$).

Results

Plasminogen activation on cells

To illustrate the accepted mechanism of plasmin formation by coassembly of plasminogen and its activators at the same cell surface, plasminogen activation experiments were performed on cultured cells. THP-1 and endothelial cells were shown to express active uPA at their membrane, identified by fibrin zymography of cell lysates (Figure 1A) on the basis of its molecular mass (M_r 54 000) and its inhibition with polyclonal anti-uPA immunoglobulin G added to the indicator fibrin gel (not shown). Similar results were obtained with human monocytes (not shown). A fibrinolytic band corresponding to tPA (M_r 70 000) was detected in lysates of mouse cortical neurons. In contrast, neither tPA nor uPA activity could be detected in the lysates of human platelets. The presence of uPA and uPAR on EMPs was shown by immunoelectron microscopy and flow cytometry as described previously.¹⁹ THP-1 and cortical neurons in culture were able to activate plasminogen at their surface in a specific and dose-dependent manner until saturation was reached (Figure 1B; THP-1, $K_m = 492\text{nM}$; neurons, $K_m = 49 \pm 9\text{nM}$, not shown), in agreement with previous studies.^{33,39,40}

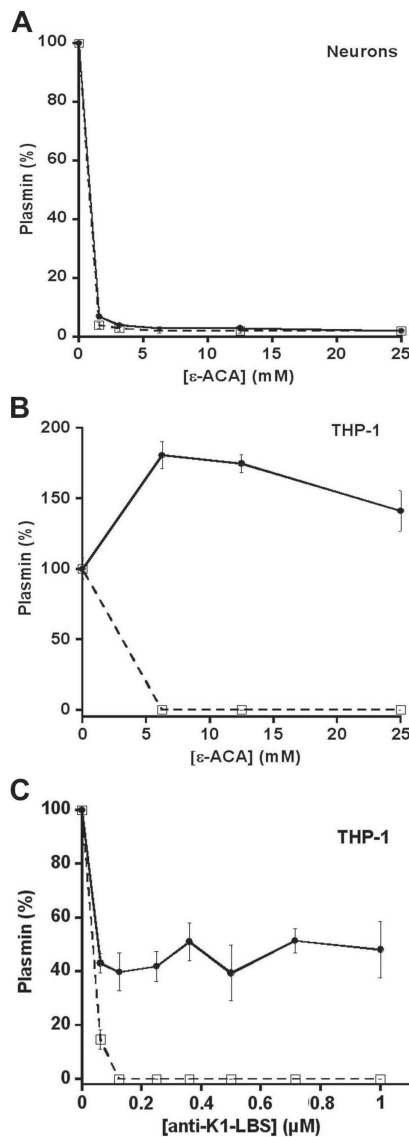


Figure 2. Cellular activation of plasminogen: effect of LBS ligands. (A) Cortical neurons (10^5 cells/well) and (B) THP-1 cells (10^5 /well) were incubated with 125nM Glu-plasminogen supplemented with various concentrations of ϵ -ACA (0–25mM) and 0.75mM CBS0065. Plasmin formation (●) was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline. (C) THP-1 cells (10^5 /well) were incubated with 125nM Glu-plasminogen supplemented with 0 to 1 μ M anti-K1-LBS mAb 34D3 and 0.75mM CBS0065. (A–C) After detection of plasmin formation, the cells were washed twice with PBS and incubated with 0.75mM CBS0065 to detect cell-associated plasmin (□). Results are expressed as a percentage (mean \pm SD; $n = 3$) of plasmin formation or of cell-associated plasmin activity in the absence of ϵ -ACA or mAb.

Contrasting effects of ϵ -ACA on plasmin formation by cell plasminogen activators

The activation of plasminogen by neuronal tPA was completely inhibited by the lysine-analog ϵ -ACA (Figure 2A), in agreement with a previous report.³³ These data indicate that inhibition of plasminogen binding to the cell surface by ϵ -ACA prevents the formation of plasmin in situ by cells that express tPA.^{21,22} Surprisingly, cells that express uPA activate Glu-plasminogen despite the presence of ϵ -ACA (THP-1; Figure 2B). Because plasmin could not be shown at the cell surface (Figure 2B dotted line), our data suggest that plasminogen was activated on contact of ϵ -ACA-liganded plasminogen with uPA-bearing THP-1 cells. Because ϵ -ACA blocks both K1- and K4-LBS of plasminogen, we

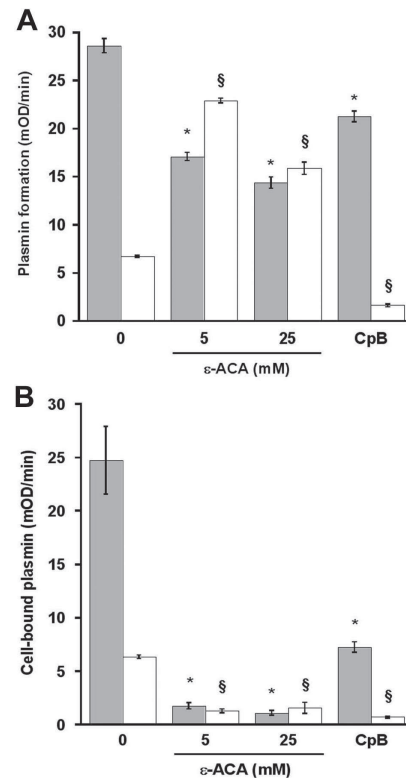


Figure 3. Effect of ϵ -ACA and carboxypeptidase B on Lys- and Glu-plasminogen activation by cellular uPA. THP-1 cells (10^5 /well) were incubated with 500nM Lys- (■) or Glu-plasminogen (□) in medium alone or supplemented with ϵ -ACA (5 or 25mM) and 0.75mM CBS0065. Carboxypeptidase B, CpB (50 μ g/mL), pretreated THP-1 cells were incubated with plasminogen and CBS0065. Rate of plasmin formation (A) and amount of cell-associated plasmin (B) were detected as indicated in Figure 2. Bars represent the amount of plasmin formed or associated to the cells (mOD/minute) versus the concentration of ϵ -ACA or after CpB treatment (mean \pm SEM; $n = 3$). Significant changes compared with Lys-Pg (* $P < .05$)/Glu-Pg (§ $P < .05$) alone.

further explored the role of K1-LBS, known to be directly implicated in plasminogen binding, using the specific mAb anti-K1-LBS, 34D3. Neutralization of K1-LBS by mAb 34D3 impaired binding of plasminogen to the cell surface, and, as a consequence, cell-bound plasmin could not be detected on THP-1 cells (Figure 2C dotted line). However, and similarly to the effect of ϵ -ACA (Figure 2B), the formation of plasmin was apparent in the supernatant despite the inhibition of plasminogen binding (Figure 2C). These results indicate that Glu-plasminogen in complex with molecular probes that selectively block the LBS of K1 (ϵ -ACA or the anti-LBS-K1 mAb) adopts a conformation that could be recognized and activated by uPA-bearing cells.

Distinct effects of ϵ -ACA on Glu- and Lys-plasminogen activation by cellular uPA

To understand the role of conformational transitions of plasminogen (closed \rightleftharpoons open) on plasmin formation by cellular uPA, we compared the activation of equimolar amounts of either Glu- or Lys-plasminogen in the absence and presence of ϵ -ACA (Figure 3). In the absence of ϵ -ACA, Lys-plasminogen is activated 4.5-fold faster than native Glu-plasminogen (Figure 3A), and the amount of plasmin that remained bound to THP-1 cells shows a similar relationship (Figure 3B). The addition of ϵ -ACA has no stimulating effect on Lys-plasminogen. In contrast, ϵ -ACA produced a 2.3-fold increase in plasmin formation from Glu-plasminogen, in agreement with data shown in Figure 2B. The rate of Glu-plasminogen

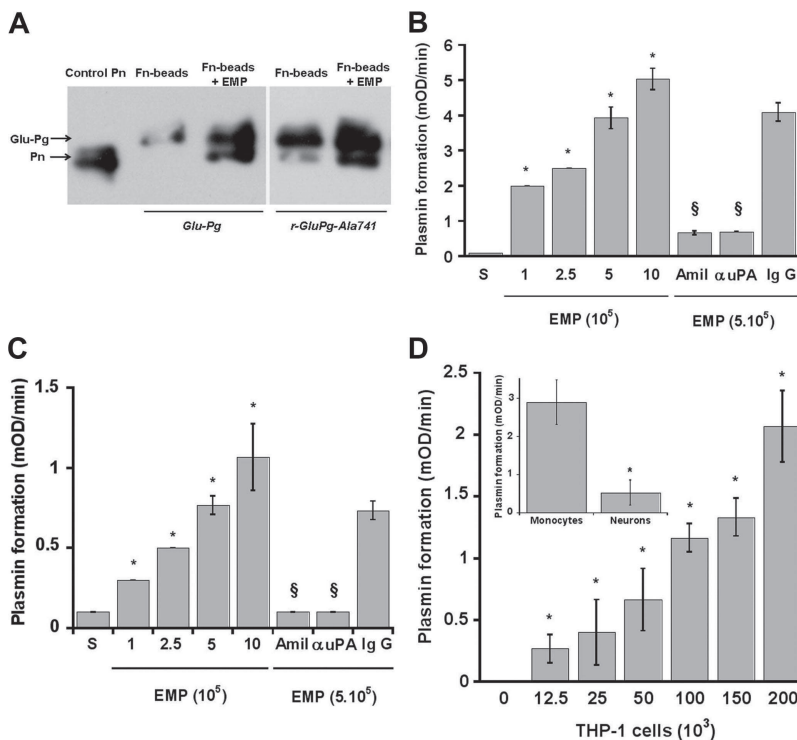


Figure 4. Fibrinolytic cross-talk: activation of fibrin- and fibronectin-bound plasminogen by cellular MPs. (A) Native or recombinant active site-inactivated Glu-plasminogen (Glu-Pg, r-Pg-Ala⁷⁴¹) at 1 μ M was bound to fibrin-coated beads for 1 hour at 37°C. Fibrin-coated beads with bound plasminogen were then incubated with 10⁶ EMPs in a final volume of 200 μ L. After overnight incubation at 22°C, the fibrin-coated beads were sedimented by centrifugation and resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 10% SDS to elute fibrin-bound plasminogen derivatives. The supernatant was electrophoresed under nonreducing conditions, proteins were transferred to PVDF membranes and revealed with a horseradish peroxidase-conjugated mAb (150 ng/mL) directed against plasminogen K1. The Western blot shows Glu-plasmin formation by EMPs. Purified plasmin is shown as reference. (B-C) Glu-plasminogen (1 μ M) was bound to fibrin (B) or fibronectin (C) surfaces. After 3 washes with PBS, EMPs were added at various concentrations. (D) Glu-plasminogen (1 μ M) was bound to fibrin surfaces (main graph) or to fibrin-coated beads (inset). THP-1 cells were then added to fibrin surfaces at various concentrations (main graph) and 2.5 \times 10⁵ fibrin-coated beads were incubated with 10⁵ adherent monocytes or neurons (inset). The formation of plasmin was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline from the chromogenic substrate CBS0065 added at 0.75 mM. Bars represent the amount of plasmin formed (mOD/minute; mean \pm SEM; n = 3) by THP-1 cells on fibrin (B,D) and fibronectin (C), and by adherent monocytes or neurons on fibrin-coated beads (D inset). Amil indicates amiloride; IgG, antibody against uPA and its nonimmune IgG control. *Significant changes compared with activation without THP-1 (A) or EMPs (B-C) or activation on neurons ($P < .05$); §changes with inhibitors compared with activation at 5 \times 10⁵ EMPs ($P < .05$).

activation approaches the value obtained for Lys-plasminogen, whereas cell-bound plasmin was undetectable for both Glu- and Lys-plasminogens (Figure 3B).

The activation experiments were then performed in the presence of CpB to eliminate plasminogen binding and activation onto C-ter Lys residues. Our data (Figure 3) indicate that, at the concentration of CpB used (50 μ g/mL), the activation of Glu-plasminogen (Figure 3A) at the cell surface and the amount of cell-bound plasmin (Figure 3B) were markedly decreased. In contrast, the activation of Lys-plasminogen (Figure 3A) was only moderately modified by CpB despite an important reduction in cell-bound plasmin (Figure 3B), suggesting that activation at the cell membrane was practically absent. These results indicate that cell-bound uPA is able to recognize and activate Lys-plasminogen and the Lys-like Glu-plasminogen conformation induced by ϵ -ACA without requirement for molecular coassembly on the same cell surface.

Plasmin generation via a proteolytic cell-to-matrix cross-talk

It has been generally accepted that the extended open conformation adopted by ϵ -ACA-liganded Glu-plasminogen mimics plasminogen bound to lysine residues in fibrin, ECM, or cells. We therefore hypothesized on the basis of the above data (Figures 2–3) that Glu-plasminogen bound to fibrin, matrix proteins, or cell membranes may be recognized and activated by other cells or cell-derived MPs present in the microenvironment and expressing uPA/uPAR complexes at their membrane. To verify this hypothesis, we analyzed the activation of r-Pg-Ala⁷⁴¹ a recombinant active site-inactivated plasminogen, bound to fibrin-coated beads, by uPA-bearing EMPs. The r-Pg-Ala⁷⁴¹ can bind to surface C-ter Lys and be cleaved into inactive Glu-plasmin by activators.²⁶ Therefore, if its binding to fibrin-coated beads induces a conformational change, it should be recognized and activated by uPA present on EMPs. Functionality of the cross-talk was verified using native Glu-plasminogen and measuring plasmin activity. Figure 4A shows that the recognition and activation of fibrin-bound r-Pg-Ala⁷⁴¹ by

uPA-bearing EMPs results in the formation of inactive Glu-plasmin at the surface of fibrin. Formation of Lys-plasminogen was not an intermediary step in the cross-talk mechanism, supporting the view that Glu-plasminogen bound to fibrin adopts a conformation that is recognized by EMPs bearing uPA. To further verify this hypothesis, we determined the generation of plasmin activity during a matrix-to-cell cross-talk between matrix-bound native Glu-plasminogen and EMPs or monocytes. Fibrin-bound plasminogen was efficiently activated, proportionally to the number of EMPs incubated with the fibrin surface (Figure 4B). In a similar manner, plasminogen-bound to the ECM protein fibronectin (Figure 4C) and laminin (supplemental Figure 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) was efficiently activated by EMPs. This activation was inhibited in the presence of amiloride or an anti-uPA specific antibody. Plasminogen bound to fibrin could also be specifically activated by uPA-bearing THP-1 cells in a cell concentration-dependent manner (Figure 4D main graph) and by adherent monocyte-borne uPA (Figure 4D inset). In contrast tPA-bearing adherent neurons failed to generate plasmin (Figure 4D inset). Plasmin formed on fibrin surfaces resulted in fibrinolysis as indicated by the specific binding of the mAb FDP-14 directed against fibrin degradation products, in agreement with previous published data.²⁷ In a similar fashion, the fibronectin in complex with fibrin was degraded by plasmin as detected by Western blot (data not shown).

Plasmin generation via a proteolytic cell-to-cell cross-talk

Cell-to-cell cross-talks were studied between platelets bearing plasminogen and cells bearing either uPA or tPA (monocytes and neurons, respectively) or EMPs. Platelets were pretreated with plasmin to enhance the number of plasminogen binding sites.³⁸ After binding of plasminogen to platelets no conversion to plasmin was detected in agreement with a previous report.⁴¹ To avoid Glu-plasminogen transfer from platelets to cells bearing the plasminogen activators, monocytes and neurons were pretreated

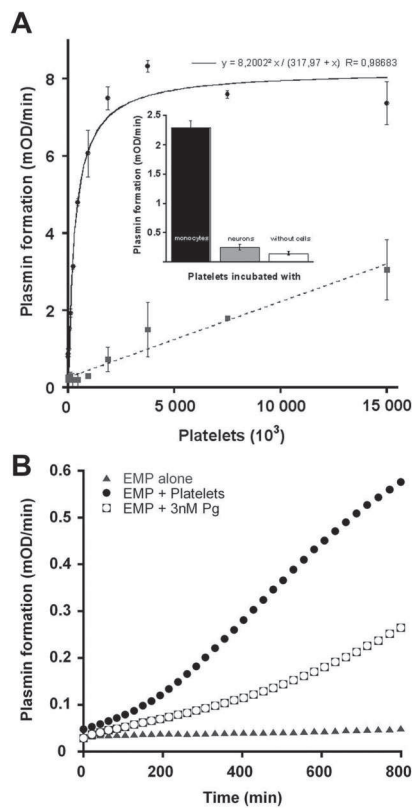


Figure 5. Proteolytic cross-talk: activation of platelet-bound plasminogen by cells bearing uPA (monocytes) or tPA (neurons). Glu-plasminogen ($2\mu\text{M}$) was bound to platelets as indicated in "Activation of platelet-bound plasminogen by monocytes or neurons." (A) After treatment with $50\mu\text{g/mL}$ CpB, monocytes (●) or neurons (■) were incubated with plasminogen-bearing platelets at various concentrations (0 – 1.5×10^6 /well) in the presence of 0.75mM CBS0065. The formation of plasmin (mOD/minute) was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline. (Inset) Detection of plasmin formation on platelets (1.8×10^6) in the absence of cells or incubated with monocytes or neurons (10^5 cells). Results are expressed as the rate of plasmin formation (mean \pm SEM; $n = 3$). (B) After treatment with $50\mu\text{g/mL}$ CpB, EMPs were incubated with 5×10^6 platelets bearing plasminogen or with 3nM plasminogen (concentration equivalent to that bound to platelets), or with buffer in the presence of 0.75mM CBS0065. The formation of plasmin (mOD/minute) was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline. Results are expressed as rate of plasmin formation ($n = 3$). A representative experiment is shown.

with CpB. Under these conditions, the extent of platelet-bound Glu-plasminogen transformation into plasmin by uPA-bearing monocytes is dependent on platelet number added until saturation (Figure 5A). In contrast to full plasminogen activation on 1.8×10^6 platelets by monocyte-bearing uPA, plasmin formation on platelets incubated with tPA-bearing neurons was approximately 10% (Figure 5A) and did not reach saturation at higher platelet concentrations. Moreover, Lys-plasminogen bound to platelets could not be activated by neuronal tPA as well (supplemental Figure 2). No plasmin was detected on monocytes or neurons surfaces, indicating that plasmin was indeed generated on the platelet surface and remained associated with the platelet (not shown). Plasmin formation on platelets in the absence of cells was undetectable at 1.8×10^6 plasminogen-bearing platelets (Figure 5A inset).

Platelet-bound plasminogen could also be activated by EMPs as indicated in Figure 5B. Because EMPs were pretreated with CpB, we exclude the possibility of plasminogen exchange during the cross-talk. Plasmin was therefore formed at the surface of platelets in contact with EMPs. The rate of plasmin formation during the platelet/EMP cross-talk ($V_i = 0.54 \pm 0.14$ mOD/minute) was higher

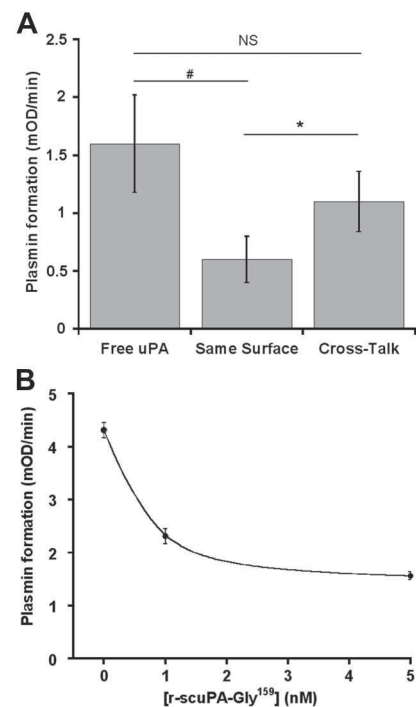


Figure 6. Efficiency and specificity of the plasminogen cross-talk. Glu-plasminogen ($2\mu\text{M}$) was bound to platelets as indicated in "Activation of platelet-bound plasminogen by monocytes or neurons." (A) After treatment with $50\mu\text{g/mL}$ CpB, adherent monocytes were incubated with 5×10^6 platelets bearing plasminogen (cross-talk) or with plasminogen (concentration equivalent to plasminogen bound to platelets; same surface) in the presence of 0.75mM CBS0065. In a parallel experiment, uPA (concentration equivalent to uPA bound to monocytes) was incubated with 5×10^6 platelets bearing plasminogen (free uPA) in the presence of 0.75mM CBS0065. Results are expressed as the rate of plasmin formation (mean \pm SEM; $n = 3$; triplicates). NS indicates nonsignificant ($P = .078$), * $P < .005$, # $P < .014$. (B) Monocytes were incubated with 1nM of native uPA and various concentrations of a nonactive mutant uPA (r-scuPA-Gly¹⁵⁹). Monocytes were then incubated with 5×10^6 platelets bearing plasminogen, in the presence of 0.75mM CBS0065. The formation of plasmin (mOD/minute) was detected by measuring the release of *p*-nitroaniline (mean \pm SEM; $n = 2$; triplicates). A representative experiment is shown ($P = .023$; 0 vs 5nM r-scuPA-Gly¹⁵⁹).

than the rate of plasminogen activation ($V_i = 0.32 \pm 0.06$ mOD/minute) on EMPs supplemented with an amount of plasminogen equivalent to that present on platelets (Figure 5B). To further investigate the relevance of the intercellular cross-talk mechanism, the formation of plasmin by a platelet/monocyte cross-talk was compared with activation of plasminogen by uPA on the same cell surface (monocytes); for the purpose of demonstration, we also studied the activation of platelet-bound plasminogen by free uPA. Equivalent amounts of either plasminogen or uPA were used in all cases. The results are shown in Figure 6A. The cross-talk mechanism resulted in a higher rate ($V_i = 1.1 \pm 0.26$ mOD/minute) of plasmin formed compared with activation on the same cell surface ($V_i = 0.6 \pm 0.2$ mOD/minute; $P = .005$), thus qualifying the efficiency of the cross-talk mechanism. Addition of free uPA to platelets resulted in a nonsignificant ($P = .078$) increase in plasmin formation compared with the cross-talk. However, free uPA cannot be a relevant plasminogen activator, because most unbound uPA in physiologic fluids is complexed to plasminogen activator inhibitor-1. Specificity of the cross-talk between platelet-bound plasminogen and uPA-bearing monocytes was established by the ability of a recombinant inactive form of scuPA (r-scuPA-Gly¹⁵⁹) to inhibit the formation of plasmin (64% inhibition at 5nM ; Figure 6B).

Discussion

Specific fibrinolytic and pericellular proteolytic functions of plasmin are determined by *in situ* molecular coassembly of plasminogen and its activators on cell receptors or on binding sites present on macromolecular complexes (fibrin or matrix surfaces).^{18,42} The use of tPA as a thrombolytic agent and the pericellular proteolytic activity of uPA-bearing cells are based on this paradigm.^{18,42} It has also been suggested that monocyte-uPA reduces thrombus size,⁴³ and we have recently shown that EMPs carrying uPA derived from the parent cell generate plasmin activity.¹⁹ We now show that uPA anchored on monocytes or EMPs recognizes and transforms into plasmin, Glu-plasminogen bound to platelets, fibrin, or ECM proteins (fibronectin, laminin). This new activation mechanism bypasses the requirement for molecular coassembly on the same surface, via a recognition and proteolytic cross-talk pathway. Because in this plasminogen activation cross-talk, plasmin is efficiently generated on platelets or on matrix surfaces by uPA-bearing cells or MPs, it may be of potential physiologic relevance in fibrinolysis or degradation of ECM components. Note that this mechanism complies with the prerequisite for activation of plasminogen on biologic surfaces, ie, plasminogen binding to C-ter Lys residues of platelets, fibrin, or ECM.¹⁸ However, it essentially differs in that the uPA is expressed on neighboring cells or MPs and in that cells bearing tPA do not reproduce this effect.

It is generally accepted that Glu-plasminogen bound to fibrin and cell surfaces adopts an open conformation similar to that induced by the C-ter Lys analog ϵ -ACA.^{6,9,13} This conformation is called Lys-like because it is similar to the conformation of truncated Lys-plasminogen as defined by electron microscopy and small-angle neutron scattering.^{8,13} The induction of an open conformation by this lysine analog has previously been shown and is well described in the literature (reviewed by Markus⁹). On the basis of this analogy and because Lys-plasminogen, the natural open form, is activated by uPA at a higher rate than Glu-plasminogen,^{10,23,24} we investigated whether ϵ -ACA-liganded Glu-plasminogen, which is unable to bind to C-ter Lys, could be activated by uPA- or tPA-bearing cells or EMPs. We demonstrate that, although ϵ -ACA-liganded Glu-plasminogen cannot bind to fibrin or cells, it was selectively activated by uPA-bearing cells. Furthermore, at equimolar concentrations, the rate of activation of Glu-plasminogen/ ϵ -ACA complexes was higher than that of Glu-plasminogen alone, in the absence of both plasminogen binding to the cell surface and free uPA activity in the medium.

Glu-plasminogen/ ϵ -ACA complexes were efficiently activated despite the cleavage of C-ter Lys on cells by CpB. Thus, ϵ -ACA-liganded Glu-plasminogen behaves as a surrogate that ensures surface-like binding conformational changes leading to its recognition and activation.

Because the LBSs of both K1 and K4 are simultaneously occupied by ϵ -ACA, we used the specific LBS-targeted 34D3 mAb to disclose the role of K1. This mAb completely inhibits plasminogen binding and activation by tPA, thus underlining the role of K1 in the initial phase of plasmin formation.³¹ In contrast, despite the inhibition of Glu-plasminogen binding and formation of plasmin at their surface, cells bearing uPA were able to activate Glu-plasminogen in the cellular microenvironment. These results indicate that uPA- but not tPA-bearing cells recognize the extended open conformation adopted by Glu-plasminogen in complex with ϵ -ACA or mAb 34D3. In a similar fashion, we demonstrated in a previous study²⁶ that Glu-plasminogen bound to C-ter Lys residues

of fibrin during ongoing fibrinolysis^{27,44} was specifically recognized and activated by scuPA.²⁶ Furthermore, using a fibrin- or platelet-bound r-Pg-Ala⁷⁴¹ in cross-talk with uPA-bearing EMPs, we demonstrate that the active site-inactivated recombinant plasminogen was cleaved into inactive Glu-plasmin *in situ* without being transformed into Lys-plasminogen. We therefore hypothesized that Glu-plasminogen bound to C-ter Lys of cell membranes, fibrin, or matrix proteins may be recognized and activated by uPA/uPAR complexes expressed on other cells or cell-derived MPs present in the microenvironment.

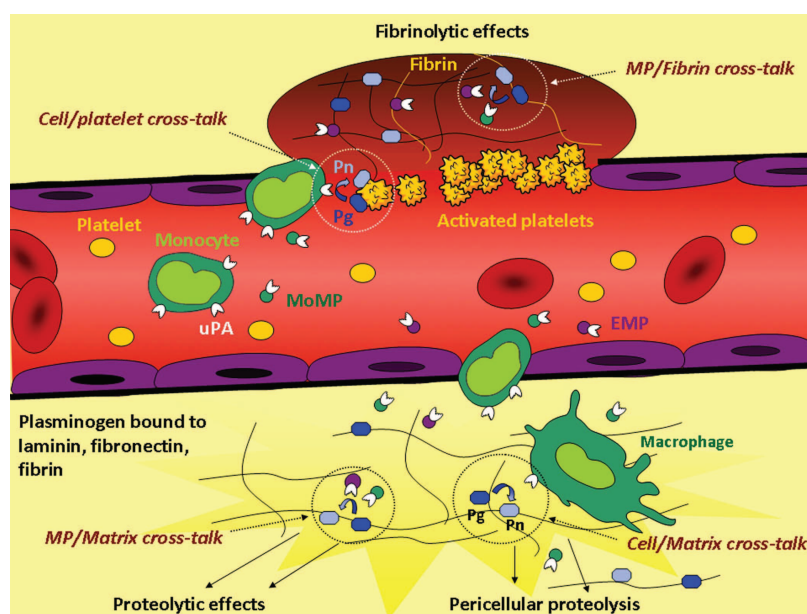
First, we demonstrated that human EMP- or monocyte-borne uPA, but not tPA-bearing cells, was able to specifically activate platelet-bound Glu-plasminogen in a dose- and saturating-dependent manner. The rate of plasmin formation on platelets by monocytes was increased 2-fold over the activation of plasminogen at the monocyte surfaces. The specificity of the uPA-driven proteolytic cross-talk was shown by its inhibition with a recombinant form of uPA having no activator activity. The fibrinolytic cross-talk mechanism bypasses the requirement for assembly of profibrinolytic proteins on the same surface, introduces a complementary and new dimension for enhancement of fibrinolysis by platelets,^{41,45} and its efficiency suggests a potential physiologic relevance. Indeed, occupancy of platelets by plasma Glu-plasminogen and a direct relation between platelet number and degree of clot lysis has been previously reported.^{46,47} Because human platelets have been shown not to express uPAR,⁴⁸ these observations are in agreement with our data showing a direct relationship between platelet number and plasmin generation by uPA-bearing monocytes or its derived MPs. Thus, platelet-bound plasminogen activated by monocytes or MPs bearing uPA could be an additional source of plasmin in the fibrin clot as recently suggested.⁴³ Our results also suggest that procedures that increase plasminogen binding to platelets may be a new direction in pharmacologic enhancement of platelet fibrinolytic functions.

Second, using a similar approach, we demonstrated that Glu-plasminogen bound to fibrin surfaces, to ECM proteins (fibronectin, laminin), or to fibrin/fibronectin complexes was selectively recognized and activated into plasmin by uPA expressed on cells or EMPs. This mechanism of cross-talk may be of physiologic relevance because it has recently been reported that monocytes may be involved in clot dissolution.^{43,49} Because activated monocytes and macrophages release MPs that may bear uPA, it is possible that these MPs may participate in activation of fibrin- or platelet-bound plasminogen. Indeed, leukocyte-derived MPs has been found in atherosclerotic plaques,⁵⁰ where they can initiate fibrinolytic or proteolytic activities that may destabilize the atheroma plaque. A similar interaction may take place during inflammatory processes in which primed cells could initiate a proteolytic cross-talk with plasminogen bound to other cells or to the matrix as suggested in the proposed model (Figure 7).

Altogether, these data provide a mechanistic support to the proteolytic cross-talk mechanism described above and suggest that, in inflammatory states or in cancer, plasminogen bound to platelets, fibrin, extracellular matrices, or adherent cells could be efficiently activated by uPA expressed on migrating cells or cellular MPs. For instance, plasminogen bound to cells may be transported into not easily accessible tissues such as the brain and be activated *in situ* by resident or migrating glial cells expressing uPA.⁵¹

In conclusion, we propose a new mechanism for plasmin formation that not only does bypass the requirement for coassembly of plasminogen and uPA on the same surface, but it also makes

Figure 7. Model of fibrinolytic and proteolytic cross-talk. In inflammatory processes of the vascular wall, activation of coagulation leads to fibrin deposits. Within this setting and according to data presented here, the fibrinolytic cross-talk mechanism could be an intermediary pathway for fibrinolysis and pericellular proteolysis. Fibrinolytic effects (top): plasminogen (Pg) bound to fibrin or to platelets could be activated by either monocyte- or MP-borne uPA (EMP or monocyte-derived microparticle [MoMP]). In ECM remodeling in the vascular wall (bottom), plasminogen bound to matrix components could be activated by MP-borne uPA (EMP or MoMP) or by macrophage-borne uPA.



Lys-plasminogen dispensable. These heterotypic cell-to-cell (platelets/monocytes; platelets/MPs), cell-to-matrix (THP-1/fibrin), or MPs-to-matrix (MPs/fibrin) proteolytic cross-talk represents an alternative pathway for localized plasmin formation that may be relevant to processes implicating cell migration and MP dissemination, ie, inflammation or angiogenesis. Finally, our data provide additional evidence for a novel role of MPs and platelets, as vectors that generate and propagate plasmin fibrinolytic and/or proteolytic activity, and could thereby constitute a pharmacologic tool.

Acknowledgments

This work was supported by funds from Inserm and the Lower-Normandy Regional Council. E.A.-C., L.D., and L.P. are members of the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 201024. The Center for Molecular and Vascular Biology is supported by the Excellentie financiering, KULeuven. T.D. is a recipient of a PhD fellowship awarded by the Nouvelle Societ e Francaise d'Athérosclérose. L.D.

is a recipient of a PhD fellowship from the Education and Research French Ministry.

Authorship

Contribution: T.D. and L.D. performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; R.L. performed research and participated in manuscript drafting; L.P. provided experimental support and participated in manuscript drafting; F.D.-G. analyzed data and participated in manuscript drafting; H.R.L. contributed analytical tools and participated in manuscript drafting; and E.A.-C. designed the research, analyzed data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for T.D. is Inserm, U698, Paris, France.

Correspondence: Eduardo Angl s-Cano, Inserm U919 Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, GIP Cyceron/Bd Henri Becquerel, 14074-cdx, Caen, France; e-mail: eduardo.angles-cano@inserm.fr or angles@cyceron.fr.

References

- Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem*. 1990;265(11):6104-6111.
- Tulinsky A, Park CH, Mao B, Llinas M. Lysine/fibrin binding sites of kringle modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin. *Proteins*. 1988;3(2):85-96.
- Herren T, Swaisgood C, Plow EF. Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci*. 2003;8:d1-d8.
- Lucas MA, Fretto LJ, McKee PA. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J Biol Chem*. 1983;258(7):4249-4256.
- Knudsen BS, Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL. Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261(23):10765-10771.
- Cockell CS, Marshall JM, Dawson KM, Cederholm-Williams SA, Ponting CP. Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem J*. 1998;333(Pt 1):99-105.
- Tranqui L, Prandini MH, Chapel A. The structure of plasminogen studied by electron microscopy. *Biol Cell*. 1979;34:39-42.
- Weisel JW, Nagaswami C, Korsholm B, Petersen LC, Suenson E. Interactions of plasminogen with polymerizing fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linker and electron microscopy. *J Mol Biol*. 1994;235(3):1117-1135.
- Markus G. Conformational changes in plasminogen, their effect on activation, and the agents that modulate activation rates—a review. *Fibrinolysis*. 1996;10(2):75-85.
- Clayes H, Vermeylen J. Physico-chemical and proenzyme properties of NH2-terminal glutamic acid and NH2-terminal lysine human plasminogen. Influence of 6-aminohexanoic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1974;342(2):351-359.
- Thorsen S, Mullertz S. Rate of activation and electrophoretic mobility of unmodified and partially degraded plasminogen. Effects of 6-aminohexanoic acid and related compounds. *Scand J Clin Lab Invest*. 1974;34(2):167-176.
- Markus G, Evers JL, Hobika GH. Comparison of some properties of native (Glu) and modified (Lys) human plasminogen. *J Biol Chem*. 1978;253(3):733-739.
- Mangel WF, Lin BH, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science*. 1990;248(4951):69-73.
- Sj holm I. Studies on the conformational changes of plasminogen induced during activation to plasmin and by 6-aminohexanoic acid. *Eur J Biochem*. 1973;39(2):471-479.
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest*. 1993;92(2):679-685.
- Angles-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B,

- Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood*. 1985;66(4):913-920.
17. Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol*. 1987;105(6 Pt 1):2535-2541.
18. Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J*. 1995;9(10):939-945.
19. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007;110(7):2432-2439.
20. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):324-333.
21. Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J*. 2003;17(10):1301-1303.
22. Rossignol P, Ho-Tin-Noe B, Vranckx R, et al. Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10346-10356.
23. Violand BN, Byrne R, Castellino FJ. The effect of alpha-omega-amino acids on human plasminogen structure and activation. *J Biol Chem*. 1978;253(15):5395-5401.
24. Waither PJ, Hill RL, McKee PA. The importance of the preactivation peptide in the two-stage mechanism of human plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1975;250(15):5926-5933.
25. Peltz SW, Hardt TA, Mangel WF. Positive regulation of activation of plasminogen by urokinase: differences in Km for (glutamic acid)-plasminogen and lysine-plasminogen and effect of certain alpha-omega-amino acids. *Biochemistry*. 1982;21(11):2798-2804.
26. Fleury V, Lijnen HR, Angles-Cano E. Mechanism of the enhanced intrinsic activity of single-chain urokinase-type plasminogen activator during ongoing fibrinolysis. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18554-18559.
27. Fleury V, Angles-Cano E. Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry*. 1991;30(30):7630-7638.
28. Busby SJ, Mulvihill E, Rao D, et al. Expression of recombinant human plasminogen in mammalian cells is augmented by suppression of plasmin activity. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15286-15292.
29. Lijnen HR, Nelles L, Van Hoef B, Demarsin E, Collen D. Structural and functional characterization of mutants of recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator obtained by site-specific mutagenesis of Lys158, Ile159 and Ile160. *Eur J Biochem*. 1988;177(3):575-582.
30. Fleury V, Loyau S, Lijnen HR, Nieuwenhuizen W, Angles-Cano E. Molecular assembly of plasminogen and tissue-type plasminogen activator on an evolving fibrin surface. *Eur J Biochem*. 1993;216(2):549-556.
31. Ho-Tin-Noe B, Rojas G, Vranckx R, Lijnen HR, Angles-Cano E. Functional hierarchy of plasminogen kringle 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis. *FEBS J*. 2005;272(13):3387-3400.
32. Siciliano JC, Gelman M, Girault JA. Depolarization and neurotransmitters increase neuronal protein tyrosine phosphorylation. *J Neurochem*. 1994;62(3):950-959.
33. Ho-Tin-Noe B, Enslin H, Doeuve L, Corsi JM, Lijnen HR, Angles-Cano E. Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42(4):288-295.
34. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. 1992;99(6):683-690.
35. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;104(1):93-102.
36. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002;99(11):3962-3970.
37. Gaussem P, Grailhe P, Angles-Cano E. Sodium dodecyl sulfate-induced dissociation of complexes between human tissue plasminogen activator and its specific inhibitor. *J Biol Chem*. 1993;268(16):12150-12155.
38. Quimet H, Freedman JE, Loscalzo J. Kinetics and mechanism of platelet-surface plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochemistry*. 1994;33(10):2970-2976.
39. Gross TJ, Sitrin RG. The THP-1 cell line is a urokinase-secreting mononuclear phagocyte with a novel defect in the production of plasminogen activator inhibitor-2. *J Immunol*. 1990;144(5):1873-1879.
40. Soulat T, Dominguez M, Martin I, Angles-Cano E. Immobilisation of monocytes to a solid support: a model for the study of ligand-binding interactions and plasminogen activation at the cell surface. *Thromb Res*. 1999;96(6):473-480.
41. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem*. 1985;260(7):4303-4311.
42. Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*. 1978;272(5653):549-550.
43. Humphries J, Gossage JA, Modarai B, et al. Monocyte urokinase-type plasminogen activator up-regulation reduces thrombus size in a model of venous thrombosis. *J Vasc Surg*. 2009;50(5):1127-1134.
44. Suenson E, Lutzen O, Thorsen S. Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur J Biochem*. 1984;140(3):513-522.
45. Miles LA, Ginsberg MH, White JG, Plow EF. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J Clin Invest*. 1986;77(6):2001-2009.
46. Carroll RC, Radcliffe RD, Taylor FB Jr, Gerrard JM. Plasminogen, plasminogen activator, and platelets in the regulation of clot lysis. Reconstitution and patient studies. *J Lab Clin Med*. 1982;100(6):986-996.
47. Adelman B, Rizk A, Hanners E. Plasminogen interactions with platelets in plasma. *Blood*. 1988;72(5):1530-1535.
48. Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup M, et al. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *Am J Clin Pathol*. 1994;102(6):835-841.
49. Singh I, Burnand KG, Collins M, et al. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation*. 2003;107(6):869-875.
50. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):772-777.
51. Washington RA, Becher B, Balabanov R, Antel J, Dore-Duffy P. Expression of the activation marker urokinase plasminogen-activator receptor in cultured human central nervous system microglia. *J Neurosci Res*. 1996;45(4):392-399.

ARTICLE 3

Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for Fibrinolysis.

Romarc Lacroix¹, Laurent Plawinski^{2,3}, Stephane Robert¹, Loïc Dœuvre^{2,4}, Florence Sabatier¹, Francine Anfosso¹, Aurelie S. Leroyer⁵, Chantal M. Boulanger^{5,6}, Eduardo Angles-Cano^{2,3} and Françoise Dignat-George¹

¹Inserm, UMR-S608, Université Aix-Marseille, Marseille, France. ²Inserm, U919, ³CNRS, UMR6232, ⁴Université de Caen, Caen, France. ⁵Inserm, U970, Paris Cardiovascular Research Center – PARCC, Paris, France. ⁶Université Paris Descartes, UMR-S970, Paris, France

Blood. Article en révision.

Nos travaux précédents ont permis d'assigner une nouvelle fonction fibrinolytique aux MP dérivées d'HMEC-1. Nous avons montré l'existence d'un mécanisme original par lequel ces MPE constituent une surface catalytique efficace pour l'activation du plasminogène par l'u-PA fixée sur son récepteur u-PAR. Nous avons montré que ces MPE participent à un mécanisme de cross-talk entre surface des MP et surfaces cellulaires, fibrine ou matrice extracellulaire. Cependant la possibilité que des MP dérivées de cellules endothéliales primaires humaines ou des cellules hématopoïétiques du sang circulant puissent également servir de support à une activité protéolytique conduisant à la formation de plasmine *in vivo* n'a pas encore été explorée.

Nous avons donc formulé l'hypothèse que chez l'homme, les microparticules présentent dans la circulation sanguine ou dérivées de cellules endothéliales primaires pouvaient constituer un support efficace pour la formation de plasmine *in vivo*.

Dans ce travail, nous avons donc étudié la capacité de génération de plasmine de MP isolées de plasma de patients en situations pathologiques ou purifiées à partir des différentes sous-populations de cellules circulantes et de cellules endothéliales primaires.

Chez des patients souffrant de pathologies caractérisées par une vésiculation endothéliale accrue, nous avons mis en évidence une génération de plasmine détectable à

partir des MP circulantes. Nous avons montré que la formation de plasmine par les MP circulantes de patients présentant une athérosclérose ou une pathologie auto-immune comme le lupus érythémateux disséminé ou le PTT, est plus importante que pour les contrôles sains. L'identification des activateurs responsables de cette activité plasminogénolytique a révélé que non seulement l'u-PA mais aussi le t-PA sont impliqués, à des niveaux variables en fonction des patients et de l'existence de complexes entre le t-PA et son inhibiteur (PAI-1). Nous avons démontré que l'activité de génération de plasmine était portée par les MP dérivées de cellules endothéliales (MPE) et de leucocytes (MPL) mais était absente des MP d'origine plaquettaire ou érythrocytaire. Les MPL expriment de l'uPA et son récepteur l'uPAR tandis que les MPE expriment du t-PA et des complexes t-PA/PAI-1.

En conclusion, cette étude montre que dans la circulation sanguine, ce sont les sous populations minoritaires de MP, les MP d'origine endothéliale et leucocytaire, qui supportent l'activité fibrinolytique. Cette activité est modulée dans des pathologies cardiovasculaires et auto-immunes.

Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis

Short title: Fibrinolytic microparticles

Romarc Lacroix^{1*}, Laurent Plawinski^{2,3*}, Stephane Robert¹, Loïc Doeuve^{2,4}, Florence Sabatier¹, Francine Anfosso¹, Aurelie S. Leroyer⁵, Chantal M. Boulanger^{5,6}, Eduardo Angles-Cano^{2,3**} and Françoise Dignat-George^{1**}

¹Inserm, UMR-S608, Université Aix-Marseille, Marseille, France. ²Inserm, U919, ³CNRS, UMR6232, ⁴Université de Caen, Caen, France. ⁵Inserm, U970, Paris Cardiovascular Research Center – PARCC, Paris, France. ⁶Université Paris Descartes, UMR-S970, Paris, France

* These authors (alphabetical order) contributed equally to this work.

** Françoise Dignat-George (dignat@pharmacie.univ-mrs.fr) and **Eduardo Angles-Cano (Eduardo.Angles-Cano@inserm.fr) are corresponding authors and share senior authorship.

Françoise Dignat-George, Inserm UMR 608, UFR de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385-cdx Marseille 5, France, Tel: 33 4 91 83 56 00 Fax: 33 4 91 83 56 02

Eduardo Anglés-Cano, Inserm U919, GIP Cyceron, Bd Henri Becquerel, 14074, Caen, France. Tel 33 2 31 47 01 64 Fax 33 2 31 47 02 22

Word counts: Total text: 1287. Abstract: 146

Number of figures: 2

Number of references: 18

Scientific category: Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology

Abstract

We recently assigned a fibrinolytic function to endothelial-derived microparticles (MPs). We report now that plasmin generation is also detectable on circulating MPs from patients with diseases featuring increased vesiculation. For instance, plasmin formation on circulating MPs from patients with atherosclerotic or autoimmune disease was significantly higher than in healthy controls. Moreover, circulating MPs from thrombotic thrombocytopenic purpura patients generate a range of plasmin activity and express a variable content in either urokinase- (uPA) or tissue-type plasminogen activator (tPA) and complexes between tPA and its inhibitor (PAI-1). We further demonstrate that plasmin was generated on endothelial- and leukocyte-derived MPs, but was absent on MPs of platelet or erythrocyte origin. Leukocyte-derived MPs express uPA and its receptor uPAR whereas endothelial-derived MPs expressed tPA and tPA-PAI-1 complexes. In conclusion, our study indicates that endothelial- and leukocyte-derived MPs support fibrinolytic activity in the circulation that is modulated in pathological situations.

Key words: fibrinolysis; microparticle, plasmin(ogen), uPA, tPA, TTP

Introduction

Microparticles (MPs) are small vesicles resulting from membrane blebbing of most activated or apoptotic cells.¹ MPs detectable in the circulation are derived from blood and vascular cells. Over the past decade, they have been accepted as diagnostic and prognostic biomarkers in cardiovascular disorders. Accumulating evidence indicates that beyond their biomarker quality, MPs also convey various bioactive effectors implicating them in activation of coagulation, inflammation, vascular remodelling and angiogenesis.²⁻⁶ We recently assigned a new fibrinolytic function to MPs derived from the human microvascular endothelial cell line HMEC-1. We provided evidence for a novel mechanism by which these endothelial MPs (EMPs) constitute an efficient catalytic surface for the activation of plasminogen by the urokinase-type plasminogen activator (uPA) anchored to its receptor uPAR.⁷ However, the possibility that MPs derived from native endothelial and blood cells also serve as a template for plasmin formation and proteolytic activity *in vivo*, remain unsolved questions. We therefore sought to investigate whether MPs from pathological situations and MPs purified from different blood cell subpopulations and primary endothelial cells could be the source of fibrinolysis in the circulation.

Materials and Methods

Detailed materials and methods are described in a supplemental document (available online). Briefly, MPs from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP, n=11) were isolated and characterized by zymography, ELISA, flow cytometry and photometric assays for plasminogen activators and plasmin generation activity as described previously.⁷ We also performed MP analyses in patients with systemic lupus erythematosus (n=12) or with atherosclerosis (n=16), and in healthy subjects (n=36). Furthermore, MPs derived from human

circulating and primary endothelial cells were generated and evaluated using the previously quoted techniques.

Results and discussion

1. Circulating microparticles support in vivo a fibrinolytic activity that is modulated in pathological settings.

To investigate whether human MPs are involved in plasmin generation in vivo, we studied MPs isolated from patients with TTP a disease featuring increased vesiculation.^{8,9} A majority of the isolated MP samples (8 out of 11) generate plasmin activity upon incubation with 1 μ M plasminogen. Figure 1A shows plasmin generation (1.6-5.9 mOD/minute) in representative samples (2.10^5 MPs/well) that display a variable content in plasminogen activator activity. Platelet- (PMPs) or erythrocyte-derived MPs may not contribute to this activity as samples depleted in these MPs displayed a slight increase rather than a decrease in plasmin formation (figure1B). The observed increase in plasmin formation is most probably related to depletion in active PAI-1/vitronectin complexes present in PMPs.¹⁰ The inhibition of plasmin generation by ϵ -ACA was consistent with a lysine-dependent mechanism for plasminogen binding and activation (figure 1C).

The plasminogen activator activity in distinct samples was identified either as uPA or as tPA in fibrin-agarose gels as indicated by the position of their fibrinolytic band relative to known markers (figure 1D, upper panel). For instance, the single fibrinolytic band apparent in sample TTP C and the corresponding uPA standard were absent in a fibrin-agarose gel containing anti-uPA antibodies (figure 1D, lower panel). This antibody also inhibited plasmin formation by MPs from TTP 1 in a chromogenic assay (figure 1C). PTT sample D in figure 1D (representative of 3 samples) contained tPA and a main fibrinolytic band of high molecular mass corresponding to the position of tPA in complex with its inhibitor. This

sample also contained a minor uPA fibrinolytic band that was blocked in the presence of anti-uPA antibodies whereas tPA and its complexes retained their activity (figure 1D, lower panel). No direct plasmin fibrinolytic band could be observed in the MP samples.

We then investigated whether this plasminogen activator activity differs between healthy subjects and patients. Previously documented pathological situations associated with increased levels of MPs namely atherosclerotic complications (n=16) or systemic lupus erythematosus (n=22) were selected.^{11,12} As shown in figure 1E, the plasminogen activator activity of MPs was significantly higher in the two groups of patients compared to healthy controls (1.51 ± 1.43 mOD/minute and 1.62 ± 1.92 mOD/minute versus 0.57 ± 0.24 mOD/minute, $p < 0.001$).

These results provide the first evidence that human circulating MPs isolated from the plasma compartment, convey plasminogen activators, activate membrane-bound plasminogen and may generate plasmin activity in vivo. This MP activity suggests a compensatory fibrinolytic response to coagulation that maintains vessel patency. Its relevance in local or systemic fibrinolysis remains to be elucidated. As a first step in this endeavor, we determined the cell origin of the plasminogen activator activity.

2. The fibrinolytic activity is borne by microparticles originating from endothelial cells and leukocytes.

To determine which subpopulations of MPs activate plasminogen into plasmin, we generated MPs from both primary human endothelial cells and circulating blood cell subpopulations. Plasmin generation (figure 2A) was detected on endothelial MPs (EMPs) with variations according to their anatomical origin. The highest plasminogen activator activity was expressed by EMPs of renal artery origin (1.2 ± 0.2 mOD/minute) and the lowest by EMPs of dermal microvascular origin (0.03 ± 0.01 mOD/minute). By zymography, two fibrinolytic bands resistant to anti-uPA antibodies were observed in lysates of EMPs (figure

2B). One band corresponded to the migration of purified tPA whereas the other, of high molecular mass and higher intensity than the fibrinolytic activity of free tPA, corresponded to the migration of tPA in complex with its inhibitor (Cs in figure 2B), in agreement with a previous report.¹³ PAI-1 and tPA antigens were indeed detected in lysates of EMPs with a specific ELISA (figure 2C). The presence of tPA was further confirmed by flow cytometry (figure 2D). In contrast, uPA activity and antigen (figure 2E) were undetectable.

Plasminogen activator activity was also detected on leukocyte MPs (LMPs) of monocyte, lymphocyte and neutrophil origin but was absent in platelet- or erythrocyte-derived MPs (figure 2A). The presence of plasminogen activator activity on LMPs was further confirmed by a lytic band on zymography corresponding to the position of uPA (figure 2B) that was absent in the presence of antibodies to uPA (not shown). The expression of uPA and its receptor uPAR on the surface of LMPs was evidenced by flow cytometry (figure 2E). In parallel experiment, tPA antigen was undetectable on LMPs, PMPs or erythrocyte-derived MPs (figure 2D). Platelet and erythrocyte MPs (up to 5×10^6 MPs per well) failed to generate plasmin (figure 2A) or a fibrinolytic band (2C). Similar negative results on plasminogen activator activity were obtained when PMPs were generated using different platelet agonist combinations (collagen, thrombin and A23187) (not shown).

Collectively, given that both platelet and erythrocyte MP populations account for the bulk of circulating MPs,¹⁴ this is the first demonstration that plasminogen activator activity is borne by a minor fraction of MPs circulating in human blood i.e. endothelial and leukocyte MPs expressing either tPA or uPA/uPAR. This selectivity contrast with the well-described procoagulant potential common to all MPs.¹⁵

In summary, our study indicates that the plasminogen activator activity of circulating human MPs is supported by subpopulations of leukocyte or endothelial origin. This fibrinolytic activity was found increased in various pathological conditions, most probably as a compensatory response to coagulation. In contrast, we did not detect plasmin generation on

erythrocyte and platelet MPs. Accordingly, plasminogen activators have not been described on red blood cells and their expression by human platelets is not clearly demonstrated except for the ectopic production of uPA in the platelet Quebec syndrome.¹⁶ It is therefore possible that platelet-derived MPs may, in some cases, develop plasminogen activator activity. Indeed, since platelets bind plasminogen,¹⁷⁻¹⁹ PMPs may be a source of substrate for enhanced fibrinolysis by scuPA²⁰ via a fibrinolytic cross-talk mechanism demonstrated recently.²¹

3. Conclusion

We provide the first evidence that surface plasminogen activation is a functional feature of plasma MPs that significantly differ between healthy subjects and pathological samples. This activity is specifically supported by endothelial and leukocyte subpopulations of MPs, the quantitatively minor contributors to the pool of circulating MPs. Although the clinical signification of this activity remains to be defined, its measurement may be indicative of pathological processes involving endothelial- and leukocyte-derived MP proteolytic responses.

References

1. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21:157-171.
2. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 2002;51:2840-2845.
3. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002;160:673-680.
4. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;104:2649-2652.
5. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 2001;15:825-835.
6. Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1512-1518.

7. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007;110:2432-2439.
8. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol*. 2001;112:81-90.
9. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol*. 2003;123:896-902.
10. Podor TJ, Singh D, Chindemi P, et al. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J Biol Chem*. 2002;277:7529-7539.
11. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2004;91:667-673.
12. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1302-1311.
13. Angles-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B, Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood*. 1985;66:913-920.
14. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:772-777.
15. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2594-2604.
16. Kahr WH, Zheng S, Sheth PM, et al. Platelets from patients with the Quebec platelet disorder contain and secrete abnormal amounts of urokinase-type plasminogen activator. *Blood*. 2001;98:257-265.
17. Ouimet H, Freedman JE, Loscalzo J. Kinetics and mechanism of platelet-surface plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochemistry*. 1994;33:2970-2976.
18. Adelman B, Rizk A, Hanners E. Plasminogen interactions with platelets in plasma. *Blood*. 1988;72:1530-1535.
19. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem*. 1985;260:4303-4311.
20. Baeten KM, Richard MC, Kanse SM, Mutch NJ, Degen JL, Booth NA. Activation of single-chain urokinase by platelet-associated plasminogen: a mechanism for stimulation of fibrinolysis by platelets. *J Thromb Haemost*. 2010.
21. Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, et al. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*. 2010;115:2048-2056.
22. Gaussem P, Angles-Cano E. The formation of complexes between human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and sodium dodecyl sulfate: possible implication in the functional properties of PAI-1. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1079:321-329.

Figure 1. Fibrinolytic activity of microparticles isolated from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), systemic lupus erythematosus (SLE) and cardiovascular disease.

Microparticles (2.10^5 per well) were isolated as indicated in Methods (supplemental file on line) and then incubated with plasminogen ($1\mu\text{M}$) in the presence of a plasmin-selective chromogenic substrate (CBS0065, 0.75mM). Bars represent the amount of plasmin formed (mOD/minute) of representative samples. Results are the mean \pm SD of a duplicate experiment. **A.** Plasmin generated by microparticles from TTP patients. **B.** Plasmin generation by TTP microparticles depleted ($>90\%$) in erythrocyte- and platelet-derived microparticles. A volume of $25\mu\text{L}$ of total (gray bars) or depleted (dark gray bars) microparticle samples tested. **C.** Effect of inhibitors (ϵ -amino-caproic acid, ϵ -ACA and anti-uPA antibody, α -uPA) and IgG, a control immunoglobulin, on the generation of plasmin by TTP 1 microparticles. **D.** Fibrin-zymography analysis of TTP microparticles. Proteins in microparticle lysates were separated by SDS-PAGE and their fibrinolytic activity revealed on fibrin-agarose gels. Reference standards are purified tPA, plasmin and uPA. The fibrinolytic activity was tested in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of $10\mu\text{g/mL}$ of a polyclonal antibody against uPA. The high molecular mass fibrinolytic band observed in the tPA lane correspond to tPA dimers.²² **E.** Plasmin generated by microparticle samples of patients with cardiovascular disease and SLE. Experiments were performed as indicated in **A.** The mean of samples for each category is indicated by the dotted lines ($\circ 1.51 \pm 1.43$ mOD/minute and $\square 1.62 \pm 1.92$ mOD/minute versus control $\diamond 0.57 \pm 0.24$ mOD/minute, $*p < 0.001$)

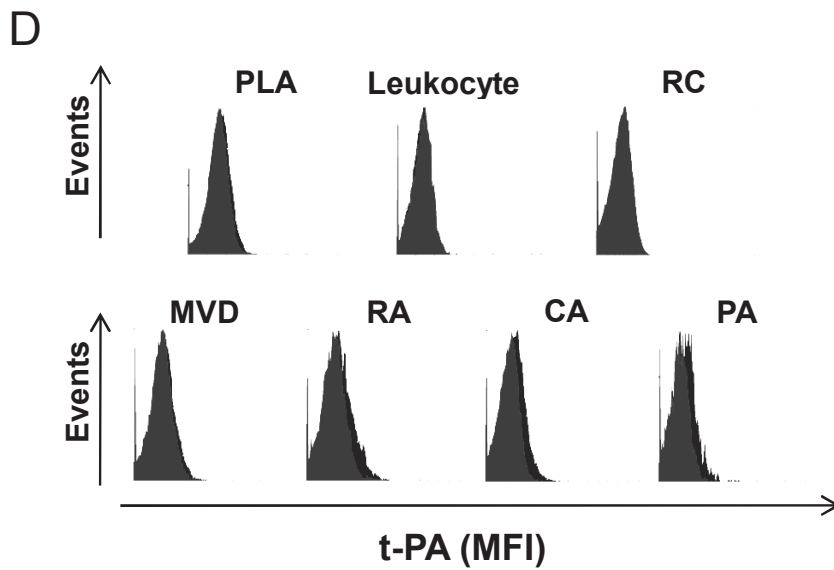
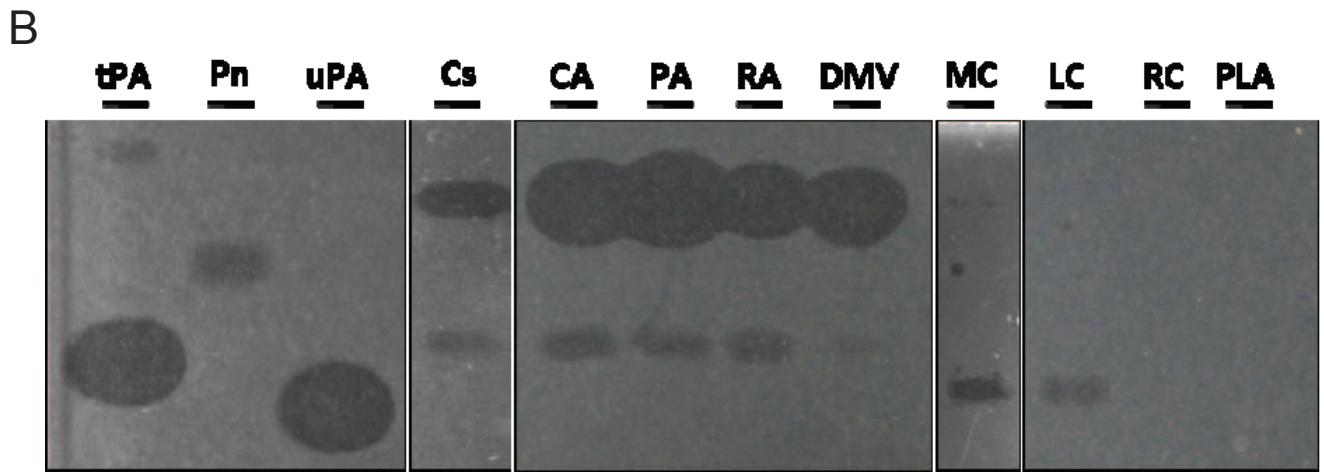
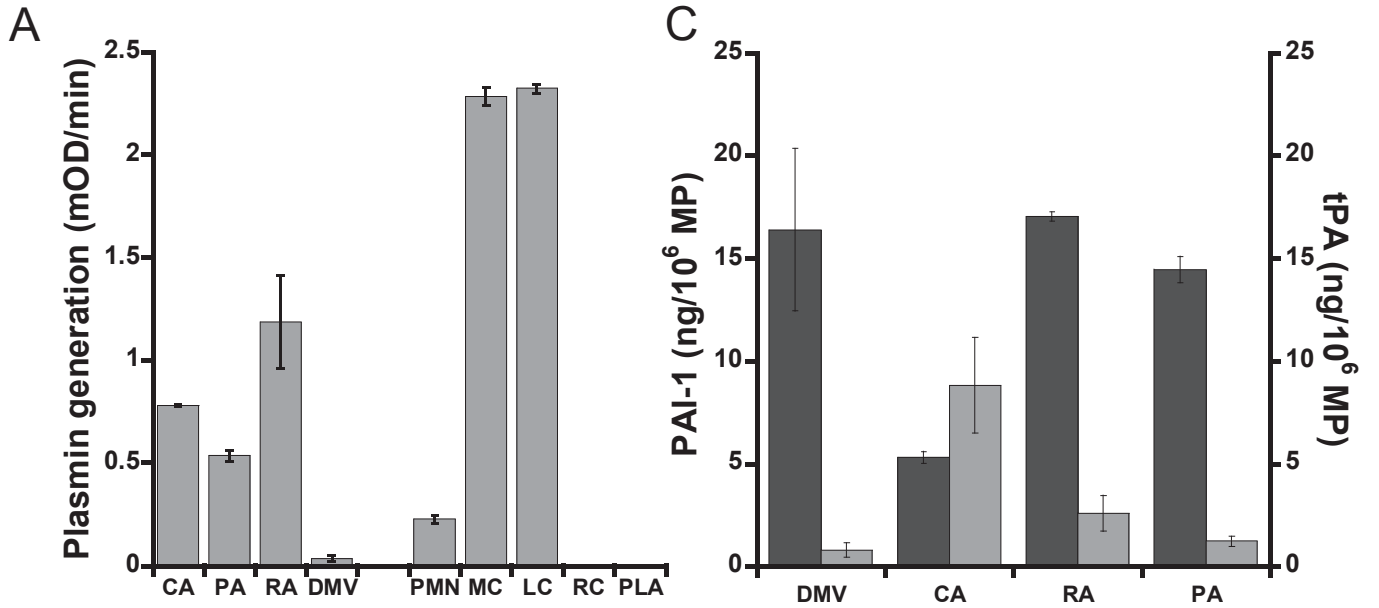
Figure 2. Fibrinolytic activity of microparticles derived from human circulating blood cells and primary endothelial cells.

Circulating blood microparticles and endothelial cell-derived microparticles were obtained and isolated as indicated in Methods (supplemental file on line). Endothelial cell-derived microparticles were obtained from primary cultures of coronary artery (CA), pulmonary artery (PA), renal artery (RA) and dermal microvascular (DMV) endothelial cells. Circulating blood cells-derived microparticles were obtained from isolated polymorphonuclear cells (PMN), monocytes (MC), lymphocytes (LC), red cells (RC) and platelets (PLA). Bars represent the amount of plasmin formed (mOD/minute). Results are the mean \pm SD of duplicate experiments. MFI: mean fluorescence intensity.

A. Plasmin generation by microparticles ($2 \cdot 10^5$ per well) was tested as indicated in figure 1.

B. Fibrin-zymography analysis of endothelial and circulating microparticles. Zymography was performed as indicated in figure 1D. Reference standards are purified tPA, plasmin, uPA and tPA in complex with PAI-1 (Cs). **C.** PAI-1 and tPA concentrations by ELISA for 10^6 endothelial cell-derived microparticle lysates per well. Results are the mean \pm SD of duplicate experiments.

D. tPA expression at the surface of endothelial and circulating microparticles by flow cytometry. Graphs represent overlays of representative fluorescence histograms obtained with isotype controls (grey) and tPA antibody (black) on annexin V+ gated events. **E.** uPAR and uPA expression at the surface of endothelial and circulating microparticles by flow cytometry. Graphs represent overlays of representative fluorescence histograms obtained with isotype controls (grey) and uPAR or uPA antibodies (black) on annexin V+ gated events.



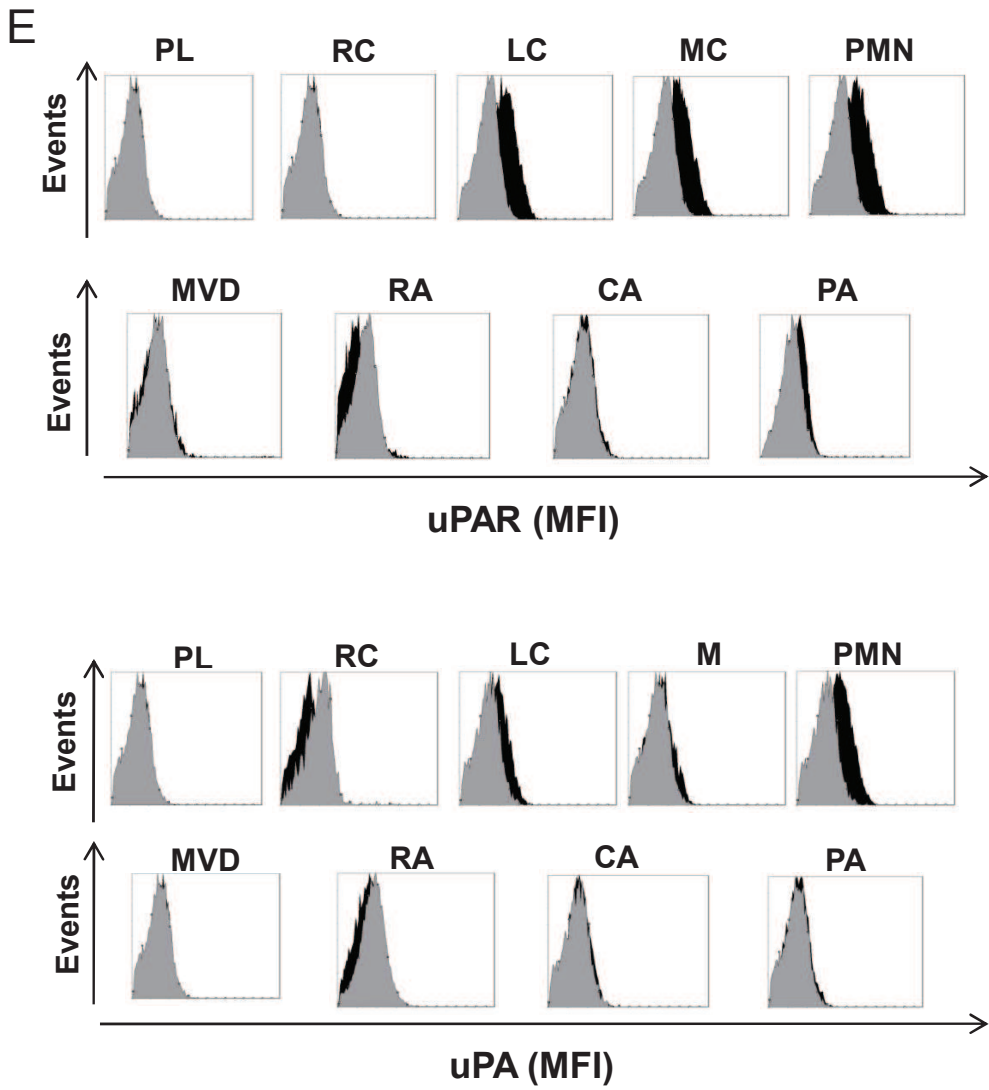


FIGURE 2

Supplemental Materials and Methods

Isolation of microparticles from human plasma

Plasma was separated (1500g, 15 minutes) from blood collected in 0.119 M sodium citrate from healthy volunteers (n=36) and from patients with autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, SLE, with, n=10, or without, n=12, antiphospholipid syndrome, APLS, according to the Sapporo criteria) or with atherosclerotic complications (n=16). MPs were also purified from 36 mL of citrated plasma obtained by plasmapheresis from patients (n=11) suffering from acute thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Informed consent was obtained from all patients.

MPs were isolated by sequential centrifugation of platelet-poor plasma, first at 13000g for 2 minutes to remove residual platelets. The platelet-free plasma was then centrifuged at 20000g for 90 minutes at 4°C. Pelleted microparticles were washed twice (20000g for 90 minutes at 4°C) and re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS).

In some experiment circulating MPs were depleted in erythrocyte- and platelet-derived microparticles by magnetic immuno-separation with beads coated with CD41 and CD235a antibodies. Depletion in MPs was checked by FCM superior at 90%. Control experiments were performed in parallel with beads coated with irrelevant antibodies.

Generation of microparticles from blood cells

To investigate which subtype of circulating MPs may support plasminogen activation activity, MPs were generated *in vitro* from different blood cell types. Whole blood from healthy volunteers or patients who had not taken anti-platelet medication for at least 2 weeks, was collected into 0.119 sodium citrated tubes.

Human platelets prepared as already described¹ were incubated without stirring for 15 minutes at 37°C with 1 NIH U/mL of thrombin and/or 1 µM of A23187 (Sigma, Saint Louis, MO), and/or 10 µg/mL of collagen (Stago, Asnières, France,). Platelets were subsequently separated by centrifugation at 20000g for 2 minutes, and MPs isolated and washed as described above.

Erythrocyte-derived MPs were generated from human red blood cells as previously described by Salzer et al. with minor modifications². Erythrocytes pelleted at 200 g for 10 minutes and subsequently washed in sodium chloride 0.9%, were resuspended in 9 volumes of PBS containing 1 mM CaCl₂ and 5 µM ionophore A23187 and incubated at 37°C for 30 minutes. Erythrocytes were subsequently separated by centrifugation at 20000g for 2 minutes, and MPs isolated and washed as described above.

Leukocyte-derived microparticles were prepared as previously described with some modifications³. Monocytes were isolated from PBMC (Lymphocytes separation medium 1077) by CD14⁺ immuno-magnetic separation on MS columns (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Purity superior at 95 % was checked by flow cytometry. Monocytes were stimulated by LPS (1µg/ml) overnight. Vesiculation was evaluated by FCM by AnnV-FITC/CD11b staining. Neutrophils were purified from citrated buffy coat and were stimulated by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMPL), 1 µM during 2h at 37°C. Lymphocytes were purified from PBMC (Lymphocytes separation medium 1077) and were stimulated by PAF/PMA (Platelet activation factor/ phorbol 12-myristate 13-acetate) 500nM/50nM during 2h at 37°C. MPs were isolated and washed as described above.

Generation and harvesting of microparticles from endothelial cells

Several subtypes of human endothelial cells originating from distinct vascular beds were purchased from Clonetics (Grand Island, NY) and cultured into 0.2 % gelatin coated flasks in EGM2-MV medium: renal artery endothelial cells (RAEC) used at passage 8, coronary artery endothelial cells (HCAEC) used at passage 7, dermal human microvascular vein endothelial cells (HMVEC-d) and human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) used at passage 6. Endothelial microparticles were purified from culture medium conditioned by sub-confluent endothelial cells stimulated or not for 24 hours with 10 ng/mL TNF- α (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) as previously described with some modifications⁴. Culture supernatants were centrifugated at 300g 5 min and 2500g 10 min to remove detached cells and debris. MPs were isolated as described above, were washed twice and re-suspended in HEPES buffer.

Characterization of microparticles by flow cytometry and ELISA

Aliquots of 10 μ L microparticles suspension, 1/10 diluted, were labeled using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (Abcys, Paris, France) or specific monoclonal antibodies. Phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD41 (BioCytex, Marseille, France), FITC anti-CD31, PE anti-CD11b and PE anti-glycophorin A were from Beckman Coulter (Miami, FL). Flow cytometry analysis was performed on Cytomics FC500* instrument (Beckman Coulter). MP were analyzed as previously described⁵.

u-PA, u-PAR and t-PA expression were evaluated by FCM using directly FITC labeled antibodies on MPs gated by CD146-PE (endothelial-MP), CD59-PE (endothelial, erythrocytes and leukocytes MP or CD41-PE (Platelet-MP) positivity. Matched antibodies for protein concentration and fluorescence/protein ratio were used as control.

Pelleted MP were lysed in 100 mmol/L Tris-HCl buffer pH 8.1, containing 0.5% Triton X-100 and supplemented with complete protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). uPA and uPAR total antigen levels were assayed by ELISA (894 and 893 IMUBIND[®] ELISA kits, American Diagnostica) according to the manufacturer's instruction. The results were expressed as ng of uPA or uPAR per 10⁷ MP. T-PA and PAI-1 total antigen level were measured by ELISA (Asserachrom* t-PA and Asserachrom* PAI-1, Diagnostica Stago, Asniere, France). Results were expressed as ng/10⁶ MPs.

Determination of plasminogen activators and plasminogen activation activity on microparticles

The presence and identity of plasminogen activators of MPs were analysed by fibrin autography of MPs lysates ran on SDS-PAGE under non-reducing conditions as previously described.⁶ When indicated the fibrin-agarose indicator gel was supplemented with antibodies (10µg/mL) directed against specific plasminogen activators.

The capacity of MP to activate plasminogen was determined by incubating a fixed concentration of plasminogen (1 µM) with the MPs in the presence of a chromogenic substrate selective for plasmin, as described previously⁷. Plasmin formed from plasminogen bound at the surface of the MPs cleaves the chromogenic substrate and the release of pNA is detected by measuring A_{405nm} as a function of time. Thus, results are expressed in A_{405nm}×10³/minute. When indicated, the following inhibitors were pre-incubated with the MPs: 10 µg/mL goat anti-human tPA (Biopool, Uppsala, Sweden), 50 µg/mL mouse anti-human uPA (American Diagnostica 3940), and respective irrelevant control IgGs (Biocytex, Marseille, France); amiloride and ε-aminocaproic acid (ε-ACA) were used at 100 µM and 0.1 M, final concentrations respectively.

Statistical analysis

Data are expressed as mean +/- standard deviation. Statistical analysis was performed with KaleidaGraph software (Synergy Software, Reading, PA, USA). Significant differences were determined using non parametric Mann-Whitney test. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

REFERENCES

1. Dubois C, Steiner B, Kieffer N, Reigner SC. Thrombin binding to GPIIb/IIIa induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIb beta3 interaction with polymerized fibrin. *Thromb Haemost.* 2003;89:853-865.
2. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R. Ca⁺⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood.* 2002;99:2569-2577.
3. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2006;177:1975-1980.
4. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999;104:93-102.
5. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 2002;51:2840-2845.
6. Gaussem P, Angles-Cano E. The formation of complexes between human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and sodium dodecyl sulfate: possible implication in the functional properties of PAI-1. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1079:321-329.
7. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2007;110:2432-2439.

BREVET 1

Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon de fluide biologique et utilisation.

Romarc Lacroix^{1,2}, Florence Sabatier^{1,2}, Eduardo Angles-Cano³ et Françoise Dignat-George^{1,2}

¹Inserm, UMR-S608, Université Aix-Marseille, Marseille, France. ²APHM, Marseille, France, ³Université de Caen, Caen, France.

Brevet 07/04060

Les travaux précédents sur la génération de plasmine par les MP circulantes ont conduit à un dépôt de brevet ayant pour objet une méthode de mesure de l'activité plasmine des MP présentes dans un échantillon de fluide biologique ou extrait tissulaire pouvant servir comme méthode de diagnostic ou de suivi d'un traitement.

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR2008/000767

International filing date: 06 June 2008 (06.06.2008)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 07 04060
Filing date: 07 June 2007 (07.06.2007)

Date of receipt at the International Bureau: 23 October 2008 (23.10.2008)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)





Brevet d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 JUIN 2008

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

 N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*05

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2**


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 540 @W/010905

REMISE DES PIÈCES DATE 07/06/2007 LIEU 13 INPI - Paca Ouest N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 07/04060 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 07 JUIN 2007		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE SANTARELLI 146 rue Paradis 13294 MARSEILLE CEDEX 6 (FRANCE)	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BIM 000165 FR/CG			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date
		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon de fluide biologique et utilisation			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public à caractère scientifique et technologique	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	101 rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	7 5 6 5 4 PARIS CEDEX 13	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

Réservé à l'INPI REMISE DES PIÈCES DATE 07/06/2007 LIEU 13 INPI - Paca Ouest N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 07/04060		DB 540 @W/010905
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom	SANTARELLI	
Prénom		
Cabinet ou Société	Cabinet de Marseille	
Nationalité		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	146 rue Paradis
	Code postal et ville	13294 MARSEILLE CEDEX 6
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	04 96 10 21 10	
N° de télécopie (facultatif)	04 96 10 21 15	
Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> } <input type="checkbox"/> } Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES (cf. Notice explicative Rubrique 9)		
<input type="checkbox"/> Personne(s) physique(s) <input type="checkbox"/> PME <input checked="" type="checkbox"/> Organisme à but non lucratif dans le domaine de l'enseignement ou de la recherche		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	2	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
SANTARELLI Cédric GALUP 02 0501		


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 2.../2...



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **07/06/2007**LIEU **13 INPI - Paca Ouest**

N° D'ENREGISTREMENT

07/04060

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 829@W/010905

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BIM 000165 FR/CG
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	Pays ou organisation	
	Date	_____ N°
	Pays ou organisation	
	Date	_____ N°
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE de CAEN Basse-Normandie
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public à caractère Scientifique, Culturel et Professionnel
N° SIREN		1 9 1 4 1 4 0 8 5
Code APE-NAF		_____
Domicile ou siège	Rue	Esplanade de la Paix - B.P. 5186
	Code postal et ville	1 4 0 3 2 CAEN CEDEX
	Pays	FRANCE
Nationalité		française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		_____
Code APE-NAF		_____
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	_____
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
SANTARELLI Cédric GANUP N° 02 0501		

L'invention a pour objet une méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon de fluide biologique ou extrait tissulaire, ladite méthode pouvant servir comme méthode de diagnostic ou comme méthode de suivi d'un traitement.

5 Ces microparticules résultant de bourgeonnements de la membrane cellulaire ont été décrites dans divers modèles cellulaires et dans de nombreuses conditions pathologiques en tant que marqueurs fiables de l'activation et/ou de l'apoptose cellulaire.

Particulièrement, les inventeurs ont initialement décrit le relargage de ces microparticules par les cellules endothéliales en réponse à une stimulation inflammatoire et l'augmentation de la quantité de microparticules endothéliales circulantes chez des patients présentant un risque de thromboses. Depuis, des niveaux élevés de microparticules endothéliales circulantes ont été décrits dans différentes conditions pathologiques telles que les syndromes coronariens, l'insuffisance rénale, le diabète, le syndrome des antiphospholipides (SAPL), le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) ou encore la drépanocytose, désordres dans lesquels la présence des microparticules reflète des dysfonctionnements endothéliaux et est indicative d'un mauvais pronostic.

Les microparticules exprimant divers composants bioactifs provenant des cellules dont elles sont issues, elles peuvent présenter un large éventail d'activités biologiques capables de moduler des fonctions de cellules endothéliales ou sanguines, d'influencer l'homéostasie vasculaire et de participer aux réponses inflammatoires ou à l'angiogénèse.

Par exemple, les microparticules présentent des surfaces phospholipidiques procoagulantes impliquées dans l'assemblage et l'activation des facteurs de coagulation.

25 De même, la participation des microparticules dans la génération de thrombine résulte de leur capacité à exprimer, transférer ou induire le facteur tissulaire dans le compartiment vasculaire.

Parmi les principaux régulateurs de l'équilibre hémostatique, le système d'activation du plasminogène est la principale voie physiologique de la dissolution du caillot de fibrine. Cette voie facilite également l'angiogénèse en aidant à la protéolyse des composants de la matrice extracellulaire.

35 La conversion du plasminogène en plasmine active dépend de deux sérines - protéases : l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA : tissue-type plasminogen activator) qui dans les vaisseaux est principalement impliqué dans la fibrinolyse et l'urokinase (u-PA ; urokinase-type plasminogen activator) qui liée à son récepteur spécifique, uPAR, est impliquée dans la protéolyse péricellulaire.

La génération de plasmine induite par l'uPA et l'activation des métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui en résulte, favorise la migration de cellules au travers de la matrice interstitielle et participe aux processus tels que le remodelage tissulaire, l'invasion métastatique et l'angiogénèse.

5 Une activation non contrôlée et/ou excessive du plasminogène peut avoir des conséquences délétères en induisant le détachement cellulaire et/ou l'apoptose cellulaire. On comprend donc que la régulation de l'expression de la plasmine à la surface des cellules, particulièrement des cellules endothéliales est d'importance critique dans la régulation de l'homéostasie vasculaire.

10 A la lecture de ce qui précède on comprend donc l'intérêt qu'il y a d'une part à pouvoir évaluer la génération de l'"activité plasmine" des microparticules dans un fluide biologique, particulièrement le sang, ou dans des extraits tissulaires et d'autre part à pouvoir moduler cette activité.

15 Par "fluide biologique" on entend tout liquide corporel extractible dont par exemple le sang, le liquide céphalorachidien (LCR), le liquide broncho-alvéolaire (LBA), l'urine, le liquide synovial, le lait maternel, la salive, les larmes, le liquide séminal, les liquides d'ascite, l'épanchement pleural, le liquide amniotique. Parmi les sources d'extrait tissulaire on peut citer les plaques d'athérome ou tout autre tissu obtenu par chirurgie.

20 Par "activité plasmine " on doit comprendre dans le présent texte la capacité d'un échantillon fluide biologique contenant des microparticules à générer de la plasmine, quel que soit le mécanisme mis en oeuvre.

25 A titre de méthode de diagnostic, mesurée dans l'échantillon fluide biologique contenant les microparticules et comparée à la mesure de cette même capacité dans un échantillon témoin obtenu d'individus dits normaux, c'est-à-dire ne présentant aucune pathologie, la valeur de l'"activité plasmine de l'échantillon testé", si elle est significativement supérieure à celle du témoin reflètera par exemple et sans limitation, pour un individu, un risque plus ou moins élevé à subir par exemple des accidents vasculaires causés par une instabilité accrue des plaques d'athérome, un risque plus ou moins élevé pour un individu atteint d'un cancer à subir une invasion métastatique ou

30 encore pour un individu un risque plus ou moins élevé à subir un accident vasculaire cérébral et ses conséquences délétères sur le fonctionnement cérébral. Si cette valeur de l'"activité plasmine de l'échantillon testé" est inférieure à celle du témoin, alors elle reflètera par exemple pour l'individu dont le sang a été testé un risque accru de thrombose.

35 A titre de suivi d'un traitement, mesurée dans les microparticules d'un 'échantillon fluide biologique d'un individu en cours de traitement, et comparée à la mesure de cette

même capacité dans un échantillon témoin obtenu du même individu avant le traitement ou précédemment dans le traitement, la valeur de l'"activité plasmine de l'échantillon testé" permet de suivre l'évolution de la réponse dudit individu en fonction du traitement qui lui est administré. Cependant, Il existe toujours un besoin en test simple, efficace et

5 fiable, des risques encourus par un patient, liés à une trop forte ou à une trop faible activité plasmine de son sang ou encore un test simple du suivi de l'évolution d'un traitement visant à moduler l'activité plasmine des microparticules d'un fluide biologique d'un individu.

C'est un des buts de la présente invention que de fournir un tel test.

10 En effet, après de longs travaux et de manière surprenante, les inventeurs ont montré et ce à leur connaissance pour la première fois, que les microparticules circulantes présentes dans un fluide biologique, particulièrement dans le sang, d'un individu, sont porteuses d'une activité biologique leur conférant la capacité à générer de la plasmine.

15 Sur la base de cette découverte, la présente invention a pour objet une méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules d'un échantillon de fluide biologique, particulièrement de sang, préalablement prélevé, dans lequel

- dans une première étape on isole les microparticules circulantes présentes dans ledit échantillon,
- 20 - dans une deuxième étape on mesure, par tout moyen approprié, la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine et
- dans une troisième étape on compare le résultat de la mesure obtenu à l'étape 2 au résultat d'une mesure identique réalisée dans les mêmes conditions sur un échantillon de fluide biologique identique témoin.

25 Selon une variante de l'invention, le fluide biologique identique témoin peut être un fluide biologique identique à celui testé mais provenant d'au moins un individu considéré comme sain, c'est-à-dire ne présentant pas de pathologie, à tout le moins pas la pathologie dont souffre l'individu dont le fluide biologique est testé, et permettant alors d'évaluer les risques dudit individu au regard d'une valeur considérée comme normale.

30 Selon une autre variante de l'invention, le fluide biologique identique témoin peut être le même fluide biologique que celui testé, provenant du même individu mais obtenu dans un prélèvement antérieur à celui ayant donné l'échantillon testé, par exemple avant le début d'un traitement, afin de pouvoir établir un suivi de l'évolution de la capacité des microparticules à générer de la plasmine par exemple au cours d'un traitement.

35 Selon l'invention, la première étape de la méthode (isolement des microparticules circulantes présentes dans l'échantillon), peut être réalisée selon tout procédé

compatible avec l'isolement de telles microparticules. Par exemple on citera la centrifugation à hautes vitesses ou encore des techniques de biocapture quel que soit le support capteur (par exemple des anticorps, par exemple de l'annexine V).

Selon une variante préférée de la première étape de la méthode selon l'invention,
5 les microparticules peuvent être isolées par une succession de centrifugations et d'ultracentrifugations dans un procédé selon lequel dans

- 10 - une étape 1A on centrifuge un volume compris entre 500 μ l et 5 ml, préférentiellement entre 1 ml et 2 ml, d'un échantillon de fluide biologique, par exemple de sang, préalablement prélevé, à une vitesse comprise entre 1000 g et 2000 g, préférentiellement entre 1200 g et 1800g, pendant un temps compris entre 5 minutes et 20 minutes, préférentiellement entre 10 et 15 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- 15 - dans une étape 1B, on centrifuge le plasma ou surnageant obtenu à l'étape 1A à une vitesse comprise entre 10000 g et 20000 g, préférentiellement entre 12000 g et 15000g, pendant un temps compris entre 1 minute et 5 minutes, préférentiellement entre 2 et 3 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- 20 - dans une étape 1C on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1B à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- 25 - dans une étape 1D on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 μ l et 4 ml, préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- 30 - dans une étape 1E on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 μ l et 4 ml, préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre
- 35

60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;

- dans une étape 1F on reprend le culot obtenu à l'étape 1E dans un volume compris entre 20 µl et 500 µl préférentiellement entre 50 et 100 µl, de tampon phosphate salin (PBS).

5

La suspension de microparticules obtenue à l'étape 1F peut être utilisée immédiatement pour analyse ou peut être conservée préférentiellement à -80°C.

Selon l'invention, la deuxième étape de la méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) peut être réalisée directement sur la quantité de microparticules obtenues à l'issue de la première étape. Préférentiellement selon l'invention, la deuxième étape de la méthode peut être réalisée sur une quantité déterminée de microparticules obtenues à l'issue de la première étape, ladite quantité pouvant être comprise entre 10000 et 1000000 microparticules, préférentiellement entre 100000 et 300000 microparticules. Dans ce cas la méthode selon l'invention peut comporter une étape supplémentaire (étape 1bis) de dénombrement des microparticules obtenues à l'issue de la première étape, ladite étape de dénombrement intervenant entre la première et la deuxième étape de la méthode selon l'invention.

10

15

Ladite étape de dénombrement peut être réalisée selon l'invention selon tout procédé connu de dénombrement de microparticules. Avantageusement, le dénombrement des microparticules peut être réalisé par cytométrie de flux selon les protocoles classiquement utilisés dans l'art antérieur, par exemple ceux décrits dans la demande de brevet français FR-A-2795820, ou encore par un test de détection basé sur l'activité procoagulante des microparticules (Zymuphen MP-activity, Hyphen BioMed) ou encore un dosage protéique. Préférentiellement selon l'invention, on dénombre les microparticules par cytométrie de flux.

20

25

Selon l'invention, la deuxième étape de la méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine peut être déterminée soit par la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, soit par mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par ces microparticules.

30

Lesdites mesures de la plasmine peuvent être réalisées par toute méthode connue.

Selon une variante de l'étape 2 de la méthode selon l'invention, la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, peut être réalisée par toute méthode connue, comme par exemple une mesure immunologique (FASEB J 2003, 17 : 1301-3) (ELISA ou Western blot) à l'aide d'anticorps antiplasmin(ogène) (par exemple TC12040, Technoclone, Austria ou product 3641, American Diagnostica) ou

35

encore par spectrophotométrie, par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm à l'aide de substrats chromogènes sélectifs de la plasmine (par exemple CBS0065, Stago).

5 Selon une autre variante de l'étape 2 de la méthode selon l'invention, la mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par les microparticules peut être réalisée selon le procédé décrit dans Thromb Haemost 2004 ; 92 :1066-75, dans lequel

- 10 - dans une étape 2-1, on ajoute aux microparticules obtenues à l'étape 1 ou à l'étape 1bis de la méthode selon l'invention, du plasminogène, avantageusement purifié, en une quantité finale comprise entre 0,1 μM et 2,0 μM , préférentiellement entre 0,5 μM et 1 μM , et d'un substrat chromogénique sélectif de la plasmine, comme par exemple le (méthyl-malonyl)-hydroxypropylarginine-p-nitroanilide (CBS0065) commercialisé par la société STAGO (France), en une quantité finale comprise entre 0,50 mM et 1,0 mM, préférentiellement entre 0,65 mM et 0,85 mM ;
- 15 - dans une étape 2-2 on incube, le mélange obtenu à l'étape 2-1, par exemple dans une étuve sèche, à une température comprise entre 25°C et 45°C, préférentiellement 30°C et 40°C, pendant un temps compris entre 30 minutes et 90 minutes, préférentiellement entre 50 et 70 minutes et
- 20 - dans une étape 2-3 on mesure la quantité de plasmine susceptible d'être produite est détectée par photométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nM (par exemple dans un lecteur de plaques de 96 puits comme le lecteur de microplaque MR 700 Dynex).

Selon une variante de l'étape 2-1, le substrat sélectif de la plasmine peut être un substrat fluorescent comme par exemple le H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-méthylcoumarin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) ou le D-AFK-ANSNH-C4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont USA).

Selon une variante de l'étape 2-2 le mélange obtenu à l'étape 2-1 est déposé dans un lecteur de plaques, thermostaté à 37°C, qui mesure la cinétique de formation de plasmine par mesure de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps.

30 Selon l'invention, la deuxième étape de la méthode peut être réalisée sur tout support compatible avec les incubations et les mesures à réaliser. A cet égard on peut citer des cupules à fond rond ou des cupules à fond plat, par exemple les cupules de plaques 48 ou 96 puits en polystyrène ou en chlorure de polyvinyl. Préférentiellement l'étape 2 de la méthode selon l'invention est réalisée dans de cupules à fond rond ou
35 des cupules à fond plat de plaques à 96 puits.

Selon l'invention, la mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par les microparticules, ou de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, peut être réalisée dans un volume final compris entre 25 μ l et 150 μ l, préférentiellement entre 50 μ l et 100 μ l, ajusté par exemple à l'aide de tampon phosphate salin (PBS) additionné d'albumine de sérum bovin (Bovin Serum Albumin: BSA) à une concentration comprise entre 1,0 et 3,0 mg/ml, préférentiellement entre 1,5 et 2,5 mg/ml. Le nombre de microparticules à tester par puits peut être compris entre 50 000 et 400 000 particules, préférentiellement 100 000 à 200 000 particules par puits. Avantageusement, lorsque la mesure est réalisée dans des cupules à fond rond, le volume final est préférentiellement de 50 μ l et quand la mesure est réalisée dans des cupules à fond plats, le volume final est préférentiellement de 100 μ l. Selon l'invention, les résultats sont exprimés en quantité de plasmine produite par nombre de microparticules.

Dans un échantillon de fluide biologique, particulièrement de sang, les microparticules circulantes représentent une population globale des microparticules dont on a vu précédemment qu'elles ont pour origine un bourgeonnement cellulaire et qu'elles peuvent être issues de nombreux types cellulaires différents. A cet égard on peut citer des microparticules issues de cellule endothéliales, de cellules hématopoïétiques.

Ainsi, selon le type cellulaire dont elles sont issues, les microparticules seront porteuses de caractéristiques propres au type cellulaire dont elles sont issues. Sur cette base il est possible d'isoler les microparticules en fonction de leur origine et ainsi de générer des populations distinctes de microparticules d'un seul type. Or, il peut être intéressant de ne réaliser la mesure de l'activité plasmine que sur un type particulier de microparticules.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la méthode peut comprendre en outre une étape 1ter d'isolement des microparticules en fonction de leur origine. Cette étape peut être réalisée après la première étape de la méthode selon l'invention, c'est-à-dire après l'étape 1 ou l'étape 1bis de la dite méthode, préférentiellement après l'étape 1 et avant l'étape 1bis.

L'isolement des microparticules d'intérêt peut être réalisé par toute méthode connue de l'art antérieur. On citera à cet égard une procédure de tri cellulaire par cytométrie ou encore l'immunoséparation magnétique. Préférentiellement selon l'invention on utilise la méthode d'immunoséparation magnétique.

Selon encore une autre variante de la méthode selon l'invention, il est possible d'immobiliser les microparticules isolées à l'étape 1 au support sur lequel l'étape 2 va être réalisée. L'immobilisation des microparticules peut être réalisée selon tout procédé

connu de l'art antérieur, particulièrement celui décrit dans la demande internationale WO-A-96/03655. Par exemple il est possible de préparer le support utilisé à l'étape 2 de la méthode selon l'invention en couvrant sa surface à l'aide d'un composé apte à immobiliser les microparticules puisque reconnaissant un élément de la surface desdites microparticules. On peut citer à cet égard l'annexine V qui reconnaît les phospholipides procoagulants, ou encore les anticorps spécifiques des complexes glycoprotéiques conformationnels actifs et/ou fonctionnels des membranes GPIIb/GPIIIa, ou encore les récepteurs adhésifs des monocytes ou des lymphocytes LFA-1 ou encore la thrombomoduline endothéliale ou encore le CD146. Selon une autre variante de la méthode selon l'invention il est possible d'immobiliser les microparticules à l'aide d'un polycation comme la poly-L-lysine.

L'invention a également pour objet l'utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique, particulièrement dans une méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite précédemment.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de diagnostic, chez un individu dont le fluide biologique est issu,

- du risque plus ou moins élevé à subir des accidents vasculaires causés par exemple par une instabilité accrue des plaques d'athérome, ou encore
- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'un cancer à subir une invasion métastatique, ou encore
- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu à subir un accident vasculaire cérébral, ses complications hémorragiques, ou encore ses conséquences sur le fonctionnement cérébral.
- du risque pour ledit individu de subir une thrombose.
- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'une maladie où la production de plasmine par les microparticules est augmentée comme l'hyperfibrinolyse ou la protéolyse péricellulaire.

Préférentiellement selon l'invention, ladite méthode de diagnostic est une méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite précédemment.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de suivi de la réponse de l'individu dont le fluide biologique est issu à un traitement.

Préférentiellement selon l'invention, ladite méthode de suivi du traitement est la méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite précédemment.

Les inventeurs ont par ailleurs pu montrer que les microparticules circulantes, particulièrement les microparticules issues de cellules endothéliales, contenues dans un fluide biologique, par exemple du sang, porteuses d'une activité plasmine au sens de l'invention, présentent une grande résistance à l'inactivation, particulièrement à la neutralisation ou l'inhibition par les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques présentes dans le fluide biologique. Cette propriété confère auxdites microparticules circulantes la capacité à véhiculer l'activité plasmine au travers de l'organisme par le fluide biologique jusqu'au lieu où la présence de la plasmine développe son activité, sans risque d'inhibition, à tout le moins avec un risque d'inhibition extrêmement diminué. A cet égard on sait que la plasmine native circulante est rapidement inhibée dans les fluides biologiques. Lesdites microparticules peuvent alors être assimilées à un vecteur de l'activité plasmine, ce qui permet d'envisager leur utilisation en tant que tel, une fois purifiées ou semi-purifiées. De la même façon que les microparticules portant le facteur tissulaire sont potentiellement utiles dans le traitement de maladies hémorragiques congénitales comme l'hémophilie (Nature Medicine 2003, 9 : 1020-1025).

Par purifiée ou semi-purifiées, on entend selon l'invention que les microparticules sont utilisées après avoir subi au moins une étape de purification.

Ainsi l'invention a pour objet l'utilisation de microparticules circulantes, particulièrement des microparticules issues de cellules endothéliales, purifiée ou semi-purifiées, à titre de vecteur de l'activité plasmine.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de microparticules circulantes, particulièrement des microparticules issues de cellules endothéliales, purifiée ou semi-purifiées, à titre de médicament, particulièrement de médicament à activité protéolytique ou antithrombotique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples suivants qui ne sont donnés qu'à titre illustratif et ne limitent en rien la présente invention.

Exemples

Exemple 1 : Mise en évidence de l'activité plasmine portée par les microparticules de cellules endothéliales en culture :

1-A : Préparation de microparticules de cellules endothéliales :

Des cellules de lignée endothéliale microvasculaire humaine HMEC-1 (J. Invest. Dermatol. 1992 ; 99 : 683-90) ont été cultivées à sous confluence en milieu MCDB 131 (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de sérum de veau foetal exempt de microparticule (FCS), 10 ng/ml d'EGF humain recombinant

(Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY, USA) et de 1 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Les microparticules endothéliales (EMP) ont été purifiées à partir du milieu de culture des cellules HMEC-1 stimulées pendant 48 h avec 100 ng/ml de TNF-α (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) selon les conditions décrites dans J. Clin. Invest. 1999 Jul; 104(1):93-102)

Les surnageants de culture ont été centrifugés 4300g pendant 5 minutes afin de les débarrasser des cellules et des débris cellulaires flottants.

Les surnageants ont alors été centrifugés à 20000g pendant 120 minutes à 4°C.

Le culot d'EMP a alors été lavé 2 fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et re-suspendu dans du PBS. Des aliquots de 10 µl de suspension d'EMP, dilué au 1/100, ont été marqués par de l'annexine V conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Abcys, Paris, France). Les EMPs ont été dénombrées par cytométrie de flux comme préalablement décrit dans J. Thromb. Haemost. 2004 Oct; 2(10):1842-3 et demande de brevet français FR-A-2795820.

1-B : Immobilisation des EMP

Les EMP ont été immobilisées sur une surface en polycation selon le principe de l'adsorption physico-chimique.

Pour cela les parois et le fond des puits à fond rond de plaques 96 puits en PVC ont été activés avec 25µg/ml poly-L-lysine (Aldrich-Sigma). Différentes concentrations d'EMP dans du PBS ont alors été incubées pendant une nuit à 4°C dans les puits préalablement activés. Les puits sont alors lavés et les EMP immobilisées ont été utilisées dans le test de génération de plasmine.

1-C : Test de génération de plasmine

1-C-1 : protocole

Dans les puits de plaques 96 puits à fond rond en PVC, différentes concentrations d'EMP en suspension dans du PBS additionné de 0,8% sérum albumine bovine (PBSA) ont été incubées avec 50 µl d'un mélange de plasminogène 1 µM et de (methyl-malonyl)-hydroxypropylarginine-p-nitroanilide (CBS0065, Stago, Asnières, France), substrat chromogénique sélectif de la plasmine, à 0,75 mM.

Un volume identique de surnageant du dernier lavage des EMP a été utilisé comme contrôle.

La microplaque est déposée dans le lecteur de microplaques et la cinétique de l'apparition de la plasmine a été suivie pendant 9 heures à l'aide d'un spectrophotomètre adapté à la lecture des plaques multi puits (MX5000, Dynex) à 37°C par mesure des

modifications de l'absorbance à 405 nm produites par le relargage de la p-nitroaniline en fonction du temps.

1-C-2 : Résultats

Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau suivant :

EMP/50 μ L	A405nm/min
10 ⁶	48,7
10 ⁵	12,9
5.10 ⁴	4,7
10 ⁴	1,6
10 ³	1,1
0	0,5
5.10 ⁴ +EACA	0,6

- 5 EACA : acide ϵ -aminocaproïque (ϵ -aminocaproic acid), inhibiteur de la liaison du plasminogène aux MPs.

1-D : Mesure de la constante de Michaelis

1-D-1 : mesure sur des EMP en suspension

1-D-1a : protocole

- 10 Dans les puits de plaques 96 puits à fond rond en PVC, 2.10⁵ EMP en suspension dans du PBS additionné de 0,8% sérum albumine bovine (PBSA) ont été incubées avec différentes concentrations de plasminogène (0 to 5 μ M) dans un volume final de 50 μ l en présence de (methyl-malonyl)-hydroxypropylarginine-p-nitroanilide (CBS0065, Stago, Asnières, France), substrat chromogénique sélectif de la plasmine, à 0,75 mM.

- 15 Un volume identique de surnageant du dernier lavage des EMP a été utilisé comme contrôle.

1-D-1b : Résultats

Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau suivant :

Pg (μ M)	A405nm/min
5	36,8
2,5	31,8
1,25	25,9
0,62	21,8
0,31	18,2
0,18	16,4
0	0,4

Par application de l'équation de Michaelis-Menten, ces résultats permettent de déterminer la constante de Michaelis de la génération spécifique de plasmine : $K_m = 0,122 \mu\text{M}$

1-D-2 : mesure sur des EMP immobilisées

5

1-D-2a : protocole

Les microparticules ont été immobilisées dans les puits comme indiqué ci-dessus (1-B Immobilisation de microparticules).

Le plasminogène et le substrat chromogène ont été ajoutés aux microparticules immobilisées selon le même protocole que pour les EMP en suspension.

10

La cinétique de formation de plasmine est détectée dans un lecteur de microplaques par mesure de l'absorbance à 405 nm.

Cette variante permet après détection de la cinétique d'activation de mesurer la plasmine liée aux microparticules immobilisées. A cet effet, les plaques sont lavées avec du PBSA et la plasmine fixée aux microparticules immobilisées a été détectée par addition de 50 μl /puits de 0,325 mM de CBS0065 et mesure de modifications de l'absorbance à 405 nm.

15

1-D-2b : Résultats

EMP/50 μL	A405nm/min
$2 \cdot 10^5$	4,6
10^5	2,3
$7,5 \cdot 10^4$	1,5
$5 \cdot 10^4$	0,8
$2,5 \cdot 10^4$	0,6

1-E : Conclusion

Ces résultats montrent que la formation de plasmine par les microparticules est fonction du nombre de microparticules ajoutées aux puits ou à concentration fixe de microparticules de la concentration de plasminogène ajoutée. Ces résultats montrent également que l'effet des microparticules est du à la présence d'un activateur du plasminogène présent sur les microparticules.

20

25

Exemple 2 : Mise en évidence de l'activité plasmine portée par les microparticules *in vivo* :

2-A : Protocole

A partir d'un échantillon de sang total préalablement obtenu d'un individu présentant une pathologie autoimmune à risque thrombotique on isole les microparticules selon la méthode suivante :

- + (étape 1A) on centrifuge 2 ml dudit échantillon de sang à la vitesse de 1500g, pendant 10 minutes, à la température de 4°C;
- + (étape 1B) on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1A à la vitesse de 17500g, pendant 2 minutes, à la température de 4°C ;
- 5 + (étape 1C) on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1B à la vitesse de 17500g, pendant 90 minutes, à la température de 4°C ;
- + (étape 1D) on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans 1000 µl de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à la vitesse de 17500g, pendant 90 minutes, à la température de 4°C ;
- 10 + (étape 1E) on reprend le culot obtenu à l'étape 1D dans 1000 µl de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à la vitesse de 17500g, pendant 90 minutes, à la température de 4°C;
- + (étape 1F) on reprend le culot obtenu à l'étape 1E dans 50 µl de tampon phosphate salin (PBS) pour conservation et utilisation ultérieure.

15 Les microparticules ainsi obtenues à l'étape 1F sont dénombrées par cytométrie de flux.

Dans une cupule à fond rond d'une plaque 96 puits (Vinyl alphanumeric U bottom plates, Ref. 2101, Thermo), dans un volume final de 50 µl, ajusté si nécessaire par du tampon phosphate salin (PBS) additionné de sérumalbumine bovine à la concentration finale de 2 mg/ml, à 200000 microparticules précédemment obtenues et préservées dans du PBS additionné de sérumalbumine bovine à la concentration finale de 2 mg/ml, on ajoute du plasminogène purifié (Américan Diagnostica, Hyphen) à une concentration finale de 0,5 µM (ou 1µM) et du CBS0065 (STAGO) à la concentration finale de 0,75 mM.

25 A l'issu de l'addition du plasminogène et du substrat chromogène aux microparticules dans un volume final de 50 µl dans la plaque de 96 puits, ladite plaque est placée directement dans le photomètre thermostaté à 37°C (MX5000, Dynex) afin de détecter la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps pendant 4 à 8 heures.

30 L'activité plasmine d'un échantillon témoin, provenant d'un sujet exempt de risque thrombotique est mesurée en parallèle dans les mêmes conditions. La quantité de plasmine produite par les microparticules est calculée par rapport à une courbe de référence faite avec des concentrations variables de plasmine (0 à 20 nM).

2-B : Résultats

P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1	1,35	5	3,5	9	0,4	13	1,5	17	3,75	21	1,5
2	1,8	6	1,0	10	0,7	14	1,05	18	7,5	22	0,9
3	0,7	7	0,6	11	1,2	15	1,8	19	6,5		
4	0,5	8	2,8	12	9,05	16	2,15	20	0,85		

A : absorbance (405 nm/min) ; P = patient

2-C : Conclusion

Ces résultats montrent que les microparticules circulantes isolées à partir du plasma d'un sujet présentant une maladie auto-immune, génèrent de la plasmine comme les particules du prototype testé in vitro. Ces résultats montrent également que l'effet des microparticules produites in vivo est dépendant de la présence de plasminogène ajouté.

REVENDEICATIONS

- 1.) Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules d'un échantillon de fluide biologique, particulièrement de sang, préalablement prélevé, dans lequel
- 5
- dans une première étape on isole les microparticules circulantes présentes dans ledit échantillon,
 - dans une deuxième étape on mesure, par tout moyen approprié, la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine et
 - dans une troisième étape on compare le résultat de la mesure obtenu à l'étape
- 10
- 2 au résultat d'une mesure identique réalisée dans les mêmes conditions sur un échantillon de fluide biologique identique témoin.
- 2.) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fluide biologique identique témoin est un fluide biologique identique à celui testé mais provenant d'au moins un individu considéré comme sain, ou est le même fluide biologique
- 15
- que celui testé, provenant du même individu mais obtenu dans un prélèvement antérieur à celui ayant donné l'échantillon testé, par exemple avant le début d'un traitement.
- 3.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la première étape de ladite méthode (isolement des microparticules circulantes
- 20
- présentes dans l'échantillon), est réalisée selon un procédé dans lequel dans
- une étape 1A on centrifuge un volume compris entre 500 μ l et 5 ml, préférentiellement entre 1 ml et 2 ml, d'un échantillon de fluide biologique, par exemple de sang, préalablement prélevé, à une vitesse comprise entre 1000 g et 2000 g, préférentiellement entre 1200 g et 1800g, pendant un temps
- 25
- compris entre 5 minutes et 20 minutes, préférentiellement entre 10 et 15 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- dans une étape 1B, on centrifuge le plasma ou surnageant obtenu à l'étape 1A à une vitesse comprise entre 10000 g et 20000 g, préférentiellement entre
- 30
- 12000 g et 15000g, pendant un temps compris entre 1 minute et 5 minutes, préférentiellement entre 2 et 3 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- dans une étape 1C on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1B à une
- 35
- vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes,

- 1.) Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules d'un échantillon de fluide biologique, particulièrement de sang, préalablement prélevé, dans laquelle
- dans une première étape on isole les microparticules circulantes présentes dans ledit échantillon,
 - 5 - dans une deuxième étape on mesure, par tout moyen approprié, la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine et
 - dans une troisième étape on compare le résultat de la mesure obtenu à l'étape 2 au résultat d'une mesure identique réalisée dans les mêmes conditions sur un échantillon de fluide biologique identique témoin.
- 10 2.) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fluide biologique identique témoin est un fluide biologique identique à celui testé mais provenant d'au moins un individu considéré comme sain, ou est le même fluide biologique que celui testé, provenant du même individu mais obtenu dans un prélèvement antérieur à celui ayant donné l'échantillon testé, par exemple avant le début d'un
- 15 traitement.
- 3.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la première étape de ladite méthode (isolement des microparticules circulantes présentes dans l'échantillon), est réalisée selon un procédé dans lequel dans
- 20 - une étape 1A on centrifuge un volume compris entre 500 μ l et 5 ml, préférentiellement entre 1 ml et 2 ml, d'un échantillon de fluide biologique, par exemple de sang, préalablement prélevé, à une vitesse comprise entre 1000 g et 2000 g, préférentiellement entre 1200 g et 1800g, pendant un temps compris entre 5 minutes et 20 minutes, préférentiellement entre 10 et 15 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre
 - 25 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1B, on centrifuge le plasma ou surnageant obtenu à l'étape 1A à une vitesse comprise entre 10000 g et 20000 g, préférentiellement entre 12000 g et 15000g, pendant un temps compris entre 1 minute et 5 minutes, préférentiellement entre 2 et 3 minutes, à une température comprise entre 2 et
 - 30 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1C on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1B à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre
 - 35 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1D on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume



**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**



Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..



N° Indigo 0 825 83 85 87
0,15 F. TTC/mn

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 300305

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BIM 000165FR/CG
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	

TITRE DE L'INVENTION (à compléter dans les espaces maximum)
07/04060

Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon de fluide biologique et utilisation

E(S) DEMANDEUR(S) :
NSERM
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

Nom	DIGNAT-GEORGE	
Prénoms	Françoise	
Adresse	Rue	308 rue Paradis
	Code postal et ville	13008 MARSEILLE (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)
7/6/2007
N° 02 0501

de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant
caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indigo 0 825 83 85 87
0,15 € TTC/mm

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BIM 000165 FR/CG
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	

TITRE DE L'INVENTION (au maximum 500 caractères)

07104050
Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules présentes dans un échantillon utilisation

LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSERM
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom	ANGLES CANO	
Prénoms	Eduardo	
Adresse	Rue	205 bd Vincent Auriol
	Code postal et ville	[7 5 0 1 5] PARIS (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom	LACROIX	
Prénoms	Romaric	
Adresse	Rue	43 avenue de la Timone
	Code postal et ville	[1 3 0 1 0] MARSEILLE (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom	MALATERRE	
Prénoms	Florence	
Adresse	Rue	11 Cours Joseph Thierry
	Code postal et ville	[1 3 0 0 1] MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page

**DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

Marseille, le 7/6/2007
SANTARELLI

Cédric GALTIER N° 02 0501

production de plasmine par les microparticules est augmentée comme l'hyperfibrinolyse ou la protéolyse péricellulaire.

- 5 21.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de suivi de la réponse d'un individu dont le fluide biologique est issu à un traitement, ladite méthode de suivi du traitement étant la méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.

- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'un cancer à subir une invasion métastatique, ou encore
- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu à subir un accident vasculaire cérébral et ses conséquences hémorragiques, ou encore
- 5 - du risque pour ledit individu de subir une thrombose.
- du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'une maladie où la production de plasmine par les microparticules est augmentée comme l'hyperfibrinolyse ou la protéolyse péricellulaire.
- 22.) Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que ladite méthode de
10 diagnostic est la méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.
- 23.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de suivi de la réponse d'un individu dont le fluide biologique est issu à un traitement.
- 15 24.) Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite méthode de suivi du traitement est la méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.
- 25.) Utilisation de microparticules circulantes, particulièrement des microparticules issues de cellules endothéliales, purifiée ou semi-purifiées, à titre de vecteur de
20 l'activité plasmine.
- 26.) Utilisation de microparticules circulantes, particulièrement des microparticules issues de cellules endothéliales, purifiée ou semi-purifiées, à titre de médicament, particulièrement de médicament à activité protéolytique ou antithrombotique.

origine.

- 16.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support sur lequel l'étape 2 est réalisée.
- 17.) Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support à l'aide d'un composé apte à immobiliser lesdites microparticules, ledit composé étant préalablement fixé à la surface dudit support.
- 18.) Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que le composé apte à immobiliser lesdites microparticules est choisi parmi l'annexine V, les anticorps spécifiques des complexes glycoprotéiques conformationnels actifs et/ou fonctionnels des membranes GPIIb/GPIIIa, les récepteurs adhésifs des monocytes ou des lymphocytes LFA-1, la thrombomoduline endothéliale, ou encore le CD 146 ou encore un polycation comme la poly-L-lysine.
- 19.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.
- 20.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18, chez un individu dont le fluide biologique est issu,
 - du risque plus ou moins élevé à subir des accidents vasculaires causés par exemple par une instabilité accrue des plaques d'athérome, ou encore
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'un cancer à subir une invasion métastatique, ou encore
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu à subir un accident vasculaire cérébral et ses conséquences hémorragiques, ou encore
 - du risque pour ledit individu de subir une thrombose.
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'une maladie où la production de plasmine par les microparticules est augmentée comme l'hyperfibrinolyse ou la protéolyse péricellulaire.
- 21.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de suivi de la réponse d'un individu dont le fluide biologique est issu à un traitement, ladite méthode de suivi du traitement étant la méthode de mesure de l'activité plasmine telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.

desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée dans un tampon phosphate salin (PBS) additionné de séralbumine bovine (Bovine Serum Albumin : BSA) à une concentration comprise entre 1,0 et 3,0 mg/ml, préférentiellement entre 1,5 et 2,5 mg/ml.

- 5 15.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape 1ter d'isolement des microparticules en fonction de leur origine.
- 16.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support sur lequel
10 l'étape 2 est réalisée.
- 17.) Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support à l'aide d'un composé apte à immobiliser lesdites microparticules, ledit composé étant préalablement fixé à la surface dudit support.
- 15 18.) Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que le composé apte à immobiliser lesdites microparticules est choisi parmi l'annexine V, les anticorps spécifiques des complexes glycoprotéiques conformationnels actifs et/ou fonctionnels des membranes GPIIb/GPIIIa, les récepteurs adhésifs des monocytes ou des lymphocytes LFA-1, la thrombomoduline endothéliale, ou encore le CD 146
20 ou encore un polycation comme la poly-L-lysine.
- 19.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.
- 25 20.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de diagnostic telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18, chez un individu dont le fluide biologique est issu,
- du risque plus ou moins élevé à subir des accidents vasculaires causés par
30 exemple par une instabilité accrue des plaques d'athérome, ou encore
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'un cancer à subir une invasion métastatique, ou encore
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu à subir un accident vasculaire cérébral et ses conséquences hémorragiques, ou encore
 - 35 - du risque pour ledit individu de subir une thrombose.
 - du risque plus ou moins élevé pour ledit individu atteint d'une maladie où la

dans un volume final compris entre 25 µl et 150 µl, préférentiellement entre 50 µl et 100 µl.

- 5 14.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée dans un tampon phosphate salin (PBS) additionné de sérumalbumine bovine (Bovine Serum Albumin : BSA) à une concentration comprise entre 1,0 et 3,0 mg/ml, préférentiellement entre 1,5 et 2,5 mg/ml.
- 10 15.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape 1ter d'isolement des microparticules en fonction de leur origine.
- 15 16.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support sur lequel l'étape 2 est réalisée.
- 15 17.) Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les microparticules isolées à l'étape 1 sont immobilisées au support à l'aide d'un composé apte à immobiliser lesdites microparticules, ledit composé étant préalablement fixé à la surface dudit support.
- 20 18.) Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que le composé apte à immobiliser lesdites microparticules est choisi parmi l'annexine V, les anticorps spécifiques des complexes glycoprotéiques conformationnels actifs et/ou fonctionnels des membranes GPIIb/GPIIIa, les récepteurs adhésifs des monocytes ou des lymphocytes LFA-1, la thrombomoduline endothéliale, ou encore le CD 146 ou encore un polycation comme la poly-L-lysine.
- 25 19.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique.
- 30 20.) Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que la méthode de mesure de l'activité plasmine dudit échantillon de fluide biologique est celle décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.
- 35 21.) Utilisation de microparticules circulantes présentes dans un échantillon de fluide biologique, dans une méthode de diagnostic, chez un individu dont le fluide biologique est issu,
- du risque plus ou moins élevé à subir des accidents vasculaires causés par exemple par une instabilité accrue des plaques d'athérome, ou encore

microparticules.

- 10.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, est réalisée par toute méthode connue comme par exemple une mesure immunologique (ELISA ou Western blot) à l'aide d'anticorps antiplasmin(ogène) ou encore par spectrophotométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm à l'aide de substrats chromogènes sélectifs de la plasmine.
- 11.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par les microparticules est réalisée selon un procédé dans lequel
 - dans une étape 2-1 on ajoute aux microparticules obtenues à l'étape 1 ou à l'étape 1bis de ladite méthode, du plasminogène, avantageusement purifié, en une quantité finale comprise entre 0,1 μM et 2,0 μM , préférentiellement entre 0,5 μM et 1 μM , et un substrat chromogénique sélectif de la plasmine, en une quantité finale comprise entre 0,50 mM et 1,0 mM, préférentiellement entre 0,65 mM et 0,85 mM ;
 - dans une étape 2-2 on incube, le mélange obtenu à l'étape 2-1, par exemple dans une étuve sèche, à une température comprise entre 25°C et 45°C, préférentiellement 30°C et 40°C, pendant un temps compris entre 30 minutes et 90 minutes, préférentiellement entre 50 et 70 minutes et
 - dans une étape 2-3 la quantité de plasmine susceptible d'être produite est détectée par photométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm.
- 12.) Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que de l'étape 2-1, le substrat sélectif de la plasmine est un substrat fluorescent comme par exemple le H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-méthylcoumarin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) ou le D-AFK-ANSNH-iC4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont USA).
- 13.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée dans un volume final compris entre 25 μl et 150 μl , préférentiellement entre 50 μl et 100 μl .
- 14.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée dans un tampon phosphate salin (PBS) additionné de sérumalbumine bovine (Bovine Serum Albumin : BSA) à une concentration comprise entre 1,0 et 3,0 mg/ml, préférentiellement entre 1,5 et 2,5 mg/ml.
- 15.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape 1^{ter} d'isolement des microparticules en fonction de leur

desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine est déterminée soit par la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, soit par mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par ces microparticules.

- 5 10.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, est réalisée par toute méthode connue comme par exemple une mesure immunologique (ELISA ou Western blot) à l'aide d'anticorps antiplasmin(ogène) ou encore par spectrophotométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm à l'aide
- 10 de substrats chromogènes sélectifs de la plasmine.
- 11.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par les microparticules est réalisée selon un procédé dans lequel
- 15 - dans une étape 2-1 on ajoute aux microparticules obtenues à l'étape 1 ou à l'étape 1bis de ladite méthode, du plasminogène, avantageusement purifié, en une quantité finale comprise entre 0,1 μM et 2,0 μM , préférentiellement entre 0,5 μM et 1 μM , et un substrat chromogénique sélectif de la plasmine, en une quantité finale comprise entre 0,50 mM et 1,0 mM, préférentiellement entre 0,65 mM et 0,85 mM ;
- 20 - dans une étape 2-2 on incube, le mélange obtenu à l'étape 2-1, par exemple dans une étuve sèche, à une température comprise entre 25°C et 45°C, préférentiellement 30°C et 40°C, pendant un temps compris entre 30 minutes et 90 minutes, préférentiellement entre 50 et 70 minutes et
- 25 - dans une étape 2-3 la quantité de plasmine susceptible d'être produite est détectée par photométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nM.
- 12.) Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que de l'étape 2-1, le substrat sélectif de la plasmine est un substrat fluorescent comme par exemple le H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-methylcoumarin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) ou le D-AFK-ANSNH-iC4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont USA).
- 30 13.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée dans un volume final compris entre 25 μl et 150 μl , préférentiellement entre 50 μl et 100 μl .
- 35 14.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité

- 8.) Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que le dénombrement des microparticules est réalisé par cytométrie de flux.
- 9.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine est déterminée soit par la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, soit par mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par ces microparticules.
- 10.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, est réalisée par toute méthode connue comme par exemple une mesure immunologique (ELISA ou Western blot) à l'aide d'anticorps antiplasmin(ogène) ou encore par spectrophotométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm à l'aide de substrats chromogènes sélectifs de la plasmine.
- 11.) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par les microparticules est réalisée selon un procédé dans lequel
- dans une étape 2-1 on ajoute aux microparticules obtenues à l'étape 1 ou à l'étape 1bis de ladite méthode, du plasminogène, avantageusement purifié, en une quantité finale comprise entre 0,1 μM et 2,0 μM , préférentiellement entre 0,5 μM et 1 μM , et un substrat chromogénique sélectif de la plasmine, en une quantité finale comprise entre 0,50 mM et 1,0 mM, préférentiellement entre 0,65 mM et 0,85 mM ;
 - dans une étape 2-2 on incube, le mélange obtenu à l'étape 2-1, par exemple dans une étuve sèche, à une température comprise entre 25°C et 45°C, préférentiellement 30°C et 40°C, pendant un temps compris entre 30 minutes et 90 minutes, préférentiellement entre 50 et 70 minutes et
 - dans une étape 2-3 la quantité de plasmine susceptible d'être produite est détectée par photométrie par lecture de l'absorbance de l'échantillon à 405 nm.
- 12.) Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que de l'étape 2-1, le substrat sélectif de la plasmine est un substrat fluorescent comme par exemple le H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-methylcoumarin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) ou le D-AFK-ANSNH-iC4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont USA).
- 13.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine, est réalisée

phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;

- dans une étape 1E on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 µl et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- dans une étape 1F on reprend le culot obtenu à l'étape 1E dans un volume compris entre 20 µl et 500 µl préférentiellement entre 50 et 100 µl, de tampon phosphate salin (PBS).

- 4.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée directement sur la quantité de microparticules obtenues à l'issue de la première étape.
- 5.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée sur une quantité déterminée de microparticules obtenues à l'issue de la première étape.
- 6.) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que, ladite quantité est comprise entre 10000 et 1000000 microparticules, préférentiellement entre 100000 et 300000 microparticules.
- 7.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle comporte une étape supplémentaire (étape 1bis) de dénombrement des microparticules obtenues à l'issue de la première étape, ladite étape de dénombrement intervenant entre la première et la deuxième étape de la méthode selon l'invention.
- 8.) Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que le dénombrement des microparticules est réalisé par cytométrie de flux.
- 9.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine est déterminée soit par la mesure de la quantité de plasmine spontanément présente sur les microparticules, soit par mesure de la quantité de plasmine susceptible d'être produite par ces

- compris entre 250 μ l et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 5
60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- dans une étape 1E on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 μ l et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise
10 entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1F on reprend le culot obtenu à l'étape 1E dans un volume
15 compris entre 20 μ l et 500 μ l préférentiellement entre 50 et 100 μ l, de tampon phosphate salin (PBS).
- 4.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée directement sur la quantité de microparticules
20 obtenues à l'issue de la première étape.
- 5.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée sur une quantité déterminée de microparticules obtenues à l'issue de la première étape.
- 25 6.) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que, ladite quantité est comprise entre 10000 et 1000000 microparticules, préférentiellement entre 100000 et 300000 microparticules.
- 7.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle comporte une étape supplémentaire (étape 1bis) de dénombrement
30 des microparticules obtenues à l'issue de la première étape, ladite étape de dénombrement intervenant entre la première et la deuxième étape de la méthode selon l'invention.
- 8.) Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que le dénombrement des microparticules est réalisé par cytométrie de flux.
- 35 9.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode, c'est-à-dire la mesure de la capacité

- préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
- dans une étape 1D on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 µl et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise
5 entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1E on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume
10 compris entre 250 µl et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon phosphate salin (PBS) et on centrifuge le mélange à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre
15 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1F on reprend le culot obtenu à l'étape 1E dans un volume compris entre 20 µl et 500 µl préférentiellement entre 50 et 100 µl, de tampon phosphate salin (PBS).
- 20 4.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée directement sur la quantité de microparticules obtenues à l'issu de la première étape.
- 25 5.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la deuxième étape de ladite méthode (mesure de la capacité des microparticules à générer de la plasmine) est réalisée sur une quantité déterminée de microparticules obtenues à l'issu de la première étape.
- 30 6.) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que, ladite quantité est comprise entre 10000 et 1000000 microparticules, préférentiellement entre 100000 et 300000 microparticules.
- 35 7.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle comporte une étape supplémentaire (étape 1bis) de dénombrement des microparticules obtenues à l'issu de la première étape, ladite étape de dénombrement intervenant entre la première et la deuxième étape de la méthode selon l'invention.

REVENDEICATIONS

- 1.) Méthode de mesure de l'activité plasmine des microparticules d'un échantillon de fluide biologique, particulièrement de sang, préalablement prélevé, dans laquelle
 - dans une première étape on isole les microparticules circulantes présentes dans ledit échantillon,
 - dans une deuxième étape on mesure, par tout moyen approprié, la capacité desdites microparticules isolées à l'étape 1 à générer de la plasmine et
 - dans une troisième étape on compare le résultat de la mesure obtenu à l'étape 2 au résultat d'une mesure identique réalisée dans les mêmes conditions sur un échantillon de fluide biologique identique témoin.
- 2.) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fluide biologique identique témoin est un fluide biologique identique à celui testé mais provenant d'au moins un individu considéré comme sain, ou est le même fluide biologique que celui testé, provenant du même individu mais obtenu dans un prélèvement antérieur à celui ayant donné l'échantillon testé, par exemple avant le début d'un traitement.
- 3.) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la première étape de ladite méthode (isolement des microparticules circulantes présentes dans l'échantillon), est réalisée selon un procédé dans lequel dans
 - une étape 1A on centrifuge un volume compris entre 500 μ l et 5 ml, préférentiellement entre 1 ml et 2 ml, d'un échantillon de fluide biologique, par exemple de sang, préalablement prélevé, à une vitesse comprise entre 1000 g et 2000 g, préférentiellement entre 1200 g et 1800g, pendant un temps compris entre 5 minutes et 20 minutes, préférentiellement entre 10 et 15 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1B, on centrifuge le plasma ou surnageant obtenu à l'étape 1A à une vitesse comprise entre 10000 g et 20000 g, préférentiellement entre 12000 g et 15000g, pendant un temps compris entre 1 minute et 5 minutes, préférentiellement entre 2 et 3 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1C on centrifuge le surnageant obtenu à l'étape 1B à une vitesse comprise entre 15000 g et 25000 g, préférentiellement entre 18000 g et 22000g, pendant un temps compris entre 45 et 120 minutes, préférentiellement entre 60 et 100 minutes, à une température comprise entre 2 et 6°C, préférentiellement entre 3 et 5°C ;
 - dans une étape 1D on reprend le culot obtenu à l'étape 1C dans un volume compris entre 250 μ l et 4 ml préférentiellement entre 1 et 2 ml, de tampon





[The main body of the page is mostly blank with some faint, illegible markings and a horizontal dashed line near the top.]

ARTICLE 4

Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry using calibrated beads: results of ISTH SSC Collaborative workshop.

R. Lacroix¹, S. Robert¹, P. Poncelet², R.S. Kasthuri³, N. S. Key³, F. Dignat-George¹, on behalf of the ISTH SSC Workshop .

¹UMR-S 608 INSERM-Aix-Marseille Université, UFR de Pharmacie, Marseille, France

²Biocytex, 140, Chemin de l'Armée d'Afrique, Marseille, France, ³ Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, United States

J. Thromb. Haemost. 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04047.x. (Disponible en ligne)

Les MP sont de petites vésicules, de taille hétérogène de 0.1 à 1µm, libérées par les cellules activées ou en apoptose. Leur rôle de biomarqueur et de biovecteur dans la coagulation, l'inflammation et le cancer est de mieux en mieux établi. Ce qui accroît l'intérêt de leur mesure en pratique clinique. Cependant, à l'heure actuelle, l'évaluation du bénéfice apporté par les MP dans l'identification des sujets à risque vasculaire ou dans le suivi thérapeutique est limitée par un manque de standardisation des méthodologies.

Parmi les différentes technologies disponibles, la CMF est la plus largement utilisée. Cependant les données de la littérature sont difficiles à comparer en raison de l'hétérogénéité des protocoles en termes de réglage des instruments et de leur sensibilité respective. Par exemple, les valeurs de MPP pour les individus sains varient de 100-4000 MPP/µl.

Le paramètre le plus approprié pour l'analyse des MP par CMF est le forward scatter (FS). Cependant, l'identification des MP sur la base de leur taille relative en utilisant ce paramètre est restreinte par la limite de sensibilité des appareils. Même si les cytomètres de dernière génération ont une limite de détection inférieure à 500 nm, la mesure à ce niveau de sensibilité demeure incertaine en pratique courante. Dans ces conditions extrêmes d'utilisation de la CMF pour la numération des MP, la limite de résolution du FS entre les MP et le bruit de fond dépend de l'ajustement fin de l'optique et de la propreté du système fluide et optique du cytomètre. Elle peut donc varier avec le temps en fonction des

maintenances effectuées sur chaque appareil, et donc, être différente entre plusieurs plateformes de CMF. Des outils et des stratégies sont donc nécessaires pour définir et contrôler de manière reproductible la limite inférieure d'analyse des MP sur le paramètre FS afin de numérer les MP de façon standardisée.

Dans ce but, un mélange de plusieurs billes fluorescentes appelé Mégamix, a été développé par la compagnie BioCytex (Marseille, France). Il est constitué de billes fluorescentes calibrées en taille de 0,5 et 0,9 μm dont la formulation respecte un ratio précis de 2 : 1 respectivement. La bille de 0,9 μm aide à placer la limite supérieure de la région d'analyse des MP ; La bille de 0,5 μm aide à régler de manière standardisée le seuil FS et donc la limite inférieure de la fenêtre MP. La valeur médiane de la bille 0,5 μm est choisie comme cible. Ceci est facilement obtenu en utilisant le ratio intrinsèque des billes 0,5/0,9 μm de 2 : 1 et en incluant toujours le même pourcentage de bille 0,5 μm (50%) dans l'analyse. Cette stratégie de calibration par un ratio de bille permet un contrôle à long terme du protocole de mesure des MP par CMF et d'obtenir des comptes reproductibles de MP dans le temps. Nous avons démontrée son efficacité sur des comptes de MPP sur un cytomètre Cytomics FC500 (Beckman Coulter). En utilisant cette stratégie, les réglages optimums ont facilement été transférés entre 3 instruments de même type et des comptes similaires ont été obtenus entre les cytomètres (Annexe5)⁵¹⁷.

A la suite de ce travail, trois sous-comités de standardisation de l'ISTH (Biologie vasculaire, Hémostase et Cancer et DIC) ont initié un projet ayant pour objectif la standardisation des MP par CMF. Dans ce cadre, nous avons organisé un premier atelier collaboratif international ayant pour objectif, de définir la reproductibilité inter-instrument des numérations de MPP dans le plasma humain en appliquant la stratégie Mégamix précédemment décrite.

Nous avons donc posé l'hypothèse qu'une stratégie de standardisation utilisant des billes fluorescentes calibrées en tailles (Mégamix) permettait d'obtenir des numérations des MPP reproductibles entre les différents cytomètres et opérateurs.

Cette étude a fédéré 40 laboratoires internationaux, soit 59 cytomètres, composés de marques et de générations différentes. Elle s'est déroulée en 2 phases : L'objectif de la phase initiale était de vérifier si les instruments utilisés pour la numération des MPP montraient les performances requises pour l'utilisation des billes fluorescentes. Dans cette phase A, les

laboratoires participant ont reçu les billes Mégamix avec lesquelles ils ont réglé sur leurs cytomètres le protocole pré-défini et l'ont validé. Basé sur les performances de résolution sur le paramètre FS et le niveau de bruit de fond, les instruments testés ont été acceptés ou rejetés pour la phase B. Dans la phase B, les laboratoires sélectionnés (n=29) ont reçu des aliquotes de plasma humain dépourvus de plaquettes correspondant à trois niveaux de MPP. Ces échantillons ont été analysés avec les instruments précédemment validés, sur le protocole établi avec les billes Mégamix et en utilisant des réactifs communs. Toutes les données brutes ont ensuite été ré-analysées par notre laboratoire.

Les résultats de ce travail ont montré qu'il était possible de définir les performances de la CMF en termes de résolution du FS et de bruit de fond quel que soit le type d'instrument en utilisant les billes Mégamix. Ces billes de calibration représentent un outil efficace pour standardiser la mesure de MPP, dont le coefficient de variation se situe entre 10 et 20% sur les cytomètres qui mesurent le paramètre FS avec un angle relativement large (1-19°) comme les instruments de type Beckman Coulter. Cette stratégie s'est cependant révélée inapplicable sans modifications substantielles sur des instruments mesurant le paramètre FS avec un angle plus réduit (1-8° Becton-Dickinson).

OFFICIAL COMMUNICATION OF THE SSC

Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop

R. LACROIX,* S. ROBERT,* P. PONCELET,† R. S. KASTHURI,‡ N. S. KEY‡ and F. DIGNAT-GEORGE*
ON BEHALF OF THE ISTH SSC WORKSHOP

*UMR-S 608 INSERM-Aix-Marseille Université, UFR de Pharmacie and Laboratoire d'hématologie, CHU Conception, Marseille; †Biocytex, Marseille, France; and ‡Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

To cite this article: Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, on behalf of the ISTH SSC Workshop. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2571–4.

Microparticles (MPs) are sub-micrometer sized vesicles released from cell membranes in response to activation or apoptosis [1]. MPs originating from several cell sources have been described in human plasma. Among them, platelet-derived MPs (PMPs) are believed to account for the majority of circulating MPs in healthy subjects [2]. Their levels are increased in several prothrombotic and inflammatory disorders [1]. In these clinical settings, PMP counts may be useful for identifying patients at risk for vascular disorders and for monitoring response to treatment [3]. However, their clinical use is not fully established, because standardized methodologies for PMP counting are lacking.

A previous International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Vascular Biology Subcommittee survey indicated that approximately 75% of laboratories use flow cytometry (FCM) to enumerate MPs in clinical samples. However, a wide variety of preanalytic variables and analytic variables have been reported in the literature, resulting in a wide range of PMP values in platelet-free plasma (PFP) of healthy subjects (100–4000 PMPs μL^{-1}). This lack of consensus stresses the need for standardization [4].

Three ISTH Scientific and Standardization Subcommittees (SSC Vascular Biology, DIC, and Haemostasis & Malignancy) have initiated a project aimed at standardizing the enumeration of cellular MPs by FCM. A first collaborative workshop was set up, to: first, establish the resolution and the level of background noise of the flow cytometers currently used in laboratories with respect to the strategy requirements; and second, define the interinstrument reproducibility of PMP enumeration in human plasma. This strategy was based on the use of fluorescent

calibrated sub-micrometer beads (Megamix beads; BioCytex, Marseille, France), which allow the window of MP analysis to be reproducibly set [5].

The study included 40 laboratories accounting for 59 flow cytometers, and was performed in two stages (Fig. S1): in stage A, participating laboratories received Megamix beads and were asked to set up the FCM protocol and to validate an instrument protocol adapted from a previously described method [5]. On the basis of forward scatter (FS)/FS channeling (FSC) resolution and background characteristics, stage A results led to acceptance or rejection of the tested instruments, with some time being allowed for technical intervention in order to improve any deficient performance. In stage B, selected laboratories received PFP samples prepared as frozen aliquots by the core laboratory, and were asked to analyze them with the previously validated instrument(s), common reagents, and the FCM protocol established in stage A. A detailed description of the methodology is available in the Supporting Information (Data S1).

The purpose of this initial phase was to check whether the instrument to be used to enumerate PMPs demonstrated the required performance with a blend of fluorescent beads with well-known sizes and relative amounts. The instruments were validated on the basis of their capacity to discriminate between 0.5- μm and 0.9- μm Megamix beads using the FS/FSC parameter, as well as their background noise. Instruments detecting < 0.1% of fluorescent bead events among total events were rejected, because such a level of background may impede the electronics functions and induce a major loss of events owing to coincidences and electronic aborts (Fig. S2A,B). Analysis of the results demonstrated that instruments were heterogeneous with respect to FS/FSC resolution and background noise. Furthermore, the level of performance could vary over time (Fig. S2C). Some of the parameters affecting FS/FSC resolution were identified with Megamix beads. Among them, FS/FSC gain, FS/FSC mode, neutral density (intensity scavenging)

Correspondence: Françoise Dignat-George, UMR-S608, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France.

Tel.: +33 491 385600; fax: +33 491 385602.

E-mail: francoise.dignat-george@univmed.fr

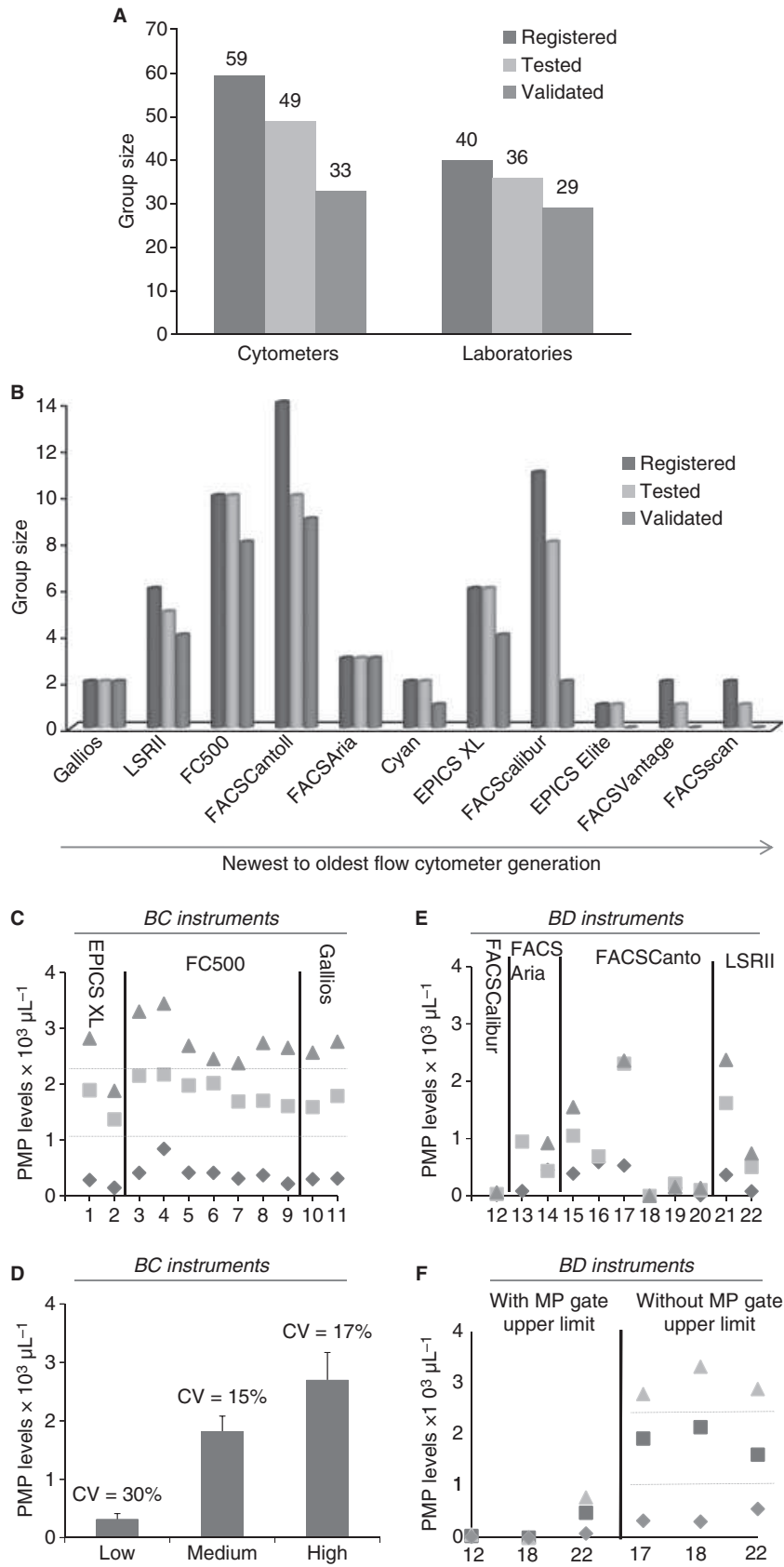


Fig. 1. Instrument validation (stage A) (A) Histogram showing the number of flow cytometers and laboratories that were registered in the workshop (black bars), were tested (light gray bars), and were validated (dark gray bars). (B) Histogram showing the number of flow cytometers that were registered in the workshop (black bars), were tested (light gray bars), and were validated (dark gray bars), according to their type, classified from newest to oldest generation. (C–F) Interlaboratory reproducibility (stage B). (C) Platelet-derived microparticle (PMP) levels obtained for the three tested platelet-free plasmas (PFP) (diamonds, low; squares, medium; triangles, high) for each validated Beckman Coulter (BC) instrument. (D) Histogram showing the interlaboratory reproducibility obtained for the three PFPs with BC instruments. (E) PMP levels obtained for the three PFPs (diamonds, low; squares, medium; triangles, high) for each validated Becton Dickinson (BD) instrument. (F) PMP levels for the three tested PFPs (diamonds, low; squares, medium; triangles, high) before and after removing the upper limit on the microparticle (MP) gate on three selected BD instruments. CV, coefficient of variation.

filters, flow rate and osmolarity of the Megamix suspension proved to be important (Fig. S3). Megamix bead analysis allowed easy optimization of these parameters.

Finally, among 59 registered instruments from 40 candidate laboratories, 49 were tested, and 33 (67%) from 29 laboratories were ultimately validated (Fig. 1A). As expected, a higher validation rate was obtained with instruments of later generations [Gallios from Beckman Coulter (BC), Miami, FL, USA; LSR II from Becton Dickinson (BD), Franklin Lake, NJ, USA; FC500 from BC; FACSCanto II from BD] than with instruments of older generations (FACSCalibur from BD; EPICS XL from BC): 84% vs. 35%, respectively. However, as shown in Fig. 1B, some of the most sophisticated instruments failed to qualify [FACSCanto II (1/10), LSR II (1/5), and FC500 (2/10)]. Conversely, some instruments of older generations reached the required criteria, as seen with EPICS XL (4/6) and FACSCalibur (2/8). This outcome shows that instrument response related to the FS/FSC parameter is highly variable, and depends on the status of an individual instrument, which needs to be recalibrated on a regular basis.

To avoid any preanalytic-linked variability, the core laboratory prepared and validated PFP samples (Fig. S4). All participants received six PFP aliquots from three different samples accounting for three different PMP levels (low, medium and high). PMPs were enumerated on validated instruments, with common reagents and the same FCM protocol that was previously calibrated with Megamix beads.

The analyses obtained from 22 instruments (11 BC and 11 BD) are shown in Fig. 1C,E. As illustrated in Fig. 1D, interlaboratory reproducibilities of 30% (low), 15% (medium) and 17% (high) were found among BC instruments with Megamix beads, whereas highly dispersed values were reported with BD instruments (Fig. 1E): – 24%, coefficient of variation (CV) = 78% (low); – 60%, CV = 87% (medium); and – 66%, CV = 91% (high).

A potential explanation for such a discrepancy between the two types of instrument was suggested by the observation of the location of the PMP population on the standardized size-related window of analysis. As shown in representative examples (Fig. S5A), the PMP population was located inside the MP gate defined by the Megamix beads for BC instruments, whereas it varied from being partly inside to entirely outside the MP gate on all BD instruments (Fig. S5B,C). Interestingly, as illustrated in Fig. 1F, when listmode files were reanalyzed without setting an upper limit on the MP gate with three BD instruments (no. 12, FACSCalibur; no. 18, FACSCanto II; and no. 22, LSR II), a similar range of PMP values

as determined by BC instruments was apparent. Taken together, these findings showed that PMP concentrations appeared to be consistent among instruments that measure the FS parameter with a relatively wide solid angle (1–19°, Beckman-Coulter; hereafter referred to as ‘wide FS platforms’). However, at present, this strategy could not be applied without substantial modifications for instruments with FSC signals collected with a lower solid angle (1–8°, Becton-Dickinson; so-called ‘low FS platforms’). These discrepancies between BD and BC instruments are also consistent with the notion that size-related information derived from plastic beads and that derived from biological particles are not comparable.

To conclude, these data indicate that standardization of PMP enumeration by FCM is feasible but is dependent on intrinsic characteristics of both the flow cytometer and the calibration strategy. Calibrated beads such as Megamix are useful standards that allow instrument qualification and follow-up. However, they do not constitute a universal biological standard for PMP enumeration. At present, this strategy has proved to be applicable for instruments that measure the FS parameter with ‘wide FS platforms’.

Moreover, additional questions are raised by this study. Is it adequate to focus only on MPs larger than about half a micrometer in size? If so, how representative is this ‘visible part of the MP iceberg’ for the clinically relevant biomarkers that we are seeking? Can we look forward to a newer generation or types of flow cytometer (or alternative technologies with similar immunologic capabilities) that would allow enumeration and characterization of particles of smaller sizes? Finally, a critical, but so far unaddressed, area is the impact of preanalytic conditions on MP enumeration. These questions constitute the basis for future SSC workshops.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Supplemental materials and methods.

Fig. S1. Design of the study.

Fig. S2. Resolution and background noise heterogeneity.

Fig. S3. Parameters affecting forward scatter (FS)/FS channeling (FSC) resolution.

Fig. S4. Interquartile variability.

Fig. S5. Platelet-derived microparticle (PMP) location on the standardized size-related window of analysis between Becton Dickinson (BD) and Beckman Coulter (BC) instruments.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Appendix

ISTH SSC Workshop: A. Leyte, M. van Schilfgaarde, A. Falanga, A. Vignoli, A. Enjeti, L. Lincz, A. Maraveyas, L. Madden, A. Bonnefoy, J. Rivard, K. Ben-Zion, J. Lopez, P. Davizon-Castillo, E. Maurer-Spurej, F. Mullier, J. Marvin, H. Kwaan, I. Weiss, I. Bosch, M. Woda, J. Pereira, P. Hidalgo, J. Antovic, F. Mobarrez, K. Ghosh, L. Macchi, G. Franck, M. Perez-Casal, M. G. Huisse, M. Macey, M. Harrison, A. Amirkhosravi, M. Davila, N. Li, N. Matijevic, W. Wang, P. Harrison, A. N. Boing, H. Büller, R. Nieuwland, W. Chandler,

W. Yeung, D. Stirling, S. Baird, S. Zahra, R. Krueger, R. Ross, J. Thom, S. Osanto, Y. Yuana, V. Martinez-Sales, V. Virtudes, V. Proulle, V. Latger-Cannard, M. De Carvalho, S. Susen, M. S. Carraway, and A. Charpentier.

References

- 1 Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; **21**: 157–71.
- 2 Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* 2007; **137**: 36–48.
- 3 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 2594–604.
- 4 Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006; **20**: 1–26.
- 5 Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 190–7.

Supplemental materials and methods

Cytometers

The study included 40 laboratories from 14 different countries, accounting for 59 cytometers. The tested instruments included 2 FACScan, 11 FACSCalibur, 2 FACSVantage, 3 FACS Aria, 14 FACSCanto, and 6 LSRII from Becton-Dickinson (BD, Franklin lakes, NJ, US) and 1 EPICS Elite, 6 EPICS XL, 2 Cyan, 10 FC500 and 2 Gallios from Beckman-Coulter (BC, Miami, FL, US).

Reagents

Megamix™ beads were provided by BioCytex (Marseille, France) to all participants. The common flow cytometry reagents for platelet-derived microparticle (PMP) staining were Annexin V FITC (fluorescein) (from AnnV/7AAD kit, Beckman Coulter), CD41-PE (phycoerythrin) (clone PL2-49) together with its concentration-matched isotype control IgG1-PE (clone 2DNP-2H11/2H12) from BioCytex and Flow-Count® beads (Beckman-Coulter) for absolute counting.

Platelet-Free Plasma preparation

PFP (Platelet Free Plasma) was prepared using serial centrifugations (15 min at 1,500g, followed by 2 min at 13,000g) of a 400 ml unit of fresh whole blood donated by a single healthy donor at the Blood Bank in Marseille. Aliquots of 100 µl were frozen in coloured Eppendorf tubes and stored at -80°C until use. Three PMP levels (low, med and high) were generated by applying variable pre-analytical conditions. Time delay between blood collection and the first centrifugation was 3h for med level and 6h for high level. Low level was obtained after 4 freeze/thaw cycles. Six aliquots of each level were provided to

participating labs for each validated instrument. Inter-aliquot reproducibility was evaluated after one freezing/thawing cycle, and stability over time of the three levels was regularly checked on the same instrument during the study.

Flow cytometry protocol for stage A

In order to evaluate the quality of FS(C) (Forward Scatter (Channel)) resolution of the cytometers using Megamix™ beads, the following protocol was designed: (a) Flow cytometry (FCM) analysis was set with a discriminator (also called threshold) on FL1 fluorescence detector (FITC detection channel) fluorescence in order to focus FCM analysis only on the Megamix fluorescent beads, and thus avoid any background originating from all other non fluorescent particles; (b) bead singlets (3/0.9/0.5 μm) were selected on FL1 x SS(C) (Side scatter (Channel)) cytograms; and (c) instrument resolution (ability to discriminate between 0.5 and 0.9 μm beads) was checked on the FS(C) histogram as well as dual scatter plots (FS(C) x SS(C)) gated on submicron beads.

To check whether background level was acceptable in these conditions, threshold was switched to the FS/FSC-H parameter and the FS/FSC settings (threshold, gains) were adjusted until the 0.5 μm bead peak represented $\sim 50\%$ (range 48% - 52%) of the total sub-micron beads. Due to the initial intrinsic 2:1 ratio of the 0.5 μm and 0.9 μm beads in Megamix, this setting corresponds to a cut centered at the median of the 0.5 μm beads histogram and thus positioned at the level of their nominal size.

FCM protocol for stage B

To enumerate PMP in PFP aliquots prepared by the core center, participating laboratories were instructed to use the protocol established in stage A with the following exception: BD instrument users were asked to modify the protocol in order to reduce the high background noise generally observed in standard conditions. Thus, a combined size-related threshold was triggered on both the FSC-H and SSC-H parameters rather than the FS threshold alone as recommended for BC instruments. SSC PMTv (photomultiplier voltage) was increased so that 0.9 μm beads reached 4×10^3 a.u. (arbitrary units) in a 5.5 decade log scale, while SSC threshold was set at the minimum possible value (200 a.u.). Based on previous tests on BD FACSCanto II and feedback from participating labs, this setting had seemed compatible with detection of all PMP seen in FC500 using the FS threshold alone.

On all instruments, FS/FSC threshold was set in order to reach 50% for the 0.5 μm beads just before PFP analysis. A rectangular dual scatter gate to measure MP was created with an upper limit defined by the tangents to an elliptical autogate set on 0.9 μm beads and the lower limit by the FS/FSC threshold. PMP were analysed in a dual fluorescence cytogram (FL1xFL2) gated on the MP scatter gate.

For each PFP level, 3 tubes were prepared. 30 μL of PFP was incubated with (a) 10 μL CD41-PE + 10 μL AnnV-FITC (diluted with PBS (phosphate buffered saline) without Ca^{2+}), (b) 10 μL IgG1-PE + 10 μL AnnV-FITC (diluted with Annexin kit Binding Buffer – BB), (c) 10 μL CD41-PE + 10 μL AnnV-FITC (diluted with BB). Incubation time was 30 min at room temperature with samples protected from light. Each stained tube was run in the standardized protocol (time stop set to 1 mn; low flow-rate), with a maximum delay of 30 min after the end of staining. Compensation was adjusted using tubes a and b. PMP were defined as

AnnV+/CD41+ events. Absolute values were determined using counting beads (Flow-Count, Beckman-Coulter) as previously described (21).

File transfer and re-analysis

Results of the analysis and all LMD (*listmode*) files corresponding to the Megamix analysis (Fluorescence and Scatter Threshold) and the PFP analysis (for each level) were sent to the core laboratory in fcs (*flow cytometry standard*) 2.0 or fcs 3.0 FCM standard format. Files were re-analyzed using FCS express software (De Novo software, LA, CA, USA). For comparison of the PMP counts and calculation of inter-laboratory variability, either a single value or the mean of all sent values when several replicates (up to 6) were sent, was used.

Statistical analysis

All data were analyzed with GRAPH PAD PRISM software v.4.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For reproducibility studies, data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The coefficient of variation (CV, %) was calculated as $100 \cdot \text{SD}/\text{mean}$. Grubb's test was applied to detect outliers in the dataset of intra-instrument reproducibility.

Supplemental figures (legend)

Supplemental figure 1

Design of the study. FCM: Flow cytometry, SSC ISTH: standardization subcommittees of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Supplemental figure 2

Resolution and background noise heterogeneity; representative graphs of FC500 and FACSCanto II cytometers. A; FS/FSC resolution heterogeneity in the capacity to discriminate between 0.5 and 0.9 μm beads. Left panel: FS(C)/SS(C) scattergrams of the 0.5 and 0.9 μm beads. Right panel: FS(C) histograms of the 0.5 and 0.9 μm beads. Threshold is set on FL1 B; FS/FSC background noise heterogeneity. FS(C)/SS(C) scattergrams of the 0.5 and 0.9 μm beads. Threshold is set on FS(C) C; Variation over a 2 year period of a FC500 cytometer performance. Upper panel: FS(C) histograms of the 0.5 and 0.9 μm beads with threshold on FL1 showing the resolution between the two beads over time. Lower panel: FS(C)/SS(C) scattergrams of the 0.5 and 0.9 μm beads with threshold on FS(C) showing the background noise over-time.

Supplemental figure 3

Parameters affecting FS/FSC resolution; A. FS/FSC gain. Increasing the FS gain provided improved resolution due to a higher number of measurement channels per decade in the upper decades. B. FS/FSC mode. During FSC signal treatment on FACS instruments that provide a choice, use of signal height (FSC-H) parameter provided better resolution than signal area (FSC-A). C. Neutral density ([light reducing](#)) filters. On a FACSAria, FSC signal absorption due to the involuntary use of a neutral density filter impeded measurement of small particles. D. Flow rate. With all cytometers, a low flow rate gave the best results compared to a higher speed option E. Osmolarity of the Megamix suspension. On BD instruments, Megamix [low](#) osmolarity seemed to influence resolution. In some [cases](#), dilution 1:2 in salted buffer/sheath fluid produced improved instrument performance in some cases.

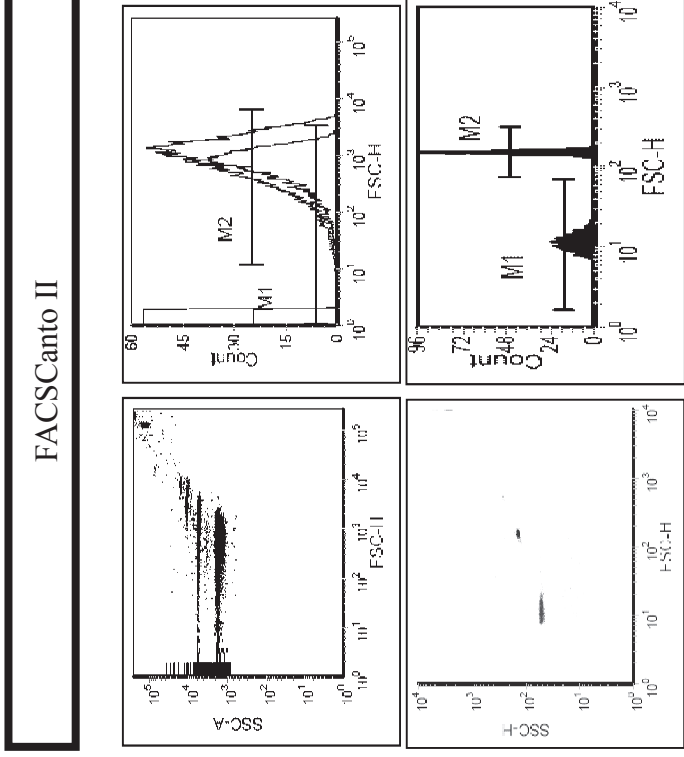
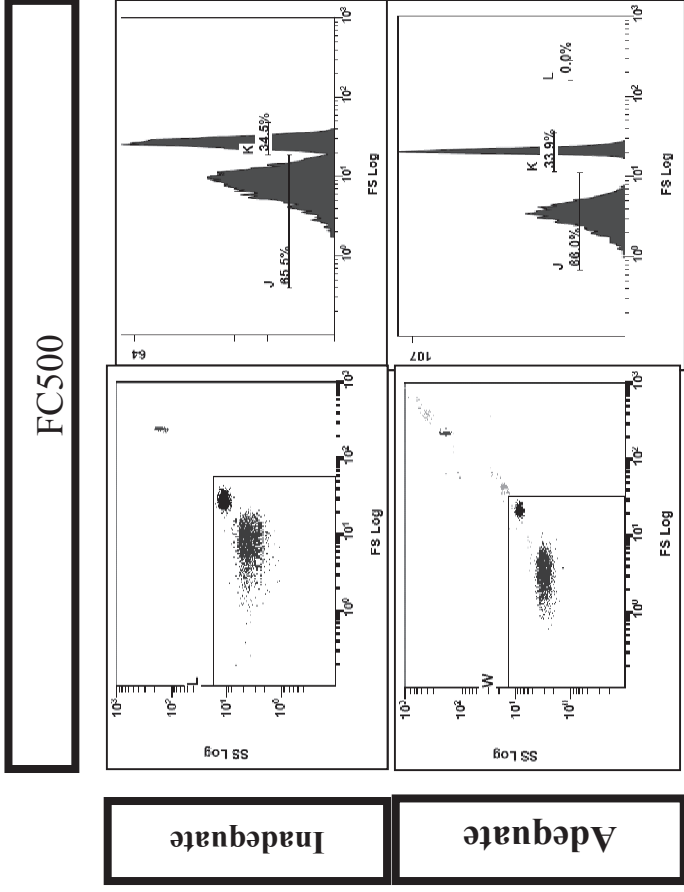
Supplemental figure 4

Inter-aliquot variability; A. Inter-aliquot reproducibility after one freeze/thaw cycle using the same cytometer, reagents, methodology and operator for the three levels of PMP including inter-run variability of the cytometer on a core lab instrument (FC500). B. Stability of frozen aliquots over time on a FC500. C. Stability of frozen aliquots over-time on a FACSCanto II. D. Overall variability (mean and range values) inter-aliquots including data obtained on 13/14 cytometers with 2 to 6 PMP enumerations each.

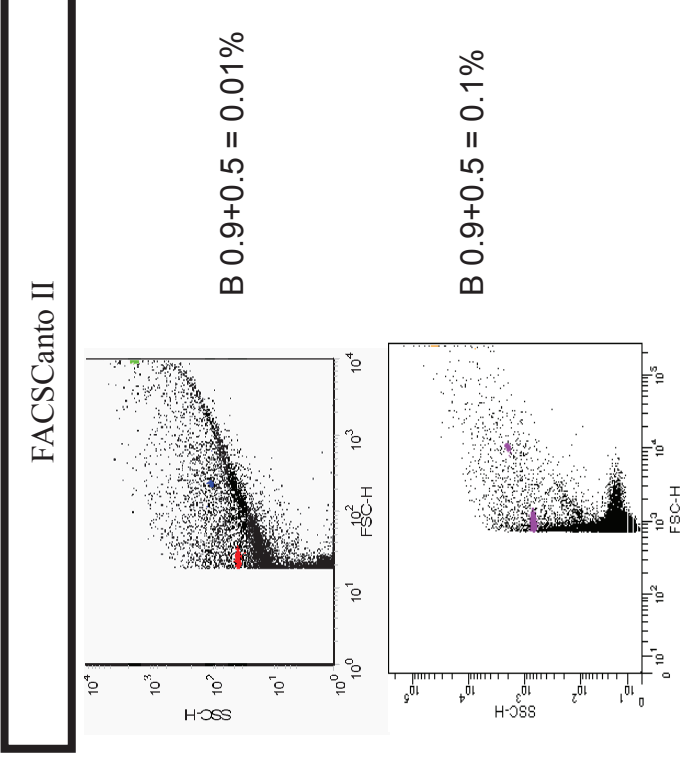
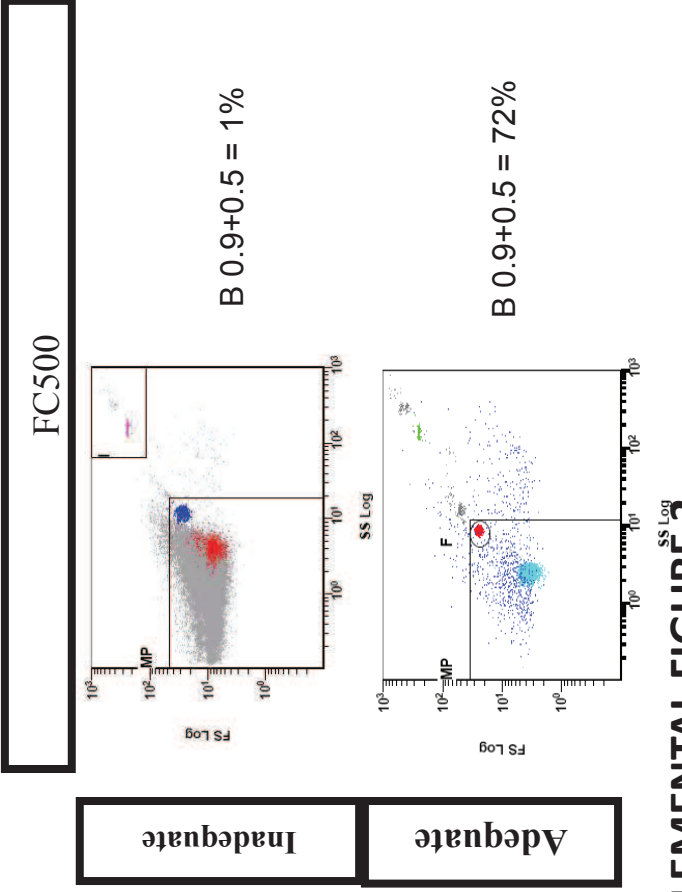
Supplemental figure 5

PMP location on the standardized size-related window of analysis between BD and BC instruments. A. EPICS XL. B. FACSCanto a. C. FACSCanto b.

A



B

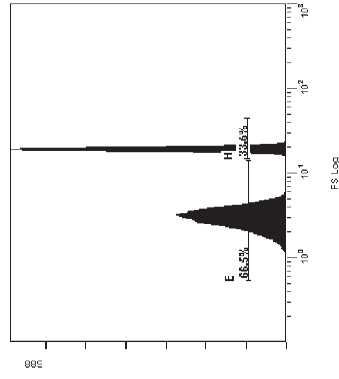


Parameter Cytometer

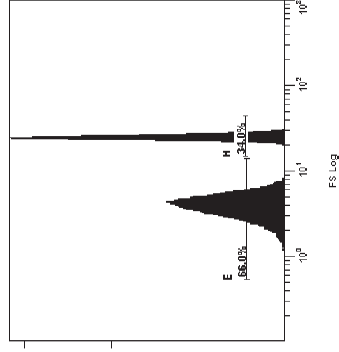
Time FC500

C Resolution

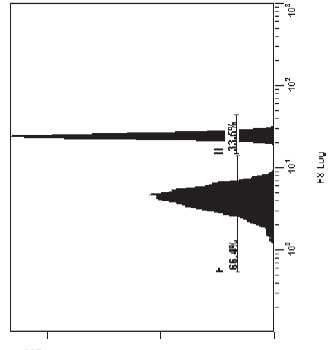
Mar07



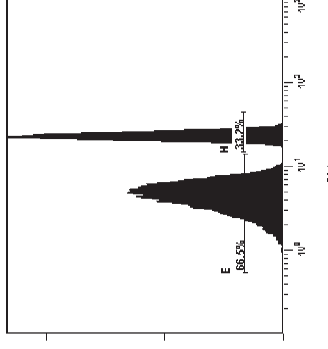
Nov07



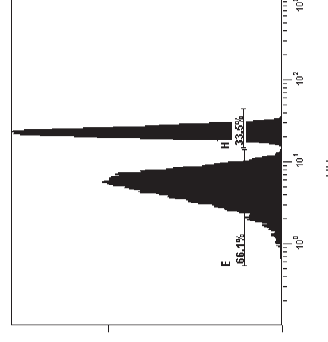
Feb08



Oct08

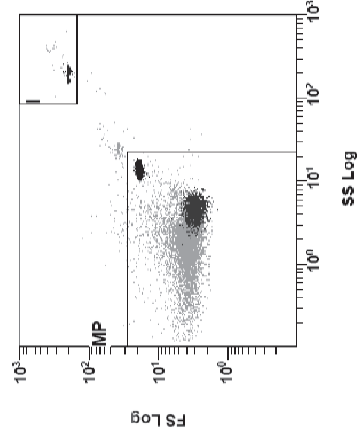


Mar09

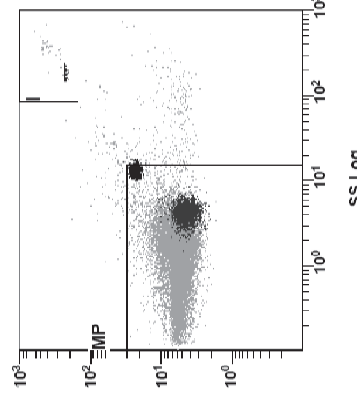


Background noise

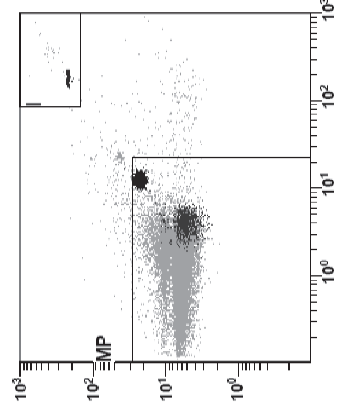
Mai07



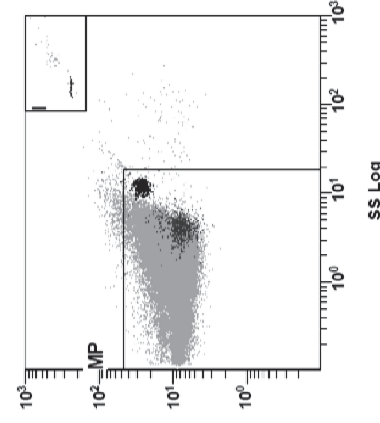
Dec07



Mai08



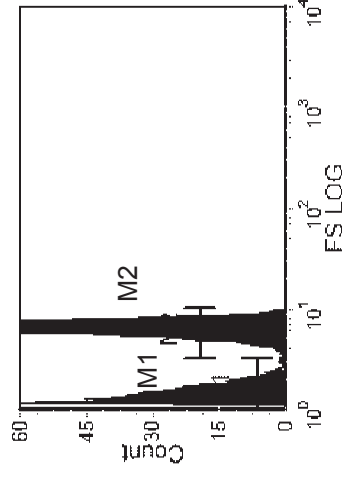
Jan09



Parameter Cytometer

(Non optimized/
Optimized)

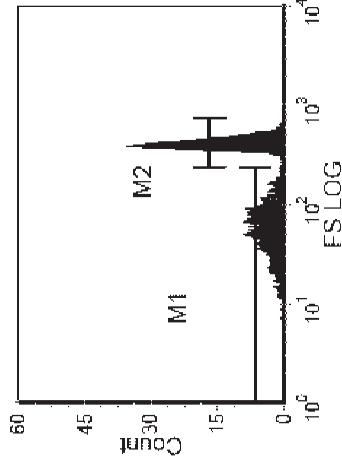
A FS/FSC gain
(High/Low) *FACSCalibur*



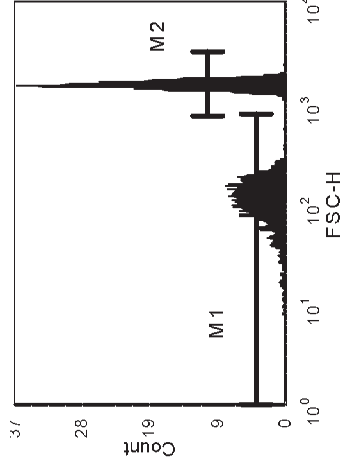
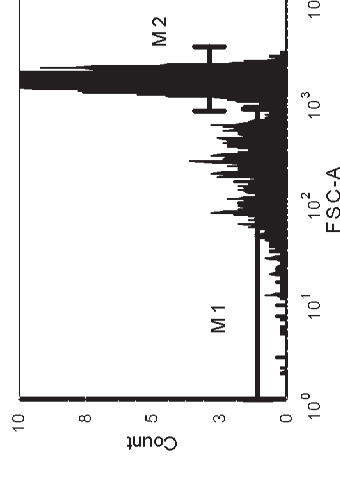
Non optimized

Optimized

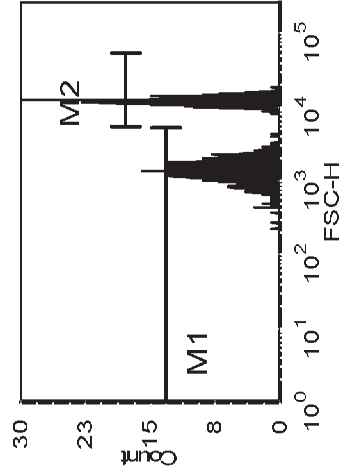
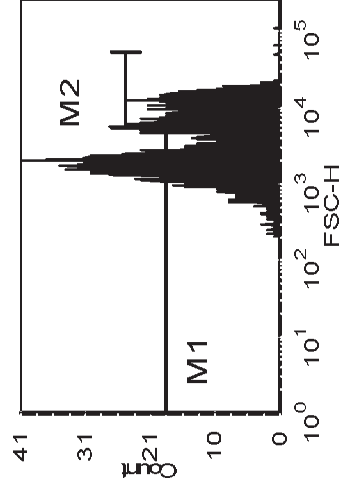
M1 = 0.5 μ m beads/M2 = 0.9 μ m beads



B FS/FSC mode
(FSC-A/FSC-H) *FACSCanto II*



C FS/FSC filter
(Neutral density filter +/-) *FACSAria*



Parameter Cytometer

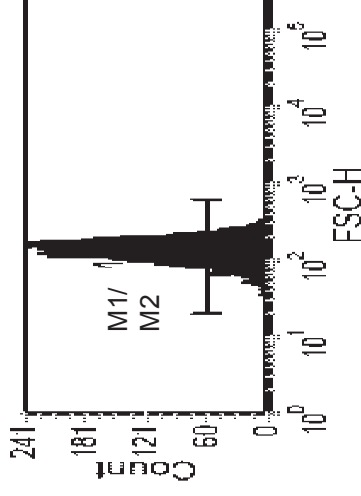
(Non optimized/
Optimized)

Non optimized

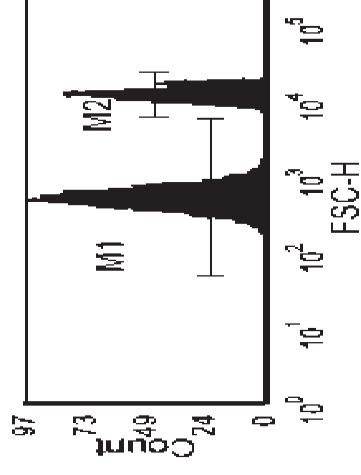
Optimized

D Flow rate (Medium/Low)

FACSCanto II

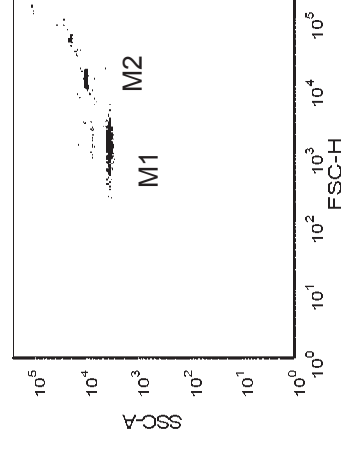
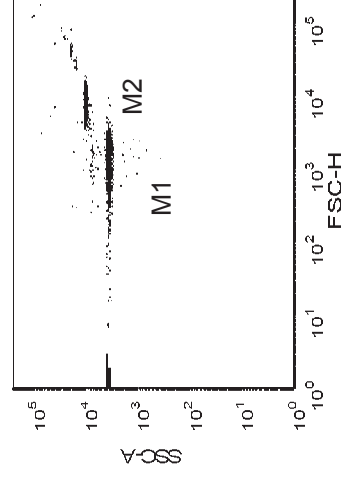


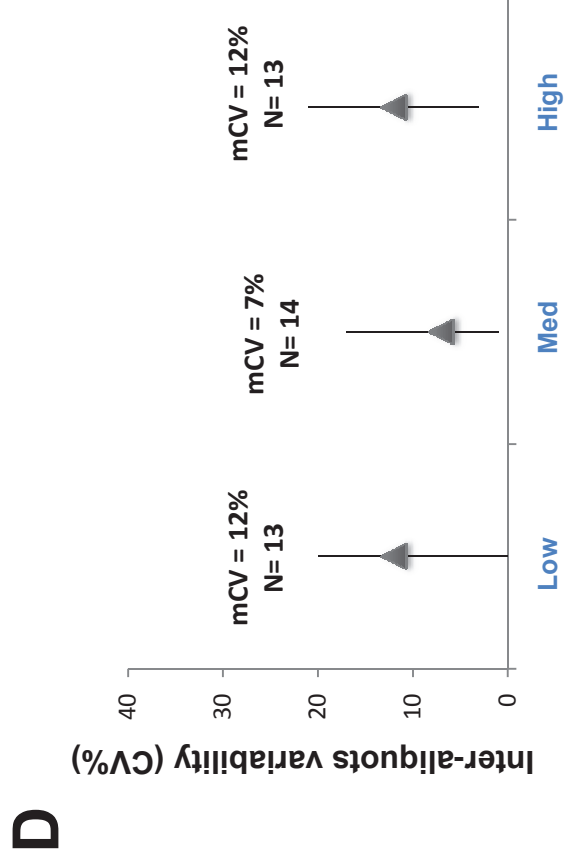
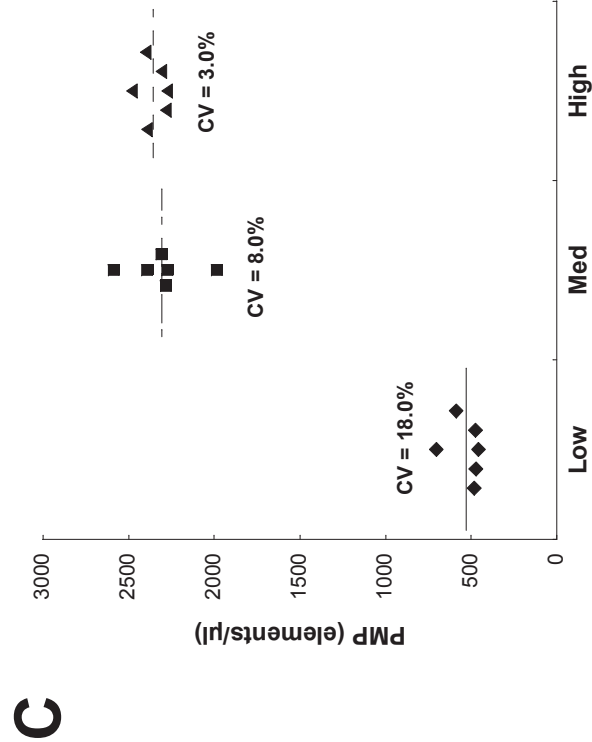
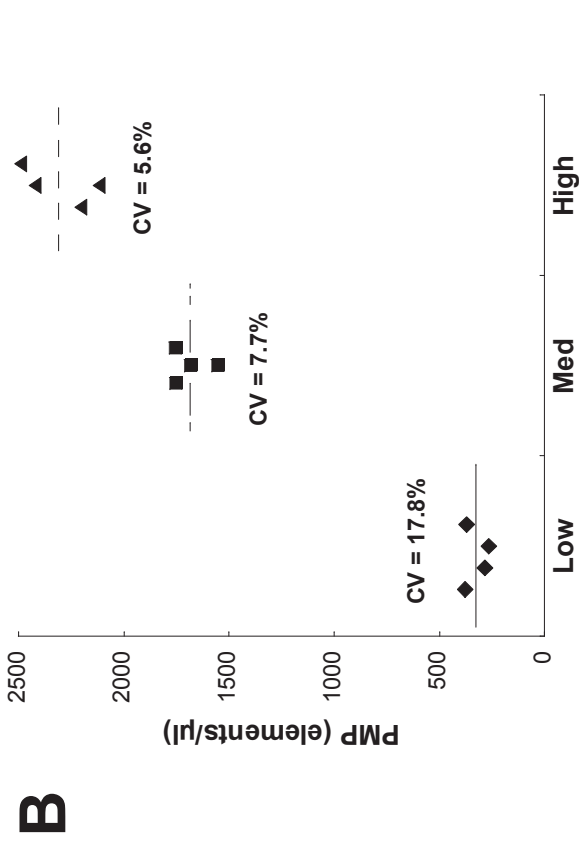
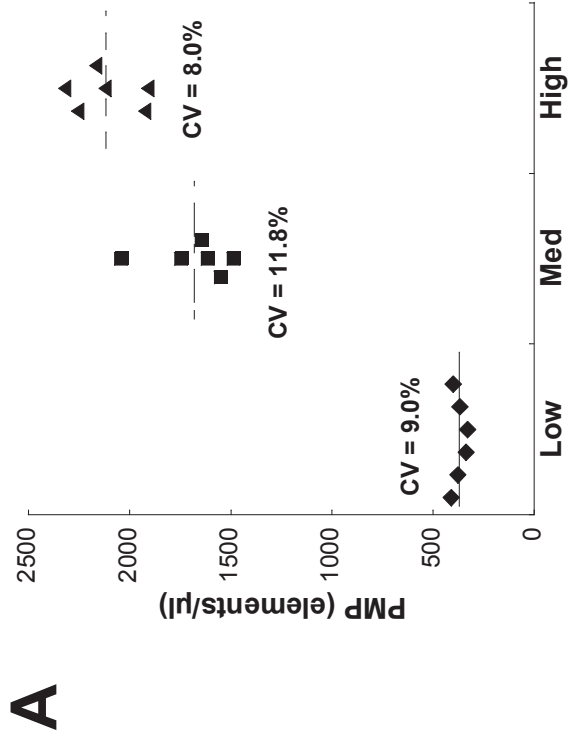
M1 = 0.5 μ m beads/M2 = 0.9 μ m beads

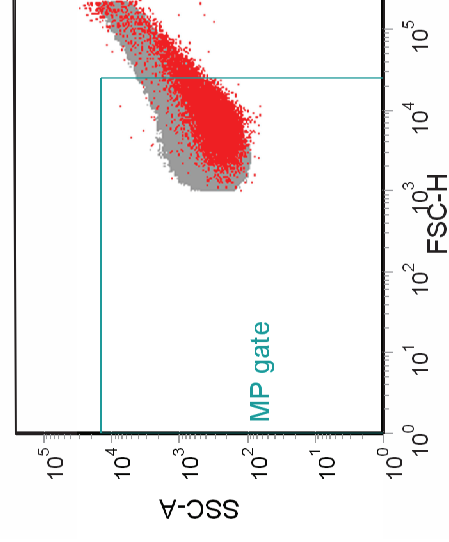
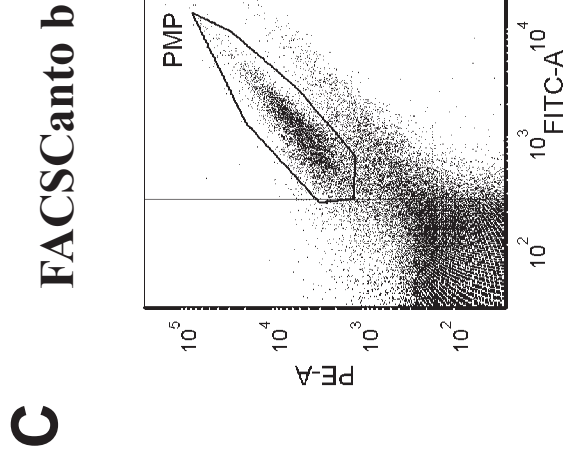
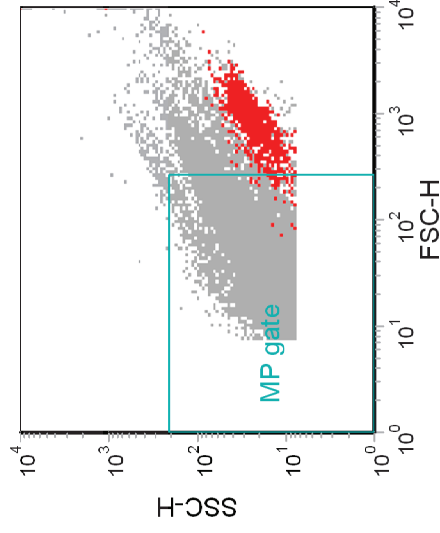
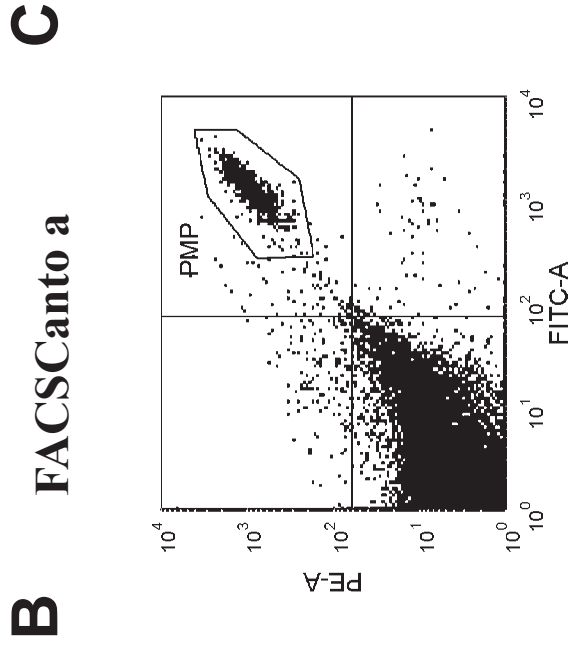
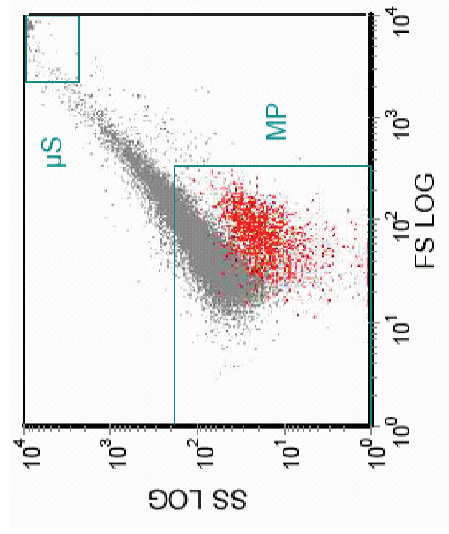
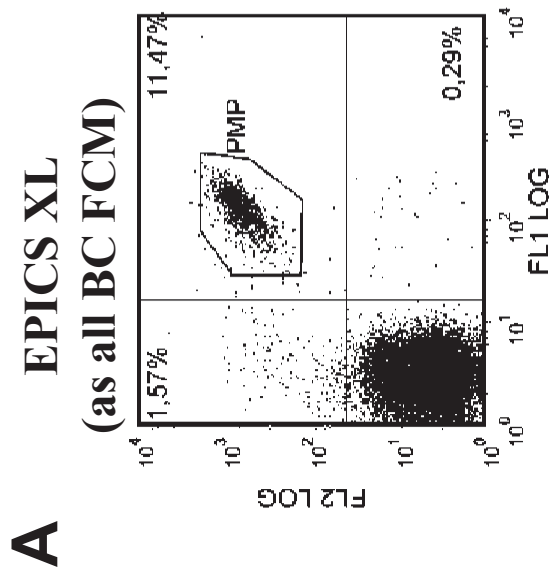


E Osmolarity (Without/with Megamix dilution in salted buffer)

FACSCanto II







ARTICLE 5

Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry.

Dr Romaric Lacroix ^{1,2} (PharmD), Stephane Robert ¹, Dr. Philippe Poncelet ³ (PhD), Pr. Françoise Dignat-George ^{1,2*} (PharmD,PhD)

¹ UMR-S608 INSERM, F-Marseille, France, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, F-Marseille, France ² Service d'hématologie, CHU La Conception, AP-HM, F-Marseille, France ³ Biocytex, Marseille, France

Seminar in Thromb. Haemost. 2010; 36 : 807-18

Le CMF est à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour la mesure des MP circulantes grâce à sa capacité d'analyse multiparamétrique de très haut débit de chaque MP individuelle. Cependant cette méthodologie présente également des limites qui expliquent que les cytomètres utilisés jusqu'à présent ne mesurent qu'une partie des MP (celles de grosse taille). Ces limites peuvent être de trois ordres : une difficulté à détecter les événements de faible antigénicité, un comptage absolu des MP couteux et sujet à variations et une difficulté à détecter des événements de faible taille (inférieure à 0.5µm).

L'objectif de cette revue a été de discuter des limites actuelles de la cytométrie en flux et de faire un état des lieux des stratégies ou améliorations technologiques permettant de dépasser ces limites.

Cette revue est focalisée sur les étapes analytiques de la mesure de MP par CMF et exclue les étapes pré-analytiques pourtant source majeure de variabilité et de potentiels artefacts. Après une courte revue des méthodologies disponibles, elle se concentre sur les limites de la CMF qui relèvent de différentes problématiques : 1/la détermination de la taille, 2/ le marquage, 3/la numération absolue. Cette revue couvre également les diverses stratégies de standardisation et les améliorations technologiques proposées pour dépasser ces limites.

Des stratégies originales de calibration et les récents progrès de l'instrumentation ouvrent de nouvelles voies pour permettre la détection des MP de plus petites tailles, jusqu'alors irréalisable, avec les cytomètres de dernière génération. Une optimisation significative de la détection des MP est aussi attendue de l'utilisation de nouveaux marqueurs fluorescents et de l'établissement de recommandations pratiques. Enfin le comptage absolu des MP va bénéficier également de stratégies adaptées basées sur des billes de comptage et de la généralisation des systèmes volumétriques. De façon globale, les récentes améliorations technologiques permettent à la CMF de rester hautement compétitive pour la mesure des MP. Le réel impact de ces améliorations pour la pratique clinique reste à démontrer dans des situations pathologiques.

Le contenu de ce manuscrit dépasse largement le cadre d'une simple revue de la littérature. Il contient de nombreux éléments et synthèses, fruits de plusieurs années d'expérience propre à notre laboratoire, de dialogues étroits avec les acteurs industriels et académiques de ce domaine et d'une prospection active amenant à une expertise directe des innovations proposées dans cette application. Ce travail est également le fruit d'une aventure humaine au sens figuré comme au sens propre quand il s'agit d'aller faire dans la même journée 1200 km de voiture dont 50 km avec des chaînes dans les neiges de l'hiver pyrénéen pour expertiser un nouveau cytomètre. Ceci justifie donc pleinement la place de cette revue dans la partie travail personnel de cette thèse.

Overcoming Limitations of Microparticle Measurement by Flow Cytometry

Romarc Lacroix, Pharm.D.,^{1,2} Stephane Robert, Mast. D.,¹
Philippe Poncelet, Ph.D.,³ and Françoise Dignat-George, Pharm.D., Ph.D.^{1,2}

ABSTRACT

Circulating microparticles are submicron vesicles released from cell membranes in response to activation or apoptosis. Acknowledgment of their role both as markers and pathogenic effectors in thrombosis, inflammation, and the spread of cancer has increased the interest of their measurement in clinical practice. However, assessment of their clinical use is impeded by technological issues. Among the different methodologies available, flow cytometry is the most commonly used technique. This review addresses flow cytometry limitations in microparticle measurement that may be subdivided into three domains: sizing, probing, and counting. This article also covers the various standardization strategies and technological improvements that have been proposed to overcome these limitations. New tools using size-calibrated beads and recent progress in instrumentation have opened new avenues to improve detection of microparticle populations of smaller sizes. Significant optimization in microparticle detection is also expected from the use of new fluorescent dyes and the establishment of practical recommendations. Finally, absolute counting of microparticles will also benefit from adapted bead-based strategies or, alternatively, from the generalized availability of volumetric systems. Overall, recent technological improvements maintain flow cytometry as a highly competitive analytical method to measure microparticles. Challenging these evolutions in pathological situations is a mandatory step to validate their real impact in clinical practice.

KEYWORDS: Microparticles, flow cytometry, standardization

Microparticles (MP) are submicron-size vesicles released from cell membranes in response to activation or apoptosis.¹ They are generally defined as 0.1- to 1- μ m membrane fragments exposing the anionic phospholipid phosphatidylserine (PS) and membrane antigens representative of their cellular origin. These characteristics discriminate MP from exosomes, which are smaller (<0.1 μ m), originate from intracellular multivesicular bodies, and differ in antigenic composition.² MP orig-

inating from several cell sources have been described in human plasma. Among them, platelet-derived MP (PMP) are believed to account for most of the circulating MP in healthy subjects, followed by erythrocyte-derived MP (Ery-MP).²⁻⁴

It is now well recognized that MP behave as vectors of bioactive molecules playing a role in blood coagulation, inflammation, cell activation, and the spread of cancer.⁵⁻⁷ In clinical practice, circulating

¹UMR-S608 INSERM, F-Marseille, and Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, F-Marseille, France; ²Service d'hématologie, CHU La Conception, F-Marseille, France; ³Biocytex, Marseille, France.

Address for correspondence and reprint requests: Françoise Dignat-George, Pharm.D., Ph.D., Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, F-Marseille, France (e-mail: francoise.dignat-george@univmed.fr).

Microparticles in Thrombosis and Hemostasis; Guest Editors, Nigel S. Key, M.D., and Hau C. Kwaan, M.D., Ph.D.

Semin Thromb Hemost 2010;36:807-818. Copyright © 2010 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel: +1(212) 584-4662.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1267034>.
ISSN 0094-6176.

MP originating from blood and vascular cells are elevated in a variety of prothrombotic and inflammatory disorders, cardiovascular diseases, autoimmune disorders, infectious diseases, and cancers.⁸⁻¹⁰ In these clinical settings, MP counts may be useful for identifying patients at risk for vascular disorders and for monitoring response to treatment.^{11,12} However, assessment of their pathophysiological relevance and their clinical use is hampered by methodological concerns. Different methodologies based on MP characteristics are available to measure them in biological samples, and these have been reviewed in a forum.¹³ Among these methodologies, flow cytometry (FCM) is the most commonly used technique.¹⁴

This review addresses the current limitations of FCM for MP measurement and how to overcome them. We focus on analytical steps, excluding preanalytical steps, although these are a major source of variability and potential artifacts in MP analysis. After a short review of the available methodologies, this article addresses the limitations of FCM that may be subdivided into three areas: sizing, probing, and counting.

HOW TO MEASURE MICROPARTICLES

Available Methodologies

FCM remains the most extensively used technique for enumeration and characterization of MP.¹⁵⁻²⁰ This technique analyzes cells and particles by suspending them in a stream of fluid and passing them by a flow cell interacting with a laser beam. Scattering of the light and fluorescence emissions detection allows simultaneous multiparametric analysis of the physical and multiple antigen characteristics of upward of thousands of particles per second.

In addition to FCM, several types of assays have been developed that can be subgrouped in two main categories. Some assays, like FCM, provide phenotypic information on a single particle basis. These include high-sensitivity microscopy,²¹ such as confocal laser microscopy, differential interference contrast microscopy, reflection interference contrast microscopy, and electron microscopy.²² Recently, atomic force microscopy was proposed by Yuana et al as a method for studying the size, antigenic properties, and numbers of defined subsets of MP.²³ Briefly, MP are captured by probes immobilized on perfectly flat surfaces on which a microsized cantilever is moved across, thus registering electrical signals proportional to the submicron size of "accidents" that are encountered.

The other group is composed of bulk assays providing global information from each sample. These include immunoassays, functional assays, and hybrid assays incorporating capture and functional testing. Immunoassays rely on antibody- or Annexin V-based

capture of MP via specific antigens and/or PS, and they allow MP measurements according to their cellular origin and/or their expression of PS.²⁴⁻²⁸ As an example, a platelet-derived (PD)MP enzyme-linked immunosorbent assay kit is commercially available from JIMRO Company Ltd (Gunma, Japan). Michelsen et al described a method that quantifies the amount of PMP-located glycoprotein (GP)IIb antigen by time-resolved immunofluorometric assay.²⁹ The high sensitivity of this method relies on the use of a lanthanide (europium chelate) as a time-delayed fluorescent reporter. Functional assays for MP are mainly based on PS- or tissue factor (TF)-dependent procoagulant activity.^{30,31} For example, MP-dependent thrombin generation tests have been performed in microplate format using the Calibrated Automated Thrombogram system (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands, and Diagnostica Stago, Asnières, France) in preeclampsia.³² The STA-Procoag-PPL (Diagnostica Stago) measures the phospholipid-dependent coagulation time in platelet-free plasma (PFP).³³ Finally, hybrid assays such as Zymuphen-MP technology, commercialized by Hyphen Biomed (Andresy, France) combine solid-phase capture of MP on annexin V or antibody and determination of prothrombinase activity.³⁴⁻³⁶

An intermediate technique has been envisaged to assess the size distribution of MP more accurately in PFP. Dynamic light scattering (DLS) measures the fluctuations of the scattered light at different angles produced by the Brownian motion of the particles.^{37,38}

Advantages and Limitations of Techniques in Microparticle Measurement

Table 1 lists the advantages and limitations of MP measurement techniques. High sensitivity microscopy and AFM allow detection of small MP but are labor-intensive and as yet not amenable to large-scale use.²³ Immunoassays offer potential for high-throughput processing of numerous samples, may be sensitive enough to detect weakly expressed antigens, and are more cost effective and user friendly than immunophenotyping techniques for large-scale studies. However, these bulk assays do not provide any size information or single particle counts. Absolute quantification of MP is related to the global amount of one measured biomarker. Assays measuring only one single molecule as a marker can interfere with soluble antigens, which may lead to overestimation of MP levels.³⁹ Functional assays measure the general contribution of MP on a specific activity that does not necessarily correlate to their number, especially when minor subpopulations (e.g., TF + MP) bear most of the activity. The expected size range of MP theoretically fits well with the working range of DLS, but this technique is more appropriate for sizing homogeneous

Table 1 Advantages and Limitations of Techniques in Microparticle Measurement

	Quantification (Bulk Quantitation)	Enumeration (Single Particle Counting)	Origin	Specificity	Sizing	Cost/Complexity of Instrumentation	Practicability
FCM	++	+++	+++	++	+	-	++
Immunoassays	+++	-	+	+	-	+	+++
Functional assays	+++	-	+	+	-	+	+++
DLS	++	+	-	-	++	+	+
AFM	-	++	+	++	+++	-	-
Electron microscopy	-	+	+	+++	++	-	-
RICM	-	+	+	+	++	-	-

FCM, flow cytometry; DLS, dynamic light scattering; AFM, atomic force microscopy; RICM, reflection interference contrast microscopy.

populations, and heterogeneous distributions such as plasma MP may generate unreliable data. In addition, DLS measures all types of particles including lipoproteins or debris, without ways to introduce specific selection thus far.

FCM has a major advantage over these techniques in that it can identify and quantify small MP subpopulations because each particle is interrogated individually. However, FCM data on MP counts are difficult to compare because standardized methodologies are lacking. Most FCM limitations are due to the fact that MP are very small and heterogeneous in size, ranging from 0.1 to 1 μm according to other pre-cited techniques. In practice, FCM limitations may be subgrouped according to three main actions: sizing, probing, and counting.

HOW TO OVERCOME FLOW CYTOMETRY LIMITATIONS

To measure MP by FCM, two main strategies have been proposed. One first selects MP according to their size, using scatter parameters or impedance (scatter-based threshold) and then analyzes fluorescent signals only on the populations preselected by size. The other preselects MP based on fluorescence staining first (fluorescence threshold) and then eventually restricts the population(s) of interest via scatter gating. Each option has advantages and drawbacks.

Size-Related Limitations

Limitations to count all MP are technologically driven, dependent on the intrinsic resolution limit of instruments for the size-related parameter used for the initial discrimination of events of interest from background noise. Consequently, currently available flow cytometers do not count all MP. Indeed, even though the most recent generation of digital flow cytometers have a threshold for particle detection $<500\text{ nm}$,⁴⁰ measurements at this level of sensitivity remain uncertain in routine practice. In addition, these characteristics may

vary between various types of cytometers and even among individual instruments of the same type and also evolve with time on the same apparatus.

Sizing in Flow Cytometry

FORWARD SCATTER

Forward scatter (noted as FS or FSC) is the measurement of the laser light scattered at low solid angles (1 to 20 degrees to the incident light). This parameter has been widely used for estimation of cell size because FS is generally proportional to particle cross-section.⁴¹ Therefore, FS was used early on to discriminate MP from platelets, apoptotic bodies, and background noise in whole blood samples⁴²⁻⁴⁴ or in platelet-poor plasma or PFP.^{20,45} In most cases the upper limit of the analysis region is defined by a latex bead around 1 μm (0.8 to 1.5 μm depending on studies) or by the smallest platelets.¹⁸ The lower limit was until recently badly defined and mostly subjected to the level of background noise. The threshold for considering a signal as a particle of interest is often set up at the lowest possible level where overwhelming background events do not significantly alter the performance of the instrument's electronic system.

The use of plastic beads for size calibration in FCM remains an imperfect model, especially for diameters close to the laser wavelength (488 nm), and it provides only a rough approximation of size for cell-derived MP. Indeed many factors other than event size influence FS, among which are the refractive index, surface roughness, and eventual presence of absorptive material. FS signal is also strongly affected by laser wavelength and by the range of solid angles over which scattered light is collected. Because manufacturers of flow cytometers do not use the same optical design for FS measurements, it is unlikely that exactly the same results could be obtained from measuring the same events in different instruments.^{46,47} However, inside the same type of cytometers, the relative position between the same reference beads and MP populations should not vary extensively, on the condition of adequate optical centering.

SIDE SCATTER

Side scatter (noted as SS or SSC) is the measurement of light scattered perpendicular to the laser axis, at large solid angles usually around 90 degrees (30 to 150 degrees to the incident light). SS gives composite information of both relative size and internal structure, including cytoplasmic granularity. Beads or microorganisms from a nominal diameter close to the wavelength of the laser highly scatter light at large angles. In some cases,⁴⁸ the resolution obtained is even better than when FS is used. Some instruments can easily discriminate two beads from 100 nm and 300 nm using SS (personal data). Thus some teams have chosen to trigger the MP population using the SS parameter.⁴⁹ However, even more than for the FS parameter, the comparative sizing of elements of different composition (beads versus cells or microorganisms or MP) is inadequate.⁴⁶

IMPEDANCE

Given the previously described limitations in MP sizing, B. Furie¹⁰ proposed to identify, size, and quantify microparticles using impedance-based flow cytometry. This system, based on the Coulter principle, determines the electronic volume of a particle that is directly proportional to the change of impedance associated with the displacement of electrolyte in a flow cell orifice by the particle of interest. Analyses were performed on a modified version of Quanta MPL (Beckman Coulter, Miami, FL). Although this system allowed an accurate sizing and an excellent discrimination between MP population and platelets, its full potential use remains limited by high electrical background.

Overcoming Size Limitations**CALIBRATION BEADS**

Tools are needed to enumerate MP in a reproducible manner, in a size-standardized window, a region that should not only have a defined upper limit but also a lower limit. Ideally, this lower limit should be as low as the limit of sensitivity of the cytometer. In this area, resolution between MP and background depends on parameters such as fine optical adjustments and both fluidics and cleanliness of the optics. In our experience, this can vary over time for a single instrument, depending on maintenance, and therefore may differ among multiple platforms, thus requiring regular follow-up.

A first generation of beads allowed a reproducible limit of the upper size of the MP window of analysis.^{40,50-53} These strategies were already a step toward better calibrated methods on the same instrument.

More recently, a blend of fluorescent beads, called Megamix, was developed by Biocytex (Marseille, France) to better standardize both upper and lower limits. It provides size-calibrated fluorescent beads of

0.5 and 0.9 μm , respectively, purposely formulated with a 2:1 numerical ratio. The 0.9- μm beads help to place the upper limit of the MP region; the 0.5- μm beads help to set-up the FS threshold and lower MP limit at a standardized level corresponding to its median value. This is easily done using a trick based on the intrinsic 2:1 ratio of 0.5- μm to 0.9- μm beads, always including the same percentage of the 0.5- μm beads in the analysis.

This calibrated-bead strategy allowed full long-term control of the FCM-based protocol and reproducible PMP counts over time on a Cytomics FC500 (Beckman-Coulter). Optimal settings were easily transferred between three instruments of the same type, using Megamix as a stable template. Similar PMP counts were obtained using the three instruments.⁵⁴

Using this strategy, the ISTH Scientific and Standardization Subcommittee in Vascular Biology organized a workshop whose objective was to measure the variability in PMP counts. As a result, PMP concentrations appeared consistent among instruments that measure FS parameter with a relatively wide solid angle (1 to 19 degrees; Beckman-Coulter). However, this strategy proved to be inapplicable without substantial modifications among instruments with FS signal height (FSC-H) measured with a lower solid angle (1 to 8 degrees; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).⁵⁵

Optimizing Scatter Performance**IMPROVING RESOLUTION**

Needs and options to improve performance are linked to the available instrument. However, optimizing settings can greatly improve results in MP enumeration. As indicated earlier, FS is more difficult to measure than the other parameters. Because FS has to be measured in a narrow scattering angle range close to a very intense light source (the laser beam itself), more precise alignment is required than for wide angle scattering or fluorescence measurements.^{46,47,56} The position of the obscuration bar that blocks direct laser light is critical. Therefore, a fine optical alignment by an experienced technician may be highly beneficial for MP analysis, more than for any other FCM application. Second, a low flow rate (e.g., $\leq 10 \mu\text{L}/\text{minute}$) gives the best results compared with higher speed options. Third, increasing FS gain allowed improved resolution due to the increased number of measurement channels in the upper decades on most cytometers. Moreover, some options for improvement are specific from cytometer types, for example, the removal of the neutral density filter (FACSaria, BD), and the use of the FS configuration for wide FS collection angle (1 to 19 degrees rather than 1 to 8 degrees on FC500). The use of FSC-H rather than signal area on FACS and LSR-II BD gives better results.

REDUCING BACKGROUND NOISE

Briefly, the scatter background noise of a cytometer can originate from three main sources: electronics, fluidics, and optics. The electronic noise that can be measured when the laser is off comes from the amplification system of the cytometer and is generally the least significant. Fluidics noise comes from true particles present in the sheath fluid or the buffer used for dilution of the sample. It also may come from tubings and release of interfering particles from internal filters. Cytometers are only equipped with a 0.22- μm internal filter. Therefore, reduction of this noise may be obtained by filtering all liquids through a 0.1- μm before running MP samples. Changing of old filters and tubing may also improve results. Optical noise is generally the most impeding. It mainly comes from dust particles and/or optical coupling gel stuck on the side of the flow cell. This noise increases slowly with time. It may be prevented by a protected atmosphere in the cytometry laboratory or reduced by cleaning the external side of the flow cell with optical-

grade alcohol (e.g., isopropanol) during regular technical service. It may also come from light scattered along the optical path, thus dependent on the quality and design of the optical system. In conclusion, laser alignment and careful optics cleaning by service technicians are critically needed to reduce optical noise.

Technological Improvements: New Cytometers

A new generation of cytometers has recently greatly improved scatter performances in terms of resolution and background, as illustrated in Fig. 1 (personal data). The same blend of fluorescent beads of 0.1, 0.3, 0.5, and 0.9 μm was run in a previous generation cytometer (FC500, Beckman-Coulter) and three more recent instruments (Gallios, Beckman-Coulter; Influx, Becton-Dickinson; and Apogee A50, Apogee Flow System, Hertfordshire, United Kingdom). FS resolution between beads (Fig. 1A) and background noise (Fig. 1B) was determined. Then instruments were set up according to

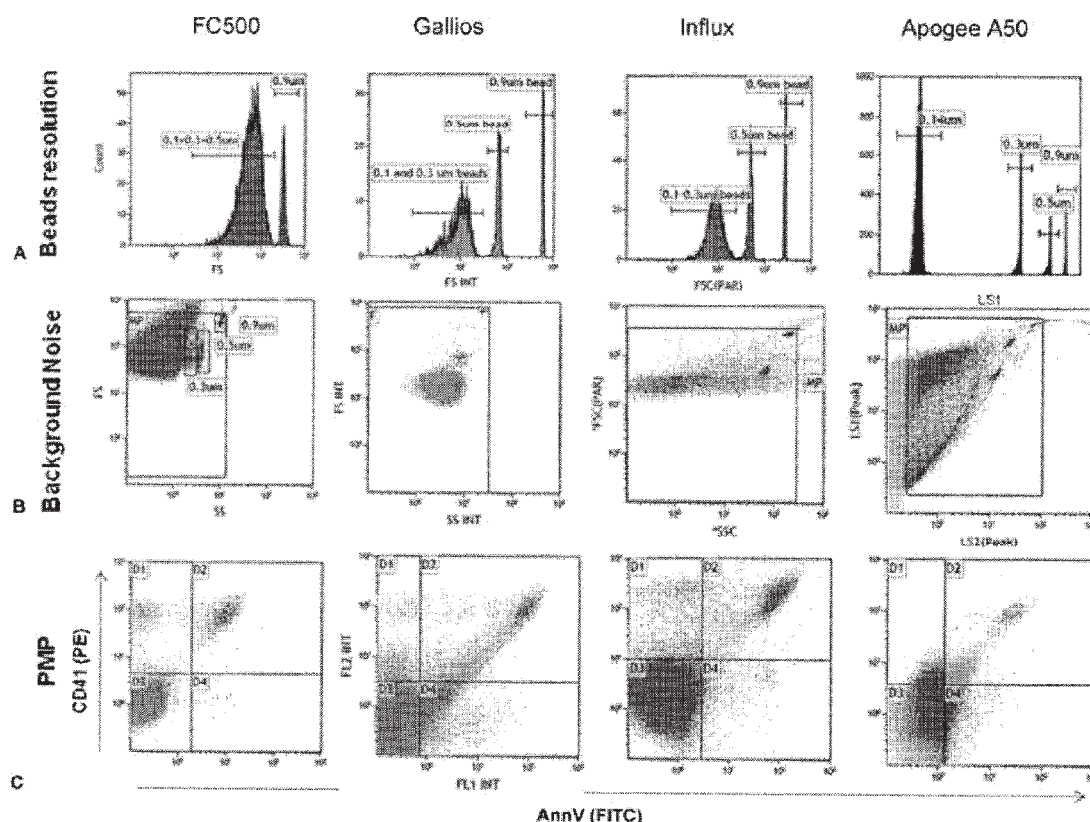


Figure 1 Technological improvement in forward scatter (FS) for microparticle (MP) measurement: (A) Beads resolution improvement: FS distribution of a blend of fluorescent latex beads (0.1/0.14, 0.3, 0.5, and 0.9 μm) with a threshold on fluorescence. (B) Background noise reduction: Scatter dot plot showing blue (0.9- μm beads), red (0.5- μm beads), green (0.3- μm beads), and violet (0.1/0.14- μm beads) beads with a FS threshold. Gray dots are background noise. (C) Platelet microparticle (PMP) count increase: AnnV (FITC)/CD41 (PE) dot plot showing PMP populations of large (red) and small (orange) size in human platelet-free plasma.

their best respective capabilities to measure PMP on aliquots of the same sample with AnnV/CD41 double staining (Fig. 1C).

As shown, the bead resolution limit varied with instrument, from no resolution between 0.5- and 0.3- μm beads (FC500) to clear resolution (Influx, Gallios, Apogee A50) and from slight resolution between 0.3- and 0.1- μm beads (Influx, Gallios) to clear resolution (Apogee A50). The background was also clearly reduced with the new instruments allowing the inclusion of very small beads in the FSxSS MP gate without impeding the system's electronics, for example, 0.3 μm (partially) for Influx, all of the 0.3 μm for Gallios, and a significant part of the 0.1 μm for Apogee A50. These results were obtained with latex beads and because FS detection systems are differently designed, these data should be interpreted with caution regarding the smallest size of biological MP that would be included in the analysis. However, with this new FCM generation, progress in FS resolution and background can be anticipated.

Further progress may rely on specific optical designs or amplification strategies to detect small particles. The Gallios takes advantage of a differential amplification of signal between internal (1 to 8 degrees) and external (8 to 19 degrees) angles measured by an FS detector (W2 strategy). The Influx cell sorter is optionally equipped with a pinhole system for detection of small size particles, and Apogee A50 benefits from a fine optical technology allowing scatter-based discrimination of small elements with a very low background noise.

Consequently, clear improvement in MP counting was observed. When PMP profiles between FC500 and the newer cytometers were compared at their respective optimal cut-off, a previously undetected subset of less intense, smaller PMP appeared in the analysis and PMP counts were greatly increased.

PROBE-RELATED LIMITATIONS

Because of MP size, the amount of any surface marker is drastically reduced in comparison with intact cells, thereby limiting their detection. Moreover, wash steps are precluded by absolute counts, and thus the resulting signal-to-background ratio is not favorable.

Fluorescence Threshold Strategies

The early publications about MP measurement by flow cytometry developed protocols based on a fluorescence threshold, where MP were first defined by a level of fluorescence signal. In 1987, Shattil et al reported that PDMP can be resolved from intact platelets by fluorescence-gated flow cytometry, allowing the membrane composition of individual particles to be analyzed using monoclonal antibodies to cell surface determinants. Samples were analyzed in a Becton-Dickinson FACStar

flow cytometer. To resolve PMP from background light scatter, acquisition was gated so as to include only those particles distinctly positive for GPIb (detected as phycoerythrin fluorescence), using a fluorescence lower limit threshold that excluded background scatter and autofluorescence of unlabeled platelets. By this method, only those cells and particles expressing the platelet-specific membrane GP were included for analysis. To discriminate between platelets and MP, the lower limit of the platelet gate was set at the left-hand border of the FS of untreated platelets. Therefore, any particle to the left of this platelet gate was analyzed as a MP.⁵⁷⁻⁵⁹ Similar methodologies were applied for analysis of PMP generated from different agonists,⁶⁰ in whole blood,^{16,48,61-63} and in PFP.^{40,64} In this last condition, positive PMP were defined as events displaying a fluorescence intensity signal above the isotype control level. Fluorescence threshold strategy was also used by several teams to measure annexin V positive events and circulating subpopulation of MP derived from erythrocytes, leukocytes, and endothelium.^{18,65}

The limitation of this strategy is the low signal-to-background ratio and variability in staining intensity. Because events analysis is not restricted to a size region, all kinds of elements (specific MP, free dyes, antibody aggregates, etc.) giving a fluorescence signal above a limit usually defined by an isotype control will therefore be counted as events of interest. This methodology is therefore more sensitive than the scatter strategy to small differences between isotype controls and specific antibodies. No standardized strategy has been proposed thus far to reproducibly position the fluorescence threshold.

Limitations in Microparticle Labeling

In both threshold strategies, MP are identified and enumerated by measuring specific antigens at their surface. Because of MP size, however, the amount of any surface marker is drastically reduced in comparison with intact cells. Therefore, some MP expressing specific antigen remains below the limit of positivity. This is evidenced by the fact that frequently there is no true separation between events considered as positive and the fluorescent noise.

Total Plasma Microparticles Labeling

Initially, uptake of fluorescent hydrophobic dyes as the 1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiIC16)⁶⁶ or the 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodine (DiOC6)(49) was used to discriminate MP from background noise. Theoretically, the intensity of fluorescence of DiOC6 depends on polarization across the membrane, and thus it is useful as a label for membranous particles. However, its use in whole blood or plasma is limited by a lack of specificity.

Annexin V binding has been extensively interpreted as evidence of a phosphatidylserine-rich surface.^{36,67-69} This placental protein with high affinity and a strict specificity for aminophospholipids has an absolute requirement for physiological calcium concentrations for binding to occur.⁷⁰⁻⁷² Negative control is provided by annexin V in a buffer that lacks bivalent cations. However, MP that do bind antibodies to cell-surface markers are not always labeled with annexin V.^{8,20,40,73} A potential explanation includes the partial exposure of PS on the outer leaflet of some MP that results in absent or reduced annexin V labeling or on scramblase activity contained by some MP, resulting in reversed phospholipid flip-flop.⁷⁴ Results in this regard may also slightly vary between laboratories due to the conditions for using annexin V (e.g., concentration, incubation time).

Limitations in Specific Microparticle Probing

MEASURING CIRCULATING MICROPARTICLE POPULATIONS

In most cases, circulating MP populations were measured after incubation of PFP or after pelleted MP were incubated with directly labeled specific monoclonal antibodies. No washing step is generally performed to avoid any loss of material. Samples are run after dilution in phosphate buffer.^{36,68,75} At first, choosing the specificity of antibodies used for identification of MP was based on the antigenic composition of the parent cells. Several panels have been reviewed.^{3,4,13} The main difficulty remains the low density of these antigens on the surfaces

of small size particles. The resulting low fluorescence signal may vary by antigen, antibody clones, and fluorochromes. Table 2 summarizes the most widely used specificities with regard to their recognition of MP subsets and to the relative intensity of the fluorescent signal, obtained with *in vitro* or *in vivo* MP.

Depending on the MP population studied and its relative abundance in human plasma, the difficulties of identifying them may vary. Platelet and erythrocyte (Ery)-derived MP are the most abundant populations and benefit from specific antigens well represented at their surface such as CD41 and CD42 for PMP^{76,77} and CD235a¹⁰⁰ for Ery-MP. Leukocyte-derived MP are physiologically less well represented. CD45 has been used to identify these MP, but this highly expressed pan-leukocyte marker suffers from a weak expression on MP. Although not specific to a leukocyte subpopulation, the differential levels of expression have been used to differentiate the monocyte (CD14) and granulocyte compartment (CD11b, CD66b).²⁰ Lymphocyte-derived MP have been identified using CD4 and CD8.³⁶ However, all these antigens remain weakly expressed, and it is possible that a large fraction of these MP may be missed during analysis. The challenge of rare event detection can thus be compounded by the targeting of weakly expressed antigens. This scenario is encountered with endothelial-derived MP. CD144 was proposed as one of the most specific, although less sensitive markers for EMP detection.^{74,78,79} Other strategies to counteract these difficulties have been developed, such as the combination of multicolor antibodies (CD31+/CD41-, CD31+/CD42b-, CD105+/CD45-) to improve the specificity, and monochrome composite

Table 2 Main Antigens Used In Measuring Cell-Derived Microparticle Subpopulations

	Antigens	Specificity	Sensitivity (Fluorescence Intensity in Vitro)	Reference
Platelet-MP	CD41	+++	+++	76
	CD42 (a or b)	+++	+++	77
	CD61	++	++	104
Erythrocyte-MP	CD235a	+++	+++	100
Leukocyte-MP	CD45	+++	+	105
	CD11b*	+++	++	20
	CD14†	+++	+	20
	CD66b‡	+++	++	106
Endothelial-MP	CD144	+++	+/-	52
	CD146-LeuMP	++	+++	80
	CD105-LeuMP	++	++	80
	CD31-PMP	+	+++	65
	CD62E	+++	+	104

*Myeloid and NK cells-derived MP.

†Monocytes-derived MP.

‡Granulocytes-derived MP.

MP, microparticles; LeuMP, leukocyte MP; PMP, platelet MP.

markers to improve the sensitivity (CD144 + CD105, CD146 + CD105).^{65,79} Recently, Duval et al found that the combination CD105 + CD146 + CD45⁻ profile appeared to be the most efficient in detecting EMP.⁸⁰

The Use of Negative Control Antibodies

Most groups quantifying MP by flow cytometry currently use commercially available isotypic controls to set limits for the discrimination of antigen-positive and antigen-negative events. Due to low fluorescence intensity, small variations in determining the antibody background binding by isotypic controls may have significant consequences on the quantification of antigen-positive MP. Variation in staining of the same MP population by different isotypic controls was well demonstrated by Trummer et al.⁸¹ As described, variability regarding background level can be mainly attributed to (1) non-compliance of isotype with antibody subgroup, (2) variations in conjugation leading to differences in the fluorochrome-to-protein (F:P) ratio, and (3) isotypic control concentration not exactly matching antibody concentration. In our hands, a useful strategy consists of checking the overlap of histograms between a (conjugated) specific antibody and its paired isotypic control on MP populations known to be unreactive with the specific antibody.

Overcoming Fluorescence Limitations

OVERCOMING LIMITATION IN TOTAL MICROPARTICLE LABELING

As an alternative to annexin V, other probes have been proposed to detect all circulating MP. BODIPY-maleimide has been identified as a potential genetic stain for detection and quantification of MP because of its ability to attach to biological membranes via cysteine residues and thiol groups in proteins.^{51,82,83} In a small cohort of 10 healthy donors, results were comparable between MP counted by bio-maleimide and annexin V. This method also presents a potential cost advantage.

Calcein-AM was also been tested.⁸⁴ It is a non-fluorescent calcein acetomethyl ester that is membrane permeable with negligible membrane binding.⁸⁵ Upon cleavage by cytosolic esterases, Calcein binds to calcium, becomes fluorescent, and is retained within the cytoplasm-containing cell/vesicle. Only intact MP would fluoresce, avoiding concomitant staining of debris seen with lipid dyes.

Another sorting strategy based on lactadherin has been described.^{40,83,86} Lactadherin is an opsonin released by stimulated macrophages and characterized by a PS-bonding motif and an integrin-binding motif. Lactadherin bridges PS-exposing apoptotic cells to macrophages, facilitating their engulfment.^{87,88} This protein

has demonstrated higher affinity than annexin V for PS, and it has the potential advantage of non-calcium-dependent binding to PS.⁸⁹

Based on the recent findings that MP contains nucleic acids, nucleic acids dyes have been tested in the detection of MP generated *in vitro* from cell lines.⁹⁰ Ullal et al used the cell permeant dye SYTO 13, which binds both DNA and RNA, to detect MP.⁹¹

For all these potential generic markers for total enumeration of MP, the determination of a limit between positive and negative events is often hazardous due to the absence of a gap, a high fluorescent noise in plasma, and the lack of an appropriate negative control. Their practical advantages need to be evaluated further in terms of specificity and performance in plasma samples.

Overcoming Limitation in Specific Microparticle Labeling

In the absence of a consensual and standardized recommended antibody and fluorochrome panel, the quality of results may be improved following some simple rules. Centrifugation of antibodies before use may help reduce interference by clusters. Titration of antibodies must be performed on appropriate microparticle samples before use³⁶ to avoid the excess of free antibody and improve resolution of specific events compared with noise. Isotype controls should have concentrations (and dye-to-protein ratios) similar to that of the specific antibodies employed, and they must be from the same species. Alternatively, the use of antigen-negative MP to adjust instrument settings has been suggested with the use of an FcR blocking reagent before antibody labeling.⁸¹

Better specificity controls in MP measurement are needed to differentiate true MP from other cell debris, especially those generated during preanalytical steps. To further improve specificity in PMP measurement, Morbarrez et al recently proposed the use of phalloidin,⁹² a cyclic peptide that binds to f-actin with high affinity. Intact platelets do not have exposed f-actin, but if the cell membrane becomes disrupted (e.g., by freezing), phalloidin will bind to exposed f-actin.⁹³ Thus phalloidin binding may indicate the presence of platelet fragments that otherwise may falsely be counted as PMP.

Finally, to improve reproducibility in quantification of antigens on a specific population, the use of MESF allowed lower variations for CD62P and CD142 (TF) determination on PMP.⁹² More recently, Orozco et al stressed the need to well quantify the analyzed population before antibody labeling.⁹⁴ The concentration of target particulate antigen is especially critical when sub-saturating amounts of a high-affinity probe (e.g., high-affinity monoclonal antibodies or annexin V) are used to optimize signal-to-background ratio.

LIMITATIONS IN COUNTING

Counting Beads

Most fluorescence flow cytometers do not use constant volume pumps for sample delivery or provide alternative means of measuring the sample volume. The flow rate cannot be determined with sufficient precision to allow calculation of MP counts per unit volume. Therefore, PMP results were initially expressed as a percentage of the whole platelet population.⁹⁵ Then absolute counting methods were introduced by using the erythrocyte count of a blood sample⁹⁶ or fluorescent beads of predefined or determined concentration as reference standards.⁹⁷⁻¹⁰⁰

The general beads methods allow for quantification of MP based on the addition of known quantities of standardized fluorescent beads to the sample. This method is suitable for reproducible and accurate measurements of MP numbers, provided that beads are well mixed before use.⁵⁴ However, because TruCount (Becton-Dickinson), Flow-Count (Beckman-Coulter), or CytoCount (Dako, Glostrup, Denmark) beads are added to each sample, this method has the potential of becoming labor intensive and expensive for large-scale studies.

Overcoming Flow Cytometry Absolute Counting Limitations

METHODS BASED ON FLOW RATE

Methods based on flow-rate use a derived calibration factor to convert cytometer events into absolute count.^{101,102} These techniques require the use of beads to calibrate the machine only before and after samples. These are less expensive but can become impractical when biological samples with different viscosities are used because a new calibration is needed before and after each type of biological sample. In these cases a calibration factor needs to be applied. To avoid this, alternative methods were proposed as single bead-enhanced cytofluorimetry.⁹⁴ This procedure uses flow-check fluorospheres (10 μm) and does not require calibration of flow rates.¹⁰³ Flow rate-based assay using red cell bead (FCB) also removes the need for a calibration factor because the red cell bead has the same matrix and viscosity as the test sample.¹⁰¹ However, it should be noted that these methods require a highly accurate pumping rate.

Volumetric Systems

Interestingly, some cytometers suitable for MP analysis are equipped with a volumetric fluidic system allowing direct absolute counting and removing the need for counting beads. For example, the Accuri C6 (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI) works with peristaltic

valves, whereas Apogee A50 (Apogee) and Quanta (Beckman-Coulter) use volumetric syringes.

CONCLUSION

Overall, with reference to the other available methodologies, important recent improvements in the analytical steps have kept FCM highly competitive to detect microparticles of small size. Validation of these evolutions in a large series of pathological settings is a mandatory step to evaluate their true impact in clinical practice. In the future, the real impact of improving the analytical step cannot be dissociated from a better control of the preanalytical steps that still remain a major source of variability and potential artifacts in MP analysis.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Dr. Gerald Gregori for his helpful guidance with the influx cell sorter.

REFERENCES

1. Freyssinet JM, Dignat-George F. More on: measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2005;3(3):613-614
2. 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):3791-3799
3. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* 2007;137(1):36-48
4. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21(3):157-171
5. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 2009;8(13):2014-2018
6. Davizon P, López JA. Microparticles and thrombotic disease. *Curr Opin Hematol* 2009;16(5):334-341
7. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007;66(2-3):159-165
8. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006;48(2):180-186
9. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004;34(6):392-401
10. Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberger D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 2009;15(22):6830-6840
11. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(12):2594-2604
12. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and

- progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009;13(3):454-471
13. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842-1851
 14. Dignat-George F, Freyssinet JM. Questionnaire on Microparticle Detection and Characterization: A Retrospective Analysis. Sydney, Australia: Vascular Biology Working Group SSC ISTH; 2005
 15. Sims PJ, Rollins SA, Wiedmer T. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem* 1989;264(32):19228-19235
 16. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75(1):128-138
 17. Suzuki M, Kawakatsu T, Miyake T, et al. Platelet-derived microparticles in alloxan-induced diabetes in rabbits. *Haemostasis* 1996;26(4):228-232
 18. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997;96(10):3534-3541
 19. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104(1):93-102
 20. Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102(7):2678-2683
 21. Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006;107(9):3537-3545
 22. Wencel-Drake JD, Dieter MG, Lam SC. Immunolocalization of beta 1 integrins in platelets and platelet-derived microvesicles. *Blood* 1993;82(4):1197-1203
 23. 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
 24. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds LH Jr, Niewiarowski S. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost* 1998;80(2):225-230
 25. Osumi K, Ozeki Y, Saito S, et al. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 2001;85(2):326-330
 26. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, et al. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb* 2009;16(6):878-887
 27. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2003;89(3):506-512
 28. Ueba T, Haze T, Sugiyama M, et al. Level, distribution and correlates of platelet-derived microparticles in healthy individuals with special reference to the metabolic syndrome. *Thromb Haemost* 2008;100(2):280-285
 29. Michelsen AE, Wergeland R, Stokke O, Brosstad F. Development of a time-resolved immunofluorometric assay for quantifying platelet-derived microparticles in human plasma. *Thromb Res* 2006;117(6):705-711
 30. Exner T, Joseph J, Low J, Connor D, Ma D. A new activated factor X-based clotting method with improved specificity for procoagulant phospholipid. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14(8):773-779
 31. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am J Transplant* 2009;9(3):550-557
 32. Macey MG, Bevan S, Alam S, et al. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb Res* 2010;125(3):e76-e81
 33. Gonzalez M, Carlo A, Poncelet P, Boulay-Moine D, Nicham F, Arnaud E, Contant G, Woodhams B. Sensitivity of 2 functional haemostasis assays to platelet-derived microparticles (PMP). *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 2): Abstract PP-MO-766
 34. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101(8):841-843
 35. Hugel B, Socié G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999;93(10):3451-3456
 36. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842-1851
 37. Maurer-Spurej E, Brown K, Labrie A, Marziali A, Glatter O. Portable dynamic light scattering instrument and method for the measurement of blood platelet suspensions. *Phys Med Biol* 2006;51(15):3747-3758
 38. Lawrie AS, Albany A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2009;96(3):206-212
 39. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842-1851
 40. 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
 41. Mullaney PF, Van Dilla MA, Coulter JR, Dean PN. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev Sci Instrum* 1969;40(8):1029-1032
 42. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb* 1992;12(12):1475-1487
 43. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1997;129(5):507-516
 44. Dehmer GJ, Nichols TC, Bode AP, et al. Assessment of platelet activation by coronary sinus blood sampling during balloon angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol* 1997;80(7):871-877
 45. Combes V, Dignat-George F, Mutin M, Sampol J. A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma. *Thromb Haemost* 1997;77(1):220

46. Nebe-von-Caron G. Standardization in microbial cytometry. *Cytometry A* 2009;75(2):86–89
47. Shapiro H. *Practical Flow Cytometry*. New York, NY: Wiley-Liss; 2003:275
48. Tocchetti EV, Flower RL, Lloyd JV. Assessment of in vitro-generated platelet microparticles using a modified flow cytometric strategy. *Thromb Res* 2001;103(1):47–55
49. Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood* 1991;77(4):887–895
50. Tesselar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;5(3):520–527
51. Dale GL, Remenyi G, Friese P. Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost* 2005;3(9):2081–2088
52. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004;125(6):804–813
53. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 2006;4(6):1296–1302
54. 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
55. Lacroix R, Poncelet P, Robert S, Key N, Dignat-George F. Standardization of flow cytometry-based enumeration of platelet microparticles using calibrated beads: results of instrument qualification. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 2): In press
56. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al. Standardisation of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry using calibrated beads; results of ISTH SSC Collaborative Workshop. *J Thromb Haemost* 2010; In press
57. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987;70(1):307–315
58. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988;263(34):18205–18212
59. Shattil SJ. Expression, regulation and detection of fibrinogen receptors on activated human platelets. In: Jamieson GA, ed. *Platelet Membrane Receptors: Biochemistry, Immunology and Pathology*. New York, NY: Liss; 1988: 345
60. Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, et al. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J* 1994;299(Pt 1):303–308
61. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem* 1991;266(36):24302–24307
62. Gemmel CH, Ramirez SM, Yeo EL, Sefton MV. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. *J Lab Clin Med* 1995;125(2):276–287
63. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996;88(9):3456–3464
64. Kim HK, Song KS, Lee ES, et al. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13(5):393–397
65. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol* 2001;112(1):81–90
66. Chang CP, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J Biol Chem* 1993;268(10):7171–7178
67. 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):2554–2565
68. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842–1851
69. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842–1851
70. Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization. *Biochemistry* 1987;26(17):5572–5578
71. Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 1985;151(3):625–629
72. Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem* 1989;264(14):7944–7949
73. Gelderman MP, Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* 2008;484:79–93
74. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(4):769–774
75. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842–1851
76. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51(9):2840–2845
77. Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(11):3381–3388
78. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 2004;9:1118–1135
79. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of

- endothelial cell-derived microparticles and their detection *ex vivo*. *J Thromb Haemost* 2003;1(11):2434–2443
80. Duval A, Helley D, Capron L, et al. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(6):1049–1055
81. Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Isotype controls in phenotyping and quantification of microparticles: a major source of error and how to evade it. *Thromb Res* 2008;122(5):691–700
82. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost* 2007;33(8):771–779
83. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009;113(6):1332–1339
84. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost* 2009;7(6):1019–1028
85. Kendall DA, MacDonald RC. A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J Biol Chem* 1982;257(23):13892–13895
86. Albanyan AM, Murphy MF, Rasmussen JT, Heegaard CW, Harrison P. Measurement of phosphatidylserine exposure during storage of platelet concentrates using the novel probe lactadherin: a comparison study with annexin V. *Transfusion* 2009;49(1):99–107
87. Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* 2000;39(20):6200–6206
88. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002;417(6885):182–187
89. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta* 2004;1667(1):82–90
90. Reich CFIII, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing *in vitro* apoptosis. *Exp Cell Res* 2009;315(5):760–768
91. Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CFIII. Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in *in vitro* systems. *Cytometry A* 2010;77(3):294–301
92. Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. *Thromb Res* 2010;125:pe 110–pe 116
93. Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 1986;123(1):86–94
94. Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A* 2010;77(6):502–514
95. Rhodes NP, Shortland AP, Rattray A, Black RA, Williams DF. Activation status of platelet aggregates and platelet microparticles shed in sheared whole blood. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8(12):747–751
96. Ault KA, Mitchell J. Analysis of platelets by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 1994;42(Pt B):275–294
97. Dickerhoff R, Von Ruecker A. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin Lab Haematol* 1995;17(2):163–172
98. Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompo P, et al. Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia. *Br J Haematol* 2007;136(3):462–471
99. Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H. Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles, and platelet aggregates with flow cytometry. *J Lab Clin Med* 1998;131(6):507–517
100. Pattanapanyasat K, Noulstri E, Fucharoen S, et al. Flow cytometric quantitation of red blood cell vesicles in thalassaemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;57(1):23–31
101. Nantakornol D, Chamma P, Day NP, et al. Quantitation of cell-derived microparticles in plasma using flow rate based calibration. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39(1):146–153
102. Storie I, Sawle A, Goodfellow K, et al. Flow rate calibration I: a novel approach for performing absolute cell counts. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;55(1):1–7
103. Montes M, Jaensson EA, Orozco AF, Lewis DE, Corry DB. A general method for bead-enhanced quantitation by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2006;317(1–2):45–55
104. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95(3):930–935
105. Enjeti AK, Lincz LF, Scorgie FE, Seldon M. Circulating microparticles are elevated in carriers of factor V Leiden. *Thromb Res* 2008;December 17 (Epub ahead of print)
106. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2001;85(5):810–820

FC500

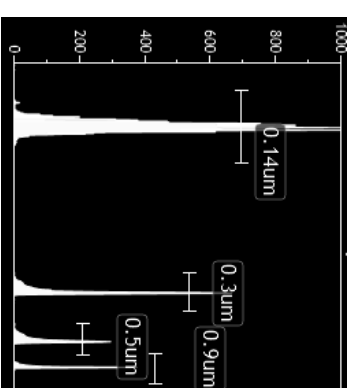
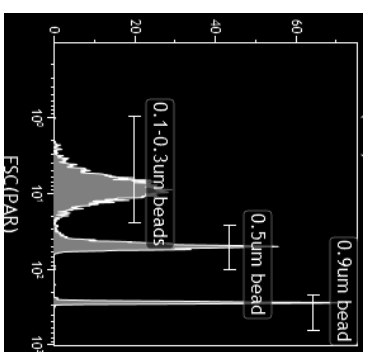
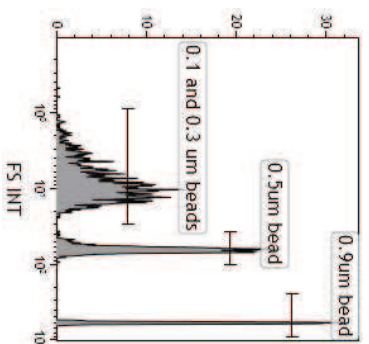
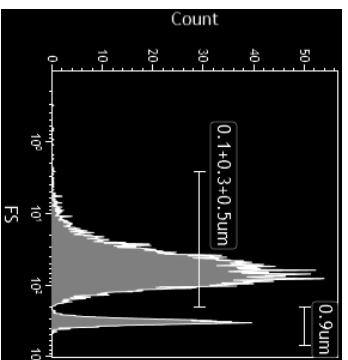
Gallios

Influx

Apogee A50

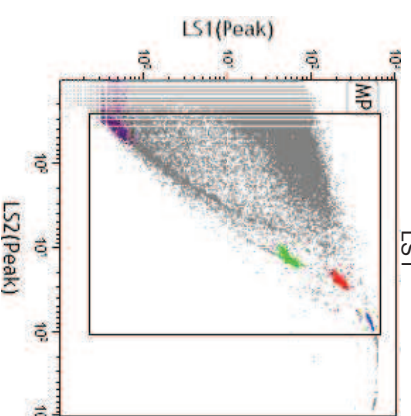
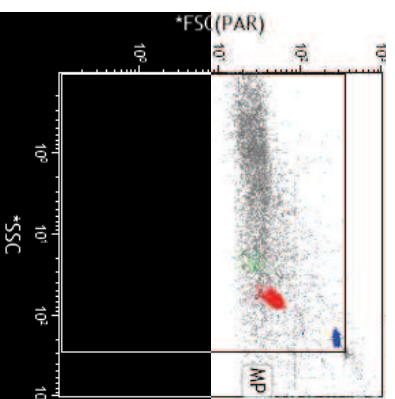
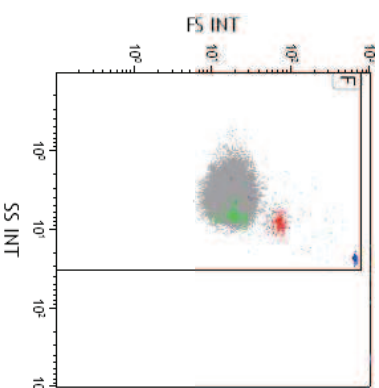
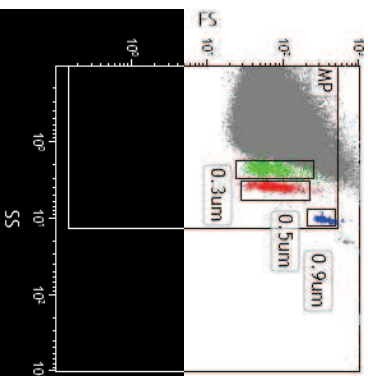
A

Beads resolution



B

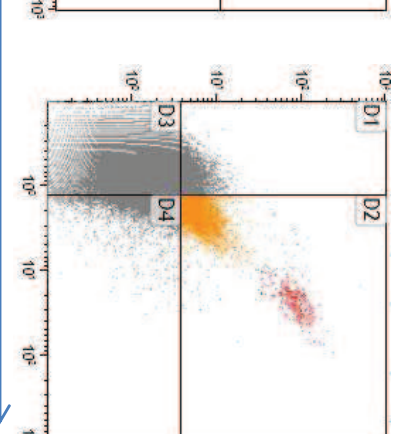
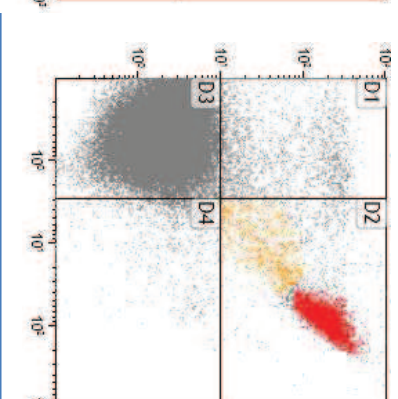
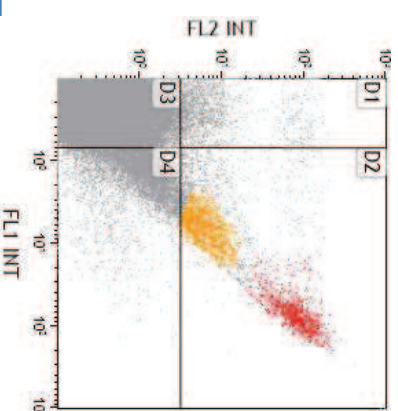
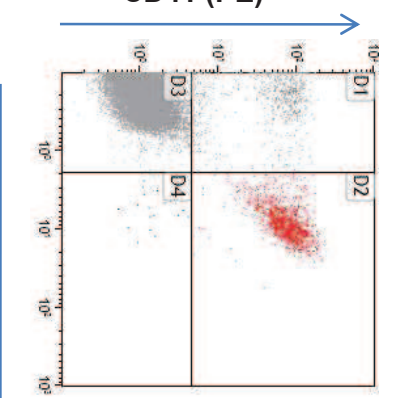
Background Noise



C

PMP

CD41 (PE)



AnnV (FITC)

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Dans la première partie de ce travail, nous avons identifié les MPE comme nouveaux acteurs dans le système d'activation du plasminogène, une facette jusqu'alors inconnue parmi les différentes réponses biologiques impliquant les MP dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire. Notre travail de thèse a été le premier à démontrer les mécanismes moléculaires responsables de la génération de plasmine dépendante du système uPA-uPAR à la surface des MP générées à partir d'une lignée endothéliale. Nous avons ensuite établi la preuve de concept *in vivo* de cette nouvelle propriété des MP en montrant qu'une génération de plasmine était détectable à la surface des MP circulantes de patients atteints d'athérosclérose, de lupus ou de PTT. Nous avons identifié les activateurs responsables de cette propriété *in vivo* en démontrant la présence d'urokinase (uPA/uPAR) et/ou d'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) à la surface des MP issues des cellules sanguines circulantes et de cellules endothéliales primaires. A l'inverse de la génération de thrombine, cette activité est vectorisée par les MP endothéliales (MPE) et leucocytaires (MPL) mais absente sur les MP plaquettaires et érythrocytaires. Par ailleurs, nos travaux ont contribué à mettre en lumière un nouveau mode d'activation du plasminogène par communication croisée entre la surface des MP et les surfaces cellulaires, la fibrine ou la matrice extracellulaire.

Microparticules : Pourvoyeurs de surface catalytiques bioactives

Les surfaces cellulaires ou matricielles sont des éléments clés dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Elles constituent le support des réactions moléculaires enzymatiques de la plupart des systèmes biologiques parmi lesquels la coagulation et la fibrinolyse. Par la colocalisation de récepteurs membranaires, elles assurent une probabilité de rencontre entre les divers éléments d'un même système et rendent accessibles les seuils énergétiques des réactions mises en jeu. Elles assurent ainsi une catalyse efficace, localisée et contrôlée permettant de générer les acteurs clés de systèmes protéolytiques comme ceux de la thrombine et de la plasmine.

La vésiculation cellulaire par activation ou par apoptose, multiplie la disponibilité des surfaces d'origine et donc la possibilité d'assemblages bioactifs dans la circulation ou les tissus. Si une telle implication des MP avait parfaitement été démontrée pour la constitution

des complexes tenase et prothrombinasique responsables de la génération de thrombine, l'assemblage des complexes aboutissant à la génération de plasmine n'avait pas été démontré dans le système vasculaire. L'existence au préalable d'un certain nombre de travaux montrant la présence de certains acteurs protéolytiques fonctionnels (uPAR, PAI-1, MMP) sur des MP d'origine tumorale doit toutefois être rappelée. Les MP possèdent à la fois des récepteurs pour les activateurs (u-PAR) et le plasminogène lui-même (Lys C term de l' α -énolase) permettant la formation du complexe moléculaire nécessaire à la génération de plasmine. L'importance de la surface des MP est montrée par l'inhibition de la génération de plasmine lorsque le plasminogène ne peut plus s'y fixer en cas d'inhibition de ces sites de fixation par la CpB ou des LBS des K1 et K4 du plasminogène par l' ϵ -ACA. La surface des MP constitue également un système de protection pour la fraction de plasmine qui reste fixée contre les inhibiteurs de la phase soluble comme l' α 2-AP. La génération de plasmine à la surface des MP est donc efficace. Nous avons également montré que la majorité des récepteurs uPAR à la surface des MPE était libre. L'uPA exogène peut être captée par ces récepteurs ce qui amplifie considérablement la génération de plasmine. Ces données suggèrent que de l'uPA sécrétée dans l'environnement local peut être transférée à la surface des MP. Ce mécanisme peut avoir des implications dans l'angiogenèse tumorale où la sécrétion d'uPA est importante. Ainsi les MP de cellules tumorales et les MPE pourraient participer à l'amplification des processus protéolytiques et à la dissémination métastatique.

Ainsi, par rapport aux surfaces cellulaires activées et aux matrices (fibrine ou matrice extracellulaire), les MP constituent un support supplémentaire efficace et abondant pour la génération de plasmine.

Microparticules : Biovecteur protéolytique

Les activateurs du plasminogène et la plasmine ainsi formée peuvent donc être vectorisés par les MP localement ou à distance. L'activité protéolytique des MP contribue ainsi au remodelage matriciel, de façon directe ou indirecte, par l'activation de MMP. Nous avons montré que cette génération de plasmine dépendante des MP module *in vitro* les propriétés angiogéniques des progéniteurs endothéliaux dans un test qui consiste à mesurer la formation de tube dans une matrice très dépendante des activités protéolytiques. Ainsi en présence de faible quantité de plasmine générée, la protéolyse limitée est suffisante pour faciliter la migration des progéniteurs endothéliaux et la formation des tubes vasculaires. En

présence d'une grande quantité d'activité protéolytique, la matrice est désorganisée, la migration cellulaire est perturbée et la formation de tube diminue. Dans ce modèle *in vitro*, ces observations sont consistantes avec les effets de la plasmine sur l'angiogenèse. Ainsi les MP par la vectorisation d'une activité protéolytique dépendante de la plasmine peuvent réguler la croissance vasculaire ;

Ce rôle protéolytique des MP est également relevant dans le remodelage matriciel au sein de la plaque d'athérosclérose. En effet, les MPE et MPL sont présentes en fortes concentrations dans la plaque d'athérosclérose⁵¹⁸. Dans un travail en cours, nous avons formulé l'hypothèse que la génération de plasmine induite par ces concentrations élevées de MP pourrait induire un remodelage tissulaire de la plaque et ainsi concourir à sa déstabilisation. Nous montrons la présence des activateurs du plasminogène et d'une génération de plasmine à la surface de MP dans les plaques d'athérosclérose humaine prélevées par endartectomie par des techniques ELISA, de CMF, de tests de génération de plasmine colorimétrique et par zymographie. De manière intéressante ces MP ont la capacité de dégrader les composants de la plaque sur des tests de dégradation matricielle *in vitro* (fibrine, fibronectine, laminine) et sur artère de rat désendothélialisé. L'activité plasminogénolytique des MP semble donc jouer un rôle dans les processus de remodelage vasculaire et détermine le caractère instable de la plaque d'athérome.

Comme nous l'avons montré, le système uPA-uPAR ne nécessite pas la présence de plasminogène sur la même surface que son activateur. La reconnaissance de ce système est strictement conformationnelle. Ainsi, l'uPA vectorisé par les MP pourra reconnaître une molécule de plasminogène fixé sur une surface cellulaire (leucocytes, plaquettes) ou matricielle (fibrine, matrice extracellulaire) lors d'une réaction de croisée entre MP/cellules ou MP/matrice. Ainsi, les MP présentent dans le caillot activent potentiellement le plasminogène déposé sur la fibrine ou sur les plaquettes, contribuant ainsi à la fibrinolyse.

La contribution réelle de la génération de plasmine dépendante des MP dans la fibrinolyse *in vivo* est inconnue à l'heure actuelle. Cette question constitue la suite de ce travail fondamental. Notre hypothèse est que par l'activité protéolytique vectorisée à la surface des MPE et MPL contribue efficacement à la lyse du caillot de fibrine. Ainsi, les prochaines étapes de notre travail sont de réaliser des études *in vitro* de lyse d'un caillot fluorescent par pesée, de mesurer de la libération de fluorescence et d'étudier la cinétique de rétraction du front de lyse par laser scanning confocal microscopy. L'impact des MPE et MPL sur la phase de décroissance d'un caillot par thrombo-élastogramme sera également

mesurée. Ces expériences seront complétées *in vivo* par l'évaluation de la contribution des MPE et MPL sur la fibrinolyse par microscopie intra-vitale dans un modèle de caillot induit par une blessure LASER. Cette technique, apprise lors d'un stage doctoral à Boston (nov 2007- nov 2008), dans le laboratoire d'hémostase du Pr. B. Furie (Université d'Harvard) nous permettra de montrer le niveau d'implication des MP dans la fibrinolyse.

Microparticules : Biomarqueur fonctionnel

Nous avons montré que les MP d'origine endothéliale et leucocytaire supportent l'activité fibrinolytique dans la circulation humaine. Cette activité est non détectable en situation physiologique mais détectable et modulée en situations pathologiques cardiovasculaires et auto-immunes. Si ceci constitue la preuve de concept de cette activité *in vivo*, la signification d'une augmentation de la génération de plasmine dépendante des MP est actuellement inconnue. On peut noter que cette activité est extrêmement faible voire indétectable chez les sujets sains. En situation pathologique les niveaux détectés sont très variables dans une même pathologie. Ils pourraient refléter une activation leuco-endothéliale et donc indirectement être en relation avec une situation inflammatoire ou à risque vasculaire. Ils pourraient également refléter une activation des systèmes coagulation/fibrinolyse en phase aiguë. En phase chronique, ils pourraient contribuer à un équilibre dans la balance hémostatique en réduisant le risque thrombotique. De manière intéressante cette activité est portée par des sous-populations de MP circulantes plus difficilement accessibles par les méthodologies de mesure actuelle comme la CMF. La mesure de cette activité apporte donc une information différente d'une simple numération de ces populations.

La mesure de cette activité plasminogénolytique des MP pourrait donc avoir un intérêt clinique de biomarqueur dans différents contextes pathologiques. Comprendre la relevance de cette nouvelle activité dans ces contextes pathologiques et transposer ces connaissances vers le développement de nouveaux outils diagnostics ou pronostics nécessite la maîtrise d'une méthodologie fiable. Ce qui n'est pas totalement le cas à l'heure actuelle. En effet, les tests réalisés jusqu'à présent dépendent d'une étape de purification des MP par centrifugation et lavages dont le rendement ne saurait en aucun cas être parfaitement reproductible d'un patient à l'autre.

L'objectif principal est donc de développer un test pour la détection des MP associées à une activité protéolytique de type plasmine adaptée à la pratique de routine des laboratoires afin d'offrir un outil sensible et reproductible. Ce projet technologique se fait actuellement en collaboration étroite avec un industriel (Stago/BioCytex) dans le cadre d'une prise d'option sur le contrat de licence du brevet correspondant. Ceci constitue une première étape pour pouvoir déterminer l'intérêt de cette activité des MP en pathologie humaine.

Dans la deuxième partie plus appliquée de notre travail, nous avons développé puis évalué une méthode de standardisation par billes fluorescentes calibrées en taille, pour la mesure des MP par CMF. Nous avons également évalué les différentes possibilités disponibles actuellement pour dépasser les limites actuelles de cette technologie dans cette application.

En effet, la volonté de porter les MP au stade d'un biomarqueur impose comme pré requis la maîtrise des paramètres pré-analytiques et analytiques. Ceci est associé à une mise au point de techniques de pointes performantes prenant en compte les spécificités physico-biologiques de ces biomarqueurs cellulaires comme en particulier leur faible taille ou leur faible nombre dans l'échantillon biologique. La validation de leur intérêt en clinique nécessite une étape importante de standardisation à l'échelle internationale.

Maîtrise de la phase analytique de la mesure des microparticules

Dans ce cadre, notre stratégie a été de développer un outil adapté aux limites actuelles de la cytométrie en flux qui permette de maîtriser les variations intra et inter-instruments. L'évaluation internationale de cet outil a montré que ces billes de calibration représentent un outil efficace pour standardiser la mesure de MPP sur les cytomètres qui mesurent le paramètre FS avec un angle relativement large (1-19°) comme les instruments de type Beckman Coulter. Cependant cette stratégie s'est cependant révélée inapplicable sans modifications substantielles sur des instruments mesurant le paramètre FS avec un angle plus réduit (1-8° Becton-Dickinson). Ceci est le reflet d'une grande variabilité entre les informations récoltées. En effet, la mesure du FS ne correspond pas exactement à la même

information entre des cytomètres de conception différente. Ainsi, le processus de standardisation se trouve limité. Cette différence de mesure entraîne une différence de rapport entre la taille apparente des billes de latex et des MP entre les différents appareils. Une solution peut venir du développement de standard biologique de même nature que les MP qui permettraient de s'affranchir de ces différences.

Dans cette stratégie de standardisation, nous nous sommes limités aux performances de la plupart des cytomètres utilisés en routine. Ainsi la mesure est limitée aux MP de grandes tailles (supérieure à 0.5 μ m). Or la grande majorité des MP est de taille inférieure comme le confirme les techniques innovantes de microscopie et de DLS. Comme développé dans la revue, les récents progrès des performances de la CMF en terme de résolution ouvrent de nouvelles perspectives pour la mesure des MP de petites tailles jusqu'alors inaccessibles. Le bénéfice apporté par la mesure des MP de petites tailles par rapport à la méthodologie actuelle dans l'utilisation de ce biomarqueur en clinique doit être évalué. Une standardisation de cette nouvelle mesure devra être amorcée.

Les progrès réalisés en termes de résolution de taille déplacent les nœuds de la technologie vers la limite de résolution de fluorescence. En effet, du fait de leur petite taille, les MP ne génèrent souvent qu'un signal de faible intensité en CMF. Nous avons donc pour objectif de développer en collaboration avec l'industrie (Beckman Coulter, BioCytex) de nouveaux outils plus sensibles pour la détection des MP soit génériques soit spécifiques de sous populations. A partir des connaissances actuelles sur le phénomène de remodelage de la membrane plasmique des cellules mères, l'approche principale consiste à définir la probabilité de concentration d'une molécule à la surface des MP. Puis de valider cette hypothèse par des marquages optimisés sur des MP purifiées avant de l'appliquer au plasma humain.

Maîtrise de la phase pré-analytique de la mesure des microparticules

L'étape pré-analytique dans le dosage des microparticules circulantes est une source importante d'artéfacts dans l'évaluation de l'intérêt clinique de ces biomarqueurs. Il n'existe pas de consensus dans ce domaine. Ce point n'a pas été développé dans ce travail. Toutefois, dans un travail en cours, nous évaluons l'impact des différents paramètres pré-analytiques sur la numération des MP circulantes par CMF et par des tests fonctionnels chez le sujet sain et en pathologie afin de proposer un protocole pré-analytique complet. Ce protocole de

standardisation sera évalué par une étude internationale afin de servir de base à des recommandations.

La maîtrise des paramètres analytiques et pré-analytiques, étape indispensable du développement d'un biomarqueur, devrait permettre la mise en place d'études multicentriques pour évaluer et convaincre de l'intérêt des MP en clinique.

ANNEXES

Annexe 1 :

Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy.

Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, **Lacroix R**, Bauer KA, Furie BC, Furie B.
Clin Cancer Res. 2009;15(22):6830-40.

Annexe 2 :

Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo.

Thomas GM, Panicot-Dubois L, **Lacroix R**, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C.
J Exp Med. 2009;206(9):1913-27.

Annexe 3 :

Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis.

Leroyer AS, Anfosso F, **Lacroix R**, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Jourde N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J, Dignat-George F.
Thromb Haemost. 2010;104(3):456-63.

Annexe 4 :

Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Towards the definition of vascular competence.

Sabatier F, **Lacroix R**, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F.
Rev Med Interne. 2010 Jun 10.

Annexe 5 :

Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?

Robert S, Poncelet P, **Lacroix R**, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F.
J Thromb Haemost. 2009 ;7(1):190-7.

Tumor-Derived Tissue Factor-Bearing Microparticles Are Associated With Venous Thromboembolic Events in Malignancy

Jeffrey I. Zwicker,¹ Howard A. Liebman,³ Donna Neuberg,² Romaric Lacroix,¹ Kenneth A. Bauer,¹ Barbara C. Furie,¹ and Bruce Furie¹

Abstract Purpose: Despite the strong association between malignant disease and thromboembolic disorders, the molecular and cellular basis of this relationship remains uncertain. We evaluated the hypothesis that tumor-derived tissue factor-bearing microparticles in plasma contribute to cancer-associated thrombosis.

Experimental Design: We developed impedance-based flow cytometry to detect, quantify, and size microparticles in platelet-poor plasma. We evaluated the number of tissue factor-bearing microparticles in a cohort of cancer patients of different histologies ($N = 96$) and conducted a case-control study of 30 cancer patients diagnosed with an acute venous thromboembolic event (VTE) compared with 60 cancer patients of similar age, stage, sex, and diagnosis without known VTE, as well as 22 patients with an idiopathic VTE.

Results: Tissue factor-bearing microparticles were detected in patients with advanced malignancy, including two thirds of patients with pancreatic carcinoma. Elevated levels of tissue factor-bearing microparticles were associated VTE in cancer patients (adjusted odds ratio, 3.72; 95% confidence interval, 1.18-11.76; $P = 0.01$). In cancer patients without VTE, a retrospective analysis revealed a 1-year cumulative incidence of VTE of 34.8% in patients with tissue factor-bearing microparticles versus 0% in those without detectable tissue factor-bearing microparticles (Gray test $P = 0.002$). The median number of tissue factor-bearing microparticles in the cancer VTE cohort (7.1×10^4 microparticles/ μL) was significantly greater than both the idiopathic VTE and cancer-no VTE groups ($P = 0.002$ and $P = 0.03$, respectively). Pancreatectomy in three patients eliminated or nearly eliminated these microparticles which coexpressed the epithelial tumor antigen, MUC-1.

Conclusion: We conclude that tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with VTE in cancer patients and may be central to the pathogenesis of cancer-associated thrombosis. (Clin Cancer Res 2009;15(22):6830-40)

Thromboembolic disease is a recognized complication of cancer (1-8). Patients with cancer experience venous thromboembolic events (VTE) at a rate four to seven times higher than that of the general population (9). Although all tumor types are as-

sociated with thrombosis, glioblastoma and carcinomas of the ovary and pancreas are consistently associated with the highest incidence of VTE (10, 11). Despite the strong association between malignant disease and thromboembolic disorders, the molecular and cellular basis of this relationship remains uncertain. Hypotheses regarding the mechanism have included the activation of blood coagulation by tissue factor in tumors (12), a factor X-activating cysteine protease (13), mucinous glycoproteins (8), and *MET* oncogene activation (14). Laboratory markers of coagulation activation are often elevated in patients with cancer (15-21) but are of little clinical utility in assessing individual risk for thrombosis.

Tissue factor, a receptor protein constitutively expressed on the plasma membrane of most nonvascular cells and inducibly expressed on monocytes and endothelial cells, initiates blood coagulation *in vivo* (22). In addition to its expression in the vessel wall, tissue factor is associated with cell-derived vesicles in blood that bind to the developing thrombus and play a role in fibrin propagation (23, 24). These vesicles, known as microparticles based on their submicron diameter, express protein surface components from the parent cell from which they are

Authors' Affiliations: ¹Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, and ²Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts; and ³Division of Hematology, Norris Comprehensive Cancer Center, University of Southern California-Keck School of Medicine, Los Angeles, California Received 2/12/09; revised 8/5/09; accepted 8/10/09; published OnlineFirst 10/27/09.

Grant support: NIH grants K23 HL084052 (J. Zwicker) and HL095084 (B.C. Furie, B. Furie).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Jeffrey I. Zwicker, Beth Israel Deaconess Medical Center, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215. Phone: 617-667-9299; Fax: 617-667-9922; E-mail: jzwicker@bidmc.harvard.edu.

© 2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0371

Translational Relevance

There is a clear association between cancer and venous thromboembolic events, but the prognostic risk factors and underlying mechanisms of this association are poorly understood. Procoagulant vesicles expressing tissue factor, known as microparticles based on their submicron diameter, are known to propagate a fibrin clot *in vivo* and may be qualitatively or quantitatively altered in various disease states. We describe the initial application of an impedance-based flow cytometer to accurately characterize these microparticles and show that tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in cancer patients. Based on our observations, a randomized clinical trial has been initiated to investigate the benefit of primary thromboprophylaxis in cancer patients with high levels of circulating tissue factor-bearing microparticles.

derived. Monocyte-derived microparticles that express tissue factor accumulate in the developing thrombus through the interaction of P-selectin and PSGL-1, thus delivering tissue factor to the site of vascular injury and facilitating fibrin propagation (24). Microparticles derived from blood and vascular cells circulate in the blood of normal subjects, and these populations are altered qualitatively and quantitatively in specific disease states (25–28). Tissue factor-bearing microparticles have been observed in the plasma of cancer patients, and a possible role for these microparticles in cancer-associated thrombosis has been proposed (29, 30). To evaluate whether tissue factor-bearing microparticles are a risk factor for and a possible cause of cancer-associated thrombosis, we quantified tissue factor-bearing microparticles in cancer patients using impedance-based flow cytometry and analyzed their association with acute venous thromboembolic disease. We show that impedance-based flow cytometry allows identification and quantitation of tissue factor-bearing microparticles, that most of these tissue factor-bearing microparticles are tumor-derived, and that the presence of detectable tissue factor-bearing microparticles is associated with an increased risk of thromboembolic disease accompanying malignant disease.

Materials and Methods

Materials. Humanized monoclonal antibody cH36 against human tissue factor was the generous gift of Dr. Hing Wong (Altor Biosciences, Miramar FL). Antibodies against MUC1 were generously provided by Dr. Donald Kufe (Dana Farber Cancer Institute, Boston MA); these antibodies were labeled with Alexa 488 using standard methods. ASPC-1, a human pancreatic carcinoma cell line, was obtained from the American Type Culture Collection. Goat anti-human Ig coupled to Alexa 488 was obtained from Invitrogen, anti-CD41a-FITC antibody and phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal TF antibody from BD Biosciences, and all other immunochemical reagents from Sigma-Aldrich. Fluorescently labeled polystyrene microspheres were purchased from Bangs Laboratories. These microspheres are homogeneous with regard to size by 10%.

Generation of tissue factor-bearing microparticles via cell culture. ASPC-1 cells were incubated at 37°C in RPMI media for 72 h. The cells were removed from conditioned media by centrifugation twice at 2,100× g. Aliquots (10 µL) of supernatant were labeled with (0.25 µg) humanized anti-tissue factor monoclonal antibody cH36 and labeled with a goat anti-human IgG-Alexa 488 antibody.

Flow cytometry analyses of platelets and platelet microparticles. Platelet-rich plasma was centrifuged for 2 min at 2,100× g. A 40 µL aliquot of plasma, containing both platelets and platelet microparticles, was incubated with 0.125 µg of anti-CD41a-FITC antibody for 30 min. The plasma samples were diluted 1:50 in NPE Iso-Diluent with 0.78-µm polystyrene microspheres at a final concentration of 6,000/µL. Samples were analyzed on a Beckman Coulter Quanta flow cytometer equipped with a 40-µm flow cell, a Becton Dickinson LSRII flow cytometer, and a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer.

Impedance-based flow cytometry for the detection of microparticles. A Quanta (NPE Systems) or Beckman Coulter SC Quanta flow cytometer (Beckman Coulter) were used to measure particle size by impedance. Both flow cytometry instruments required postmarket installation of smaller flow cells (25 µm or 40 µm, respectively) to analyze particles between 0.3 and 1.0 µm in diameter. A 0.5 µg aliquot of humanized monoclonal antibody cH36 against human tissue factor or a purified human IgG antibody control was added to platelet-poor plasma, and the sample was incubated for 30 min at room temperature. Subsequently, a secondary goat anti-human IgG coupled to Alexa 488 was added, and the sample was incubated for 30 min at room temperature. An aliquot of the antibody-treated platelet-poor plasma (10 µL) was diluted 1:100 into filtered NPE Iso-Diluent (Beckman-Coulter) and assayed in triplicate in the Quanta flow cytometer. Microparticle concentration, particle size, and particle fluorescence were recorded. Fluorescent 0.78-µm microspheres were used for instrument calibration. The cell-free supernatant of ASPC-1 pancreatic cells containing tissue factor-bearing microparticles served as positive controls. The lower limit of detection of tissue factor-bearing microparticles at these dilutions was estimated to be 1×10^4 microparticles per µL of plasma. Dual label experiments were done using 5 µL of platelet-poor plasma and 0.05 µg phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal tissue factor antibody (BD Biosciences) and 0.5 µg mouse anti-human MUC-1 monoclonal antibody labeled with Alexa 488 (Invitrogen). Isotype-matched mouse IgG controls were similarly labeled.

Survey of patients with advanced malignancy for plasma tissue factor-bearing microparticles. The plasma of cancer-free subjects and subjects with surgically unresectable or metastatic cancer were assayed for tissue factor-bearing microparticles. Malignancy diagnosis required histologic documentation as well as radiographic evidence of disease. Cancer diagnoses included pancreatic carcinoma, non-small cell lung cancer, ovarian carcinoma, colorectal cancer, and breast cancer. Cancer-free controls were cancer-free by history, without a history of VTE, and could not be taking warfarin for any indication.

Clinical trial to determine whether tissue factor-bearing microparticles in cancer patients are more likely associated with those with thrombosis than those free of thrombosis. Patients with an active malignancy who presented with symptomatic proximal deep venous thrombosis or pulmonary embolism were enrolled. A qualifying VTE required radiographic evidence of proximal deep vein thrombosis by compression ultrasound and/or a pulmonary embolism by high probability ventilation/perfusion lung scan or computed tomography angiogram of the pulmonary arteries. Patients who experienced a thrombotic event within 30 d of a surgical procedure or following trauma were excluded.

The control population was a cohort of cancer patients without evidence of venous thromboembolic disease in the previous 5 y, matched for cancer diagnosis, cancer stage at time of blood draw (equal stage or higher), age (within 10 y), and sex, with each cancer patient in the acute VTE cohort. Two control patients were enrolled for each cancer patient with acute venous thromboembolic disease. This provided a control group with a similar distribution of diagnoses, age, and sex. Radiotherapy or chemotherapy administered within 30 d prior to enrollment was

documented. For patients in the cancer–no VTE group, a retrospective analysis was done to evaluate the incidence of VTE; all radiographic reports for the cancer–no VTE group were analyzed by a reviewer blinded to microparticle status. Only documented evidence of a new proximal extremity deep vein thrombosis or pulmonary embolism was included in the analysis. A third comparator group included patients who presented with an acute idiopathic symptomatic VTE. An idiopathic event was defined as not occurring within 30 d of surgery or trauma and no history of malignancy within the last 5 y. Patients with hereditary thrombophilias were not specifically excluded.

All venipunctures were done within 72 h of initial diagnosis of acute VTE. Blood anticoagulated in citrate buffer was centrifuged at $2,100\times g$ for 20 min twice to obtain platelet-poor plasma and stored at -80°C . All study protocols were approved by the Human Investigation Review Board at Beth Israel Deaconess Medical Center and the University of Southern California prior to the enrollment of study subjects. All patients signed informed consent prior to laboratory testing and personal health information was protected in accordance with Health Insurance Portability and Accountability Act guidelines.

Statistical analysis. Based on our preliminary data that tissue factor-bearing microparticles were measurable in patients with prothrombotic malignancies (31), the study was powered to detect a difference of 40 percentage points between the percentage of individuals in the cancer-VTE group versus the cancer–no VTE group who had measurable tissue factor-bearing microparticles. We anticipated enrollment of a minimum of 21 patients with cancer–acute VTE with a 2:1 matched enrollment of no VTE–cancer controls ($n = 42$) to achieve a statistical power of 80% with a two-sided α level of 0.05%. Matching was implemented to assure similar age, sex, and cancer diagnosis distribution in the VTE and no-VTE groups; there was no plan to do a matched analysis. We also anticipated comparing the cancer-VTE group with an idiopathic VTE group, with planned enrollment of 21 patients with acute idiopathic VTE. To account for this second comparison involving the cancer-VTE group, significance by Fisher's exact testing was defined *a priori* as $P \leq 0.025$.

The determination of significance between groups based on the presence or absence of detectable tissue factor-bearing microparticles was done using Fisher's exact analysis. The odds ratio with 95% confidence intervals for thrombotic risk attributable to tissue factor-bearing microparticles was calculated by logistic regression; stepwise logistic regression was used to identify factors that significantly contributed to thromboembolic risk in addition to tissue factor-bearing microparticles. Absolute differences in tissue factor-bearing microparticles were analyzed by the Wilcoxon rank-sum test as the median values for the cancer–no VTE control and idiopathic VTE groups fell within the undetectable range. The incidence of VTE among cancer patients without VTE at the time of blood sampling was estimated by the method of cumulative incidence, identifying death without VTE as a competing risk; only patients alive without VTE were censored. Differences in the time to VTE using the cumulative incidence method were assessed by the Gray test.

Results

To investigate whether tissue factor-bearing microparticles are associated with VTE in cancer patients, we first evaluated impedance-based flow cytometry as an accurate method for microparticle detection and subsequently carried out a series of clinical investigations to establish a link between elevated tissue factor-bearing microparticles and cancer-associated thrombosis as outlined in Supplementary Fig. S1 (supplementary data).

We previously showed in a mouse model of thrombosis that tissue factor-bearing microparticles accumulate in the developing thrombus in an interaction that is mediated by platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 (24). However, our efforts

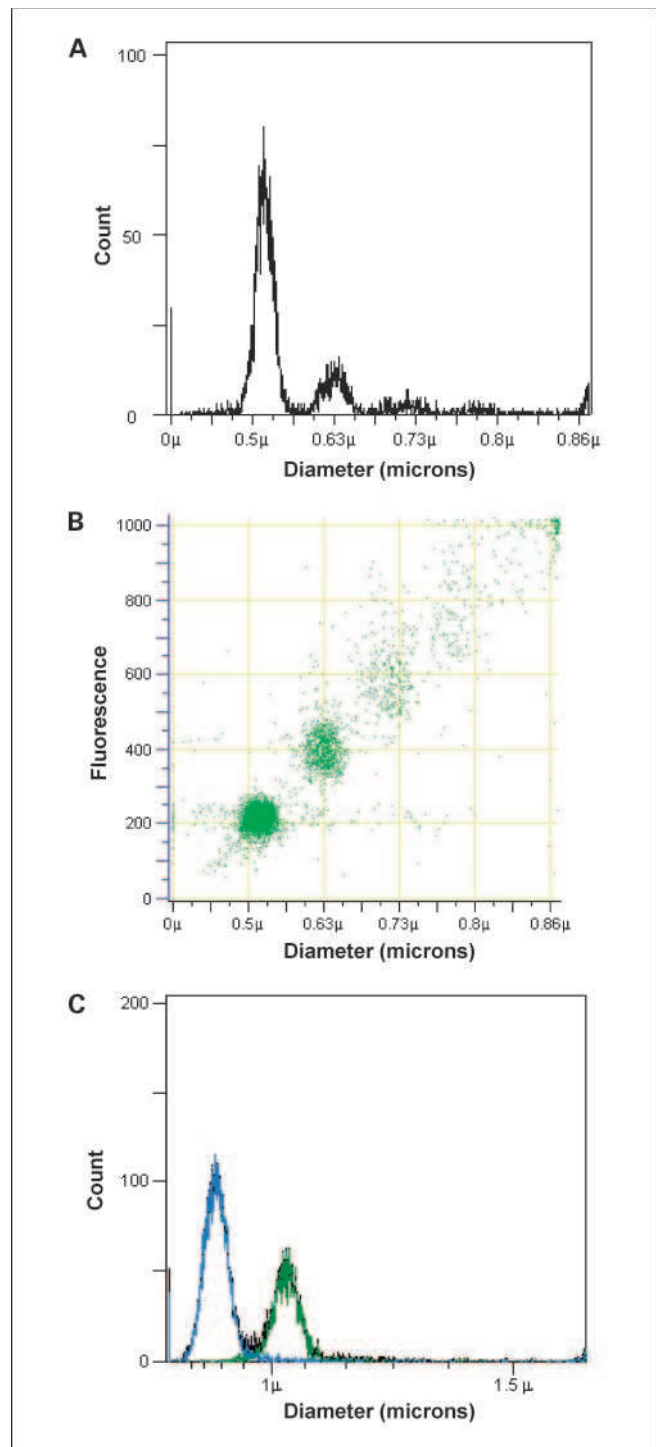


Fig. 1. Analysis of fluorescent microspheres using impedance-based flow cytometry. *A*, histogram of 0.52- μm polystyrene fluorescent microspheres showing particle distribution as a function of particle size. *B*, dot plot of particle diameter versus relative fluorescence for 0.52- μm microspheres. Some aggregates were observed. *C*, histograms generated by measurement of electronic volumes of a mixed population of microspheres with diameters of 0.78 μm (blue) and 1.01 μm (green) showing full resolution of the two populations. Fluorescence was monitored at 488 nm.

to detect, quantitate, and size these tissue factor-bearing microparticles by light scattering using flow cytometry were limited by conventional methods. When particles are of the same order of magnitude as the incident wavelength, the angular

distribution of forward light scatter is not dependent on particle size (32, 33). Moreover, the sizing of particles by light scatter is influenced by the refractive index, internal structure, and presence of absorptive material on the particle surface. The absolute sizing of cells or particles by flow cytometry is typically done by referencing the light scatter characteristics of a uniform population of sized beads, ignoring the fact that the refractive index of polystyrene microspheres is much greater than cellular membranes (33). These issues have been recognized by others, but for lack of better alternatives, light scattering-based flow cytometry has remained a standard method for microparticle detection and measurement.

Impedance-based flow cytometry: application to fluorescent beads of defined size. For these reasons, we have explored a novel method for identifying, sizing, and quantitating microparticles utilizing impedance-based flow cytometry. This system, based on the Coulter principle, determines the electronic volume of a particle based on the fact that the electronic volume is proportional to the change in the impedance associated with the displacement of electrolyte in a flow cell by the particle of interest. The system is calibrated using fluorescent polystyrene microspheres of uniform size. In the example shown, poly-

styrene microspheres 520 nm in diameter were monitored by impedance-based flow cytometry. A dominant population with a diameter of 520 nm is observed in the histogram (Fig. 1A) as are smaller populations of microsphere aggregates. A plot of fluorescence against particle size illustrates the size distribution of fluorescently labeled microspheres (Fig. 1B). Using polystyrene microspheres of known concentration, analyses of solutions containing these microspheres determined concentration within 5% of the theoretical concentration value. The mean coefficient of variation for microspheres with a diameter of 0.78 μm included an electronic volume and fluorescence of 25.2% and 9.2%, respectively ($n = 15$). Populations of polystyrene microspheres of two sizes can be resolved from each other based on their diameter, and independently quantitated (Fig. 1C).

To compare microsphere and microparticle sizing, we measured platelet microparticles, calibrated microspheres, and platelets in human plasma both by impedance- and light scatter-based flow cytometry. When characterized by forward light scatter, there is poor size discrimination between platelets and platelet microparticles (Fig. 2A and B). Furthermore, the platelet population and the platelet microparticle population overlap with the 0.78- μm microspheres. Using impedance-based

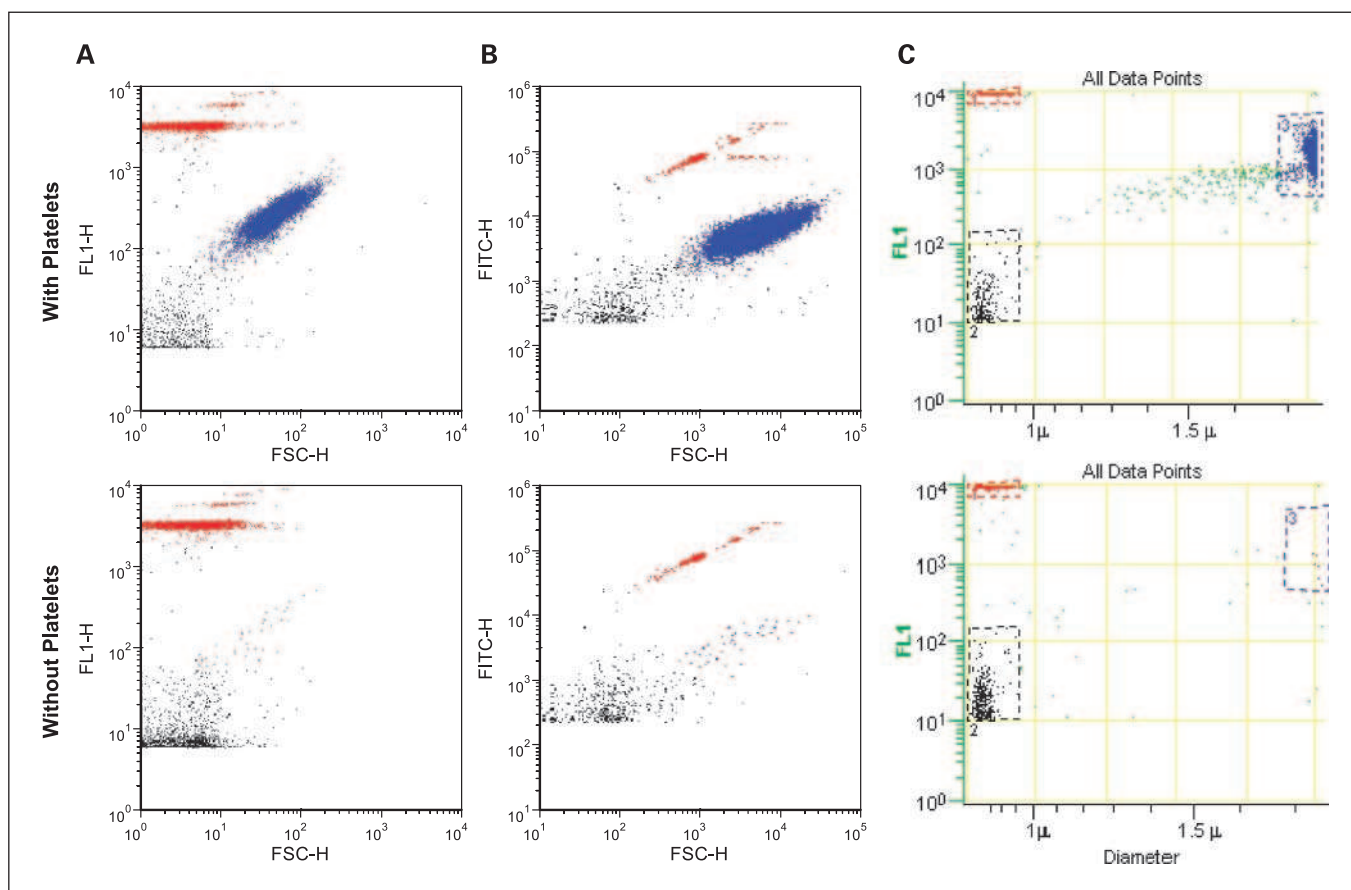


Fig. 2. Particle size comparisons. Platelet microparticles, platelets, and 0.78- μm fluorescent microspheres were analyzed using impedance-based and light scatter-based flow cytometry (top). Platelets were removed by centrifugation; platelet microparticles and 0.78- μm microspheres alone were detected (bottom). **A**, light scatter flow cytometry with Becton Dickinson FACSCalibur. Platelets (blue) and platelet microparticles (black) were partially resolved, and both overlap with 0.78- μm microspheres (red). The platelet microparticles appear within the tail of the platelet population (x-axis, forward scatter, y-axis, fluorescence). **B**, light scatter flow cytometry with the Becton Dickinson LSRII. Platelets (blue) and platelet microparticles (black) were partially resolved, and both overlap with the population of 0.78- μm microspheres (red; X-axis, forward scatter, Y-axis, fluorescence). **C**, impedance-based flow cytometry. Platelets (blue) and platelet microparticles (black) were resolved (X-axis, diameter; Y-axis, fluorescence), and can be compared with the 0.78- μm microspheres (red). Platelets and platelet microparticles were labeled with CD41a-FITC antibody. Platelets (blue), platelet microparticles (black), and platelet microparticles (black). Dot plots depict events accumulated over 30 s.

flow cytometry, the dot plot of the diameter versus fluorescence showed a platelet microparticle population measuring less than the 0.78- μm microspheres that is completely resolved from the population of platelets (Fig. 2C).

Impedance-based flow cytometry: application for detection of tissue factor-bearing microparticles. Dvorak et al. has previously shown that procoagulant microvesicles are released from malignant cells in culture (34). Based on this observation, we examined conditioned media from ASPC-1 pancreatic cells in culture for the presence of tissue factor-bearing microparticles. Using a monoclonal antibody specific for human tissue factor and a FITC-labeled secondary antibody directed against the anti-tissue factor antibody, tissue factor-bearing microparticles were detected, sized, and quantitated by impedance-based flow cytometry (Fig. 3A). Tissue factor-bearing microparticles derived from the ASPC-1 pancreatic cells varied in size from about 800 nm to 300 nm. As a control, purified human IgG was used in place of the anti-tissue factor antibody (Fig. 3B).

Tissue factor-bearing microparticles in cancer patients. To determine whether tissue factor-bearing microparticles could be detected and quantitated in platelet-poor plasma from cancer patients, blood samples were obtained from patients with advanced disease for an initial survey. Four histograms from the analysis of samples from patients with metastatic breast carcinoma, non-small cell lung carcinoma, and pancreatic carcinoma are shown. Tissue factor-bearing microparticles were detected in these four samples, and the microparticle size varied from 0.30 μm to 0.75 μm , with a median value of about 0.40 to 0.45 μm (Fig. 4A).

Blood samples were randomly collected from a variety of cancer patients as well as a cohort of cancer-free controls to provide preliminary information concerning the prevalence of tissue factor-bearing microparticles in these disorders. These data were subsequently used to adequately power a case-control study. All cancer patients had metastatic or locally advanced disease whereas the control population was cancer free by history. Tissue factor-bearing microparticles were detected in the platelet-poor plasma of subjects in all categories (Fig. 4B). Tissue factor-bearing microparticles were detected in 68% of patients with pancreatic cancer, seven of whom had previously incurred a VTE. About half of the patients with metastatic ovarian carcinoma, breast carcinoma, and colorectal carcinoma had detectable tissue factor-bearing microparticles. The concentration of tissue factor-bearing microparticles varied from 20,000 to 10 million per μL , with the lower limits of detection at 10,000 microparticles/ μL . Tissue factor-bearing microparticles were detectable in significantly fewer cancer-free controls and patients with non-small cell lung carcinoma compared with patients with advanced pancreatic cancer ($P < 0.001$) or colorectal cancer ($P = 0.03$). These data show that tissue factor-bearing microparticles can be measured in a significant percentage of cancer populations using impedance-based flow cytometry.

Tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolic disease. Given that tissue factor-bearing microparticles can be detected in a high percentage of patients with malignant diseases using impedance-based flow cytometry, we explored the statistical association between tissue factor-bearing microparticles and thromboembolic disease in patients with cancer. A case-control study was conducted to establish whether there is a relationship between the presence

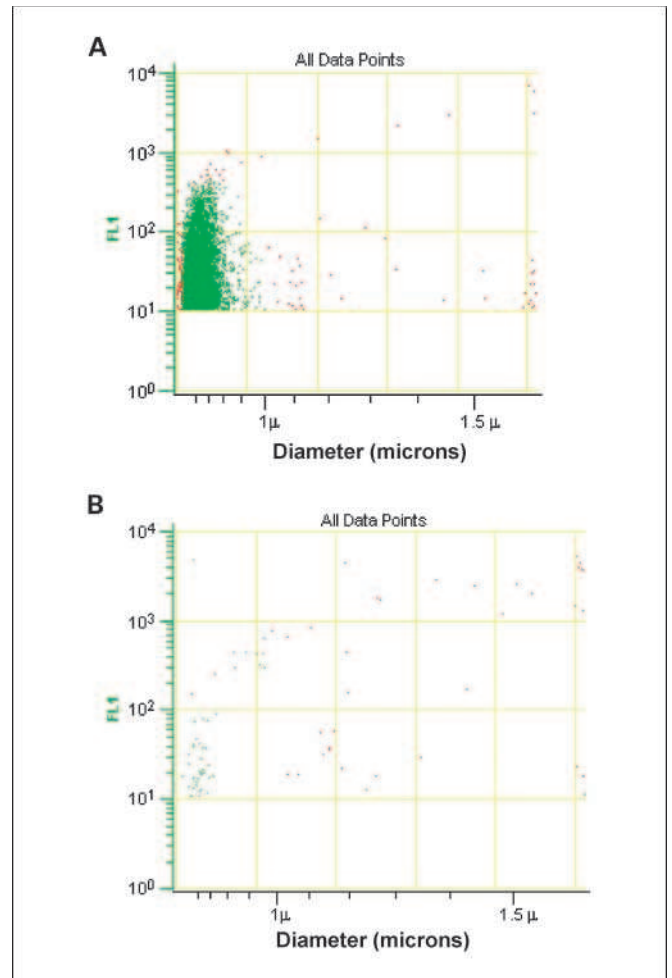


Fig. 3. Tissue factor-bearing microparticles were measured in the conditioned media from the ASPC-1 pancreatic cancer cell line. The X-axis presents particle diameter and the Y-axis presents fluorescence using a humanized anti-TF monoclonal antibody. The scatter plots for anti-tissue factor-Alexa 488 (A) and IgG-Alexa 488 control (B) are shown.

of tissue factor-bearing microparticles and cancer-associated thrombosis.

Tissue factor-bearing microparticles were measured in 30 cancer patients with acute VTE and 60 cancer patients without VTE selected to reflect a similar distribution of age, stage, sex, and diagnosis (Table 1). The median age in this cohort was 60 years. In the cancer-VTE group, one half of qualifying events were pulmonary emboli and five patients presented with both a proximal deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolus at time of enrollment. Nine patients were enrolled with an isolated deep vein thrombosis; three were of the lower extremity and one patient was simultaneously diagnosed with upper and lower extremity DVT. A single patient was enrolled with a large inferior vena cava thrombus. The cancer stages of the cancer-VTE group were as follows: two myeloma patients at stage I by International Staging System, one case of chronic lymphocytic leukemia (Rai stage II), three patients with non-Hodgkins lymphoma at stage III and one at stage II, and the patient with ovarian cancer with active recurrent disease. The patient with glioblastoma had active disease, and all of the other solid tumor malignancies were metastatic except one patient with stage

I breast cancer. A greater percentage of controls were actively receiving either chemotherapy or radiation therapy. With regard to antiangiogenesis agents associated with thrombosis, one individual in the acute VTE group was receiving lenalidomide whereas two control patients were taking thalidomide. Bevacizumab was administered to one individual in the acute VTE group and four in the control group. The detection of tissue factor-bearing microparticles was not associated with gender, active therapy, smoking, or diabetes by Fisher's exact test ($P > 0.05$), or with age, complete blood count parameters (white cell count, hematocrit, platelet count) by Wilcoxon rank sum analysis ($P > 0.05$).

In this case-control study, tissue factor-bearing microparticles were identified in 60% (18 of 30) of patients with cancer-

associated VTE compared with 27% (16 of 60) of patients with cancer without VTE ($P = 0.01$). This corresponded to a >4-fold increase risk of thrombosis associated with detectable tissue factor-bearing microparticles (odds ratio, 4.13; 95% confidence interval, 1.63-10.43). Multivariable models suggest that in addition to the presence of tissue factor-bearing microparticles, lower platelet count, active therapy for underlying disease, and lower hemoglobin were also significantly associated with VTE. The adjusted odds ratio for the effect of detectable tissue factor-bearing microparticles on occurrence of VTE in this model is 3.72 (95% confidence interval, 1.18-11.76).

Microparticles predict the development of thrombosis in cancer patients initially free of venous thromboembolic disease. To

Fig. 4. Survey of tissue factor-bearing microparticles in cancer patients. **A**, histograms of tissue factor-bearing microparticle detected in four cancer patients. Tissue factor microparticle count versus particle diameter; the X-axis is linear for particle volume but is presented in particle diameter in micrometers (0-1.0 μm). The patients had advanced disease, and samples were drawn prior to a cycle of chemotherapy. The cancer diagnoses were (a) breast, (b) pancreatic, (c) pancreatic, and (d) non-small cell lung cancer. Microparticle size varied from 0.3 μm (the lower limits of detection) to 500 to 800 μm . **B**, tissue factor-bearing microparticle concentrations in advanced malignant disease. The percentage of patients with elevated levels of tissue factor-bearing microparticles was significantly greater for pancreatic carcinoma (25 of 39) and colorectal carcinoma (7 of 12) compared with cancer-free subjects (6 of 31; $P < 0.001$ and $P = 0.03$ respectively). Significant differences were not observed between cancer-free subjects and non-small cell lung carcinoma (5 of 28), breast carcinoma (4 of 9), and ovarian cancer (5 of 8). Tissue factor-bearing microparticle concentrations $< 1 \times 10^4/\mu\text{L}$ were considered undetectable (gray). The P values were calculated using Fisher's exact test and cancer-free controls were compared with each cancer category (pancreatic, non-small cell lung cancer, colorectal, breast, and ovary).

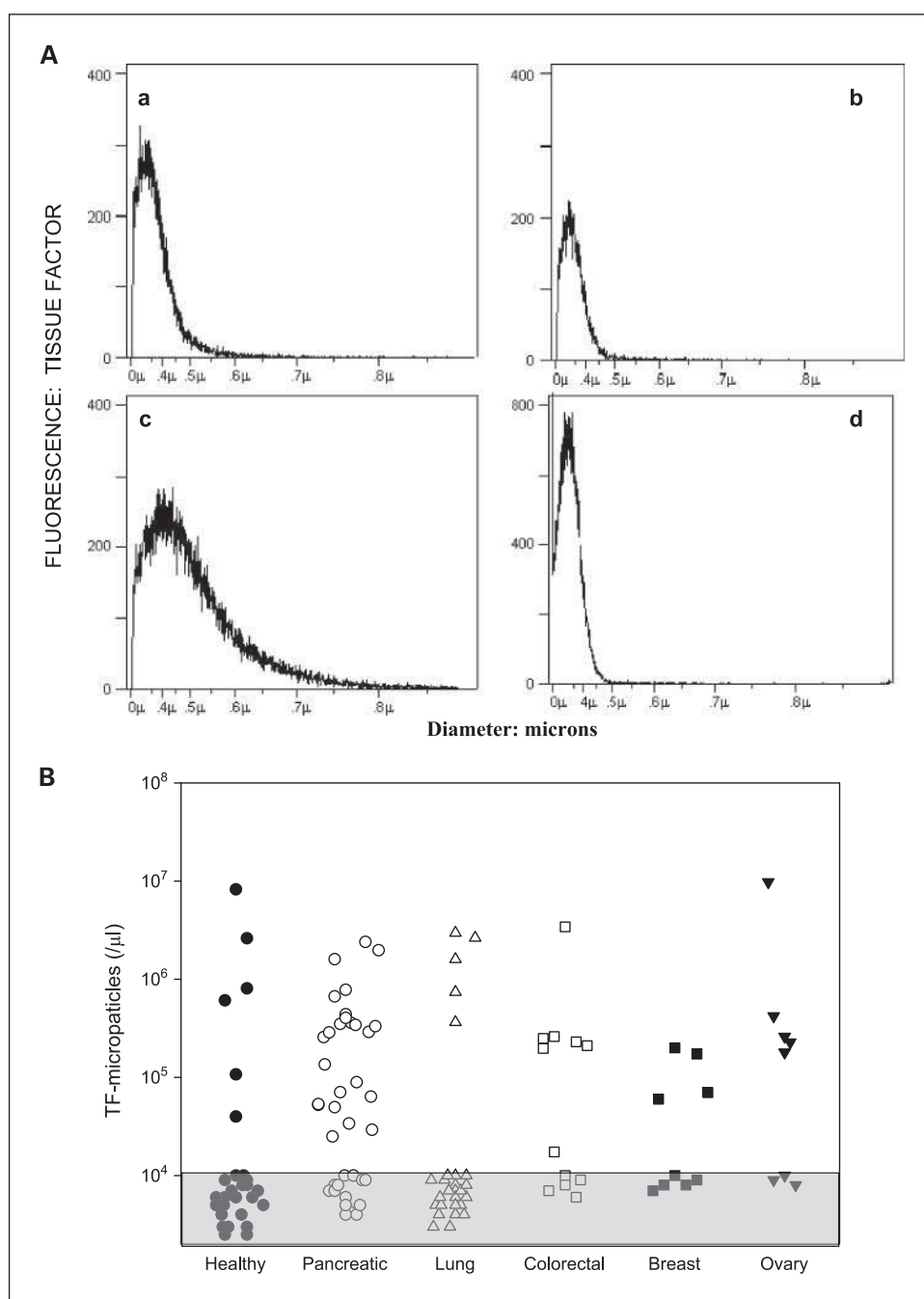


Table 1. Characteristics of cancer patients with acute VTE compared with matched cancer controls

	Cancer VTE (n = 30)	Cancer controls (n = 60)	P*
Median age (y)	59.5	59	0.93
Female (%)	60	58	0.94
Cancer diagnosis:			
Breast	4	8	
Non-Hodgkin's lymphoma	4	8	
Ovarian	4	8	
Renal cell	4	8	
Non-small cell lung cancer	2	4	
Myeloma	2	4	
Pancreatic	2	4	
Colon	1	2	
Rectal	1	2	
Thyroid	1	2	
Glioblastoma	1	2	
Hepatocellular	1	2	
Gastric	1	2	
Chronic lymphocytic leukemia	1	2	
Uterine	1	2	
WBC count ($\times 10^9/L$)	6.4	6.1	0.90
Hemoglobin (g/dL)	10.8	12.8	<.01
Platelet count ($\times 10^9/L$)	220	295	0.01
Active cancer therapy	16 (53%)	47 (78%)	0.02
Diabetes	6 (20%)	9 (15%)	0.56
Current smoker	2 (6.7%)	6 (10%)	0.71

*Age and complete blood counts were compared by Wilcoxon rank sum analysis.

further assess the relationship between tissue factor-bearing microparticles and thrombosis, we performed a retrospective analysis of deep venous thrombosis or pulmonary emboli diagnosed in the cancer-no VTE group in the two years following enrollment. Only documented evidence of a new proximal extremity deep vein thrombosis or pulmonary embolism was included in the analysis. Of the 60 patients in this group, 16 had measurable tissue factor-bearing microparticles, 4 of whom subsequently developed radiographic evidence of VTE within 12 months of enrollment (Fig. 5). One thrombotic event was recorded among the 44 patients without detectable tissue factor-bearing microparticles, but after 15 months following enrollment into the study. The tissue factor-bearing microparticle-positive group and the tissue factor-bearing microparticle-negative group did not differ significantly for age, sex, active cancer treatment, smoking status, diabetes, or the presence of metastatic disease at time of enrollment. Identifying death without VTE as a competing risk, the 1-year estimate of the rate of VTE in cancer patients with detectable tissue factor-bearing microparticles was 34.8%; among the same group without detectable tissue factor-bearing microparticles, the 1-year rate was 0% (Gray test $P = 0.002$). The presence of tissue factor-bearing microparticles in cancer patients initially thrombosis-free predicted a 7-fold increased risk of thrombosis over cancer patients who were negative for tissue factor-bearing microparticles (odds ratio, 7.00; 95% confidence interval, 0.85-82.74; $P = 0.02$). Elevated levels of tissue factor-bearing microparticles were associated with a sensitivity of 0.80 and specificity of 0.78 for the development of VTE with a positive predictive value of 0.25 and negative predictive value of 0.97 for a popu-

lation with disease site distribution that matches that of our study.

Tissue factor-bearing microparticles in idiopathic VTE. A total of 22 patients with idiopathic venous thromboembolic disease without cancer were compared with the 30 cancer patients complicated by acute venous thromboembolic disease to determine whether the presence of tissue factor-bearing microparticles was a feature of venous thromboembolic disease. The median age in the idiopathic VTE group was 55.5 years, which was younger than 59.5 years in the cancer VTE group ($P = 0.01$), and 54.5% subjects were female (12 of 22; $P = 0.47$). Nine patients were diagnosed with a pulmonary embolism; this number did not differ significantly from that of the cancer VTE group ($P = 0.71$). Tissue factor-bearing microparticles were detectable in 23% patients with acute idiopathic VTE (5 of 22), significantly fewer than the 60% (18 of 30) in the cancer patients with acute thromboembolic disease ($P = 0.01$). The median number of tissue factor-bearing microparticles in the cancer VTE cohort (7.1×10^4 microparticles/ μL) was significantly greater than both the idiopathic VTE and cancer-no VTE groups whose levels fell within the undetectable range ($P = 0.002$ and $P = 0.03$, respectively). These results confirm that the high prevalence of tissue factor-bearing microparticles in patients who present with an acute VTE is associated with cancer patients and not VTE alone.

Decrease in tissue factor-bearing microparticles following cancer resection. To examine whether the measured tissue factor-bearing microparticles are derived from the underlying malignancy, we measured tissue factor-bearing microparticle concentrations before and after definitive surgery in three patients with pancreatic carcinoma. In one patient, the preoperative

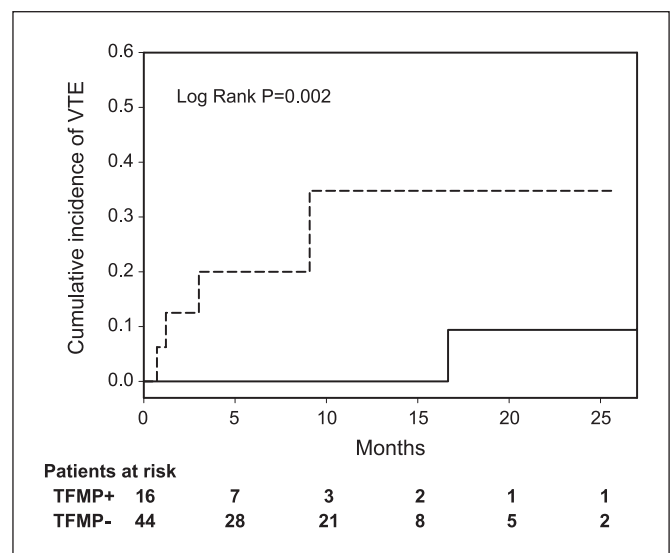


Fig. 5. Cumulative incidence of VTE for cancer patients initially without VTE according to the presence of tissue factor-bearing microparticles. Tissue factor-bearing microparticle-positive (dashed line; $n = 16$) and tissue factor-bearing microparticle-negative (solid line; $n = 44$) cancer patients were assessed for radiographic evidence of thromboembolic disease. In the year following enrollment, thromboembolic disease only developed in a subset of patients who had detectable tissue factor-bearing microparticles. Median follow up was 8.9 mo (range, 1.4-27.9 mo), and 75% of the patients were followed for ≥ 5 mo. There were 11 deaths on record, at a median of 4 mo after study entry (range, 4 d to 23 mo). Dashed line, cancer patients with high levels of tissue factor bearing microparticles (TFMP+); solid line, those with undetectable levels (TFMP-).

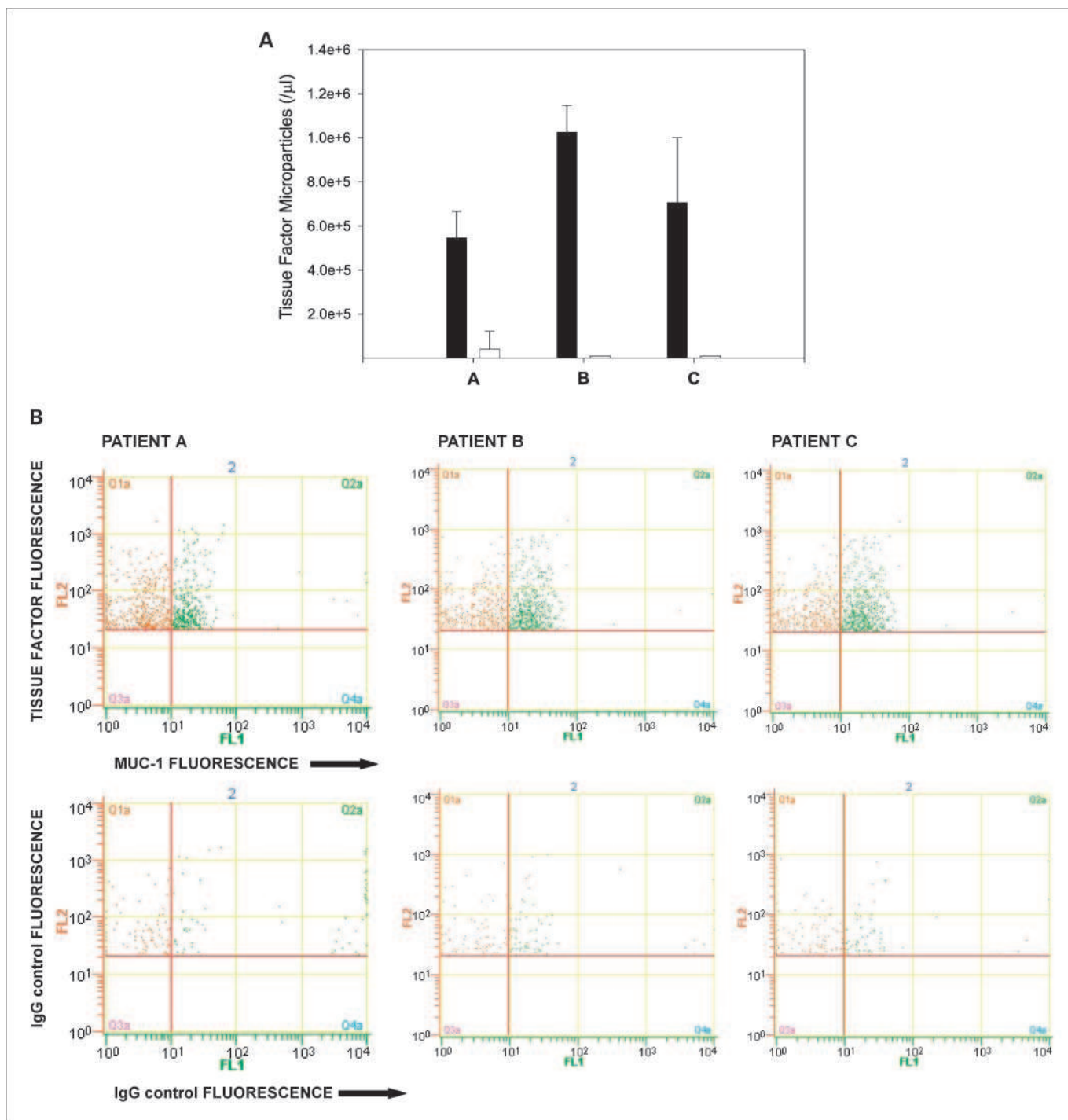


Fig. 6. Concentration of tissue factor-bearing microparticles and MUC-1 expression in patients with pancreatic carcinoma undergoing surgery with curative intent. *A*, patient A was evaluated on postoperative day 44, patient B on day 26, patient C on postoperative day 27. Pre, preoperative measurements (*black*); Post, postoperative measurements (*white*). *B*, the preoperative plasma samples from three pancreatic cancer patients were analyzed by flow cytometry for the expression of tissue factor and MUC-1 on microparticles. Samples were labeled with either anti-tissue factor and anti-MUC-1 antibodies or IgG isotype-matched controls. FL1 represents the fluorescence associated with anti-MUC1 antibody conjugated with Alexa 488 (X-axis) and FL2 represents the fluorescence associated with anti-tissue factor conjugated with phycoerythrin (Y-axis).

concentration of tissue factor-bearing microparticles was $5.40 \times 10^5/\mu\text{L}$. Forty-four days following distal pancreatectomy, there was a >10-fold decrease of these microparticles to $3.92 \times 10^4/\mu\text{L}$ (Fig. 6A). In a second patient, the preoperative concentration of tissue factor-bearing microparticles was $1.02 \times 10^6/\mu\text{L}$. These microparticles were undetectable 26 days post-

operatively. In a third patient, the preoperative concentration of tissue factor-bearing microparticles was $7.06 \times 10^5/\mu\text{L}$, and similarly these microparticles were undetectable 27 days postoperatively. These results are consistent with the concept that the tissue factor-bearing microparticles in these patients are tumor-derived.

To further explore this question, we examined the tissue factor-bearing microparticles from these patients with pancreatic cancer for the presence of the tumor marker, MUC-1. The MUC-1 antigen is a transmembrane glycoprotein overexpressed in epithelial malignancies such as pancreatic cancer but is not found on circulating hematopoietic cells (35, 36). The preoperative samples were labeled with the anti-tissue factor antibody and a monoclonal antibody directed against the MUC-1 antigen. In the three patients tested, approximately 50% of the circulating tissue factor-bearing microparticles in these patients were also positive for the MUC-1 antigen (Fig. 6B). These results support the premise that a population of microparticles is derived from the underlying malignancy. Whether the tissue factor-positive, MUC-1-negative microparticles are derived from the underlying tumor where the MUC-1 signal may be below the level of sensitivity or from hematopoietic cells has not been established.

Discussion

In this study, we have examined the hypothesis that the pathogenesis of thrombosis that complicates many forms of cancer is due to high levels of tissue factor associated with circulating tumor-derived microparticles. To test this hypothesis, we had four requirements: (a) to develop a method for reliably detecting, sizing, and quantitating tissue factor antigen-bearing microparticles in platelet-poor plasma, without isolation and manipulation of microparticles; (b) to survey patients with various forms of cancer to approximate the prevalence of tissue factor-bearing microparticles in their plasma; (c) to design and execute a case-control study to determine whether the detection of tissue factor-bearing microparticles is more closely associated with cancer patients with acute thrombosis than with cancer patients without thrombosis; and (d) to determine whether tissue factor-bearing microparticles associated with malignancy are tumor-derived.

In order to address the analytical issues of identifying and quantitating microparticles in platelet-poor plasma, we adapted a flow cytometric methodology capable of particle size measurements based upon impedance. Triggering on fluorescence, the diameter, in micrometers, of each fluorescent particle was determined. We showed that this system was capable of reproducibly determining both the size and number of fluorescent microspheres to an accuracy of $\pm 5\%$. This method shows marked improvement over light scattering-based flow cytometry, a nonoptimal technique for estimating microparticle size and number.

In the current work, we have shown a significant association between the presence of tissue factor-bearing microparticles and acute cancer-associated thrombosis. In contrast, acute thromboembolic disease in the absence of malignant disease was not characterized by a similar increase in levels of tissue factor-bearing microparticles. The cancer patients who presented with an acute VTE were similar to a cancer-no VTE population for multiple factors including age, sex, cancer diagnosis, current cancer stage, diabetes, and smoking. However, the cancer patients with VTE tended to have lower platelet counts or hemoglobin and were less likely to be receiving chemotherapy. The basis for the differences in blood counts and active therapy between the cancer-VTE and cancer-no VTE groups was likely due to differences in timing of study enrollment. The acute

VTE group was identified at any point during the treatment cycle whereas control patients were enrolled at outpatient visits and were more likely to have recovered from chemotherapy-associated cytopenias. As both higher platelet counts and chemotherapy are considered contributing risk factors for cancer-associated VTE (9, 37, 38), the risk of thrombosis attributed to tissue factor-bearing microparticles may in fact be greater than observed. In this case-control study, we established that tissue factor-bearing microparticles are 4-fold more likely to be found in cancer patients with an acute thrombotic event than in cancer patients without an acute thrombotic event. These results extend previous observations that tissue factor-bearing microparticles can be found in the plasma of some patients with cancer, and show that tissue factor-bearing microparticles are a risk factor for the development of thrombosis.

To further explore the association of circulating tissue factor-bearing microparticles and VTE, we conducted a review of all radiographic studies obtained following enrollment to assess for the development of proximal deep vein thrombosis or pulmonary emboli in cancer patients who had not incurred VTE at time of enrollment. Although this retrospective review was done in a blinded manner, the patients were not systematically assessed for the development of VTE. However, the potential for systematic bias was low as this was a nonintervention trial and enrollment did not impact the subsequent management of these patients. Only those cancer patients with detectable tissue factor-bearing microparticles subsequently developed a thrombotic event in the year following enrollment. This analysis corroborated the association between tissue factor-bearing microparticles and cancer-associated thrombosis identified in the case-control study and suggests that these microparticles may be central to the pathogenesis of thromboembolic disorders associated with malignant disease. Due to the inherent limitations of small case-control studies and retrospective cohort analysis, larger prospective studies with systematic monitoring for the development of VTE are required to confirm these findings.

Other groups have also observed that tissue factor-bearing microparticles can be measured in patients with advanced cancer (29, 30, 39). Tesselaar and colleagues showed an increase in tissue factor activity in platelet-poor plasma from patients with cancer compared with platelet-poor plasma from healthy controls (29). Tissue factor activity associated with microparticles was measured in all seven metastatic cancer patients with a recent history of venous thromboembolic disease. However, the absolute number of tissue factor-bearing microparticles measured by flow cytometry was not significantly different in cancer patients compared with healthy controls (29). Tesselaar et al., using light scattering-based flow cytometry, reported a median of 460 tissue factor-bearing microparticles per μL of platelet-poor plasma in pancreatic cancer patients (range, 240-1,550/ μL ; ref. 29), or less than one tissue factor-bearing microparticle per leukocyte, whereas the tissue factor-bearing microparticle concentrations in our cancer patients varied from 70,000/ μL to 3,200,000/ μL . This is a discrepancy of 3 to 4 orders of magnitude, and raises issues of the sensitivity for the identification of tissue factor-bearing microparticles by light scattering. Hron et al. reported that the median number of tissue factor-bearing microparticles was significantly greater in 20 cancer patients with colorectal cancer compared with controls whereas the individuals' history of VTE was not specified

(30). More recently, Khorana and colleagues observed that two patients with pancreatic cancer with increased levels of plasma tissue factor subsequently developed a venous thromboembolic event.(39)

We present two independent arguments that the tissue factor-bearing microparticles are largely derived from the tumor itself rather than from inflammatory cells. First, in three patients with pancreatic carcinoma undergoing pancreatectomy with curative intent, the microparticle concentration before surgery was reduced to very low or unmeasurable levels about a month after surgery. Second, in three patients with pancreatic carcinoma, we showed that about 50% of the tissue factor-bearing microparticles coexpress MUC-1, a tumor marker for pancreatic carcinoma. Tumor cells express tissue factor (12), the expression of tissue factor activity on tumor cells correlates with thrombotic risk in pancreatic cancer patients (40), cancer cells in culture shed procoagulant vesicular structures (34), and circulating tumor-derived tissue factor-bearing microparticles can be detected in mice xenografted with human pancreatic tumors (41). These results provide compelling evidence that tissue factor-bearing microparticles are derived from certain tumors. Indeed, we suspect that the variability of microparticle generation from different tumors, as well as the total tumor burden, is the basis for the variability of thrombotic events in cancer-associated thrombosis. However, the presence of circulating tissue factor-bearing microparticles is not unique to cancer patients as high levels were identified in a subset of

noncancer controls as well as individuals with an idiopathic VTE. The clinical significance of these elevations in noncancer populations is not known.

Venous thromboembolic disease is a leading cause of death in patients with malignant disease (42), but several recent randomized studies have failed to show the benefit of prophylactic anticoagulation in cancer patients even in the presence of indwelling central catheters (43–45). The methodologies and conclusions of this work provide a rational basis to determine whether the detection of tissue factor-bearing microparticles in cancer patients and their use as a biomarker predict an increased risk of a thromboembolic event. If so, it is critical to determine whether patients identified with this biomarker will benefit from primary thromboprophylaxis.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Cynthia Kos, Koryn Johnson, and Thomas LaRocca for excellent technical assistance and Marie Mahony RN for clinical support; Michael Brochu, Sr., Rick Thomas, Michael Brochu, Jr., and Raquel Cabana at NPE Systems and Gus Alban at Beckman-Coulter for their collaboration in flow cytometer development for this application, and Vasilis Toxavidis at the BIDMC Flow Core Facility; Dr. Hing Wong at Altor Biosciences for the gift of humanized tissue factor antibody; and Dr. Donald Kufe for the monoclonal antibody to MUC1.

References

- Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983;62:14–31.
- Donati MB. Cancer and thrombosis: from Phlegmasia alba dolens to transgenic mice. *Thromb Haemost* 1995;74:278–81.
- Francis JL, Biggerstaff J, Amirhosravi A. Hemostasis and malignancy. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:93–109.
- Arkel YS. Thrombosis and cancer. *Semin Oncol* 2000;27:362–74.
- Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 2001;102:V215–24.
- Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest* 2003;124:58–68S.
- Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* 2004;5:655–63.
- Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007;110:1723–9.
- Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ III. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 2000;160:809–15.
- Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost* 2006;4:529–35.
- Levitan N, Dowlati A, Remick SC, et al. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:285–91.
- Callander NS, Varki N, Rao LV. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992;70:1194–201.
- Gordon SG, Cross BA. A factor X-activating cysteine protease from malignant tissue. *J Clin Invest* 1981;67:1665–71.
- Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005;434:396–400.
- Sun NC, McAfee WM, Hum GJ, Weiner JM. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. *Am J Clin Pathol* 1979;71:10–6.
- Nand S, Fisher SG, Salgia R, Fisher RI. Hemostatic abnormalities in untreated cancer: incidence and correlation with thrombotic and hemorrhagic complications. *J Clin Oncol* 1987;5:1998–2003.
- Buccheri G, Ferrigno D, Ginardi C, Zuliani C. Hemostatic abnormalities in lung cancer: prognostic implications. *Eur J Cancer* 1997;33:50–5.
- Johnson MJ, Walker ID, Sproule MW, Conkie J. Abnormal coagulation and deep venous thrombosis in patients with advanced cancer. *Clin Lab Haematol* 1999;21:51–4.
- Sallah S, Wan JY, Nguyen NP, Hanrahan LR, Sigounas G. Disseminated intravascular coagulation in solid tumors: clinical and pathologic study. *Thromb Haemost* 2001;86:828–33.
- Sallah S, Husain A, Sigounas V, et al. Plasma coagulation markers in patients with solid tumors and venous thromboembolic disease receiving oral anticoagulation therapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:7238–43.
- Miller GJ, Bauer KA, Howarth DJ, Cooper JA, Humphries SE, Rosenberg RD. Increased incidence of neoplasia of the digestive tract in men with persistent activation of the coagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2004;2:2107–14.
- Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938–49.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2311–5.
- Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi *in vivo* is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003;197:1585–98.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol* 2001;112:81–90.
- Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102:2678–83.
- Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104:93–102.
- Chironi G, Simon A, Hugel B, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2775–80.
- Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;7:520–7.
- Hron G, Kollars M, Weber H, et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007;97:119–23.
- Zwicker JI, Furie BC, Kos C, LaRocca T, Bauer KA, Furie B. Trousseau's syndrome revisited: tissue factor-bearing microparticles in pancreatic cancer [abstract 259]. *Blood* 2005;106.
- Hercher M, Mueller W, Shapiro HM. Detection

- and discrimination of individual viruses by flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1979;27:350-2.
33. Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2003.
34. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, et al. Tumor shedding and coagulation. *Science* 1981; 212:923-4.
35. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993;53:641-51.
36. Levi E, Klimstra DS, Andea A, Basturk O, Adsay NV. MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia. *J Clin Pathol* 2004;57:456-62.
37. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer* 2007;110: 2339-46.
38. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* 2005;104:2822-9.
39. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost* 2008;6:1983-5.
40. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2870-5.
41. Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost* 2008;6:1517-24.
42. Donati MB. Cancer and thrombosis. *Haemostasis* 1994;24:128-31.
43. Couban S, Goodyear M, Burnell M, et al. Randomized placebo-controlled study of low-dose warfarin for the prevention of central venous catheter-associated thrombosis in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2005;23: 4063-9.
44. Karthaus M, Kretschmar A, Kroning H, et al. Dalteparin for prevention of catheter-related complications in cancer patients with central venous catheters: final results of a double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Ann Oncol* 2006;17:289-96.
45. Verso M, Agnelli G, Bertoglio S, et al. Enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism associated with central vein catheter: a double-blind, placebo-controlled, randomized study in cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23: 4057-62.

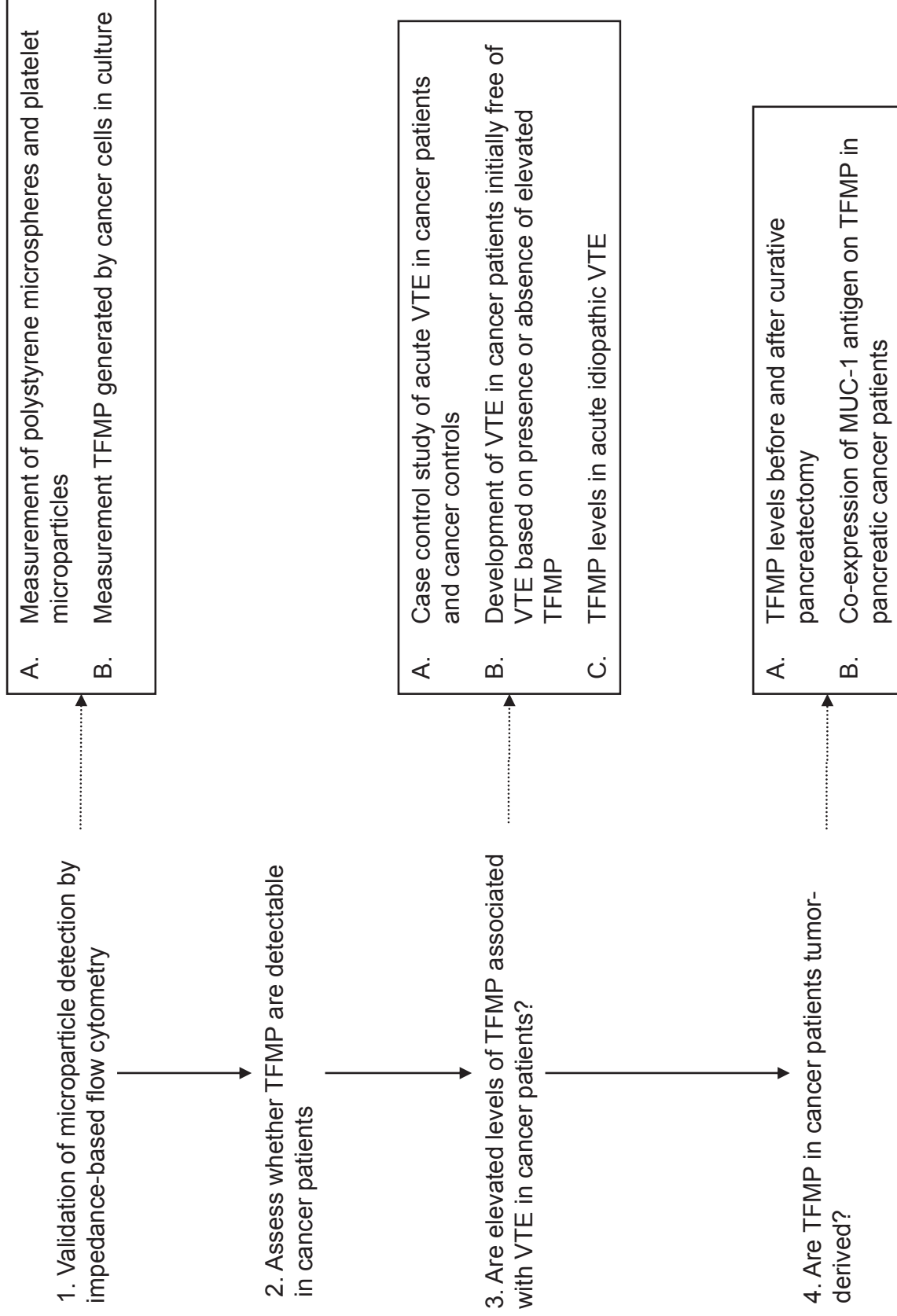


Figure 1.

Cancer cell–derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo

Grace M. Thomas,^{1,2} Laurence Panicot-Dubois,^{1,2} Romaric Lacroix,³
Françoise Dignat-George,³ Dominique Lombardo,^{1,2}
and Christophe Dubois^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR911, Centre de Recherche en Oncologie Biologique et Oncopharmacologie, 13385 Marseille, France

²Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine La Timone, 13385 Marseille, France

³INSERM UMR608, Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, 13385 Marseille, France

Recent publications have demonstrated the presence of tissue factor (TF)–bearing microparticles (MPs) in the blood of patients suffering from cancer. However, whether these MPs are involved in thrombosis remains unknown. We show that pancreatic and lung cancer cells produce MPs that express active TF and P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1). Cancer cell–derived MPs aggregate platelets via a TF-dependent pathway. In vivo, cancer cell–derived MPs, but not their parent cells, infused into a living mouse accumulate at the site of injury and reduce tail bleeding time and the time to occlusion of venules and arterioles. This thrombotic state is also observed in mice developing tumors. In such mice, the amount of circulating platelet-, endothelial cell-, and cancer cell–derived MPs is increased. Endogenous cancer cell–derived MPs shed from the growing tumor are able to accumulate at the site of injury. Infusion of a blocking P-selectin antibody abolishes the thrombotic state observed after injection of MPs or in mice developing a tumor. Collectively, our results indicate that cancer cell–derived MPs bearing PSGL-1 and TF play a key role in thrombus formation in vivo. Targeting these MPs could be of clinical interest in the prevention of thrombosis and to limit formation of metastasis in cancer patients.

CORRESPONDENCE

Christophe Dubois:
christophe.dubois@univmed.fr

Abbreviations used: MP, microparticle; PPP, platelet-poor plasma; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1; Qdot, quantum dot; TF, tissue factor.

The association between the development of metastasis and the risk of thrombotic complications has been documented since 1865. Armand Trousseau was the first to establish a direct correlation between thrombophlebitis and the development of cancer (Trousseau, 1865). A rather common complication and one of the leading causes of death in patients with cancer is the risk of developing thromboembolic diseases (Kakkar and Williamson, 1999; Stein et al., 2006; Schiavetti et al., 2008). The incidence of thrombosis is high in adenocarcinomas such as ovarian, prostate, lung, and gastrointestinal carcinomas (Blom et al., 2006b), and it is particularly high (up to 57%) in patients suffering from pancreatic cancer (Sack et al., 1977; Blom et al., 2006a). In the latter case, thromboembolic diseases are the second most common cause of mortality, accounting for 44% of total deaths after cancer progression (Neoptolemos et al., 2001). The recurrence of

thrombotic complications may also be the first manifestation of underlying malignant disease (Prandoni et al., 1992).

The pathogenesis of the thrombotic state in cancer is associated with the generation of a local and systemic hypercoagulable/thrombotic state that confers a growth advantage to tumor cells. It is now known that activation of the coagulation cascade and aggregation of blood platelets around cancer cells protects the cells from the different degradative pathways present in the blood, and also facilitates dissemination of cancer cells to various sites of metastasis (Gasic et al., 1976; Sierko and Wojtukiewicz, 2007). This supports a model in which the presence of tissue factor (TF), generation of thrombin, and activation of platelets favor the aggressive

© 2009 Thomas et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

biology of cancer. Nevertheless, the cause of this association remains unclear.

Different reports suggest a potential role for circulating microparticles (MPs) in the establishment of a thrombotic state in cancer (Kim et al., 2003; Del Conde et al., 2007; Tilley et al., 2008). MPs are defined as cell-derived membrane fragments and range in size from 0.1 to 1 μm in diameter. They are characterized by their presence at the surface of negative phospholipid moieties that are essential for initiation of blood coagulation (Ghosh et al., 2008); they also bear at least one of the antigenic markers distinctive of the parent cell (Abid Hussein et al., 2003). Aggregated platelets, leukocytes, erythrocytes, and endothelial lineages constitute the most important sources of circulating MPs under many pathophysiological situations, including thrombosis, inflammation, and angiogenesis (Müller et al., 2003). Recent clinical studies have shown that the concentration of circulating TF-bearing MPs is significantly greater in patients with cancer (Tilley et al., 2008), including patients with pancreatic cancer (Del Conde et al., 2007; Hron et al., 2007; Tesselaar et al., 2007), suggesting that these MPs may be responsible for the thrombotic state associated with cancers. Meanwhile, the cellular origins of such MPs have not been determined (Hron et al., 2007; Zwicker et al., 2007; Langer et al., 2008) and may include platelets (Hron et al., 2007; Tesselaar et al., 2007), cancer cells (Dvorak et al., 1981), or monocytes (Falati et al., 2003; Myers et al., 2003; Vandendries et al., 2007). At their surface, platelet-derived MPs express activated integrins (e.g., $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ or $\alpha_v\beta_3$) and receptors (i.e., GPVI and GPIb-IX-V) known to be involved in thrombus formation. Monocyte-derived MPs that have been isolated, labeled, and infused into a recipient mouse accumulate at the site of a laser-induced injury by binding to P-selectin expressed on activated platelets through P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1; Falati et al., 2003; Vandendries et al., 2007). To date, no study has determined the role of cancer cell-derived MPs in thrombus formation *in vivo*.

In the present study, we hypothesize that cancer cell-derived MPs bearing PSGL-1 are involved in the development of a thrombotic state. We demonstrate that pancreatic cancer cells are able to produce MPs *in vitro* that express active TF and PSGL-1. We show that cancer cell-derived MPs circulate in the bloodstream and accumulate at the site of injury in a P-selectin-dependent manner *in vivo*. Finally, we observe that cancer cell-derived MPs, but not their parental cells, accelerate thrombus formation in a mouse model of cancer.

RESULTS

Human and mouse pancreatic and lung cancer cell lines are able to shed MPs that express TF and PSGL-1 *in vitro*

To determine whether pancreatic or lung cancer cells could shed MPs, ultracentrifuged supernatants of human (SOJ-6) and mouse (Panc02) adenocarcinoma pancreatic cell lines or mouse Lewis lung carcinoma cancer cell lines (LLC1) were evaluated by flow cytometry. All cancer cell lines produced vesicles ranging in size from 0.4 to 1 μm in diameter, and these particles were able to bind annexin V (Fig. 1 A). Previous

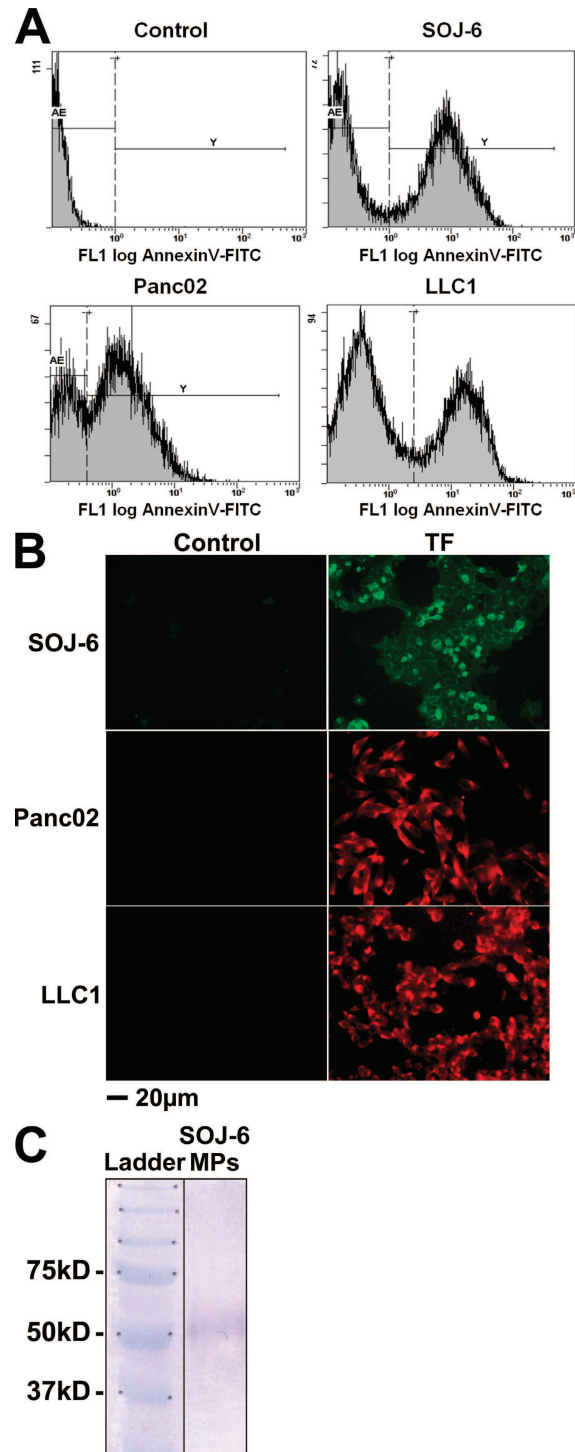


Figure 1. Pancreatic and lung cancer cell lines shed MPs that express TF *in vitro*. (A) Flow cytometry analysis showing annexin V-FITC labeling of SOJ-6, Panc02, and LLC1 cell-derived MPs. Negative controls were realized without addition of calcium. (B) Immunofluorescence microscopy of cancer cells using an anti-TF antibody. (C) Western blot analysis of protein extracts from SOJ-6-derived MPs with a specific anti-TF antibody. All of the experiments were independently performed three times.

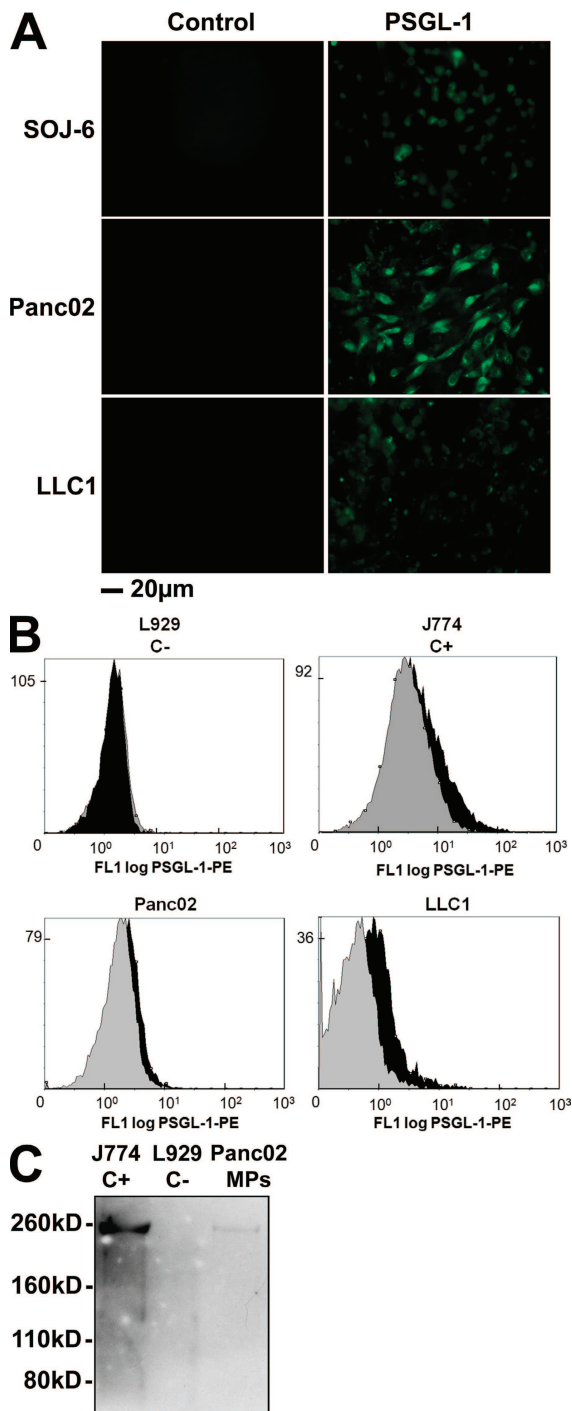


Figure 2. Pancreatic and lung cancer cell-derived MPs express PSGL-1. (A) Immunofluorescence microscopy of SOJ-6, Panc02, and LLC1 cells with an antibody directed against PSGL-1 and an Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. Incubation with the secondary antibody alone served as a negative control. (B) Flow cytometric analysis of J774 (C+), L929 (C-), Panc02-, and LLC1-derived MPs labeled both with annexin V-FITC and with an anti-PSGL-1 PE-conjugated antibody. PSGL-1⁺ MPs are represented by the black histogram. Negative controls were obtained by excluding calcium from the annexin V labeling and in the pres-

ence of an irrelevant PE-conjugated IgG (gray histogram). (C) Western blot analysis of Panc02-derived MPs (Panc02 MPs) and J774 (C+) and L929 (C-) cells with a specific anti-PSGL-1 antibody. All of the experiments were independently performed three times.

reports have shown that TF is present on the surface of cancer cell lines (Haas et al., 2006; Khorana et al., 2007). Accordingly, we observed that SOJ-6, Panc02, and LLC1 cancer cells express TF on their surface by immunofluorescence (Fig. 1 B). TF was also detected by Western blotting of lysates obtained from pancreatic cancer cell-derived MPs (Fig. 1 C). Identical results were obtained with all other pancreatic adenocarcinoma (BxPC-3) and carcinoma (MiaPaCa-2, PANC-1, and LLC1) cell lines studied. Monocyte-derived MPs have been shown to express PSGL-1 (Falati et al., 2003; Myers et al., 2003). Double labeling with annexin V as a positive control revealed that Panc02 and LLC1 cancer cells (Fig. 2 A), as well as Panc02- and LLC1-derived MPs (Fig. 2 B), express PSGL-1 but not P-selectin (not depicted) on their surface. PSGL-1 was also detected by Western blotting in lysates obtained from pancreatic cancer cell- and monocyte-derived MPs (Fig. 2 C). In contrast, no signal was detected by flow cytometry analysis or Western blotting when mouse fibroblast-derived MPs (L929 cell lines) were studied. We conclude that pancreatic and lung cancer cells can shed MPs that constitutively express active TF and PSGL-1.

Cancer cell-derived MPs, but not their parental cells, modulate thrombus formation in vivo

We have previously described the kinetics of thrombus formation in mice after an injury induced by topical application of an FeCl₃ solution (Dubois et al., 2006b). To determine the involvement of MPs in thrombus formation in vivo, experiments we performed using a fibered fluorescent microscope that allows for real-time in vivo imaging after excitation at 660 nm. We examined thrombus formation induced by exposure of the adventitial surface of the mouse mesenteric vessels to 10% FeCl₃ for 5 min. Under these conditions, platelets began to accumulate in injured vessels between 5 and 15 min after FeCl₃ exposure (Fig. 3 A). Only three out of the eight wild-type mice studied formed occlusive thrombi during the 35-min experiment (Fig. 3 B). When Panc02 cancer cell-derived MPs (0.2 µg/g/mouse corresponding to 18,000 MPs/g/mouse) were infused into the bloodstream 5 min before topical application of FeCl₃, platelets began to accumulate 1–5 min after induction of the injury, leading to occlusion of the arterioles between 3 and 10 min after injury (Fig. 3 A). The median time to occlusion of the arteriole in this condition was 6 min ($P < 0.01$; Fig. 3 B). Similar results were observed after infusion of LLC1-derived MPs (0.08 µg/g/mouse, corresponding to 18,000 MPs/g/mouse), with a median time to occlusion of the arteriole of 12 min ($P < 0.05$; Fig. 3 B). The median time to arteriole occlusion was significantly shorter than the median time to occlusion observed without infusion of MPs ($P < 0.05$). These results indicate that infusion of cancer

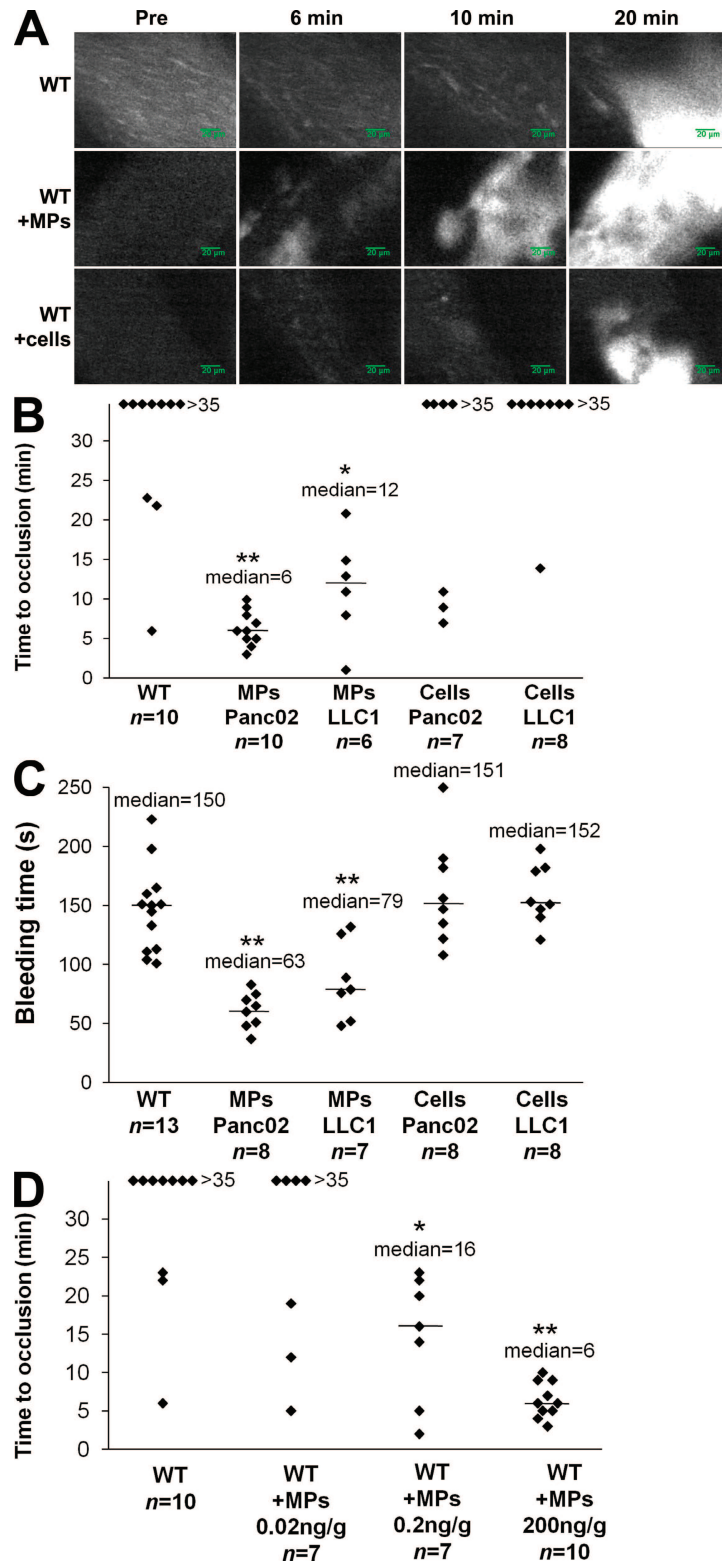


Figure 3. Cancer cell-derived MPs accelerate thrombus formation in vivo. Thrombus formation was assessed after infusion of Alexa Fluor 660-conjugated anti-CD41 antibody into wild-type mice in the presence of Panc02-derived MPs (MPs Panc02, 0.2 μ g of MP-associated proteins/g/mouse), LLC1-derived MPs (MPs LLC1, 0.08 μ g of MP-associated proteins/g/mouse), or Panc02 cells (Cells Panc02, 5,000 cells/g/mouse) or LLC1 cells (Cells LLC1, 5,000 cells/g/mouse). Injury of the mesenteric vessels was induced with 10% FeCl₃ for 5 min. (A) Representative composite images of fluorescence depicting

cell-derived MPs affected the kinetics of thrombus formation. To determine whether cancer cells may also be involved in thrombus formation, we determined the time to occlusion in arterioles after infusion of cancer cells (5,000 cells/g/mouse, equivalent to the maximum concentration of cells that may be infused without altering blood flow; not depicted; Fig. 3 A). In this condition, no statistical difference was found in comparison with the kinetics observed when wild-type mice were injured. Indeed, platelet accumulation was detected between 5 and 10 min after injury. Only three out of seven mice studied after infusion of Panc02 cells and only one out of eight mice studied after infusion of LLC1 cells formed occlusive thrombi (Fig. 3 B). To confirm the involvement of cancer cell-derived MPs in thrombus formation, tail bleeding time experiments were performed as previously described (Panicot-Dubois et al., 2007). After injection with Panc02- and LLC1-derived MPs, the median tail bleeding time observed in wild-type mice was 63 s ($n = 8$) and 79 s ($n = 7$), respectively. These values were significantly lower ($P < 0.01$) than the bleeding times (close to 150 s) obtained for wild-type mice that were not infused with cells or MPs ($n = 13$), wild-type mice infused with Panc02 cells ($n = 8$), or wild-type mice infused with LLC1 cells ($n = 8$; Fig. 3 C). We next determined the number of MPs sufficient enough to affect kinetics of thrombosis. We observed that an amount as low as 0.2 ng/g/mouse of cancer cell-derived MPs significantly accelerated kinetics of thrombosis in vivo in our model (Fig. 3 D). Collectively, these results indicate that infusion of cancer cell-derived MPs, but not infusion of their parental cells, accelerates thrombus growth in vivo, suggesting that cancer cell-derived MPs may participate in thrombus formation.

To determine whether cancer cell-derived MPs accumulate at the site of FeCl₃-induced injury in vivo, MPs were isolated, labeled with the DiD fluorochrome, and infused into a recipient mouse. First, we determined the half-life of exogenous MPs in the blood circulation of healthy mice (Fig. 4 A). The results show that 50% of exogenous MPs were eliminated from the blood circulation in <15 min, confirming the results previously described for erythrocyte-derived MPs infused into the rat (Willekens et al., 2005). After infusion of exogenous MPs and induction of a chemical injury to mesenteric arterioles, a fluorescent signal corresponding to DiD-labeled MPs was detected (Fig. 4 B). This accumulation of cancer cell-derived MPs at the site of injury was further confirmed by intravital microscopy (Dubois et al., 2007; Panicot-Dubois et al., 2007). Using such a system,

we simultaneously imaged DiO-labeled cancer-derived MPs (0.2 μg/g/mouse, corresponding to 18,000 MPs/g/mouse) and DiD-labeled cancer cells (5,000 Panc02 cells/g/mouse) infused into the bloodstream of a recipient mouse. Both cancer cell-derived MPs and cancer cells were detected circulating in the blood (Fig. 4 C). However, only cancer cell-derived MPs were found to accumulate at the site of the FeCl₃-induced injury. 8 min after injury, the number of exogenous MPs accumulating at the site of injury increased, indicating that thrombus-associated MPs remained in the animal for a longer time period than did circulating MPs (Fig. 4 C). We conclude that cancer cell-derived MPs, but not their parental cells, accumulate at the site of injury in vivo and accelerate thrombus growth.

Characterization of a thrombotic state in mice developing ectopic tumors

Next, we created a mouse model of cancer induced by subcutaneous injection of pancreatic (Panc02) or lung cancer (LLC1) cells. 5 wk after induction of the ectopic tumor, the number of endogenous circulating MPs in both healthy mice and mice developing tumors were compared by flow cytometry analysis. To characterize the cellular origin of MPs, we first labeled MPs using antibodies specific for platelets (CD41⁺), erythrocytes (TER 119⁺), leukocytes (CD45⁺), cells likely of endothelial origin (CD31⁺CD41⁻), and cancer cells (MUC-1⁺). The data are presented in Table I (see also Fig. S1). As expected, the number of endogenous circulating annexin V⁺ MPs was significantly increased in mice developing tumors in comparison with control mice (median = 9,383 MPs/μl and 10,018 MPs/μl of plasma for Panc02- and LLC1-induced-tumor mice, respectively, and 8,951 MPs/μl of plasma in control mice; $P < 0.05$). The amount of platelet- and endothelial cell-derived MPs was significantly increased in mice developing tumors in comparison with control mice. However, neither the number of leukocyte-derived circulating MPs nor the quantity of endogenous erythrocyte-derived MPs increased in comparison with the control. We also addressed the presence of endogenous circulating cancer cell-derived MPs using Muc-1, a protein that is highly expressed in various epithelial cancers. As expected, the amount of Muc-1-bearing MPs was significantly increased in tumor-induced mice in comparison with healthy mice. We also detected MPs bearing the carbohydrate CA19-9, which is highly expressed in lung and pancreatic cancers. Of note, this antigen was only present on MPs in blood obtained from Panc02- and LLC1-tumor-induced

thrombus formation of labeled platelet accumulation (white) on mesenteric vessels (Pre, before injury). (B) Time to vessel occlusion reported in minutes for mesenteric arterioles in wild-type mice ($n = 10$ thrombi in 10 mice), wild-type mice infused with Panc02-derived MPs ($n = 10$ thrombi in 7 mice), or with LLC1-derived MPs ($n = 6$ thrombi in 6 mice), Panc02 cells ($n = 7$ thrombi in 7 mice), or LLC1 cells ($n = 8$ thrombi in 8 mice). (C) Bleeding time in seconds determined in wild-type mice ($n = 13$ mice), wild-type mice infused with Panc02-derived MPs ($n = 8$ mice), or with LLC1-derived MPs ($n = 7$ mice), Panc02 cells ($n = 8$ mice), or LLC1 cells ($n = 8$ mice). (D) Times to arteriole occlusion were observed in wild-type mice ($n = 10$ thrombi in 10 mice) and in wild-type mice infused with different concentrations of Panc02-derived MPs (MPs 0.02 ng/g/mouse, $n = 7$ thrombi in 6 mice; MPs 0.2 ng/g mouse, $n = 7$ thrombi in 7 mice; and MPs 200 ng/g mouse, $n = 10$ thrombi in 9 mice). Horizontal bars indicate median values. Experiments were independently performed 10 times (A and B) and at least six times (C and D). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

mice (Table I). Because we have previously observed that Panc02- and LLC1-derived MPs express PSGL-1 on their surface (Fig. 2) and because the quantity of leukocyte-derived MPs, which also bear PSGL-1, was not increased in tumor-induced mice in comparison with control mice, we determined the quantity of circulating PSGL-1-bearing MPs in the different populations of mice. The number of MPs bearing PSGL-1 was significantly increased in mice developing tumors in comparison with healthy mice. Collectively, our results indicate that the elevation of endogenous cell-derived MPs positive for annexin V results from a selective increase in MPs originating from platelets, endothelial cells, and tumor cells.

Tail bleeding times were significantly reduced in mice developing a tumor (median times for mice that received Panc02 or LLC1 cancer cells were 70 and 78 s, respectively) in comparison with mice that did not (median time = 150 s; $P < 0.01$; Fig. 5 A). We determined the kinetics of thrombus formation after FeCl_3 injury to both the mesenteric arterioles

and venules of control and tumor-bearing mice (Fig. 5 B). A significant decrease in the time to occlusion of the arterioles ($P < 0.05$; Fig. 5 C) and venules ($P < 0.05$; Fig. 5 D) was observed in mice developing tumors (a median time to occlusion of 8 and 15 min in arterioles and 13 and 8 min in venules in mice developing Panc02- and LLC1-induced tumors, respectively) in comparison with control mice (median time > 35 and 18 min in arterioles and venules, respectively). Interestingly, the tail bleeding time and time to occlusion of arterioles and venules were similar in mice developing tumors (median volume = 239 mm^3) and mice for which Panc02-derived MPs were infused into the circulation (compare Fig. 3 B with 5 C and Fig. 3 C with 5 A). Furthermore, we did not observe any linear correlation between the volume of the tumor and the bleeding time (Fig. 5 E). Our results indicate that the presence of an ectopic tumor in mice increases the quantity of MPs present in the bloodstream and accelerates thrombus formation, as compared with healthy mice.

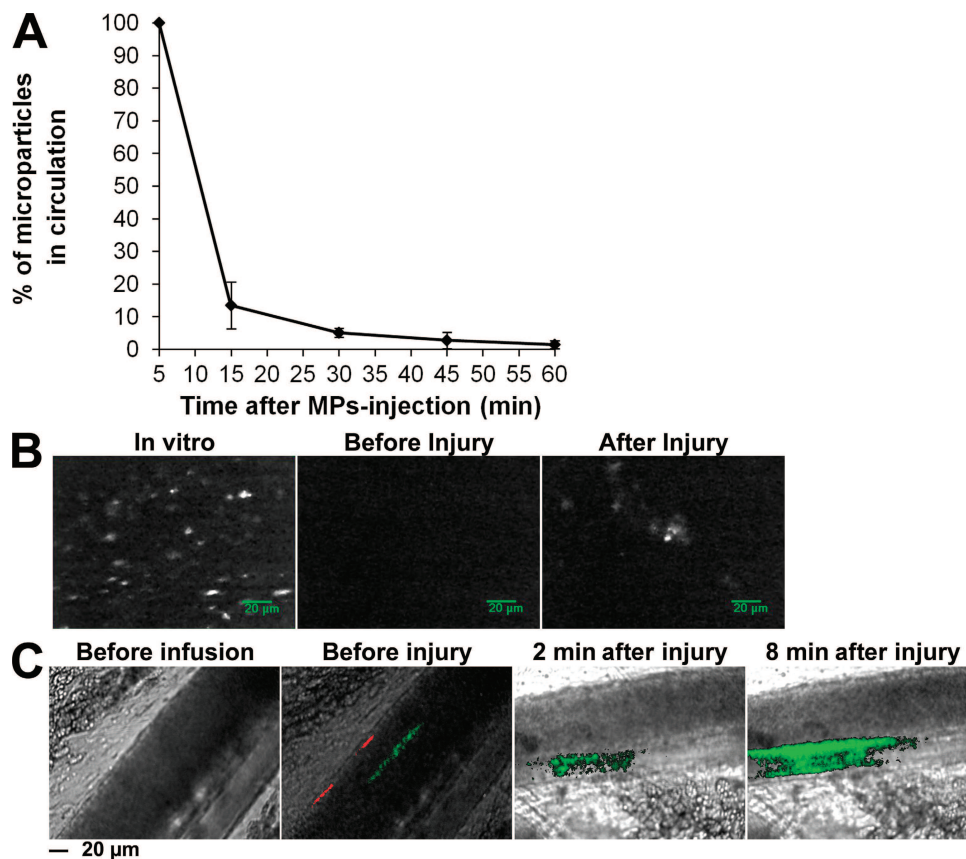


Figure 4. Cancer cell-derived MPs accumulate at the site of injury in mice. (A) Half-life of DiO-labeled Panc02-derived MPs in the blood circulation of a healthy mouse ($n = 4$ mice, performed independently) reported as the mean \pm SD. (B) Imaging of DiD-labeled Panc02-derived MPs using fibered fluorescence microscopy. Panc02-derived MPs were labeled with DiD (left) before infusion into the blood circulation of a living mouse. Although no fluorescent signal was detected in the microcirculation before injury (middle), MPs were detected accumulating at the site of FeCl_3 -induced injury (right). Images are representative of six injuries performed in three mice, independently. (C) Intravital videomicroscopy visualization of mesenteric vessels. DiO-labeled MPs (depicted in green; 0.2 μg of MP-associated proteins/g/mouse) and their DiD-labeled parental cells (depicted in red; 5,000 cells/g/mouse) were simultaneously infused into a recipient mouse. Circulating MPs and cells were detected in the microcirculation before injury (second from left). Note that no fluorescent signal was detected before infusion of MPs and cells (left). The experiment was independently performed three times in three mice.

Endogenous cancer-derived MPs accumulate at the site of thrombus formation in vivo

To determine if cancer cells and/or MPs shed during tumor growth could participate and influence thrombus formation in vivo, an ectopic tumor was induced by injection of Panc02 cells labeled with quantum dots (Qdots). Using this compound, we were able to detect fluorescence in vitro for more than a week in cultured cells and in MPs shed from the cells (unpublished data). 1 wk after injection of Qdot-labeled cells, FeCl₃ injury was administered to the mesentery of the mouse. The presence of Panc02 cells and/or MPs at the site of injection, in the circulation, and at the site of injury was followed by in vivo imaging. As expected, when Qdots alone were injected into mice, a fluorescent signal was detected 1 wk later only at the site of injection. In contrast, Qdot-labeled cells and/or MPs were detected at the site of injection and in the circulation, and also accumulated at the site of injury (Fig. 6 A). These results indicate that in mice developing ectopic tumors, cancer cells and/or cancer-derived MPs may reach the bloodstream and accumulate at the site of injury, suggesting that these MPs may influence the kinetics of thrombus growth. To discriminate between Panc02 cells and endogenous Panc02-derived MPs (produced by the tumor in contrast with MPs prepared in vitro and infused into the bloodstream), we stably

transfected Panc02 cells with the pEGFP-N1 vector encoding GFP (Fig. 6 B). 5 wk after subcutaneous injection of Panc02 cells overexpressing GFP, the presence and accumulation of a fluorescent signal before and after injury induced by a dye laser (Dubois et al., 2006a; Dubois et al., 2007) were detected in the cremaster microcirculation using the intravital microscope. Particles were observed, ranging in size from 0.4 (the minimum size we were able to detect using our system) to 1 μm (the maximum size measured for detected particles), that were likely endogenous MPs circulating in the blood circulation (Fig. 6 C) and accumulating at the site of injury in both venules (Fig. 6 D, left) and arterioles (Fig. 6 D, right). Together with our previous results showing that Panc02-derived MPs but not Panc02 cells accumulate at the site of injury, we conclude that Panc02-derived MPs shed from a growing tumor circulate in the bloodstream and participate in thrombus formation in mice.

Endogenous cancer-derived MPs accumulate at the site of injury by binding to P-selectin and accelerate thrombus growth in a TF-dependent pathway

The thrombotic effects of cancer cell-derived MPs on tail bleeding time (Fig. 7 A) and time to occlusion of arterioles (Fig. 7 B) and venules (Fig. 7 C) were significantly decreased

Table I. Number and cellular origins of MPs ($\times 10^6/\text{liter}^{-1}$ plasma) in healthy and cancer mice

MP origins	Controls (<i>n</i> = 8)	Pancreatic cancer (<i>n</i> = 8)	Lung cancer (<i>n</i> = 7)	p-value ^a	p-value ^b
	$\times 10^6/\text{liter}^{-1}$ plasma	$\times 10^6/\text{liter}^{-1}$ plasma	$\times 10^6/\text{liter}^{-1}$ plasma		
Total (annexin V ⁺)					
Median	8,951	9,383	10,018	0.024	0.047
Range	5,994–14,714	5,536–14,794	5,048–16,442		
Platelet (CD41 ⁺)					
Median	2,294	3,096	3,024	0.035	0.014
Range	1,724–3,216	1,636–5,476	770–8,784		
Erythrocyte (TER 119 ⁺)					
Median	1,410	694	828	0.149	0.242
Range	250–4,672	288–2,712	478–2,480		
Leukocyte (CD45 ⁺)					
Median	346	251	722	0.209	0.424
Range	74–1,032	130–888	68–2,206		
Endothelial cell (CD31 ⁺ CD41 ⁻)					
Median	135	275	164	0.001	0.014
Range	108–330	150–336	92–296		
MUC-1 ⁺					
Median	117	1,089	1,492	0.003	0.003
Range	0–7,424	0–15,468	98–4,786		
CA19.9 ⁺					
Median	0	264	127	0.001	0.003
Range	0	0–6,852	0–2,428 (<i>n</i> = 6)		
Annexin V ⁺ PSGL-1 ⁺					
Median	146	293	234	0.004	0.006
Range	76–376	74–522	134–550		

^aDifferences between mice developing a pancreatic cancer and healthy mice.

^bDifferences between mice developing a lung cancer and healthy mice.

when proteins at the surface of MPs were stripped by trypsin before infusion into the recipient mouse. Cancer cells and MPs express TF on their surfaces (Fig. 1). To determine whether

TF was present in a decrypted (active) form on the surface of cancer cells and MPs, the activity of TF present on SOJ-6, Panc02, and LLC1 cells, as well as MPs, was determined.

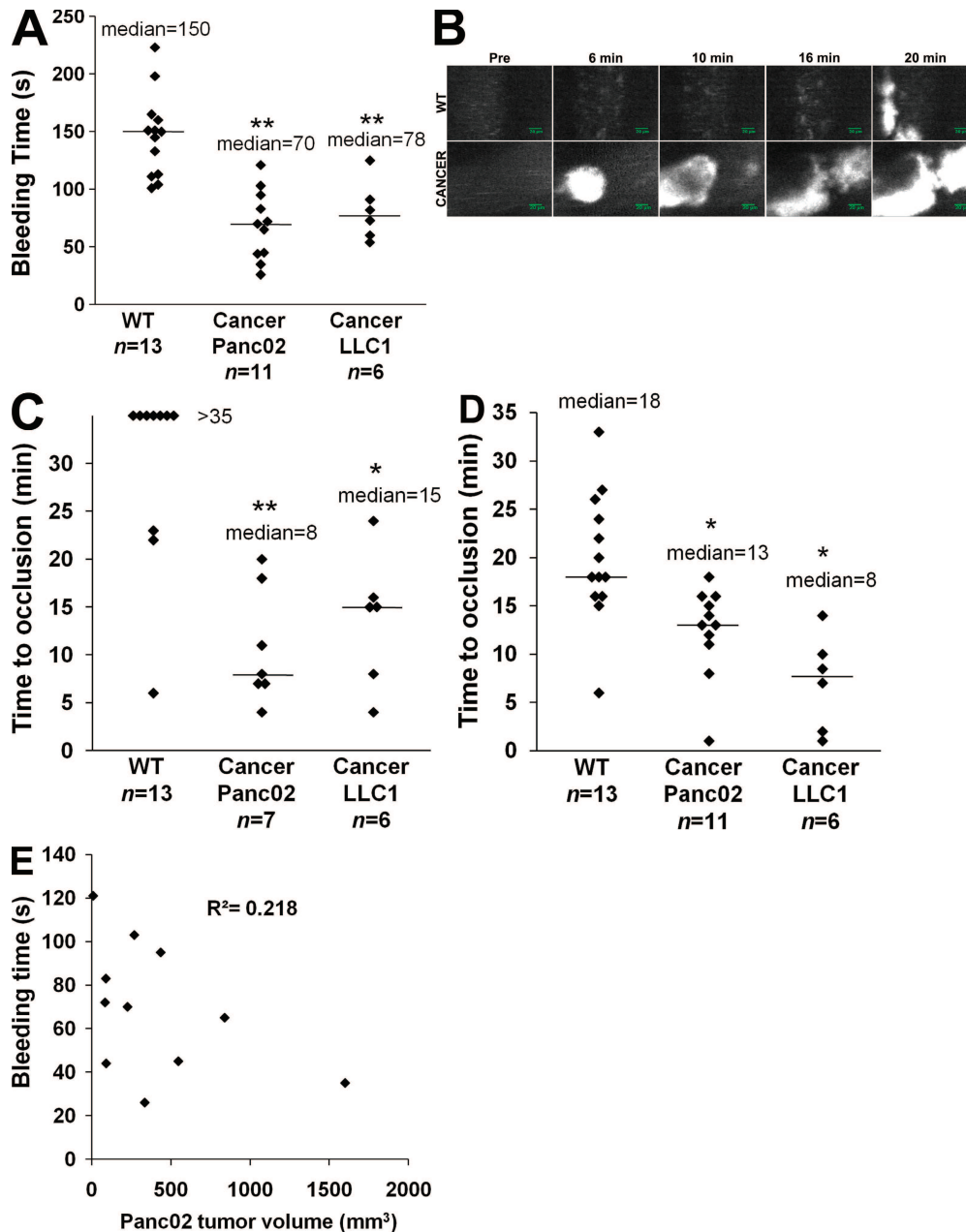


Figure 5. Characterization of a thrombotic state in mice developing tumors. Kinetics of thrombosis in wild-type mice or in mice developing Panc02-derived (Cancer Panc02) or LLC1-derived (Cancer LLC1) tumors. (A) Bleeding times were determined in wild-type mice ($n = 13$ mice), mice developing a Panc02 tumor ($n = 11$ mice), or mice developing an LLC1 tumor ($n = 6$ mice). (B) Thrombus formation was studied after infusion of Alexa Fluor 660-conjugated anti-CD41 Fab fragment and Syto 62 in wild-type mice and in mice developing tumors. Injury was induced in mesenteric vessels by topical application of 10% FeCl_3 for 5 min. Representative fluorescence images depicting the kinetics of thrombus formation of labeled platelet accumulation (white) on mesenteric arterioles (Pre, before injury). (C and D) Time to vessel occlusion reported in minutes for mesenteric arterioles ($n = 13, 7,$ and 6 thrombi for WT, Cancer Panc02, and Cancer LLC1, respectively; C) and venules ($n = 13, 11,$ and 6 thrombi for WT, Cancer Panc02, and Cancer LLC1, respectively; D). One injury was performed per mouse. (E) Bleeding times (in seconds) in function of the tumor volume (in mm^3) in Panc02 tumor-bearing mice ($n = 11$). The linear coefficient of determination value is represented by R^2 . Horizontal bars in A, C, and D indicate median values. Experiments were independently performed at least six times (A–D) and 11 times (E). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

As previously described by others (Milsom et al., 2007; Pawlinski and Mackman, 2008), we observed that cancer cells express active TF, demonstrating activity ranging from 7×10^{-4} pmol/cell for the two mouse cancer cell lines tested to 17×10^{-4} pmol/cell for human SOJ-6 cancer cells (Fig. 7 D). All MPs studied expressed similar concentrations of active TF (between 2.3×10^{-4} and 4.3×10^{-4} pmol/MP). We then determined the activity of TF as a ratio of TF concentration to surface area to control for the difference in size between a cancer cell (diameter = 20 μ m) and an MP (diameter = 1 μ m). Results obtained show that the density of active TF is increased >100-fold in MPs as compared with cancer cells. (Fig. 7 D). These cancer cell-derived MPs were able to activate platelets and to induce platelet aggregation and formation of a fibrin mesh after addition of platelet-poor plasma (PPP) to a washed platelet preparation (Fig. 7 E). This effect was slightly inhibited when a fibrinogen-deficient plasma was added to the platelet preparation and was abolished by using a factor VII-depleted PPP (Fig. 7 E). These data demonstrate that MPs activate and aggregate platelets via a TF-dependent pathway *in vitro*.

To determine whether endogenous MPs arising from cancer cells accumulate in the thrombus growth via an interaction between PSGL-1 and P-selectin, the accumulation of endogenous Panc02-derived MPs was compared at the site of injury before and after infusion of a blocking P-selectin monoclonal antibody, as previously described (Falati et al., 2003; Vandendries et al., 2007). Although accumulation of endogenous MPs was observed after laser- or FeCl₃-induced injury (Fig. 8 A, left) to the mesentery, no signal corresponding to endogenous cancer cell-derived MPs bound to a thrombus was detected upon infusion of the P-selectin antibody (Fig. 8 A, right). The same results were observed when exogenous DiD-labeled cancer cell-derived MPs were infused into the circulation in the presence of blocking antibody (unpublished data). We conclude that cancer cell-derived MPs accumulate at the site of thrombus formation via interactions between the PSGL-1 expressed at their surface and P-selectin expressed on activated platelets and endothelial cells. Furthermore, the median times to occlusion in arterioles (Fig. 8 B) and venules (Fig. 8 C) were significantly higher when cancer cell-derived MPs were infused in the presence of blocking P-selectin antibody than when they were infused alone ($P < 0.05$). These results were confirmed by determining the tail bleeding time, which was significantly higher in the presence of P-selectin ($P < 0.01$; Fig. 8 D). Collectively, our results indicate that tumor-shed MPs reach the bloodstream, accumulate at the site of injury in a P-selectin-dependent manner, and accelerate thrombus growth mainly via a TF-dependent pathway.

DISCUSSION

In the present paper, we studied the role of cancer cell-derived MPs in thrombus formation. To characterize the thrombotic/coagulation state *in vivo*, we measured the kinetics of thrombus formation after a chemical- or laser-induced injury. We also compared the tail bleeding time of healthy mice, mice developing tumors, and mice after infusion of

cancer cells and MPs. Our results indicate that pancreatic and lung cancer cells are able to shed MPs expressing TF and PSGL-1 on their surface. *In vivo*, in a mouse model of cancer, these MPs circulate in the blood, accumulate at the site of injury in a P-selectin-dependent manner, and may participate in

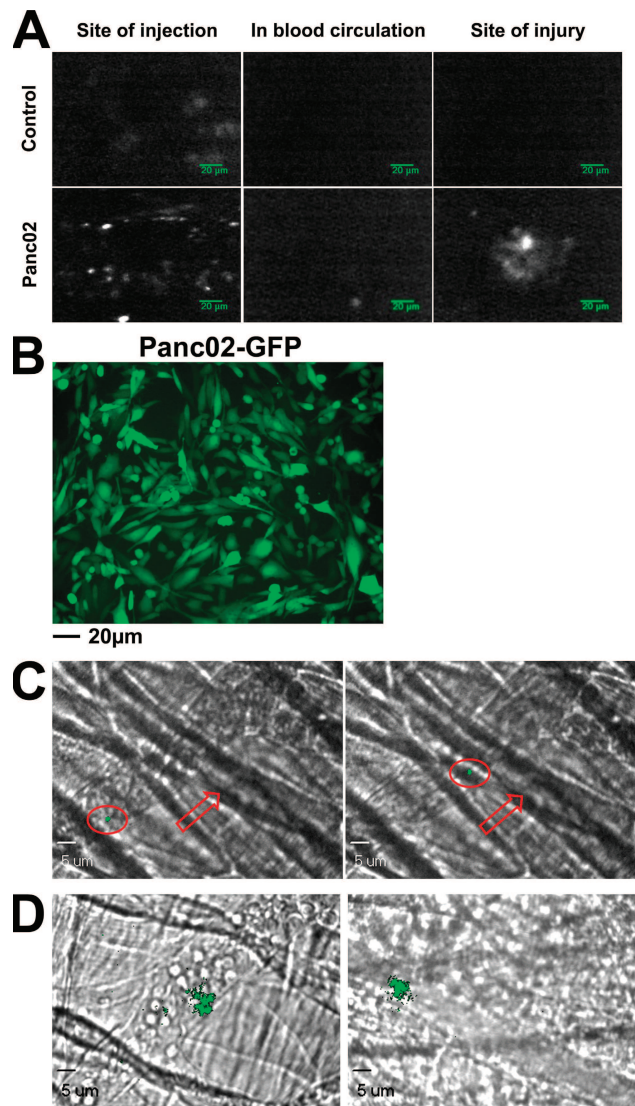


Figure 6. Endogenous cancer cell-derived MPs accumulate at the site of thrombus formation *in vivo*. (A) Qdot-labeled Panc02 cells (2×10^6 cells) or Qdots alone (Control) were injected subcutaneously into the right flank of a mouse. 1 wk later, fluorescent signals were detected at the site of injection (left), and in the mesentery before (middle panel) and after (right) FeCl₃-induced injury. (B) Fluorescence microscopy of Panc02 cells overexpressing GFP before subcutaneous injection into wild-type mice. (C and D) 2×10^6 Panc02 cells overexpressing GFP were injected subcutaneously into the right flank of a mouse. 5 wk later, the cremaster was isolated and fluorescent circulating GFP-labeled MPs were detected in the blood microcirculation (red arrow, direction of the blood flow; red circle, GFP microparticle; C) and accumulating at the site of injury in venules (D, left) and arterioles (D, right). All images are representative of three independent experiments observed for nine thrombi formed in three mice.

the generation of thrombin, likely via the expression of active TF at their surface. The presence of MPs is necessary for the formation of a thrombotic state *in vivo*. Finally, our results show that cancer cells do not accumulate at the site of injury and do not accelerate the kinetics of thrombosis in our model. To our knowledge, this is the first study to use imaging of endogenous cancer cell-derived MPs and cancer

cells to characterize their respective roles in the kinetics of thrombus formation *in vivo*.

Among the different proteins able to activate and aggregate platelets while simultaneously favoring the process of metastasis, TF expressed on cancer cells has been suggested to play a key role in the development of a cancer-associated thrombotic state (Riewald and Ruf, 2001; Haas et al., 2006;

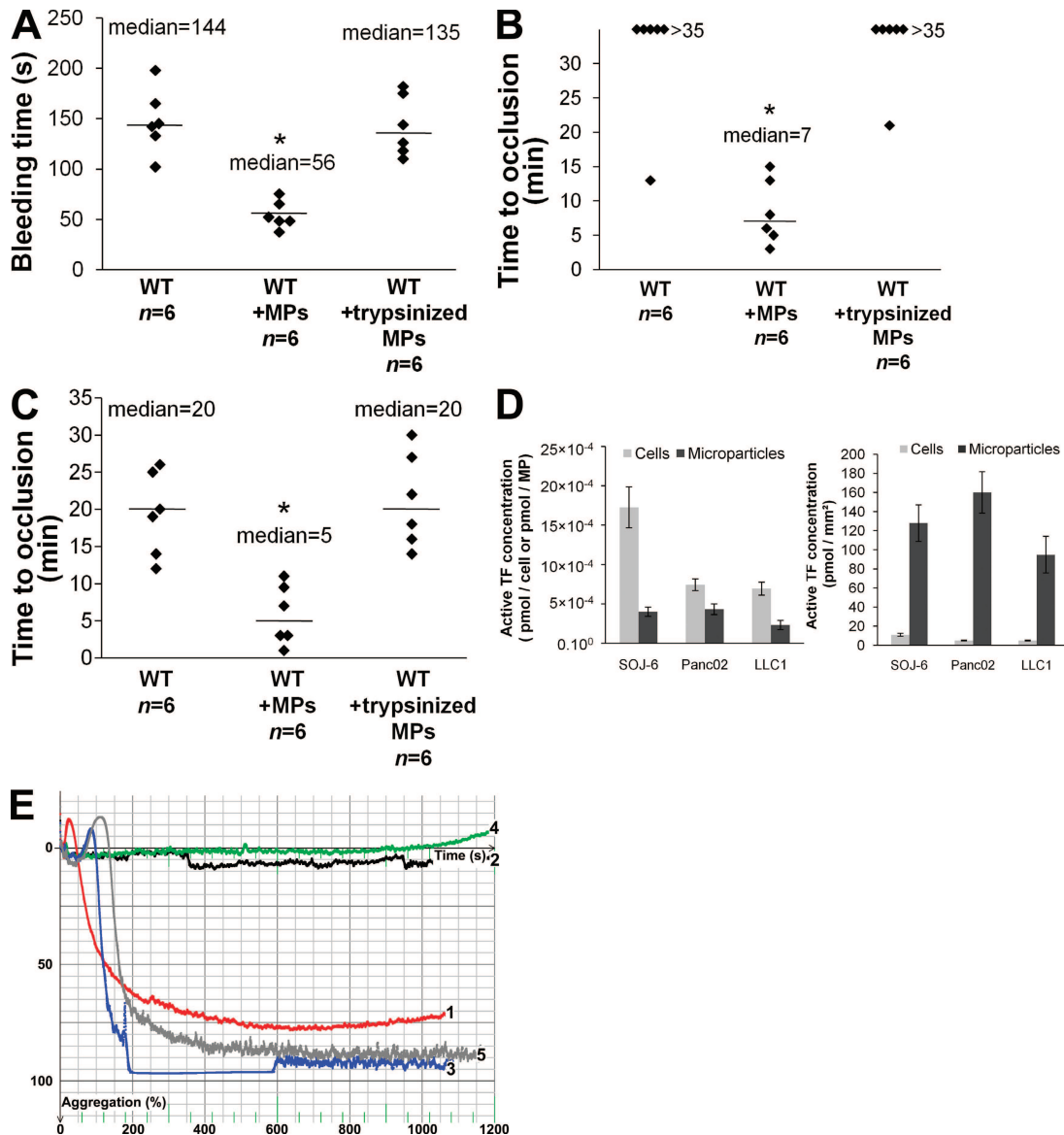


Figure 7. Endogenous cancer-derived MPs accelerate thrombus growth through a TF-dependent pathway. (A–C) Kinetics of thrombosis in mice perfused with control Panc02 MPs or trypsinized Panc02 MPs (18,000 MPs/g/mouse) compared with wild-type mice. (A) Bleeding time of wild-type mice and of mice perfused with control MPs (WT+MPs) or trypsinized MPs (WT+trypsinized MPs; $n = 6$ mice for each group). Time to vessel occlusion reported in minutes for mesenteric arterioles (B) and venules (C; $n = 6$ thrombi in six mice for each group). Injury of the mesenteric vessels was induced by topical application of 10% FeCl₃ for 5 min. Horizontal bars indicate median values. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. (D) Measurement of TF activity on the surface of cancer cells and MPs in pmol/cell⁻¹ and pmol/MP⁻¹ (left) or in pmol/mm² (right), reported as the mean \pm SD. (E) Aggregation of 2.5×10^8 human washed platelets/ml induced by addition of thrombin (Curve 1, red), SOJ-6 MPs (1 μ g of MP-associated proteins/ml) in the absence (Curve 2, black) or presence of 5% vol/vol (final) of PPP (Curve 3, blue), factor VII-depleted PPP (Curve 4, green), or fibrinogen-deficient PPP (Curve 5, gray). Experiments were independently performed six times (A–C) and three times (D and E).

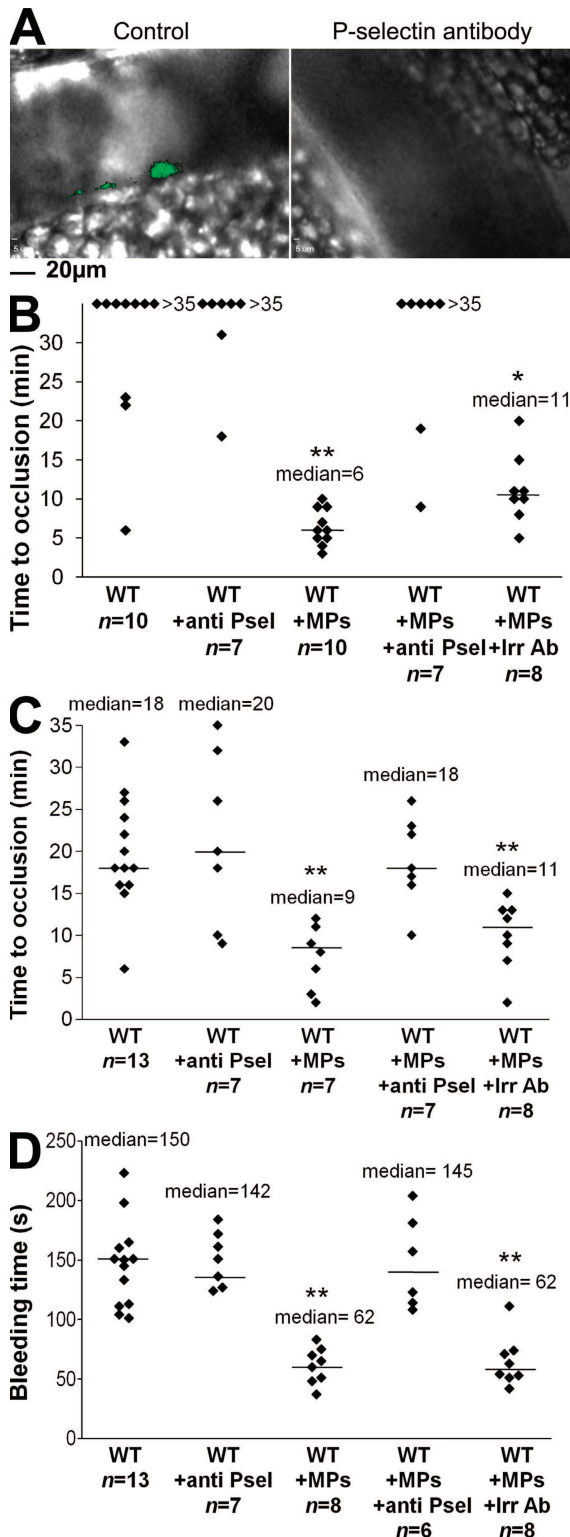


Figure 8. Endogenous cancer-derived MPs accelerate thrombus formation in a P-selectin-dependent manner. (A) 2×10^5 Panc02 cells overexpressing GFP were injected subcutaneously into the right flank of a mouse. 5 wk later, chemical injury of the mesentery was induced, and fluorescence was detected in the absence (left, Control) or presence of

Versteeg et al., 2008). However, no direct correlation could be established between the presence of TF on cancer cells and the development of thrombotic complications associated with cancer (Furie and Furie, 2006), suggesting that other important mechanisms may link cancer and thrombosis. Recently, various reports have shown that the number of circulating MPs is increased in patients developing different types of cancers known to be associated with a thrombotic state (Kim et al., 2003; Del Conde et al., 2007; Zwicker et al., 2007). These observations suggest that MPs may play a key role in the development of the thrombotic complications associated with cancer. Our results indicate that MPs derived from cancer cells enhance thrombus formation. The presence of PSGL-1 targets MPs to sites of thrombosis, whereas active TF actively participates in the formation of the thrombus by generating thrombin and fibrin. Two recent reports have shown, in mice models, a direct correlation between the size of a tumor and the level of TF present in cell-free plasma (Yu et al., 2005; Davila et al., 2008). We did not observe such correlation when comparing the bleeding time associated with the volume of the tumors (Fig. 5 E). Indeed, even relatively small tumors are sufficient enough to strongly diminish the tail bleeding time and the occlusion time in our model. These results confirm that the presence in the bloodstream of few tumor-derived MPs is sufficient enough to induce a thrombotic state in mice. Last, in the two papers, authors have not discriminated the origin of circulating TF that may come from platelets or monocyte-derived MPs. Other studies have previously shown that such MPs may originate from platelets (Hron et al., 2007; Tesselaar et al., 2007). In this study, we observed that the quantities of circulating platelet-, endothelial cell-, and cancer cell-derived MPs are increased in mice developing tumors compared with healthy mice. With the knowledge that platelets release MPs only when they aggregate (Piccin et al., 2007), it not surprising that the amount of circulating MPs derived from platelets increases when patients/mice develop a thrombotic state. Indeed, this pathological

circulating P-selectin blocking antibody (right, P-selectin antibody; $n = 6$ thrombi in three mice). (B–D). Kinetics of thrombosis in wild-type mice, wild-type mice infused with Panc02 MPs (WT+MPs, 0.2 μg of MP-associated proteins/g/mouse), or with Panc02 MPs plus 2 μg/g/mouse of anti P-selectin blocking antibody (WT+MPs+anti P-sel). Controls were performed by infusion of anti-P-selectin antibody into wild-type mice (WT+anti P-sel) or by infusing an irrelevant antibody into wild-type mice perfused with MPs (WT+MPs+Irr Ab). Injury of the mesenteric vessels was chemically induced, and the time to vessel occlusion for arterioles ($n = 10$ for WT, $n = 7$ for WT+anti Psel, $n = 10$ for WT+MPs, $n = 7$ for WT+MPs+anti Psel, and $n = 8$ for WT+MPs+Irr Ab; B) and veinules ($n = 13$ for WT, $n = 7$ for WT+anti Psel, $n = 7$ for WT+MPs, $n = 7$ for WT+MPs+anti Psel, and $n = 8$ for WT+MPs+Irr Ab; C) was measured. (D) Bleeding times were determined for all conditions studied ($n = 13$ for WT, $n = 7$ for WT+anti Psel, $n = 8$ for WT+MPs, $n = 6$ for WT+MPs+Anti Psel, and $n = 8$ for WT+MPs+Irr Ab). One thrombus was performed per mouse. Horizontal bars designate median values. Experiments were independently performed three times (A) and at least seven times (B–D). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

state leads to the activation and aggregation of platelets, either directly via cancer cells or indirectly via production of thrombin by TF. Therefore, it is likely that platelet-derived MPs are a consequence of thrombotic complications and do not cause the development of this phenotype. However, platelet-derived MPs, when present in the blood, may also participate in the stability of a thrombotic state associated with cancer. Endothelial cells activated by tumoral MPs may provide a supplementary procoagulant surface by TF exposure. Although several reports have shown that TF is expressed on cancer cells, there is conflicting evidence as to the presence of this factor at the surface of platelets and their MPs (Furie and Furie, 2006). To our knowledge, this is the first paper to demonstrate an increase in circulating endothelial cell-derived MPs in association with cancer. However, previous publications have shown that the level of endothelial cell-derived MPs is increased in inflammatory-related diseases (Combes et al., 1999; Chamouard et al., 2005). These MPs, by expressing proteins such as metalloproteases, urokinase plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator receptor (Lacroix et al., 2007), may potentially take part in and amplify the processes of inflammation, angiogenesis, and fibrinolysis. Further experiments are needed to determine the actual role of platelet-derived MPs in concert with cancer cell- and endothelial cell-derived MPs.

When cancer cells and cancer cell-derived MPs were infused into the circulation of a living mouse, only MPs were observed to accumulate at the site of a laser- or chemical-induced injury, suggesting that cancer cells may not participate in thrombus formation. These cells were not eliminated from the blood, because we were able to detect them circulating in the vessels (Fig. 4 C, before injury). This result was confirmed by our data showing that injection of cancer cells did not influence either the kinetics of thrombus formation or bleeding times. Our results are consistent with previous observations showing that monocyte-derived MPs, but not their parent cells, may indeed interact with a growing thrombus (Falati et al., 2003). Although circulating cancer cells did not bind to the site of injury, they may interact with the endothelium at sites of premetastatic niches to form sites of metastasis (Kaplan et al., 2006). Different hypotheses may explain why MPs and not their parental cells bind to a growing thrombus. It is possible that this interaction occurs via the negative phospholipid moieties commonly expressed on the surface of MPs. Furthermore, the quantity and density of binding partners present, such as PSGL-1, may be more important for MPs than for their parent cells. This point is illustrated by our results showing that even if the activity of cell TF was greater than that of the MP, when the results were reported per surface unit, the activity of TF was >100-fold higher in MPs than in cells. This result may also explain why the cells were not thrombogenic compared with MPs. In our conditions, Panc02-derived MPs have a more dramatic effect on thrombosis in arterioles compared with venules, whereas LLC1-derived MPs have the opposite effect. This tendency may be caused,

at least partially, by the levels of active TF expressed by Panc02- and LLC1-derived MPs. Indeed, activation of the coagulation cascade resulting in thrombin generation is known to play a more important role in thrombus formation induced in arteries than in veins.

We demonstrated that PSGL-1 is present on the surface of MPs and showed that injection of a P-selectin blocking antibody prevents the accumulation of MPs at the site of injury and reduces thrombus formation. The P-selectin-PSGL-1 axis has previously been described as being involved in the binding of MPs to platelets. Indeed, Falati et al. (2003) have previously shown that exogenous monocyte-derived MPs express PSGL-1 and bind to a growing thrombus in a P-selectin-dependent manner in a laser injury model. We determined that inhibition of P-selectin did not affect time to occlusion in the FeCl₃ model in healthy mice, showing that accumulation of monocyte-derived MPs by the P-selectin-PSGL-1 axis may have a minor implication when cancer-derived MPs are not involved in thrombus formation after a FeCl₃-induced injury. Our results identify P-selectin as a potentially good pharmaceutical target for the prevention of thrombosis associated with cancer, and may also explain why heparin, which binds to and blocks selectin, is much more effective than warfarin, a vitamin K antagonist, in preventing thrombosis in patients suffering from Trousseau's syndrome (Del Conde et al., 2007). MPs also express negatively charged phospholipids on their surface that may participate with TF in activation of the coagulation cascade. However, based on our results, the activity of TF seems to be critical for the generation of thrombin. Indeed, we found that (a) *in vitro* TF activity per surface unit is 100-fold more important in MPs than in their parental cells (Fig. 7 D), (b) the use of factor VII-deficient plasma abolishes the effect of MPs on platelet aggregation and the formation of a fibrin mesh (Fig. 7 E), and (c) *in vivo* hydrolysis of the surface proteins but not the negatively charged phospholipids present on MPs completely abrogated their effect on the kinetics of thrombosis (Fig. 7, A-C). Based on our results, we propose a two-step mechanism to describe the involvement of cancer cell-derived MPs in thrombosis. First, MPs bind to the site of injury by interactions between PSGL-1 and P-selectin present on activated platelets and endothelial cells. Second, MPs affect thrombus formation, likely via the expression of active TF on their surface. Other proteins and lipids may also be of importance in this process. Among the different proteins expressed by cancer cell-derived MPs, fetopancreatic protein and fibronectin were identified (unpublished data; Ni et al., 2003). Both of these may play an important role in thrombus formation. Fetopancreatic protein, an onco-isoform of bile salt-dependent lipase, increases the kinetics of thrombus formation by binding to CXCR4 on the surface of activated platelets (Panicot-Dubois et al., 2007). Overall, our data provide a new molecular basis for establishing relationships between cancer and thrombosis, and may facilitate the development of new pharmaceutical drugs designed to prevent thrombosis and metastasis in patients suffering from cancer.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Wild-type C57BL/6J mice were obtained from Janvier. All animal care and experimental procedures were performed as recommended by the European Community guidelines and approved by the local ethical committee of the Université de la Méditerranée and the French Ministry of Agriculture (agreement no. 13.382).

Antibodies and reagents. Rat monoclonal anti-mouse CD41 antibody (clone MWR_{reg}30) was obtained from Emfret. Fab fragments for the anti-CD41 antibody were generated by using the immunopure Fab preparation kit from Thermo Fisher Scientific, and then conjugated to Alexa Fluor 660. Human α -thrombin, factor VII-deficient plasma, and sheep anti-human TF were obtained from Bioprep. Rabbit anti-mouse TF was purchased from American Diagnostica Inc. PE rat anti-mouse CD41 (clone MWR_{reg}30), PE rat anti-mouse CD45 (clone 30-F11), PE rat anti-mouse CD31 (clone MEC 13.3), PE rat anti-mouse TER-119 (clone TER-119), PE rat anti-mouse PSGL-1, blocking rat monoclonal anti-mouse P-selectin (clone RB40.34), and rat monoclonal anti-mouse PSGL-1 (clone 4RA10) antibodies, and FITC-annexin V, PE-annexin V, and PE rat and mouse isotype controls were obtained from BD. Monoclonal anti-CA19.9 and anti-MUC-1-core glycoprotein antibodies were purchased from Novocastra Laboratories and were conjugated in house to Alexa Fluor 488. Irrelevant rat immunoglobulins were purchased from BD and SouthernBiotech. Peroxydase-conjugated donkey anti-rat, donkey anti-rat-Alexa Fluor 488, donkey anti-sheep-Alexa Fluor 488, and donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 antibodies; Vybrant DiD and DiO cell-labeling solutions; the Qtracker 705 cell labeling kit; Alexa Fluor 594 and Alexa Fluor 660 antibody-labeling kits; Syto 62, Lipofectamine 2000, PLUS reagent, RPMI 1640, DMEM, and OptiMEM media; and penicillin, streptomycin, L-glutamine, trypsin-EDTA, nonenzymatic cell dissociation solution, and fungizone were obtained from Invitrogen. Megamix beads were purchased from BioCytex. Prostaglandin I₂ was obtained from EMD. BSA, apyrase grade VI, Gly-Pro-Arg-Pro, and FeCl₃ were purchased from Sigma-Aldrich. pEGFP-N1 vector was obtained from Clontech Laboratories, Inc. Tirofiban (Aggrastat) was purchased from Iroko Pharmaceuticals.

Cell lines and culture conditions. One cell line from human pancreatic adenocarcinomas (SOJ-6; Fujii et al., 1990), and two cell lines from a mouse pancreatic adenocarcinoma (Panc02) and a Lewis lung carcinoma (LLC1) were studied. The Panc02 cell line has been established and described by Corbett et al. (1984). In brief, it is derived from a pancreatic ductal adenocarcinoma induced by implantation of cotton thread-carrying 3-methylcholanthrene into the pancreas tissue of a C57BL/6 mouse. The LLC1 cell line has been established and described by Bertram and Janik (1980) and was obtained from the American Type Culture Collection. It is derived from a Lewis lung carcinoma of a C57BL mouse strain. The Panc02 cell line was provided by E. Beraud (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale [INSERM] UMR911, Marseille, France). L929 mouse fibroblasts and J774 mouse macrophages were provided by F. Levy (INSERM UMR608, Marseille, France). SOJ-6, LLC1, L929, and J774 cells were grown in DMEM medium, and Panc02 cells were grown in RPMI 1640 medium. Media were supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 0.1% fungizone. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Transfection. Panc02 cells were stably transfected with the pEGFP-N1 plasmid using Lipofectamine 2000 and PLUS reagent according to the manufacturer's recommendations. Cells were cloned as previously described (Panicot-Dubois et al., 2004).

Isolation of MPs. The isolation of MPs was adapted from Berckmans et al. (2001). In brief, cells at 80% of confluency were incubated for 15 h in OptiMEM medium. MP-rich medium was centrifuged at 1,500 g to eliminate cellular debris and ultracentrifuged at 20,000 g to isolate MPs. The final pellet containing MPs was resuspended in 0.5 ml PBS. Mice MPs were isolated

as previously described (Dignat-George, 2006). L929 and J774 cells were activated with 10 ng/ml TNF- α before MP isolation. Concentrations of MPs were determined by protein quantification using the bicinchoninic acid assay (Thermo Fisher Scientific).

PAGE and Western blotting. SDS-PAGE performed on gels of polyacrylamide (7.5% acrylamide in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate) and Western blotting were performed as previously described (Panicot-Dubois et al., 2007).

Flow cytometry. Platelet-free plasma (PFP) samples were prepared as previously described (Sabatier et al., 2002) using serial centrifugations and stored at -80°C until use. For MP labeling, 30 μ l of freshly thawed PFP or of the MP suspension was incubated for 30 min with 10 μ l FITC-annexin V or PE-anti-mouse monoclonal antibodies (30 μ g/ml anti-CD41, 40 μ g/ml anti-TER-119, 40 μ g/ml anti-CD45, 40 μ g/ml anti-CD31, or 50 μ g/ml anti-PSGL-1). Concentration-matched PE-isotype antibodies (IgG1, clone R3-34; IgG2a, clone R35-95; IgG2b, clone A95-1) or annexin V-FITC with phosphate-buffered saline without calcium were used as control. Analyses were performed on a flow cytometer (Cytomics FC500; Beckman Coulter) using a Megamix bead-calibrated protocol (BioCytex), as previously described (Robert et al., 2009). Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter) were added to each sample to express MP counts as absolute numbers.

Fluorescence microscopy. Cells were grown up to 80% confluence on an 8-chamber glass slide system (Thermo Fisher Scientific), washed with PBS, and fixed for 30 min at 4°C in PBS containing 2% paraformaldehyde. Once fixed, cells were blocked for 1 h at 4°C with 1% BSA in PBS buffer. Cells were then incubated at 4°C with the appropriate dilution of antibodies, followed by incubation with an Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody. Between each step, cells were exhaustively rinsed with PBS and were observed on a microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss, Inc.).

TF activity assays. A chromogenic assay (Actichrome TF; American Diagnostica Inc.) was used to analyze TF activity. TF activity was measured in cell or MP suspension according to the manufacturer's instructions. Cells or MPs were incubated in the presence of factors VIIa and X. The reagents were incubated at 37°C for complex formation to convert factor X to factor Xa, and the amount of Xa generated was measured by its ability to cleave a chromogenic substrate, spectrozyme Xa. Absorbance was read at 405 nm with a microplate reader (MR5000; Dynatech). TF concentration was determined by interpolation of a standard curve obtained from different amounts of lipidated TF standards. For TF activity measurement in mouse plasma, a TF/TF pathway inhibitor-depleted plasma was added to the reaction mixture of lipidated TF standards, and $\Delta A_{405-490}$ was measured to calculate TF concentration.

Platelet aggregation studies. Washed platelets were obtained as previously described (Dubois et al., 2004). 2.5×10^8 washed platelets/ml were stirred at 37°C for 10 min in 2×4 -channel aggregometers (Apact 4004; LABiTec). Positive controls were performed in the presence of 1 U/ml thrombin. The extent of platelet aggregation was defined as the percent change in optical density (Dubois et al., 2007).

MP half-life. The carotid arteries and jugular veins of 8-wk-old mice were cannulated. DiO-labeled MPs were infused in the bloodstream via the jugular veins. Blood samples were collected in sodium citrate (3.2%, 1:2 vol/vol) via the carotid artery catheter before MP injection and 5, 15, 30, 45, and 60 min after injection.

Induction of ectopic tumor. For all in vivo experiments, tumor cells in the exponential growth phase were briefly exposed to nonenzymatic cell dissociation buffer to dislodge the cells. They were next carefully washed, resuspended in PBS, and diluted to the desired cell number/inoculum. 3-wk-old C57BL/6 mice were injected subcutaneously into the right flank with 2×10^5 Panc02 cells, 2×10^5 LLC1 cells, 2×10^6 Panc02-labeled cells, or with

PBS alone for control mice. Cells were labeled with Qdots (Qtraker 705), DiD, or DiO according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Intravital microscopy. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine and 12.5 mg/kg Xylazine (Bayer). The jugular vein was cannulated to maintain anesthesia by injection of 50 mg/kg pentobarbital injection and to infuse antibodies, cells, and MPs as needed. The trachea was intubated to facilitate spontaneous respiration by the mouse, and a thermocontrolled blanket maintained the mouse at 37°C. Cremaster and mesentery preparations were performed as previously described by Dubois et al. (2007). Intravital videomicroscopy was performed as previously described (Dubois et al., 2007; Panicot-Dubois et al., 2007). Data were obtained using a microscope (BX61WI; Olympus) with a 60 × 0.9 or a 20 × 0.5 NA water immersion objective. Alternatively, a fibered fluorescence microscopy imaging system (Cellvizio; Mauna Kea Technologies) was used to image platelets. The optical probe used in this study has a tip diameter of 4.2 mm (MiniO/100; Mauna Kea Technologies), providing images below the surface of biological tissue and at a depth 100 ± 5 μm, with a lateral resolution of 1.8 μm.

FeCl₃-induced injury. The FeCl₃-induced model of thrombosis has been shown to cause substantial damage to the endothelium and exposure of underlying collagen (Dubois et al., 2006b). Vessel injuries were generated by using a 1 × 2-mm filter paper soaked with a 10% FeCl₃ solution and placed over the vessel for 5 min, as previously described (Dubois et al., 2006b). Platelet accumulation at the site of injury was detected by infusion in blood circulation of 250 ng/g/mouse of anti-CD41 Fab fragment coupled with Alexa Fluor 660 for 35 min or until blood flow cessation lasted for >10 s (occlusion). Typically, one venous and one arterial injury were performed per mouse.

Laser-induced injury. Vessel-wall injuries were induced with a nitrogen dye laser (Micropoint; Photonics Instruments) focused through the microscope objective, parfocal with the focal plane and aimed at the vessel wall, as previously described (Dubois et al., 2006b; Dubois et al., 2007). Typically, one or two pulses were required to induce vessel wall injury.

Tail bleeding time. Tail bleeding times were performed as previously described on anesthetized 8-wk-old mice (Dubois et al., 2007).

Statistics. Significance was determined by a paired two-tailed Student's *t* test for the in vitro experiments and by Wilcoxon's rank-sum test for the in vivo experiments. The difference was considered significant at *P* < 0.05.

Online supplemental material. Fig. S1 shows the box plot distribution of CD31⁺CD41⁻ MPs and TER119⁺ MPs in healthy and tumor-bearing mice (data are from Table I). Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20082297/DC1>.

The authors are indebted to L. Arnaud for the quantification of MPs. The authors are grateful to J. Varin, J. Courageot, and C. Prévot for expert technical assistance, and to M.-C. Alessi for the use of the aggregometers. The authors thank P.-A. Dancer, B. Brisson, J. Rebouillat, A. Hembury, and Mauna Kea Technologies for the use of the Cellvizio fibered fluorescence microscopy imaging system.

This work was supported by institutional funding from INSERM and Aix-Marseille Université. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (grant ARC-1038 to C. Dubois).

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 14 October 2008

Accepted: 17 July 2009

REFERENCES

- Abid Hussein, M.N., E.W. Meesters, N. Osmanovic, F.P. Romijn, R. Nieuwland, and A. Sturk. 2003. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J. Thromb. Haemost.* 1:2434–2443.
- Berckmans, R.J., R. Nieuwland, A.N. Böing, F.P. Romijn, C.E. Hack, and A. Sturk. 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 85:639–646.
- Bertram, J.S., and P. Janik. 1980. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.* 11:63–73.
- Blom, J.W., S. Osanto, and F.R. Rosendaal. 2006a. High risk of venous thrombosis in patients with pancreatic cancer: a cohort study of 202 patients. *Eur. J. Cancer.* 42:410–414.
- Blom, J.W., J.P. Vanderschoot, M.J. Oostindiër, S. Osanto, F.J. van der Meer, and F.R. Rosendaal. 2006b. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J. Thromb. Haemost.* 4:529–535.
- Chamouard, P., D. Desprez, B. Hugel, C. Kunzelmann, C. Gidon-Jeangirard, M. Lessard, R. Baumann, J.M. Freyssinet, and L. Grunebaum. 2005. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 50:574–580.
- Combes, V., A.C. Simon, G.E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol, and F. Dignat-George. 1999. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 104:93–102.
- Corbett, T.H., B.J. Roberts, W.R. Leopold, J.C. Peckham, L.J. Wilkoff, D.P. Griswold Jr., and F.M. Schabel Jr. 1984. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* 44:717–726.
- Davila, M., A. Amirkhosravi, E. Coll, H. Desai, L. Robles, J. Colon, C.H. Baker, and J.L. Francis. 2008. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J. Thromb. Haemost.* 6:1517–1524.
- Del Conde, I., L.D. Bharwani, D.J. Dietzen, U. Pendurthi, P. Thiagarajan, and J.A. López. 2007. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 5:70–74.
- Dignat-George, F. 2006. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70:104–105.
- Dubois, C., B. Steiner, and S.C. Meyer Reigner. 2004. Contribution of PAR-1, PAR-4 and GPIIb/IIIa in intracellular signaling leading to the cleavage of the beta3 cytoplasmic domain during thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 91:733–742.
- Dubois, C., B. Atkinson, B.C. Furie, and B. Furie. 2006a. Real time in vivo imaging of platelets during thrombus formation. In *Platelets*. A.D. Michelson, editor. Elsevier/Academic Press, Worcester, MA. 611–628.
- Dubois, C., L. Panicot-Dubois, G. Merrill-Skoloff, B. Furie, and B.C. Furie. 2006b. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 107:3902–3906.
- Dubois, C., L. Panicot-Dubois, J.F. Gainor, B.C. Furie, and B. Furie. 2007. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J. Clin. Invest.* 117:953–960.
- Dvorak, H.F., S.C. Quay, N.S. Orenstein, A.M. Dvorak, P. Hahn, A.M. Bitzer, and A.C. Carvalho. 1981. Tumor shedding and coagulation. *Science.* 212:923–924.
- Falati, S., Q. Liu, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, J. Chou, E. Vandendries, A. Celi, K. Croce, B.C. Furie, and B. Furie. 2003. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J. Exp. Med.* 197:1585–1598.
- Fujii, Y., M. Sekiguchi, Y. Shiroko, H. Shimizu, I. Sugawara, K. Hasumi, M. Eriguchi, T. Ikeuchi, and H. Uchida. 1990. Establishment and characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line SOJ producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Hum. Cell.* 3:31–36.
- Furie, B., and B.C. Furie. 2006. Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 36:177–181.
- Gasic, G.J., P.A. Koch, B. Hsu, T.B. Gasic, and S. Niewiarowski. 1976. Thrombogenic activity of mouse and human tumors: effects on platelets, coagulation, and fibrinolysis, and possible significance for metastases. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* 86:263–277.
- Ghosh, A., W. Li, M. Febbraio, R.G. Espinola, K.R. McCrae, E. Cockrell, and R.L. Silverstein. 2008. Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J. Clin. Invest.* 118:1934–1943.

- Haas, S.L., R. Jesnowski, M. Steiner, F. Hummel, J. Ringel, C. Burstein, H. Nizze, S. Liebe, and J.M. Löhr. 2006. Expression of tissue factor in pancreatic adenocarcinoma is associated with activation of coagulation. *World J. Gastroenterol.* 12:4843–4849.
- Hron, G., M. Kollars, H. Weber, V. Sagaster, P. Quehenberger, S. Eichinger, P.A. Kyrle, and A. Weltermann. 2007. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb. Haemost.* 97:119–123.
- Kakkar, A.K., and R.C. Williamson. 1999. Prevention of venous thromboembolism in cancer patients. *Semin. Thromb. Hemost.* 25:239–243.
- Kaplan, R.N., S. Rafii, and D. Lyden. 2006. Preparing the “soil”: the pre-metastatic niche. *Cancer Res.* 66:11089–11093.
- Khorana, A.A., S.A. Ahrendt, C.K. Ryan, C.W. Francis, R.H. Hruban, Y.C. Hu, G. Hostetter, J. Harvey, and M.B. Taubman. 2007. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13:2870–2875.
- Kim, H.K., K.S. Song, Y.S. Park, Y.H. Kang, Y.J. Lee, K.R. Lee, H.K. Kim, K.W. Ryu, J.M. Bae, and S. Kim. 2003. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur. J. Cancer.* 39:184–191.
- Lacroix, R., F. Sabatier, A. Mialhe, A. Basire, R. Pannell, H. Borghi, S. Robert, E. Lamy, L. Plawinski, L. Camoin-Jau, et al. 2007. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 110:2432–2439.
- Langer, F., B. Spath, K. Haubold, K. Holstein, G. Marx, J. Wierocky, T.H. Brummendorf, J. Dierlamm, C. Bokemeyer, and B. Eifrig. 2008. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation. *Ann. Hematol.* 87:451–457.
- Milsom, C., J. Yu, L. May, B. Meehan, N. Magnus, K. Al-Nedawi, J. Luyendyk, J. Weitz, P. Klement, G. Broze, et al. 2007. The role of tumor- and host-related tissue factor pools in oncogene-driven tumor progression. *Thromb. Res.* 120(Suppl. 2):S82–S91.
- Müller, I., A. Klocke, M. Alex, M. Kotzsch, T. Luther, E. Morgenstern, S. Zieseniss, S. Zahler, K. Preissner, and B. Engelmann. 2003. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 17:476–478.
- Myers, D.D., A.E. Hawley, D.M. Farris, S.K. Wroblewski, P. Thanaporn, R.G. Schaub, D.D. Wagner, A. Kumar, and T.W. Wakefield. 2003. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J. Vasc. Surg.* 38:1075–1089.
- Neoptolemos, J.P., D.D. Stocken, J.A. Dunn, J. Almond, H.G. Beger, P. Pederzoli, C. Bassi, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, F. Lacaine, et al; European Study Group for Pancreatic Cancer. 2001. Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann. Surg.* 234:758–768.
- Ni, H., P.S. Yuen, J.M. Papalia, J.E. Trevithick, T. Sakai, R. Fässler, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2003. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2415–2419.
- Panicot-Dubois, L., M. Aubert, C. Franceschi, E. Mas, F. Silvy, C. Crotte, J.P. Bernard, D. Lombardo, and M.O. Sadoulet. 2004. Monoclonal antibody 16D10 to the C-terminal domain of the feto-acinar pancreatic protein binds to membrane of human pancreatic tumoral SOJ-6 cells and inhibits the growth of tumor xenografts. *Neoplasia.* 6:713–724.
- Panicot-Dubois, L., G.M. Thomas, B.C. Furie, B. Furie, D. Lombardo, and C. Dubois. 2007. Bile salt-dependent lipase interacts with platelet CXCR4 and modulates thrombus formation in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 117:3708–3719.
- Pawlinski, R., and N. Mackman. 2008. Use of mouse models to study the role of tissue factor in tumor biology. *Semin. Thromb. Hemost.* 34:182–186.
- Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith. 2007. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21:157–171.
- Prandoni, P., A.W. Lensing, H.R. Büller, A. Cogo, M.H. Prins, A.M. Cattelan, S. Cuppini, F. Noventa, and J.W. ten Cate. 1992. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 327:1128–1133.
- Riewald, M., and W. Ruf. 2001. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:7742–7747.
- Robert, S., P. Poncelet, R. Lacroix, L. Arnaud, L. Giraud, A. Hauchard, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2009. 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.* 7:190–197.
- Sabatier, F., P. Darmon, B. Hugel, V. Combes, M. Sanmarco, J.G. Velut, D. Arnoux, P. Charpiot, J.M. Freyssinet, C. Oliver, et al. 2002. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 51:2840–2845.
- Sack, G.H., Jr., J. Levin, and W.R. Bell. 1977. Trousseau’s syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasms: clinical, pathophysiologic, and therapeutic features. *Medicine (Baltimore).* 56:1–37.
- Schiavetti, A., M. Foco, A. Ingresso, E. Bonci, L. Conti, and M. Matrionola. 2008. Venous thrombosis in children with solid tumors. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 30:148–152.
- Sierko, E., and M.Z. Wojtukiewicz. 2007. Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? *Semin. Thromb. Hemost.* 33:712–721.
- Stein, P.D., A. Beemath, F.A. Meyers, E. Skaf, J. Sanchez, and R.E. Olson. 2006. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *Am. J. Med.* 119:60–68.
- Tesselaar, M.E., F.P. Romijn, I.K. Van Der Linden, F.A. Prins, R.M. Bertina, and S. Osanto. 2007. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J. Thromb. Haemost.* 5:520–527.
- Tilley, R.E., T. Holscher, R. Belani, J. Nieva, and N. Mackman. 2008. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb. Res.* 122:604–609.
- Trousseau, A. 1865. Phlegmasia alba dolens. In *Clinique Médicale de l’Hôtel-Dieu*. J.-B. Baillière, Paris. 654–712.
- Vandendries, E.R., J.R. Hamilton, S.R. Coughlin, B. Furie, and B.C. Furie. 2007. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:288–292.
- Versteeg, H.H., F. Schaffner, M. Kerver, H.H. Petersen, J. Ahamed, B. Felding-Habermann, Y. Takada, B.M. Mueller, and W. Ruf. 2008. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood.* 111:190–199.
- Willekens, F.L., J.M. Werra, J.K. Kruijt, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y.A. Groenen-Döpp, A.G. van den Bos, G.J. Bosman, and T.J. van Berkel. 2005. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood.* 105:2141–2145.
- Yu, J.L., L. May, V. Lhotak, S. Shahrzad, S. Shirasawa, J.I. Weitz, B.L. Coomber, N. Mackman, and J.W. Rak. 2005. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood.* 105:1734–1741.
- Zwicker, J.I., B.C. Furie, and B. Furie. 2007. Cancer-associated thrombosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62:126–136.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

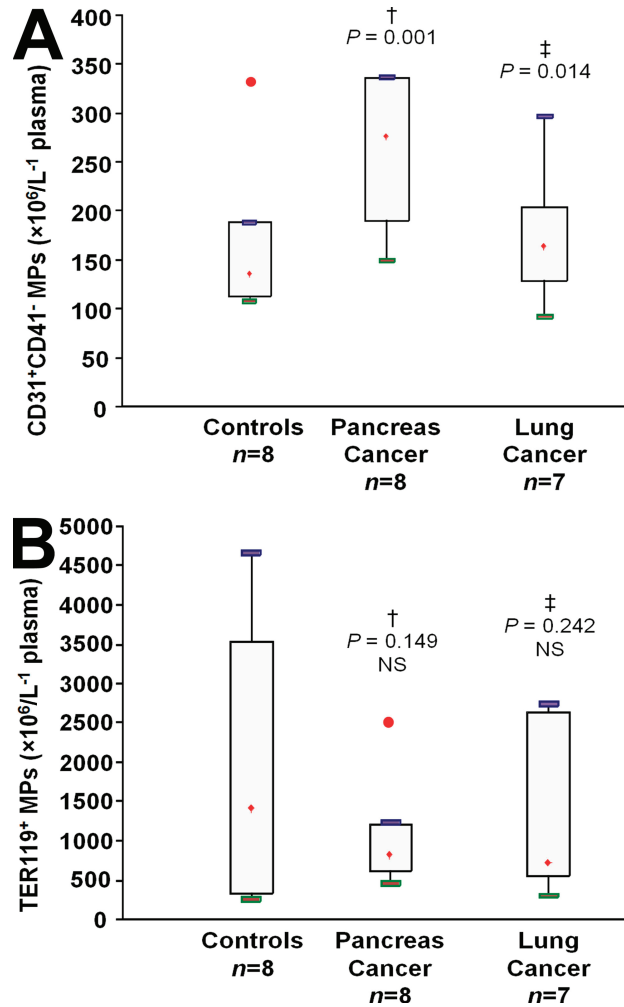
Thomas et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20082297/DC1>

Figure S1. Statistical distribution of endothelial cell- and erythrocyte-derived MPs in healthy and cancer-bearing mice. (A and B) Ranges of observed numbers of MPs ($\times 10^6/\text{liter}^{-1}$ plasma) represented by box plot. The red rhombs inside boxes represent the median number of events. The boxes represent the interquartile range (50% of values). Tails extend to values within $1.5\times$ the interquartile range. CD31⁺CD41⁻ MPs (A) and TER119⁺ MPs (B) are shown. The red dots represent an outlier $>1.5\times$ the interquartile range. Experiments were independently performed at least seven times. †, difference between mice developing a pancreatic cancer and healthy mice; ‡, difference between mice developing a lung cancer and healthy mice.

Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis

Aurélien S. Leroyer¹; Francine Anfosso¹; Romaric Lacroix^{1,2}; Florence Sabatier^{1,3}; Stéphanie Simoncini¹; Sébastien M. Njock¹; Noémie Jourde^{1,4}; Philippe Brunet^{1,4}; Laurence Camoin-Jau^{1,2}; José Sampol¹; Françoise Dignat-George^{1,2}

¹Laboratoire de Physiopathologie de l'Endothélium - UMR_S 608 INSERM, Université de la Méditerranée, Marseille, France; ²Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de La Conception, Assistance publique – hôpitaux de Marseille, Marseille, France; ³Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, INSERM CIC-BT 510, Hôpital de la Conception, Assistance publique – hôpitaux de Marseille, Marseille, France; ⁴Centre de néphrologie et de transplantation rénale, hôpital de la Conception, Assistance publique – Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Summary

Endothelial microparticles (EMP) are complex vesicular structures that can be shed by activated or apoptotic endothelial cells. EMP are composed of a phospholipid bilayer that exposes transmembrane proteins and receptors and encloses cytosolic components such as enzymes, transcription factors and mRNA derived from their parent cells. Thus, EMP behave as biological conveyors playing a key role in the tuning of vascular homeostasis. This review focuses on the multifaceted roles of EMP, notably in coagulation, inflammation and angiogenesis and also on the mechanisms that trigger their formation. In this con-

text, EMP could compromise vascular homeostasis and then represent key players in the pathogenesis of several inflammatory and thrombotic diseases. Consequently, elucidating their role and their mechanisms of formation will bring new insights into the understanding of endothelial-associated diseases. Moreover, in the future, it can open novel therapeutic perspectives based on the inhibition of EMP release.

Keywords

Microparticles, endothelium, coagulation, inflammation, thrombosis, vascular homeostasis, vesiculation

Correspondence to:

Prof. Françoise Dignat-George
Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de La Conception
Assistance publique – hôpitaux de Marseille
Marseille, F-13385 France
E-mail: francoise.dignat-george@univmed.fr

or

Laboratoire de Physiopathologie de l'Endothélium
UMR_S 608 INSERM
UFR de Pharmacie
27, bd Jean Moulin
Marseille, F-13385 France

Financial support:

This work was supported by grants from Inserm and Université de la Méditerranée, L'Agence nationale de la recherche grant AO5064AS MIPRAMET and Assistance Publique-Hopitaux de Marseille Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant 02/07. MS Njock was a recipient of Region PACA-Inserm doctoral funds.

Received: February 11, 2010

Accepted after minor revision: April 15, 2010

Prepublished online: July 20, 2010

doi:10.1160/TH10-02-0111

Thromb Haemost 2010; 104: ■■■■

Introduction

It is now well established that disruption of endothelial integrity represents a crucial event in the initiation and development of cardiovascular diseases. The endothelium is able to respond to physical and chemical signals by production of a wide range of factors that regulate vascular tone, thrombo-resistance, cell proliferation and vessel wall inflammation. In addition to these soluble molecules, the endothelium can shed microparticles (MP) as a result of cell activation or apoptosis. Since the first description of MP as circulating 'dust' in 1967 (1), numerous studies have reported the *in vitro* release of MP from different subtypes and their presence in human plasma. MP were defined as small vesicular structures with a heterogeneous diameter (from 0.1 to 1 micron), resulting from the remodelling of membrane phospholipids and expressing phosphatidylserine (PS) and antigens representative of their parent cells. MP harbouring endothelial-associated molecules were identified both *in vitro* and in human plasma and therefore, were called endothelial-derived MP (EMP). Moreover, the exposure of pro-coagulant phospholipids and specific receptors at their surface also indicate that EMP behave as bio-messengers linking inflam-

mation, thrombosis and angiogenesis. This brief review summarises the mechanisms leading to EMP formation, their structure and function relationship as well as their physiopathological involvement in vascular homeostasis.

Mechanisms of EMP formation

The current knowledge on EMP formation derives mainly from experiments on isolated or cultured endothelial cells. Indeed, *in vivo* mechanisms involved in EMP generation still remain mostly unclear.

Remodelling of membrane phospholipids

Under physiological conditions, cell membrane is defined by an asymmetric distribution of negative phospholipids being sequestered into the inner leaflet of the membrane. Disruption of

phospholipids asymmetry is a universal feature of cells undergoing activation or apoptosis, leading to exposure of phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet as a consequence of the calcium-dependent activation of scramblase and floppase/ABC1 and the inhibition of translocase/flippase activities (2–4). Moreover, MP formation and shedding necessitate modifications in cell structural architecture involving disruption of cytoskeleton protein organisation. Altogether, these events lead to plasma membrane budding, formation of membrane blebs and MP release into the extracellular fluid.

Inducers of endothelial vesiculation

Cultured endothelial cells can release EMP after activation by a variety of prolonged stimuli, essentially inflammatory stimuli. Combes et al. first described the generation of EMP from human umbilical endothelial cells (HUVECs) stimulated by tumour necrosis factor- α (TNF- α) (5). Inflammatory cytokines (6), bacterial lipopolysaccharides, reactive oxygen species (6), plasminogen activator inhibitor (7), thrombin (8), camptothecin (9), C-reactive protein (10) and ureamic toxins (11) are also able to induce EMP generation *in vitro*.

The *in vivo* mechanisms of EMP release were documented through a recent study showing that low shear stress is associated with *in vivo* EMP release in end-stage renal disease (12).

Molecular mechanisms involved in EMP release

Very few studies have analysed the intrinsic mechanisms leading to the formation and release of MP from endothelial cells. A study based on gene profiling analysis has identified an original pathway of endothelial vesiculation induced by thrombin, involving an activation of the Rho-kinase ROCK-II by caspase 2 in the absence of cell death (8). This mechanism of EMP generation depends on the nuclear factor (NF)- κ B activation and proceeds with several steps: a first phase that occurs early after thrombin binding to its receptor PAR-1, and a second phase that depends on transcriptional events mediated by thrombin and involving TRAIL/Apo2L, a cytokine that belongs to the TNF- α superfamily (13). This pathway implies the soluble form of TRAIL, secreted by endothelial cells under thrombin- or inflammatory- stimulation. The interaction between sTRAIL and its endothelial receptor TRAIL-R2 initiates the recruitment of death-domain-containing adaptor proteins TRADD and then TRAF2, RIP1 and NF- κ B, which participate to EMP release. Moreover, the engagement of this signalling pathway controls the thrombin-mediated up-regulation of the inflammatory mediators ICAM-1 and IL-8 (13). Moreover, gene profiling also identified IL-1 and IL-1Ra as additional players of thrombin-induced EMP. Indeed, thrombin stimulation of HMEC-1 resulted in an increase in IL-1R1 expression, a concomitant decrease in IL-1Ra and a low secretion of IL-1 (► Fig. 1A). Thrombin-induced EMP release was inhibited by specifically silencing of IL-1R1 or IL-1 (Fig. 1B). The engagement of IL-1R1 resulted in the recruitment of

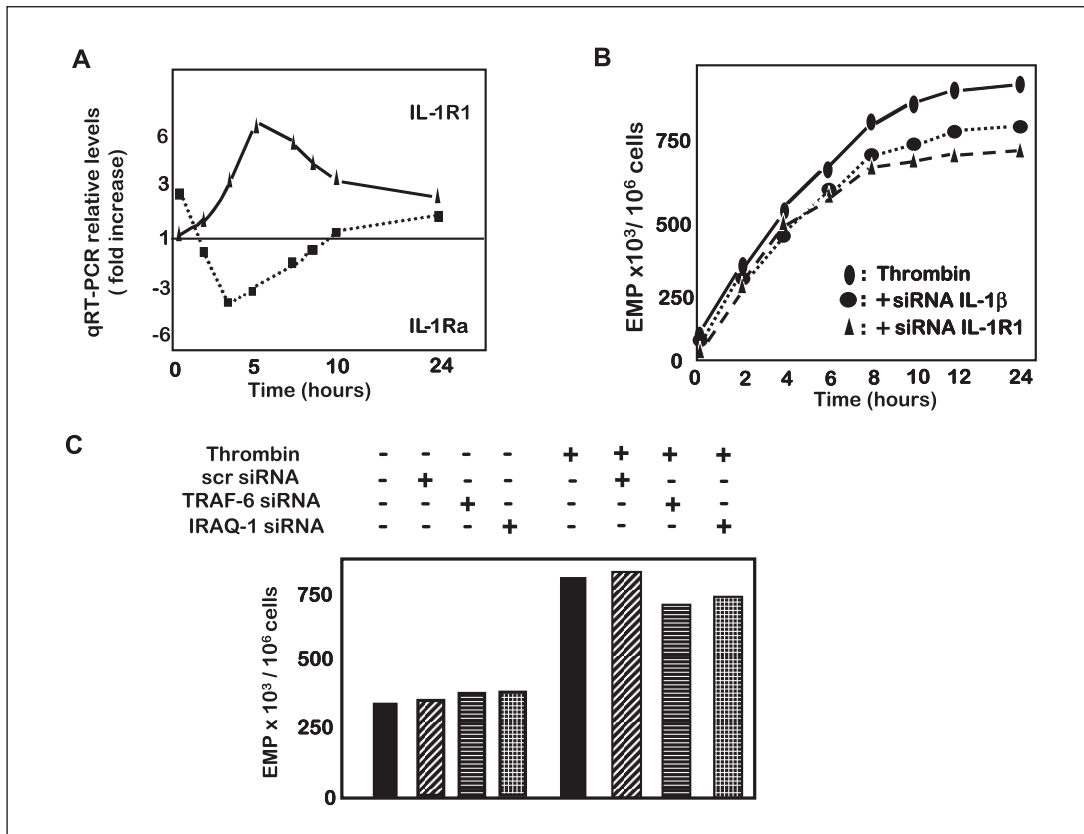


Figure 1: Involvement of IL-1 and IL-1R1 in EMP generation mediated by thrombin. A) Time-dependent mRNA expression of IL-1R1 and IL-1Ra in HMEC-1 in response to thrombin stimulation. B) EMP generation by thrombin in HMEC-1 transiently transfected with IL-1 or IL-1R1 siRNA. C) EMP generation by thrombin after engagement of IL-1R1 in HMEC-1 specifically TRAF6 and IRAQ-1 (n=3).

adaptors proteins TRAF6 and IRAQ1 that transduced a signalling pathway leading to amplification of EMP release by thrombin (Fig. 1C). Consequently, the inflammatory mediators regulated by thrombin are key partners linking coagulation and inflammation, and represent an autocrine pathway that amplifies endothelial vesiculation (► Fig. 2).

Whether intracellular pathways regulating EMP release and the general inflammatory response can be related remains an open question. A recent study identified p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) as a critical molecule in the production of pro-inflammatory EMP (14). Indeed, the authors showed that EMP triggered by TNF- α activation induced an increase of soluble ICAM-1 from endothelial cells, thus providing a paracrine loop enhancing the endothelial response to inflammation.

Another open question is whether EMP released from apoptotic cells differ in lipid and protein composition from those shed following cell activation, and could possibly have different physiological effects. Blebbing of the cellular membrane occurs rapidly after cells enter the apoptotic process. Bleb formation depends upon actin cytoskeleton and actin-myosin contraction, which is regulated by caspase3-induced Rho Kinase I and II activation (8, 15, 16). Rho kinase activation is required for re-localisation of DNA fragments from the nuclear region to membrane blebs, suggesting that MP from apoptotic cells may contain nuclear material (15, 17, 18). Among the classical apoptosis mechanisms, the signalling pathways controlling EMP formation still remain mostly unknown. It has been suggested that EMP generated in response to apoptosis are more likely to express the constitutive endothelial cell marker PECAM-1, whereas EMP released by endothelial cell activation are characterised by increased expression of inducible endothelial markers such as CD62E (19, 20). Due to this difference, the analysis of EMP phenotypic signatures could provide clinically useful information on the status of the endothelium.

EMP structure and functions

EMP composition

Endothelial-derived microparticles are complex vesicular structures that express a large repertoire of molecules representative of their parent cells. Their composition may vary depending upon the cell they originate from and the type of stimulus that caused their formation (21, 22). EMP harbour at their surface a panel of phospholipids and proteins including oxidised bioactive lipids, membrane receptors controlling the coagulation equilibrium (23–27) (endothelial protein C receptor [EPCR], thrombomodulin [TM] and tissue factor [TF]), adhesion molecules (5) (intercellular cell adhesion molecule-1 [ICAM-1], platelet endothelial cell adhesion molecule-1 [PECAM-1], vascular cell adhesion molecule [VCAM-1], endothelial-selectin [E-selectin]). In addition, enzymes such as matrix metalloproteases (MMP) (28), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase (29) or proteolytic systems such as urokinase plasminogen activator/uPA receptor (uPA/uPAR) plasminogenic activity (30) and also growth factor receptors (19, 31) (endoglin, Hedgehog morphogen [32]) are also expressed on EMP surface. Presence of immunoglobulins, complement molecules or major histocompatibility complex (MHC) molecules were also reported at the MP surface (33–35). Moreover, recent studies have demonstrated that MP can enclose transcription factors, mRNA and microRNA (36–41), suggesting a possible regulatory role for MP. All together, the phospholipids, proteins, receptors and genetic information are selectively sorted during the vesiculation process. This selective enrichment of surface molecules may be due to the accumulation of membrane lipids and proteins in cholesterol-rich raft domains prone to blebbing during MP formation. Thus, EMP released after endothelial cell activation or apoptosis could not only be considered as

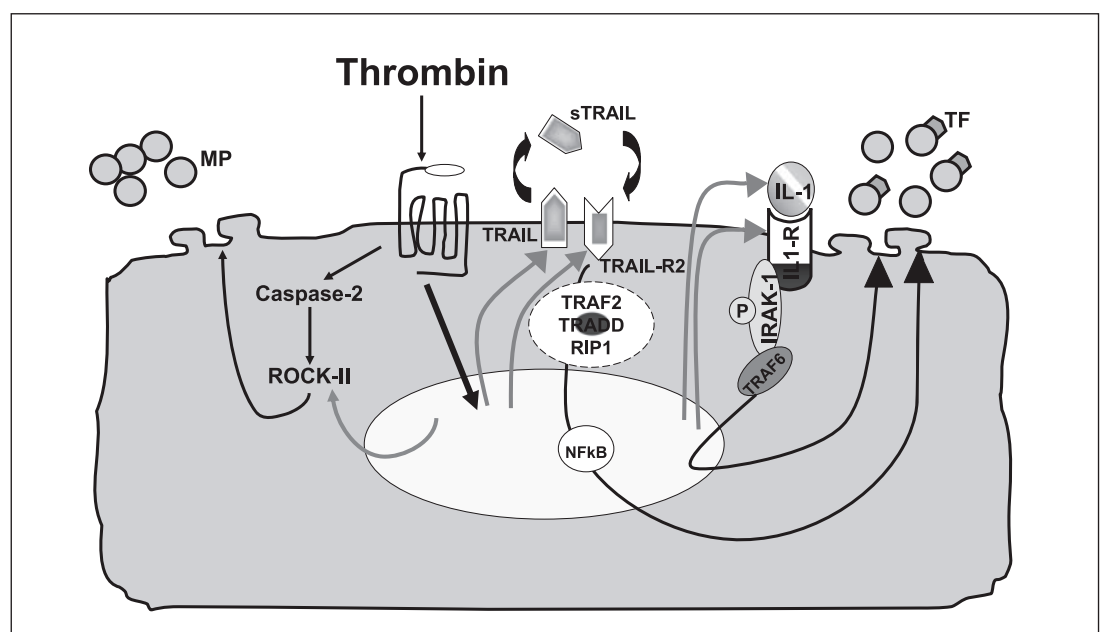


Figure 2: Mechanisms of EMP formation.

Thrombin stimulation of endothelial cells induces a complex release of EMP that requires kinase and NF- κ B activation, and the expression of pro-inflammatory cytokines, which amplifies the endothelial vesiculation.

«miniature versions of endothelial cells» but also as specific biological entities by their capacity to enrich specific molecules from parent cells and then to display different properties.

Expression of this large repertoire of molecules supports the multifaceted functions of EMP. In this section, we will summarise the proposed functions of EMP, in vascular homeostasis, that derived from *in vitro* and *in vivo* observations (► Fig. 3).

Role of EMP in thrombosis

A direct consequence of PS expression on EMP is that PS can bind to coagulation factors and promote their activation, consistent with a pro-coagulant potential for EMP. In addition to PS exposure, EMP harbour tissue factor (TF), the initiator of the extrinsic coagulation pathway, suggesting that EMP could promote the assembly of clotting enzymes leading to thrombin generation. This capacity of EMP to mediate thrombin generation was first demonstrated by the reduction of the clotting time of normal plasma incubated with increasing amounts of EMP released *in vitro* (5). The pro-coagulant activity of EMP was then confirmed by the demonstration that EMP from activated cells triggered TF-dependent thrombin formation *in vitro* and thrombus formation *in vivo* (42). Moreover, the contribution of endothelial cells to the circulating pool of TF-bearing MP was demonstrated in patients with endotoxaemia (43) and intravascular coagulopathies (27). Pro-coagulant EMP have also been found in atherosclerotic plaques (44, 45) and in patients with acute coronary syndrome (46). Thus, by exposing PS and TF, EMP behave as biological vectors in the dissemination of pro-coagulant potential. However, recent studies demonstrated that EMP can also expose endothelial protein C receptor and exhibit anticoagulant properties (25, 26), suggesting that EMP participate in the tuning of the pro-coagulant / anti-coagulant equilibrium.

Moreover, because of the expression of endothelial adhesive molecules, EMP can bind to other cell types and transfer bioactive molecules such as TF (31), so participating to the dissemination

and amplification of pro-inflammatory and pro-coagulant responses. Indeed, it was reported that TF-positive EMP bind to the monocytic cell line THP-1 and then induce monocyte TF expression and pro-coagulant activity (31). A possible TF transfer from TF-bearing EMP to activated platelets could be also involved in this pro-coagulant response, since such a mechanism was reported for TF-exposing leukocyte MP (47). Consequently, EMP can induce pro-coagulant pathways leading to thrombin generation, directly due to their intrinsic TF and PS-dependent pro-coagulant activity, but also indirectly, through dynamic interactions with monocytes able to trigger TF-dependent pathways. As a whole, EMP can amplify the bi-directional relationship between inflammation and thrombosis by conveying cell information.

Involvement of EMP in the tuning of angiogenesis

Besides their pro-coagulant activity, EMP also behave as a surface supporting plasmin generation by expressing the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) (30), which could counteract the thrombin generated by EMP. In this context, EMP support a link between haemostasis and angiogenesis. Indeed, the plasminogen activation system plays a pivotal role in maintaining vascular patency and facilitating cell migration and angiogenesis. This proteolytic potential affects the angiogenic potential of endothelial progenitor cells (30). By conveying plasmin, EMP activate matrix metalloproteases (MMP) which are involved in the extracellular matrix degradation and the release of growth factors that play a crucial role in tissue remodelling, angiogenesis and cancer spreading. Other *in vitro* studies provided evidence that EMP convey angiogenic messages supported by proteases belonging to the MMP family (28) but also by a horizontal transfer of mRNA, able to activate a pro-angiogenic program in endothelial cells (37). These findings were confirmed *in vivo* by a recent study demonstrating that EMP derived from ischaemic muscle promote *in vitro* endothelial proliferation and *in vivo* post natal vasculogenesis (29). However, the involvement of EMP in angiogenic re-

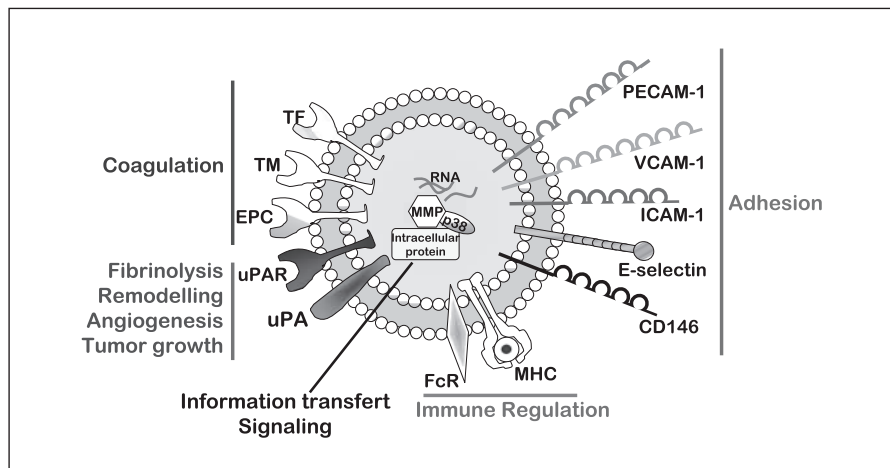
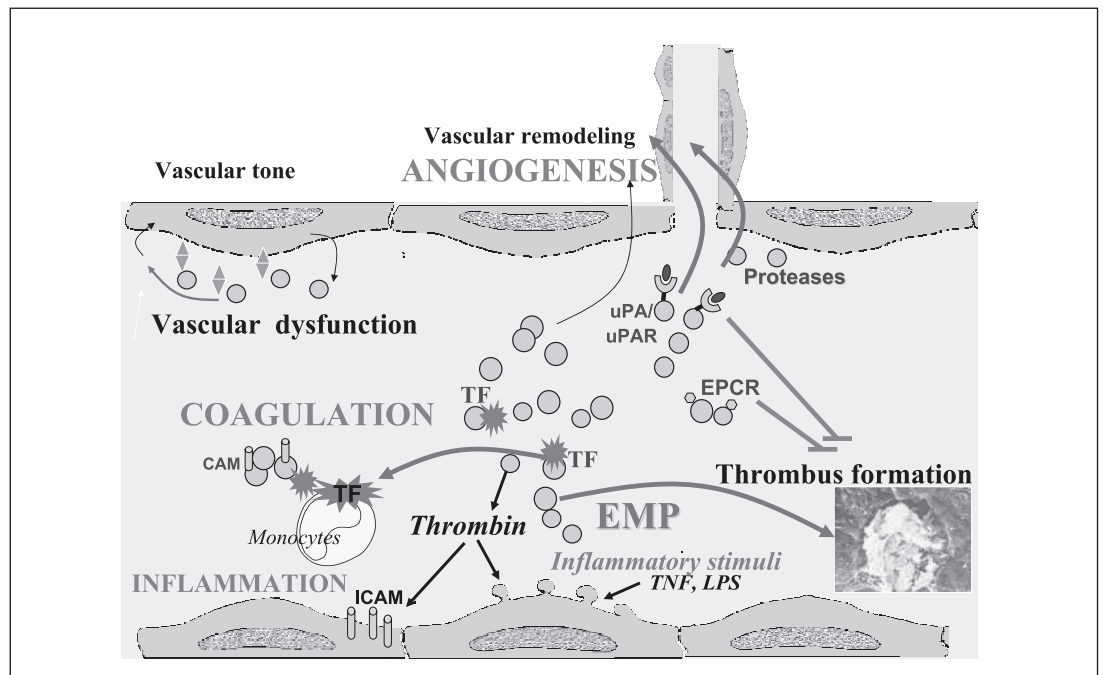


Figure 3: EMP harbour a panel of receptors, enzymes and molecules which confer them a role in coagulation, inflammation, angiogenesis and immune regulation. TF, tissue factor; TM, thrombomodulin; EPCR, endothelial protein C receptor; uPAR, urokinase plasminogen activator receptor; uPA, urokinase plasminogen activator; FcR, Fc receptor; MHC, major histocompatibility complex; E-selectin, endothelial selectin; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; MMP, matrix metalloproteases.

Figure 4: EMP released after endothelial activation are at the crossroad of thrombosis and angiogenesis and participate in a cross-talk between inflammation and coagulation.

CAM, cell adhesion molecule; TF, tissue factor; TNF, tumour necrosis factor; LPS, lipopolysaccharide; EPCR, endothelium protein C receptor; uPA, urokinase plasminogen activator; uPAR, urokinase plasminogen activator receptor.



sponse and vascular repair is still controversy. For example, Mezentsev et al. demonstrated that EMP reduced endothelial proliferation as well as formation of new vessels *in vitro* (48). Taraboletti et al. reported that MP isolated from HUVECs promoted formation of capillary-like structures by endothelial cells in low concentrations whereas high levels of EMP abolished angiogenesis (28). Consequently, the pro-angiogenic role of EMP and its associated mechanisms need to be further elucidated, and will open new perspectives for MP pathological implications. Indeed, EMP could be endogenous survival signals responsible of vascular repair in ischaemic tissues. However, promotion of angiogenic response may also have deleterious effects in cancer spreading, proliferative diabetic retinopathy (49) or atherosclerotic plaque destabilisation by promoting intraplaque neovascularisation (50).

Role of EMP in vascular tone

EMP have also been reported to be critical inducers of endothelial dysfunction, both *in vitro* and *in vivo*. Indeed, total plasma MP impair the release of nitric oxide (NO) from vascular endothelial cells, which was observed on isolated arteries exposed *in vitro* to circulating concentrations of MP from patients with acute coronary syndromes, end-stage renal failure or preeclampsia, but not with MP from healthy subjects (51–53). It was shown that EMP subpopulation levels were correlated with endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure (51). These data identify EMP not only as bystanders but also as mediators of endothelial dysfunction, by direct alteration of NO production and impairment of endothelium dependent vasorelaxation.

Role of EMP in cell survival

Abid-Hussein et al. demonstrated that EMP could play a role in cell survival. Indeed, they showed that EMP release can protect endothelial cell apoptosis, diminishing levels of caspase-3 in cultured endothelial cells by enclosing caspase-3 during vesiculation (54). In a more recent study, they demonstrated that statins improve the overall condition of the remaining vascular endothelium by facilitating this EMP release *in vitro* (55). Nevertheless, the effect of statins on EMP release is still a matter of debate (56, 57). Finally, EMP-associated EPCR could also promote cell survival by induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects (25).

Role of EMP in the transfer of cell information

The mechanisms by which MP exert an effect on their target cells remain mostly unknown. It is not known yet whether they act on surrounding cells by a paracrine pathway or cell-to-MP contact. Some studies indicated that MP operate by transferring proteins to the surface of endothelial cells (58, 59). Other studies suggested mechanisms similar to phagocytosis involving either scavenger receptors or phosphatidylserine receptor (60). Also membrane fusion between MP and target cells might trigger cell activation. Finally, more recent studies bring new insights into these mechanisms showing that MP are able to transfer their RNA content and specially their microRNA to endothelial cells, so modulating the response of the target cells (38, 41, 61, 62).

On the one hand, EMP can promote beneficial effects on vascular repair and cell survival, but on the other hand, they could initi-

ate and perpetuate endothelial dysfunction as well as coagulation dissemination. Consequently, pathophysiological functions attributed to EMP may contribute to the tuning of vascular homeostasis (► Fig. 4).

EMP pathological implications

Increased EMP levels in diseases

Because EMP can compromise vascular homeostasis, they may represent new players in the initiation / amplification of several inflammatory and thrombotic diseases. Circulating EMP are detectable in the plasma of healthy subjects and their amount increase under pathological conditions associated with increased thrombotic risk and endothelial dysfunction. Thus, elevated levels of EMP were reported in acute coronary syndromes (46, 63, 64), acute ischaemic stroke (65, 66), diabetes (67–70), metabolic syndrome (71), severe hypertension with endorgan damage (72–74), thrombotic thrombocytopenic purpura (75), antiphospholipid syndrome (76, 77), lupus anticoagulant (5), vasculitis (78), chronic venous insufficiency (79), venous thromboembolism (80), paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (81), all conditions defined by deregulated inflammatory and homeostatic responses.

Relationship between EMP levels and endothelial dysfunction

The release of EMP has also been associated with endothelial dysfunction assessed by abnormal flow mediated dilatation in pathological settings such as end stage renal failure or preeclampsia (51, 82) but also in obese women (83) and multiple sclerosis (84). Accumulating evidence showing pro-coagulant, pro-inflammatory and pro-angiogenic role for EMP indicate that EMP not only constitute an emerging marker of endothelial injury useful to identify patients with vascular risk, but can also be considered as pathogenic vectors. Accordingly, sustained elevated amount of EMP after myocardial infarction or diabetes are indicative of a poor clinical outcome (85). In a recent study, EMP levels were reported to be an independent predictor of the presence of coronary artery disease (69).

EMP as biomarkers of vascular risk

Accumulating data showed that elevated levels of EMP have been detected in several diseases, particularly cardiovascular diseases including acute coronary syndrome (46, 63, 64), stroke (65, 66) and hypertension (73), but also in other vascular settings associated with a thrombotic propensity (86). Elevated EMP are associated with most of the cardiovascular risk factors such as obesity, hyper-

tension, diabetes (87), and appear indicative of a poor clinical outcome. In the future, provided that standardisation of available methodologies could be achieved, EMP measurement will offer new perspectives to assess vascular risk. Indeed, EMP measurement remains a technical challenge due to the lack of standardisation. First, several pre-analytical variables such as blood collection, sample processing, transportation and centrifugation may have a major impact on MP measurement. Second, flow cytometry measurement presents some limitations such as threshold for particle size detection or standardised instrument settings. However, this limit will be overcome with the new generation of flow cytometers. Moreover, the choice of specific antibodies against endothelial antigens is critical for EMP quantification in pathological settings (88, 89). Therefore, developing standardised protocols for EMP measurement is a prerequisite for the full definition of their clinical interest as prognosis markers.

Moreover, another critical point, still debated, is whether EMP can be considered as a cause or a consequence in these diseases. In patients with end-stage renal disease, it was recently suggested (90) that EMP could both reflect and induce endothelial dysfunction. Indeed, EMP could promote vascular dysfunction by decreasing NO production, and thus trigger the disease. On the other hand, patients with end-stage renal failure present low shear stress and increased concentrations of uremic toxins, both participating in endothelial vesiculation.

EMP as new therapeutic targets?

The recognition of EMP as vectors in the transcellular exchange of pathogenic information offers new pharmacological perspectives. Indeed, several therapies beneficial in cardiovascular disorders were reported to reduce circulating MP levels. For example, type 2 diabetic patients treated with the calcium antagonist nifedipine showed a reduced level of platelet-, monocyte- and endothelial-cell derived MP (91). Administration of benidipine, another channel calcium blocker, decreased concentrations of EMP in hypertensive patients with type 2 diabetes (92). Moreover, diabetic patients treated with eicosapentaenoic acid showed a significant decrease of their EMP plasma concentrations (93). In patients with metabolic syndrome, pioglitazone administration diminished EMP levels (94). Intra-vitreous anti-VEGF injection decreased vitreous EMP shed following proliferative diabetic retinopathy (49). Thus, these studies bring new insights into the understanding of the mechanisms of EMP generation and the development of associated diseases.

In conclusion, EMP can be considered as complex structures expressing a large repertoire of endothelial molecules and biological functions that are related to their potential involvement in the tuning of vascular homeostasis. The notion that EMP are conveyors of biological activities with major role in inflammation, thrombosis and angiogenesis is an exciting prospect. However, proof of this concept remains to be fully established *in vivo* using animal models, a critical step to better understand the pathophysi-


ological implications of EMP. Moreover, extending our knowledge on the mechanisms controlling endothelial vesiculation will certainly open novel therapeutic perspectives based on the inhibition of EMP release.

References

- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13: 269–288.
- Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; 44: 233–242.
- Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 399–406.
- Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121–1132.
- Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93–102.
- Szotowski B, Antoniak S, Goldin-Lang P, et al. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 806–812.
- Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation* 2002; 106: 2372–2378.
- Sapet C, Simoncini S, Loriord B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 2006; 108: 1868–1876.
- Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol* 2002; 3: 11.
- Wang JM, Wang Y, Huang JY, et al. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res* 2007; 44: 241–248.
- Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 566–573.
- Boulangier CM, Amabile N, Guerin AP, et al. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 2007; 49: 902–908.
- Simoncini S, Njock MS, Robert S, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res* 2009; 104: 943–951.
- Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 701–709.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 339–345.
- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 346–352.
- Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, et al. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 888–896.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H, et al. Circulating nucleosomes in serum. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 93–102.
- Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, et al. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2434–2443.
- Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, et al. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 2184–2189.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003; 109: 175–180.
- Miguet L, Pacaud K, Felden C, et al. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 2006; 6: 153–171.
- Banfi C, Brioschi M, Wait R, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 2005; 5: 4443–4455.
- Kushak RI, Nestoridi E, Lambert J, et al. Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity. *Thromb Res* 2005; 116: 409–419.
- Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, et al. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* 2009; 94: 387–394.
- Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005; 105: 1515–1522.
- Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102: 2678–2683.
- Tarabozetti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, et al. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 673–680.
- Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009; 119: 2808–2817.
- Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007; 110: 2432–2439.
- Sabatier F, Roux V, Anfosso F, et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962–3970.
- Agouni A, Mostefai HA, Porro C, et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J* 2007; 21: 2735–2741.
- Biro E, Nieuwland R, Tak PP, et al. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1085–1092.
- Mayr M, Grainger D, Mayr U, et al. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 379–388.
- Smalley DM, Root KE, Cho H, et al. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 2007; 97: 67–80.
- Chen TS, Lai RC, Lee MM, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 215–224.
- Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007; 110: 2440–2448.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694.
- Koh W, Sheng CT, Tan B, et al. Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. *BMC Genomics* 2010; 11 (Suppl 1): S6.
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–856.
- Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 2009; 4: e4722.
- Abid Hussein MN, Boing AN, Biro E, et al. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res* 2008; 121: 865–871.
- Aras O, Shet A, Bach RR, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; 103: 4545–4553.
- Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 772–777.
- Mallat Z, Hugel B, Ohan J, et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348–353.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841–843.
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106: 1604–1611.

48. Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1106–1114.
49. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, et al. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* 2010; 59: 694–701.
50. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1302–1311.
51. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3381–3388.
52. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimiyan T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649–2652.
53. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, et al. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187: 450–456.
54. Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A, et al. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1096–1107.
55. Diamant M, Tushuizen ME, Abid-Hussein MN, et al. Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Thromb Haemost* 2008; 100: 489–497.
56. Nomura S. Statin and endothelial cell-derived microparticles. *Thromb Haemost* 2008; 100: 377–378.
57. Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, et al. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 34–38.
58. Majka M, Kijowski J, Lesko E, et al. Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells--implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 27–32.
59. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, et al. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1512–1518.
60. Kirsch T, Woywodt A, Beese M, et al. Engulfment of apoptotic cells by microvascular endothelial cells induces proinflammatory responses. *Blood* 2007; 109: 2854–2862.
61. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, et al. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* 2010; 38: 233–245.
62. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81.
63. Bulut D, Tuns H, Mugge A. CD31+/Annexin V+ microparticles in healthy offspring of patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 17–22.
64. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 601–608.
65. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol* 2009; 66: 191–199.
66. Simak J, Gelderman MP, Yu H, et al. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1296–1302.
67. Bernard S, Loffroy R, Serusclat A, et al. Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Atherosclerosis* 2009; 203: 429–435.
68. Feng B, Chen Y, Luo Y, et al. Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2010; 208: 264–269.
69. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1622–1630.
70. Nomura S. Dynamic role of microparticles in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5: 245–251.
71. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008; 173: 1210–1219.
72. Amabile N, Heiss C, Chang V, et al. Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: 1081–1086.
73. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003; 41: 211–217.
74. Wang JM, Su C, Wang Y, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 2009; 23: 307–315.
75. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol* 2003; 123: 896–902.
76. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91: 667–673.
77. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus* 2009; 18: 671–675.
78. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1820–1825.
79. Georgescu A, Alexandru N, Popov D, et al. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1566–1575.
80. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1467–1471.
81. Helley D, Peffault de Latour R, Porcher R, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010; 95: 574–581.
82. Gonzalez-Quintero VH, Smarkusky LP, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1418–1424.
83. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, et al. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3676–3679.
84. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001; 56: 1319–1324.
85. Morel O, Hugel B, Jesel L, et al. Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 2004; 91: 345–353.
86. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, et al. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 454–471.
87. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594–2604.
88. Duval A, Helley D, Capron L, et al. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 1049–1055.
89. van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, et al. Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): Effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res* 2010; 125: 332–339.
90. Boulanger CM, Leroyer AS, Amabile N, et al. Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2008; 57: 149–154.
91. Nomura S, Inami N, Kimura Y, et al. Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 38–44.
92. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, et al. Benidipine improves oxidized LDL-dependent monocyte and endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2005; 19: 551–557.
93. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on endothelial cell-derived microparticles, angiopoietins and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16: 83–90.
94. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1926.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com



Idées et débats

Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence »

Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Towards the definition of vascular competence

F. Sabatier^{a,b}, R. Lacroix^{a,b}, L. Camoin-Jau^{a,b}, F. Anfosso^a, J. Sampol^a, F. Dignat-George^{a,*,b}

^a UMR-S 608 Inserm, laboratoire d'hématologie et d'immunologie, UFR de pharmacie, université de la Méditerranée, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

^b Laboratoire d'hématologie, CHU La Conception, 13005 Marseille, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :
Cellules endothéliales circulantes
Microparticules endothéliales
Progéniteurs endothéliaux
Biomarqueurs endothéliaux
Lésion/réparation de l'endothélium
Vasculocompétence

Keywords:
Circulating endothelial cells
Endothelial-derived microparticles
Circulating endothelial progenitor cells
Biomarkers

RÉSUMÉ

L'exposition à des processus délétères d'origine métabolique, infectieuse, auto-immune ou mécanique altère l'endothélium qui progresse vers une activation pro-inflammatoire et procoagulante, une sénescence accélérée et une mort par apoptose. Cette « réponse à la lésion » de l'endothélium joue un rôle majeur dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires. Au cours des dix dernières années, l'identification dans le sang périphérique de cellules endothéliales matures (CEC) et de microparticules (MPE) reflétant les processus de lésion de l'endothélium a ouvert la voie à de nouvelles méthodes d'exploration non invasives. En effet, ces biomarqueurs sont associés à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire, sont corrélés à des marqueurs établis de dysfonction endothéliale et constituent des indicateurs de mauvais pronostic. De plus, ils représentent des vecteurs biologiquement actifs capables de transmettre des signaux délétères dans le compartiment vasculaire. Plus récemment, ce concept a été revisité par la découverte d'un puissant mécanisme de réparation, basé sur la mobilisation à partir de la moelle osseuse, de progéniteurs endothéliaux (PEC) capables de régénérer les cellules endothéliales lésées. Les facteurs de risque cardiovasculaires altèrent le nombre et les propriétés fonctionnelles de ces PEC. Le rôle critique de l'équilibre lésion/régénération dans l'homéostasie vasculaire permet aujourd'hui d'intégrer CEC, MPE et PEC dans un phénotype endothélial définissant la « vasculocompétence » à l'échelle individuelle. La standardisation des méthodes disponibles pour l'étude de ces biomarqueurs endothéliaux émergents est un prérequis majeur pour confirmer leur intérêt dans la définition du risque vasculaire et l'évaluation de thérapies ciblées sur le vaisseau.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Exposure to deleterious processes of metabolic, infectious, autoimmune or mechanical origin, alters the endothelium which progresses towards a proinflammatory and procoagulant activation, senescence and apoptosis. This "response to injury" of the endothelium plays a key role in the initiation and progression of cardiovascular disorders. In the last 10 years, identification in peripheral blood of circulating endothelial cells (CEC) and endothelial-derived microparticles (EMP) reflecting endothelium damage has led to the development of new noninvasive methods for endothelium exploration. Indeed, these biomarkers were associated with most of the cardiovascular risk factors, were correlated with established parameters of endothelial dysfunction, and were indicative of a poor clinical outcome. Moreover, they behave as biological vectors able to disseminate deleterious signals in the vascular compartment. More recently, this concept has been enlarged by the discovery of a potent repair mechanism based on the recruitment of the circulating endothelial progenitor cells (EPC) from the bone marrow, able to regenerate injured

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : dignat@pharmacie.univ-mrs.fr (F. Dignat-George).

endothelial cells. Cardiovascular risk factors alter EPC number and function. Because the damage/repair balance plays a critical role in the endothelium homeostasis, CEC, EMP and EPC could be combined in an endothelium phenotype that defines the "vascular competence" of each individual. In the future, progress in standardization of available methodologies to measure these emerging biomarkers is a crucial step to establish their clinical interest for assessment of vascular risk and monitoring of vascular-directed therapeutics.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

De part sa position anatomique, l'endothélium vasculaire sert d'interface entre le sang et les tissus. Il constitue de ce fait la cible privilégiée de stimulations physiopathologiques et joue un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasomoteur, de l'hémostase, de l'inflammation et de la croissance vasculaire. Les données accumulées ces 20 dernières années ont clairement démontré qu'en l'absence de régulation adaptative, les altérations de l'endothélium jouent un rôle majeur dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires (MCV) [1]. Ce rôle clé de l'endothélium, comme cible et acteur des pathologies vasculaires, a motivé le développement de méthodes d'exploration du vaisseau, une des limites étant le caractère difficilement accessible de l'endothélium. Ces méthodes consistent soit à évaluer directement la fonctionnalité de l'endothélium, soit à mesurer des biomarqueurs circulants reflétant les altérations de son intégrité. Le premier groupe inclut la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, de la rigidité artérielle et de la propagation de l'onde de pouls [2]. La seconde catégorie comprend tout un panel de marqueurs solubles en relation avec les principales fonctions régulatrices de l'endothélium comme l'hémostase (facteur von Willebrand [vWF], facteur tissulaire [FT], thrombomoduline, activateur tissulaire du plasminogène [t-PA], inhibiteur de l'activation du plasminogène de type 1 [PAI-1]), l'inflammation (molécule d'adhérence intercellulaire de type 1 [ICAM-1], molécule d'adhérence des cellules vasculaires de type 1 [VCAM-1], E-sélectine, P-sélectine. . .) ou le tonus vasomoteur (oxyde nitrique, endothéline, prostacycline. . .). Toutefois, malgré la simplicité de leur dosage, ces marqueurs se sont montrés décevants par manque de spécificité pour les réponses endothéliales, ce qui limite leur intérêt dans la pratique clinique. Plus récemment, la mise en évidence, dans le sang périphérique, de sous-populations cellulaires dérivées de l'endothélium, a conduit à une nouvelle vision de l'endothélium : celle d'un tissu dynamique, en équilibre avec un compartiment circulant, reflétant les processus de lésion et de régénération de l'arbre vasculaire. Ce compartiment circulant donne accès à une troisième catégorie de biomarqueurs cellulaires comportant les cellules endothéliales circulantes (CEC), les microparticules (MPE) et les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) [3]. Cette revue a pour but de définir chacun de ces marqueurs, de faire le point sur les méthodes actuelles permettant de les mesurer et sur leur intérêt respectif pour évaluer l'intégrité endothéliale de manière spécifique et non invasive. Cette revue discute également l'intérêt potentiel de ces biomarqueurs émergents dans la définition ou prédiction du risque vasculaire et dans la prise en charge thérapeutique.

2. Lésion et régénération de l'endothélium : la théorie de la réponse à la lésion revisitée

Longtemps considéré comme une monocouche de cellules tapisant l'arbre vasculaire, l'endothélium est reconnu aujourd'hui comme une interface dynamique, capable de répondre à des contraintes physiques mais aussi à des stimulations autocrines ou paracrines résultant d'interactions avec des cellules et des

molécules circulantes. Cette capacité de l'endothélium à s'adapter aux conditions physiologiques le rend aussi particulièrement sensible aux modifications pathologiques. Ainsi, selon la théorie de la réponse à la lésion de Russel Ross, les atteintes mécaniques ou l'exposition chronique de l'endothélium à des facteurs de risque altèrent les propriétés de régulation de l'endothélium, qui va progressivement évoluer vers une activation pro-inflammatoire, une sénescence et une apoptose [4]. Ainsi, l'endothélium stimulé s'engage dans un spectre complexe de réponses délétères regroupées sous le terme de dysfonction endothéliale qui participent à la perte de son intégrité. Ces réponses comprennent la formation de microparticules, qui résultent de processus d'activation ou d'apoptose [5], et l'apparition de cellules endothéliales qui se détachent de la paroi vasculaire [6]. Plus récemment, cette théorie de la réponse à la lésion a été revisitée par la découverte d'un puissant mécanisme de réparation basé sur la mobilisation de progéniteurs endothéliaux. Les travaux pionniers d'Asahara et al. [7] ont clairement établi que les PEC représentent un mécanisme complémentaire de l'angiogenèse pour assurer la réparation endothéliale. Recrutées à partir de la moelle osseuse, ces cellules sont capables de se différencier en cellules matures et de restaurer l'intégrité endothéliale. Au total, ce spectre complexe de réponses endothéliales peut être intégré dans une triade dynamique « activation/lésion/régénération » qui a fait évoluer notre vision de la biologie endothéliale.

3. Biomarqueurs endothéliaux de la lésion et de la régénération endothéliale

L'évolution des connaissances sur la physiopathologie de la réponse endothéliale s'est accompagnée du développement de nouvelles méthodes d'explorations non invasives basées sur la mesure des CEC, des MPE et des PEC. Leurs caractéristiques comparées sont résumées dans le Tableau 1.

4. Cellules endothéliales circulantes

En 1970, c'est sur des critères morphologiques que les CEC ont été décrites dans le sang périphérique par Bouvier et Lhadovec. Grâce au développement d'anticorps monoclonaux spécifiques, les CEC ont été caractérisées sur des critères immunologiques en 1992, chez des patients subissant une angioplastie coronaire, et ainsi identifiées comme un marqueur du traumatisme secondaire à l'agression mécanique de l'endothélium [6]. Les CEC sont définies comme des cellules matures détachées de la paroi vasculaire [8]. Elles présentent une taille hétérogène (de 10 à 50 μm), expriment des marqueurs endothéliaux (vWF, CD31, CD144, CD146) mais sont négatives pour les marqueurs leucocytaires [9]. Par opposition aux PEC, elles n'expriment pas de marqueur d'immaturation comme le CD133 et sont incapables de donner naissance à des colonies de cellules à haut potentiel prolifératif.

Les CEC appartiennent à la catégorie des événements rares présents dans le sang périphérique. La technique de référence pour leur numération est l'immuno-séparation magnétique (IMS) [10]. Cette méthode combine une première étape d'enrichissement grâce à

Tableau 1
 Caractéristiques comparées des CEC, MPE et PEC.

	CEC	MPE	PEC
Origine	Paroi du vaisseau sanguin	Paroi du vaisseau sanguin	Moelle, autres niches PEC précoces
Morphologie	Cellules matures 15–50 µm de diamètre	Vésicules dérivées de l'endothélium de diamètre 0,1 à 1 µm	Cellules immatures de diamètre < 15 µm
Phénotype	CD31+, CD105+, CD146+ Ulex Europaeus lectin+, vWF+ eNOS+ CD45–, CD133–, CD34+	CD144+, CD146+, CD62E+, CD51+ CD31+/CD42– CD31+/CD51+	CD133+, CD34+, KDR+, CD117+ CD146± CD45±
Méthodes de détection	Gradient de densité CD146 IMS et fluorescence CD146 IMS et cytométrie en flux CD146 IMS et analyse d'image Cytométrie en flux	Cytométrie en flux Elisa Capture en phase solide	Cytométrie en flux Tests clonogéniques CFU-EC ou culture (« PEC myéloïdes ») HPP-ECFC (« PEC non myéloïdes »)
Physiopathologie	Lésion endothéliale	Activation/apoptose de l'endothélium	Néo-vascularisation, réparation

CEC : cellules endothéliales circulantes ; MPE : microparticules endothéliales ; PEC : progéniteurs endothéliaux circulants ; IMS : séparation immuno-magnétique ; CFU-EC : colony forming unit-endothelial cells ; HPP-ECFC : high proliferation potential-endothelial colony forming cells.

des microbilles magnétiques couvertes d'anticorps anti-CD146 et une seconde étape de comptage des cellules utilisant la microscopie à fluorescence, après marquage par un marqueur spécifique de l'endothélium. Chez le sujet normal, des valeurs de CEC inférieures à dix cellules par millilitre ont été rapportées de manière consensuelle grâce à cette technique [11]. Plus récemment ont été proposées des méthodes hybrides combinant l'enrichissement immunomagnétique à une identification multiparamétrique des CEC en cytométrie de flux ou par analyse d'image [12,13], ces approches fournissant des valeurs du même ordre de grandeur que l'IMS. Des méthodologies alternatives basées sur la cytométrie de flux ont été largement utilisées chez les patients atteints de cancer [14–16].

Le détachement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire résulte de mécanismes multiples et non exclusifs parmi lesquels on peut citer une agression mécanique de la paroi vasculaire, une altération des propriétés d'adhérence aux cellules adjacentes, une protéolyse accrue de la matrice, une levée de l'inhibition de contact des cellules endothéliales pouvant conduire soit à une apoptose (phénomène d'Anoikis), soit à l'activation de réponses prolifératives comme observé dans l'angiogenèse tumorale [11].

Sur le plan clinique, une élévation du nombre des CEC a été rapportée dans différentes pathologies associées à des altérations de l'endothélium (Tableau 2) telles que les pathologies cardiovasculaires, mais aussi en relation avec la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire comme le diabète, l'hypertension et l'insuffisance rénale chronique. À côté de ces pathologies, des valeurs élevées de CEC ont été mentionnées au cours des maladies auto-immunes à composante vasculaire, au cours des pathologies hématologiques et infectieuses mais aussi en transplantation et en cancérologie. De façon générale, les principales études cliniques, rapportées dans le Tableau 2, indiquent que le niveau des CEC est un signe d'activité de la maladie. Les nombres de CEC sont corrélés aux marqueurs évaluant la fonctionnalité de l'endothélium comme la mesure de la dilatation dépendante du flux. Ils sont également corrélés à des marqueurs plasmatiques traduisant une lésion (vWF) ou une activation pro-inflammatoire (E-sélectine) et procoagulante (FT) [17–19]. Ainsi les CEC sont le reflet d'une altération de l'endothélium en réponse à une agression qui selon le contexte pathologique peut résulter de la présence chronique des facteurs de risque ou d'un agent microbien, d'une réponse aiguë inflammatoire et/ou ischémique ou d'un préconditionnement de l'endothélium par des agents cytotoxiques. En supposant que les CEC soient représentatives des vaisseaux dont elles dérivent, l'analyse de leur phénotype pourrait fournir des renseignements intéressants non seulement sur leur territoire vasculaire d'origine et la pathogénie

sous-jacente mais aussi sur leur capacité à vectoriser des activités délétères dans le courant circulatoire. Si certaines études ont rapporté l'expression de molécules bioactives par les CEC telles que le facteur tissulaire ou la E-sélectine [20,21], leur rôle pathogène reste encore à démontrer.

Au-delà de leur rôle de marqueur d'une lésion endothéliale, l'intérêt pronostique des CEC a été rapporté dans des situations pathologiques comme les syndromes coronaires aigus, l'hémodialyse ou le choc septique où des valeurs élevées de CEC sont prédictives de mortalité ou de complications vasculaires majeures (Tableau 2). De plus, au cours des syndromes coronaires aigus (SCA), l'élévation des CEC est plus précoce et indépendante par rapport à la troponine cardiaque suggérant qu'une stratégie combinant ces deux marqueurs pourrait permettre d'optimiser le diagnostic précoce chez des patients présentant un angor instable. L'intérêt diagnostique des CEC a également été rapporté récemment, pour identifier des formes irréversibles d'hypertension pulmonaires chez des enfants présentant des cardiopathies congénitales, en évitant le recours à une biopsie pulmonaire [22].

5. Les microparticules endothéliales

Les microparticules endothéliales (MPE) ont été décrites pour la première fois chez des patients présentant un lupus anticoagulant [5]. Elles sont définies comme des vésicules de petite taille avec un diamètre hétérogène compris entre 0,1 et un micron. Les MPE résultent d'importantes modifications des flux calciques entraînant un remaniement des phospholipides membranaires au cours de l'activation ou de l'apoptose cellulaire. Elles expriment à leur surface des phospholipides anioniques, notamment la phosphatidylsérine (PS) qui lie l'annexine V, et des antigènes caractéristiques des cellules endothéliales [3]. Les MPE ne sont pas seulement des marqueurs d'activation ou de mort endothéliale mais représentent également de véritables effecteurs cellulaires capables d'amplifier ou de moduler l'hémostase, l'inflammation, le tonus vasculaire et l'angiogenèse [23]. La caractérisation phénotypique des MPE, réalisée à partir de cellules endothéliales en culture indique que les MPE expriment des molécules identiques aux cellules d'origine. Ainsi, des récepteurs comme VCAM-1 ou la E-sélectine sont détectables sur les MPE générées à partir de cellules endothéliales en culture activées au *tumor necrosis factor* (TNF) indiquant qu'elles représentent une signature des réponses pro-inflammatoires de l'endothélium. Par ailleurs, l'expression de PS qui permet l'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation et du FT, confère aux MPE un potentiel procoagulant [5]. Chez l'homme, l'expression de FT par les MPE a été démontrée

Tableau 2
 Variation du niveau sanguin des cellules endothéliales circulantes en pathologie.

Pathologie/Circonstance	Variation	Signification clinique [référence]
<i>Pathologies cardiovasculaires</i>		
Angioplastie coronaire	↑	Traumatisme de la paroi vasculaire [6]
Syndromes coronariens aigus	↑	Marqueur de lésion [56] Marqueur précoce et indépendant de la troponine Corrélation aux taux plasmatiques de vWF et d'IL6 [57] Prédiction de la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs [58]
Insuffisance cardiaque	↑	Corrélation inverse à la dilatation induite par le flux et positive au vWF et au FT [59]
Accident vasculaire cérébral	↑	Corrélation à la E-sélectine soluble et au vWF [18]
Hypertension pulmonaire	↑	Corrélation aux pressions systoliques et diastoliques [20]
<i>Facteurs de risques cardiovasculaires</i>		
Diabète	↑	Marqueur indépendant de la glycémie et du taux d'HbA1c [60]
Hémodialyse	↑	Prédiction de la survenue d'évènements cardiovasculaires [61]
<i>Pathologies hématologiques</i>		
Microangiopathie thrombotique	↑	Valeur pronostique [62]
Drépanocytose	↑	Corrélation aux crises drépanocytaires [63]
<i>Transplantation</i>		
Transplantation rénale	↑ ↓	Marqueur du rejet vasculaire [64] Marqueur corrélé à l'histoire cardiovasculaire du patient qui diminue à un an après transplantation et est dépendant du traitement immunosuppresseur [65]
Greffe hématopoïétique	↑	Corrélation avec l'intensité du conditionnement [66]
<i>Maladies auto-immunes</i>		
Sclérodémie	↑	Corrélation avec le score de sévérité de la maladie et l'hypertension pulmonaire [67]
Vascularites	↑	Corrélation à la sévérité de la maladie et la réponse au traitement immunosuppresseur [21]
<i>Pathologies infectieuses</i>		
Infection par le CMV	↑	Marqueur de l'activité de la maladie [68]
Rickettsiose	↑	Marqueur d'activité; diminution après traitement [69]
<i>Cancérologie</i>		
Cancer rectal	↑	Marqueur corrélé à la survie après traitement [70]
Tumeur solide	↑	[15]
Cancer métastatique	↑	[16]

IMS : immunoséparation magnétique ; CMF : cytométrie de flux ; vWF : facteur von Willebrand ; FTs : facteur tissulaire soluble ; HbA1c : hémoglobine A1c ; CMV : cytomégalo-virus.

dans un modèle d'endotoxémie [24] et chez des patients atteints de coagulopathies intravasculaires, et cette expression est corrélée aux marqueurs circulants d'activation de la coagulation [25]. La présence de MPE procoagulantes a également été décrite dans les plaques d'athérosclérose [26] et dans la circulation de patients souffrant de SCA [27]. À côté de cette activité procoagulante, des études in vitro ont démontré que des MPE générées à partir de cellules endothéliales stimulées par de la protéine C activée expriment le récepteur endothélial à la protéine C fonctionnel, ce qui leur confère une propriété anticoagulante [28]. Bien que ce mécanisme ne soit pas encore documenté in vivo, il pourrait indiquer l'existence d'un potentiel anticoagulant capable de contrebalancer le caractère prothrombotique des MPE. La capacité des MPE à générer de la plasmine a été démontrée plus récemment [29]. Ce caractère protéolytique confère potentiellement aux MPE un rôle dans la fibrinolyse intravasculaire et la dégradation du caillot mais aussi dans les processus de remodelage vasculaire associées à la protéolyse extravasculaire.

Les MPE sont présentes chez le sujet sain et leur concentration est accrue dans différentes situations pathologiques. La cytométrie de flux est la méthode la plus largement utilisée pour caractériser les MPE à l'aide d'anticorps monoclonaux parmi lesquels les plus utilisés sont le CD144, le CD146, le CD105 ou la combinaison CD31+/CD41-. À côté de la cytométrie de flux, qui permet de compter les MPE, il existe des tests fonctionnels basés sur la mesure de leur activité procoagulante [30,31]. Quelle que soit la technique utilisée, l'étude des MPE exige le respect de règles strictes aussi bien sur les étapes pré-analytiques qu'analytiques.

En clinique humaine, des niveaux élevés de MPE ont été rapportés dans les maladies cardiovasculaires et dans d'autres pathologies

auto-immunes ou hématologiques présentant une atteinte endothéliale (Tableau 3). De plus, les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires tels que le diabète, l'HTA, les dyslipidémies ou l'insuffisance rénale s'accompagnent d'une élévation des taux plasmatiques de MPE. Chez le sujet sain, l'hypertriglycéridémie post-prandiale s'accompagne d'une élévation rapide (une à trois heures après l'ingestion) et transitoire des taux plasmatiques de MPE. Le rôle des MPE comme marqueur de la dysfonction endothéliale a été rapporté dans différentes situations cliniques comme l'insuffisance rénale terminale, la maladie coronarienne ou chez des femmes atteintes d'obésité où il existe une corrélation entre les MPE et la dysfonction endothéliale mesurée par l'angiographie ou la vasodilatation induite par le flux. Par ailleurs, plusieurs études cliniques suggèrent un rôle pronostique des taux initiaux de MPE dans la récurrence d'accidents vasculaires cérébraux, dans les SCA ou dans la survenue de complications vasculaires chez les patients diabétiques [32,33]. Au-delà de leur rôle de marqueurs, les MPE sont des effecteurs biologiques pathogènes capables d'induire ou d'aggraver une dysfonction vasculaire préexistante. Ainsi, les MPE générées sous l'action de nombreux agonistes entraînent une altération de la relaxation vasculaire à l'acétylcholine, une majoration du stress oxydatif et une diminution de la production de monoxyde d'azote, puissant vasodilatateur, anti-agrégant plaquettaire et facteur majeur de survie des cellules endothéliales [34].

Ce potentiel délétère des MPE ouvre de nouvelles perspectives pharmacologiques. Plusieurs thérapeutiques largement utilisées pour leur effet bénéfique dans les maladies cardiovasculaires comme les antioxydants, les bêtabloquants ou les statines [23] réduisent les concentrations de MPE associées à différentes pathologies.

Tableau 3
 Variation du niveau sanguin des microparticules endothéliales en pathologie.

Pathologie/Circonstance	Variations	Signification clinique [référence]
<i>Pathologies cardiovasculaires</i>		
Syndromes coronariens aigus	↑	Corrélation avec les lésions à haut-risque [71]
Accident vasculaire cérébral	↑	Relation avec la sévérité des lésions et le pronostic [33]
Hypertension	↑	Corrélation avec les pressions sanguines diastoliques et systoliques [72]
Hypertension pulmonaire	↑	Prédiction de la sévérité de l'hypertension pulmonaire [73]
<i>Facteurs de risques cardiovasculaires</i>		
Diabète de type 2	↑	Corrélation à l'atteinte des artères coronaires [32]
Diabète de type 1	↑	Corrélation à l'HbA1c [74]
Insuffisance rénale terminale	↑	Corrélation à la dysfonction vasculaire [75]
Hyper-triglycéridémie post-prandiale	↑	Corrélation à la teneur lipidique postprandiale [76]
Obésité	↑	Corrélation avec la dilatation induite par le flux [77]
<i>Pathologies hématologiques</i>		
Purpura thrombotique thrombocytopenique	↑	Corrélation à l'activation endothéliale [50]
Hémoglobinurie paroxystique nocturne	↑	Corrélation avec le statut inflammatoire des cellules endothéliales [78]
Drépanocytose	↑	Relation avec les crises drépanocytaires [25]
<i>Pathologies auto-immunes</i>		
Syndrome des anti-phospholipides	↑	Corrélation avec la présence d'un anticoagulant de type lupique [79]
Vasculaites	↑	Corrélation à l'activité de la maladie [80]
<i>Transplantation</i>		
Rein	↑	Corrélation avec l'histoire cardiovasculaire des patients et diminution un an après la transplantation [65]

6. Les progéniteurs endothéliaux circulants

Depuis les travaux pionniers d'Asahara [35] il y a dix ans, deux critères sont reconnus pour définir les PEC et les distinguer des CEC. In vitro, les PEC ont la capacité de proliférer et de se différencier en cellules adhérentes dont l'appartenance à la lignée endothéliale est attestée par l'expression de divers antigènes spécifiques de l'endothélium (KDR, UEA-1, vWF, CD146, CD144). In vivo, ces précurseurs contribuent significativement à la néo-angiogenèse au niveau des sites d'ischémie, à la réparation de la paroi endothéliale lésée ou à la croissance tumorale [7,36]. Bien que les mécanismes moléculaires sous-tendant ce processus de vasculogenèse adulte soient encore mal identifiés, trois étapes critiques sont reconnues ; la mobilisation des PEC depuis leur réservoir médullaire, leur recrutement dans les sites ischémiques ou lésés, et leur différenciation endothéliale. Ces étapes sont dépendantes de signaux émis par l'endothélium activé et/ou en réponse à l'hypoxie tissulaire tels que la production de VEGF, de SDF-1 et l'induction de molécules d'adhérence telles que les sélectines ou ICAM-1. Des données récentes ont permis de démontrer que les PEC comprennent un groupe hétérogène de cellules circulantes quant à leur origine et leurs caractéristiques fonctionnelles. Une sous-population d'origine « myéloïde » est caractérisée par un délai d'apparition rapide en culture, un potentiel de prolifération limité, un phénotype associant marqueurs endothéliaux et persistance de marqueurs de monocytes/macrophages. Ces cellules ont une capacité à promouvoir l'angiogenèse qui dépend essentiellement d'une activité paracrine. À l'inverse, une sous-population d'origine non hématopoïétique, nommée *endothelial colony forming cells* (ECFC) dont la fréquence dans la circulation périphérique adulte est plus faible, est identifiée sur la base d'un potentiel de prolifération élevé à l'échelon clonal, une différenciation endothéliale stricte et surtout un potentiel vasculogénique spécifique, c'est-à-dire une aptitude propre à la formation de néovaisseaux fonctionnels in vivo [37,38].

Malgré le manque de consensus sur une définition stricte des PEC, différentes méthodologies ont été intensément développées pour quantifier ces cellules en situation clinique. Les plus communes utilisent une analyse en cytométrie de flux des cellules mononucléées exprimant une combinaison variable des antigènes CD34, CD133 (marqueurs d'immatrité) et KDR (marqueur de lignée endothéliale) [39,40]. Différents tests de culture ex vivo, basés sur le potentiel clonogénique des PEC, constituent

une approche complémentaire mais ont l'inconvénient d'évaluer principalement la sous-population de « PEC myéloïdes ». La quantification des ECFC, considérés comme « vrais angioblastes », est plus difficile à mettre en œuvre pour les larges cohortes car elle demande des protocoles longs de culture et un grand volume de sang en raison de leur faible fréquence. Actuellement, l'absence de corrélation entre ces différents tests, en lien avec l'hétérogénéité des sous-populations de PEC dénombrées, reste une source de discordance possible entre les études publiées et justifie la poursuite d'un travail de standardisation méthodologique [41,42].

Les premières études cliniques, résumées dans le Tableau 4 partie B, ont rapporté une réduction du nombre et/ou de la fonctionnalité des PEC chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires chroniques comme la maladie coronarienne chronique, la défaillance cardiaque congestive, les maladies cérébrovasculaires, la vasculopathie du transplanté ou dans la re-sténose de stent. Des déficits en PEC sont également documentés au cours de différentes pathologies auto-immunes et inflammatoires telles que le lupus érythémateux disséminé, ou la sclérodermie et chez les patients présentant les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que le diabète, l'hypertension, l'insuffisance rénale chronique, le vieillissement ou le tabagisme. La relation entre la réduction des PEC et la présence de ces facteurs de risque a été établie de manière convaincante chez des patients avec différents degrés d'athérosclérose. De même, une corrélation significative avec le score de Framingham est rapportée dans l'athérosclérose subclinique, témoignant de l'intérêt des PEC comme marqueur potentiel du risque cardiovasculaire cumulé [43].

Par ailleurs, l'altération du nombre et des capacités fonctionnelles des PEC constitue un déterminant majeur de la dysfonction endothéliale [44]. Dans différents contextes tels que le vieillissement physiologique ou la polyarthrite rhumatoïde, et en l'absence d'athérosclérose avérée, l'activité des PEC est corrélée à l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium évaluée par la mesure de la vasodilatation endothélium dépendante. De plus, dans la population saine comme chez des patients coronariens, le nombre de PEC apparaît comme le déterminant principal de la dysfonction endothéliale comparé aux facteurs de risque traditionnels [8,45]. Ces données suggèrent que les PEC participent de manière continue au maintien de l'intégrité endothéliale et qu'un déficit affectant ce mécanisme de réparation pourrait avoir un rôle causal dans la progression d'une maladie vasculaire. En faveur de ce concept, une étude menée chez

Tableau 4
 Situations cliniques illustrant les variations du niveau sanguin des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC).

	Signification clinique [référence]
Partie A : situations cliniques associées à une élévation des niveaux de PEC	
<i>Ischémie aiguë</i>	
Infarctus du myocarde	Corrélation avec le VEGF plasmatique et les CPK [81] Corrélation avec la formation de vaisseaux collatéraux [82] Différentiation des PEC associée à une meilleure préservation de la fonction myocardique [83] Corrélation avec un remodelage post-IDM favorable [84]
Angor instable	Corrélation avec les niveaux de CRP sérique [85]
Accident vasculaire cérébral	Élévation des PEC dans la première semaine prédictive d'un pronostic neurologique favorable [86]
Transplantation hépatique	Mobilisation des PEC du receveur associée à l'augmentation des taux de VEGF, SCF, G-CSF [87]
<i>Lésion vasculaire mécanique</i>	
Mise en place d'un stent coronarien	Augmentation plus marquée chez les patients développant une re-sténose [88] Corrélation inverse avec l'atteinte vasculaire évaluée par la numération des CEC [52]
<i>Thérapeutique/Modification du mode de vie</i>	
Statines	Augmentation des PEC indépendante du VEGF [89] Amélioration de la fonctionnalité des PEC en relation avec la production d'IL-8 par les monocytes [90] Association avec l'amélioration de la fonction endothéliale (DMF) chez les patients avec une insuffisance cardiaque chronique [91]
Érythropoïétine	Association avec le traitement à long terme chez les patients cardiovasculaires [92] Association avec une amélioration de la survie et fonction des PEC chez les patients insuffisants rénaux anémiques traités avec une dose standard d'EPO [93]
Exercice physique	Augmentation des PEC chez les patients avec infarctus du myocarde recevant une dose unique de EPO [94] Corrélation avec l'amélioration de la fonction endothéliale (DMF) [95] Association avec l'intensification de la pratique du sport scolaire chez les enfants [96] Association avec réduction de l'apoptose des PEC chez les patients coronariens [97]
<i>Cancers</i>	
Cancer du sein	Corrélation avec le grade de la tumeur [98]
Lymphome	Corrélation avec le grade de la tumeur [99]
Thérapeutiques anti-angiogéniques	Mobilisation de taux élevés de PEC avec les chimiothérapies agressives à l'inverse des traitements métronomiques [100]
Partie B : situations cliniques associées à une diminution des niveaux de PEC	
<i>Pathologies cardiovasculaires</i>	
Angor stable	Corrélation inverse avec la présence de facteurs de risque cardiovasculaire [101] Valeur prédictive indépendante sur le pronostic cardiovasculaire [102] Corrélation inverse entre le nombre de PEC et leur activité migratoire et la sévérité de la sténose coronarienne et la CRP [103]
Maladies vasculaires cérébrales	Corrélation avec le flux sanguin régional [104]
Hypertension pulmonaire	Corrélation avec l'IL-6, le vWF et les niveaux de BNP Association avec une réduction de la migration et de l'adhésion des PEC à la fibronectine [105] Association avec une élévation des marqueurs inflammatoires et amélioration par les inhibiteurs de phosphodiésterases (sildénafil) [106]
Insuffisance cardiaque	Corrélation avec la sévérité de la maladie [107] Association avec une réduction du pool de PEC fonctionnels dans la moelle osseuse [108] Association avec les stades avancés de la maladie [109]
Resténose sur stent	Les bas niveaux de PEC et leurs défauts fonctionnels sont associés à une re-sténose diffuse [110] L'augmentation de la sénescence des PEC est associée à la resténose intra-stent [111]
<i>Facteurs de risque cardiovasculaire</i>	
Diabète de type 2	Corrélation inverse avec la sévérité de la maladie et prédiction des complications microvasculaires au niveau individuel [112] Association avec la dysfonction des PEC impliquant la eNOS [113] Corrélation avec les valeurs d'HbA1c chez les patients non traités et augmentation par le contrôle glycémique pharmacologique [114] Réduction plus marquée chez les patients avec une atteinte vasculaire périphérique Corrélation avec l'ABI [115]
Diabète de type 1	Association avec une dysfonction des PEC [116]
Hypertension	Corrélation inverse avec la pression sanguine systolique [117] L'hypertension réfractaire détermine de façon indépendante le nombre de PEC [118]
Insuffisance rénale terminale	Corrélation entre la réduction du nombre et l'altération des fonctions des PEC et les niveaux sériques de fetuine A, l'hématocrite et les réticulocytes [119] Corrélation inverse entre le nombre des PEC et leur propriété de migration et l'urémie et la pression sanguine systolique. Restauration par l'hémodialyse [120] Corrélation avec la fonction rénale et normalisation après transplantation rénale [121] Corrélation inverse avec le score de Framingham [122]
Dyslipidémie	Corrélation inverse entre la réduction du nombre et l'altération des fonctions des PEC et le taux de cholestérol total et LDL [123]
Tabagisme	Corrélation du ratio MPE/PEC avec le cholestérol LDL et la rigidité artérielle [54] Relation entre l'altération de la fonction des PEC et l'augmentation du stress oxydatif [124] Augmentation du niveau des PEC après sevrage tabagique [125]
Viellissement	Corrélation avec la diminution de l'élasticité artérielle [126,127] Niveaux plus élevés de PEC dans l'enfance. Relation inverse avec l'âge chez les sujets sains [127]
Hyperhomocystéinémie	Corrélation inverse avec les niveaux d'homocystéine [128]

VEGF : *vascular endothelial growth factor* ; CPK : créatine phosphokinase ; IDM : infarctus du myocarde ; CRP : protéine C-réactive ; IL-8 : interleukine-8 ; SCF : *stem cell factor* ; G-CSF : *granulocyte-stem cell factor* ; IL-6 : interleukine-6 ; DMF : dilatation médiée par le flux ; EPO : érythropoïétine ; BNP : peptide natriurétique type B ; vWF : facteur von Willebrand ; eNOs : nitrique oxyde synthase endothéliale ; ABI : *ankle brachial index* ; LDL : *low density lipoprotein*.

Pour citer cet article : Sabatier F, et al. Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence ». Rev Med Interne (2010), doi:10.1016/j.revmed.2010.03.341

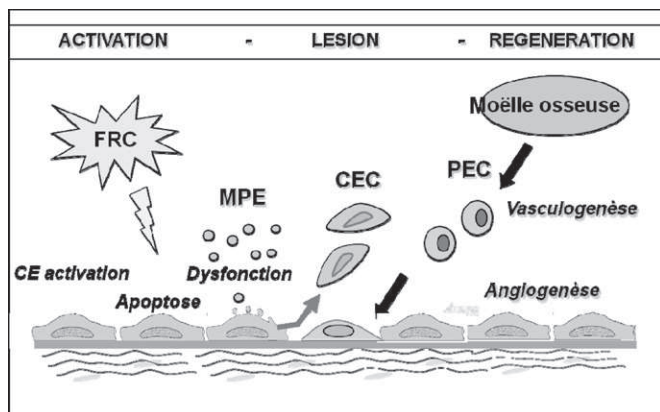


Fig. 1. Les lésions d'origine mécanique ou l'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire (FRC) altèrent les fonctions régulatrices de l'endothélium qui progresse vers la dysfonction et la mort par apoptose. La rupture de l'intégrité de l'endothélium est associée à un large spectre de réponses incluant le détachement de cellules endothéliales matures (CEC) et la libération de microparticules endothéliales (MPE). En réponse à la lésion, les progéniteurs endothéliaux (PEC), recrutés à partir de la moelle osseuse, sont capables de se différencier en cellules matures et de restaurer l'intégrité endothéliale. Ces réponses endothéliales peuvent être intégrées dans une triade dynamique « activation/lésion/régénération ».

plus de 500 patients coronariens, suivis pendant 12 mois, démontre que le taux cumulé de survie sans événements cardiovasculaires majeurs augmente avec le niveau basal des cellules circulantes 34+/KDR+ [46]. Néanmoins cette étude demeure controversée en raison du manque de spécificité de la méthode de détection des PEC utilisée. La signification pronostique des PEC reste donc à démontrer de manière plus rigoureuse. Plus récemment, Fadini et al. ont rapporté l'intérêt de la numération des cellules CD34+ circulantes dans l'identification du risque vasculaire chez des patients présentant un syndrome métabolique [47]. Ainsi, la réparation vasculaire dépendante des PEC apparaît comme un mécanisme de protection capable de contrebalancer l'impact des facteurs de risque cardiovasculaire, de limiter l'évolution clinique de l'athérosclérose et finalement de déterminer le risque cardiovasculaire.

Fig. 1.

7. Lésion versus régénération de l'endothélium : vers une définition de la vasculocompétence

Les dommages subis par l'endothélium et la capacité endogène de réparation peuvent être intégrés dans un phénotype endothélial qui est la résultante de ces deux processus. Ce phénotype endothélial caractérise un état ou statut vasculaire que l'on peut, à l'échelle individuelle, définir comme une « compétence vasculaire » et apprécier de manière originale et non invasive par la mesure combinée des CEC, MPE et PEC (Fig. 2). Des données récentes de la littérature suggèrent l'intérêt d'une telle stratégie « multi-marqueurs » pour identifier les patients à risque vasculaire et leur réponse au traitement.

À l'état physiologique, l'endothélium est un organe caractérisé par une remarquable quiescence et un renouvellement extrêmement lent [48]. Cette quiescence se traduit par la présence dans la circulation périphérique de sujets sains de quantités très faibles de CEC, MPE et PEC. De plus, quelques données suggèrent la participation des MPE à certaines fonctions physiologiques de l'endothélium comme le maintien d'une activité anticoagulante [28] ou l'élimination de signaux pro-apoptotiques favorisant la survie cellulaire [49].

Si le niveau de base des CEC, MPE et PEC représente l'état de l'endothélium en situation normale, un déséquilibre de cette

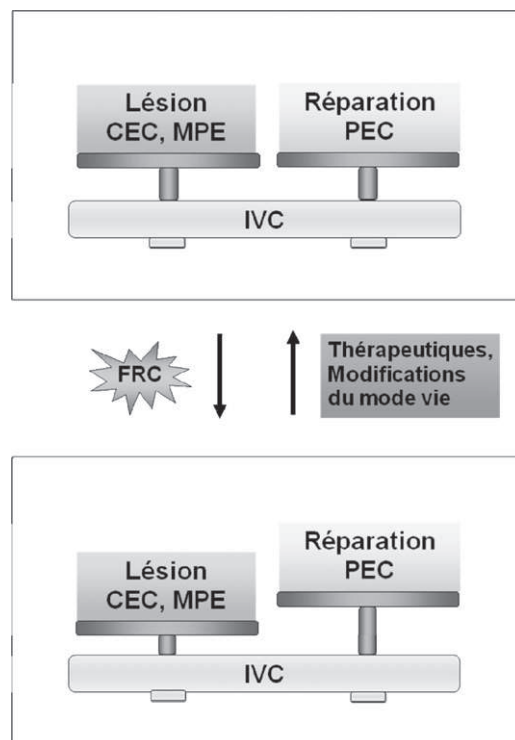


Fig. 2. L'équilibre entre les lésions de l'endothélium, reflétées par les cellules endothéliales circulantes (CEC), les microparticules endothéliales (MPE) et la capacité de réparation endogène, attestée par les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), conditionne l'intégrité de l'endothélium.

Le résultat net de cet équilibre caractérise un phénotype endothélial que l'on peut définir à l'échelle individuelle comme la « vasculocompétence » (IVC : index de vasculocompétence). L'exploration de cette compétence vasculaire par des stratégies « multi-marqueurs » combinant CEC, MPE et PEC est une approche prometteuse pour apprécier l'impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur la progression de la maladie. Elle offre également des outils innovants pour l'évaluation et le suivi de stratégies thérapeutiques ou de modifications du mode de vie visant à limiter les lésions et/ou à renforcer les mécanismes de régénération de l'endothélium.

balance oriente vers l'existence d'un processus délétère affectant l'endothélium. Il est maintenant établi que l'élévation des CEC et des MPE corrèle avec l'intensité ou l'étendue des lésions vasculaires. De plus, l'analyse phénotypique de ces marqueurs peut apporter des indications sur les mécanismes ou l'étiologie des lésions. Par exemple, les MPE CD62E+ sont principalement libérées lors d'une activation pro-inflammatoire tandis que les MPE CD144+ seraient la résultante d'une apoptose ou des dommages structuraux [32,50]. De même, les CEC surexpriment des molécules d'adhérence pour les leucocytes dans les pathologies inflammatoires comme la drépanocytose [51], alors qu'elles ont un phénotype évocateur d'apoptose ou de nécrose endothéliale chez les patients lupiques.

En situation aiguë, comme l'ischémie-reperfusion, ou une stimulation pro-inflammatoire, l'élévation des MPE et des CEC est associée à une augmentation transitoire du nombre des PEC circulants. Ce profil de biomarqueurs traduit l'existence d'un mécanisme de réparation compensatoire pouvant s'inscrire dans une réponse physiologique ou vasculocompétence visant à rétablir l'intégrité endothéliale. En faveur de cette hypothèse, cette mobilisation des PEC, au cours de l'ischémie myocardique ou cérébrale, a été associée à un pronostic fonctionnel favorable. À l'inverse, une réponse régénérative insuffisante, associée ou non à une élévation persistante des marqueurs de lésions, suggère une réponse inadaptée de l'endothélium ou « vasculo-incompétence » conduisant à un état pathologique à risque vasculaire. Une étude, menée chez des patients subissant une angioplastie coronaire avec implantation de stent, a montré [52] une élévation simultanée des CEC et des

PEC au décours de la procédure. L'amplitude de mobilisation était inversement corrélée à l'étendue de la lésion reflétée par les CEC. Cela suggère que des dommages endothéliaux importants associés à une réparation endothéliale insuffisante pourraient permettre d'identifier des patients à risque de complications post-procédure.

À l'inverse des situations aiguës, les lésions endothéliales résultant de l'exposition chronique à des stimuli pathogènes sont associées à une réduction en précurseurs efficaces pour la réparation. Ce déséquilibre, objectif par une augmentation des MPE et/ou CEC associée à une réduction du nombre et/ou de la fonctionnalité des PEC, met en évidence un déficit de réparation compensatoire qui contribue au développement et à la progression de l'athérosclérose. Comme illustré récemment chez des patients présentant une insuffisance ventriculaire gauche post-ischémique, ou chez des patients dyslipidémiques, un index vasculaire combinant la mesure des PEC et des marqueurs de lésion tel que les MPE, offre une meilleure appréciation du risque vasculaire en évaluant les deux composantes de la dysfonction endothéliale [53,54].

Malgré ces résultats prometteurs, l'intégration en pratique clinique des stratégies « multi-marqueurs » basées sur les CEC, les MPE et les PEC n'en est encore qu'à ses débuts. Si l'on a pu montrer l'association entre ces marqueurs et le risque vasculaire, un véritable lien de causalité reste à démontrer expérimentalement. Par ailleurs, une meilleure connaissance des processus de réparation et de lésion endothéliale doit permettre de définir plus précisément la relation entre les CEC, les MPE et les PEC en conditions pathologiques. In vitro les MPE sont capables de moduler de l'activité angiogénique des PEC [29]. De plus, in vivo la production de MPE par les tissus ischémiques stimule le recrutement et la différenciation des PEC [55]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces connexions restent à préciser, néanmoins ces données suggèrent que les MPE pourraient constituer un signal endogène stimulant les processus de réparation dépendant des PEC. De plus, les variations physiologiques avec des paramètres tels que l'âge, le sexe ou le rythme circadien doivent être définis dans des cohortes de sujets sains. Enfin, la standardisation des méthodologies disponibles est aussi une étape cruciale pour une définition complète de la signification clinique de ces marqueurs.

8. Conclusion

La possibilité d'explorer l'endothélium de manière non invasive a ouvert la voie à une nouvelle compréhension de la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, définie par un déséquilibre entre lésion de l'endothélium et sa capacité de réparation. Dans le futur, des approches multi-marqueurs combinant la mesure des CEC, des MPE et des PEC seront utiles pour une approche globale de la « vasculocompétence ». En clinique, ces marqueurs cellulaires fourniront certainement des nouveaux outils pour détecter la dysfonction endothéliale à des stades précoces, mais aussi pour évaluer le risque vasculaire à des stades plus avancés des désordres athérotrombotiques et pour déterminer des options thérapeutiques. En effet, des stratégies thérapeutiques efficaces pour améliorer la fonction endothéliale pourraient cibler sélectivement une réduction de la lésion endothéliale ou promouvoir les mécanismes de régénération. Au niveau individuel, de telles options thérapeutiques peuvent intégrer non seulement le mécanisme prédominant mais aussi les prédispositions génétiques et les facteurs de risque environnementaux. D'importantes avancées dans le monitoring des certaines pathologies et des options thérapeutiques nouvelles émergeront certainement de ce domaine en plein essor.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- [1] Landmesser U, Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007;22:316-20.
- [2] Goligorsky MS. Clinical assessment of endothelial dysfunction: combine and rule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:617-24.
- [3] Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009;13:454-71.
- [4] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- [5] Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104:93-102.
- [6] George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 1992;67:147-53.
- [7] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- [8] Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowiecny PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:936-42.
- [9] George F, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Lequeux N, et al. Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 1991;139:65-75.
- [10] Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, et al. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 2006;6:671-7.
- [11] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005;93:228-35.
- [12] Rowand JL, Martin G, Doyle GV, Miller MC, Pierce MS, Connelly MC, et al. Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas. *Cytometry A* 2007;71:105-13.
- [13] Widemann A, Sabatier F, Arnaud L, Bonello L, Al-Massarani G, Paganelli F, et al. CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2008;8:869-76 [see comment].
- [14] Vrolijk L, Yuana Y, Schuurhuis GJ, van Hinsbergh VW, Gundy C, de Haas R, et al. VEGFR2 expressing circulating (progenitor) cell populations in volunteers and cancer patients. *Thromb Haemost* 2007;98:440-50.
- [15] Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost* 2006;96:45-52.
- [16] Jacques N, Vimond N, Conforti R, Griscelli F, Lecluse Y, Laplanche A, et al. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 2008;337:132-43.
- [17] Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GY. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J* 2004;25:371-6.
- [18] Nadar SK, Lip GY, Lee KW, Blann AD. Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2005;94:707-12.
- [19] Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood* 2004;103:3677-83.
- [20] Bull TM, Golpon H, Heibel RP, Solovey A, Cool CD, Tuder RM, et al. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 2003;90:698-703.
- [21] Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 2003;361:206-10 [see comment].
- [22] Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israel-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, et al. Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation* 2009;119:374-81.
- [23] Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594-604.
- [24] Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Heibel RP, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004;103:4545-53.
- [25] Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102:2678-83.
- [26] Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atheros-

- lerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348–53.
- [27] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841–3.
- [28] Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005;105:1515–22.
- [29] Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110:2432–9.
- [30] Freyssinet JM, Dignat-George F. More on: measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2005;3:613–4 [comment].
- [31] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2:1842–51 [comment].
- [32] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1622–30.
- [33] Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 2006;4:1296–302.
- [34] Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1910–5.
- [35] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
- [36] Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572–9.
- [37] Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatizadeh MR, et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 2007;35:1109–18 [see comment].
- [38] Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007;109:1801–9 [see comment].
- [39] Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008;197:496–503.
- [40] George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 2006;12:331–5.
- [41] Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 2007;21:1141–9.
- [42] Xiao Q, Kiechl S, Patel S, Oberhollenzer F, Wegeser S, Mayr A, et al. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis: results from a large population-based study. *PLoS ONE* 2007;2:e975.
- [43] Geft D, Schwartzberg S, George J. Circulating endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:1115–21.
- [44] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600 [see comment]. Reprint in *Can J Cardiol* 2004;20(Suppl. B):44B–48B; PMID: 15309205.
- [45] Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, et al. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2007;102:565–71.
- [46] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [see comment]. *N Engl J Med* 2005;353:999–1007 [see comment].
- [47] Fadini GP, Albiero M, Boscaro E, Agostini C, Avogaro A. Endothelial progenitor cells as resident accessory cells for post-ischemic angiogenesis. *Atherosclerosis* 2009;204:20–2.
- [48] Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1728–30.
- [49] Abid Hussein MN, Boing AN, Biro E, Hoek FJ, Vogel GM, Meuleman DG, et al. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res* 2008;121:865–71.
- [50] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;109:175–80.
- [51] Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Heibel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001;97:1937–41.
- [52] Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:979–81 [see comments].
- [53] Bulut D, Maier K, Bulut-Streich N, Borgel J, Hanefeld C, Muge A. Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 2008;14:336–40.
- [54] Pirro M, Schillaci G, Paltriccina R, Bagaglia F, Menecali C, Mannarino MR, et al. Increased ratio of CD31+/CD42– microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2530–5.
- [55] Leroyer AS, Ebrahimiyan TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009;119:2808–17.
- [56] Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999;93:2951–8 [see comments].
- [57] Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard JB, Mutin M, Bonnet JL, et al. Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;110:1586–91.
- [58] Lee KW, Blann AD, Lip GY. Plasma markers of endothelial damage/dysfunction, inflammation and thrombogenesis in relation to TIMI risk stratification in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2005;94:1077–83.
- [59] Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation* 2004;110:1794–8.
- [60] McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, et al. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1c). *Diabetologia* 2005;48:345–50 [see comments].
- [61] Koc M, Richards HB, Bihorac A, Ross EA, Schold JD, Segal MS. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2005;67:1078–83.
- [62] Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta* 2006;373:17–26.
- [63] Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Heibel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997;337:1584–90 [see comments].
- [64] Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, et al. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:1–4.
- [65] Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundou A, et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:2360–7.
- [66] Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;103:3603–5.
- [67] Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1296–304.
- [68] Grefte A, van der Giessen M, van Son W, The TH. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 1993;167:270–7.
- [69] George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, et al. Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 1993;82:2109–16 [see comments].
- [70] Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004;10:145–7 [see comment]. Erratum appears in *Nat Med* 2004;10(6):649.
- [71] Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003;145:962–70.
- [72] Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003;41:211–7 [see comment].
- [73] Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1268–75 [see comment].
- [74] Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840–5.
- [75] Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Bodaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3381–8.
- [76] Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* 2004;110:3599–603 [see comment].
- [77] Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiro R, Sardelli L, Misso L, et al. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3676–9.
- [78] Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004;125:804–13.
- [79] Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the throm-

- botic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004;91:667-73 [see comment].
- [80] Brogan PA, Shah V, Brachet C, Harnden A, Mant D, Klein N, et al. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum* 2004;50:927-36.
- [81] Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *J Vasc Res* 2005;42:199-206.
- [82] Lev EI, Kleiman NS, Birnbaum Y, Harris D, Korbling M, Estrov Z. Circulating endothelial progenitor cells and coronary collaterals in patients with non-ST segment elevation myocardial infarction. *J Vasc Res* 2005;42:408-14.
- [83] Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, et al. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation* 2006;114:1114-9.
- [84] Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 2005;26:1196-204 [see comment].
- [85] George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004;25:1003-8 [see comment].
- [86] Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007;38:2759-64.
- [87] Lemoli RM, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 2006;24:2817-25.
- [88] Inoue T, Sata M, Hikichi Y, Sohma R, Fukuda D, Uchida T, et al. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation* 2007;115:553-61 [see comment].
- [89] Spiel AO, Mayr FB, Leitner JM, Firbas C, Sieghart W, Jilma B. Simvastatin and rosuvastatin mobilize Endothelial Progenitor Cells but do not prevent their acute decrease during systemic inflammation. *Thromb Res* 2008;123:108-13 [see comment].
- [90] Park KW, Hwang KK, Cho HJ, Hur J, Yang HM, Yoon CH, et al. Simvastatin enhances endothelial differentiation of peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic patients and induces pro-angiogenic cytokine IL-8 secretion from monocytes. *Clin Chim Acta* 2008;388:156-66.
- [91] Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005;111:2356-63 [see comment].
- [92] Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE, Mersin N, Meneveau N, Penfornis A, et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long-term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2007;562:111-8.
- [93] Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int* 2003;64:1648-52.
- [94] Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:135-41.
- [95] Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005;181:305-10.
- [96] Walther C, Adams V, Bothur I, Drechsler K, Fikenzer S, Sonnabend M, et al. Increasing physical education in high school students: effects on concentration of circulating endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:416-22.
- [97] Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220-6.
- [98] Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107:133-8.
- [99] Igreja C, Courinha M, Cachaco AS, Pereira T, Cabecadas J, da Silva MG, et al. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients. *Haematologica* 2007;92:469-77 [see comment].
- [100] Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 2006;313:1785-7.
- [101] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1-7.
- [102] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111:2981-7.
- [103] Wang HY, Gao PJ, Ji KD, Shen WF, Fan CL, Lu L, et al. Circulating endothelial progenitor cells C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. *Hypertens Res Clin Exp* 2007;30:133-41.
- [104] Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004;109:2972-5.
- [105] Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, Junzhu C. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2008;102:1073-9.
- [106] Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008;117:3020-30.
- [107] Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol* 2007;119:344-8.
- [108] Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, Aicher A, Honold J, Fischer-Rasokat U, et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2341-9 [see comment].
- [109] Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:1209-12.
- [110] George J, Herz I, Goldstein E, Abashidze S, Deutch V, Finkelstein A, et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e57-60.
- [111] Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, Tomobuchi Y, Kubo T, Hano T, et al. The effect of senescence of endothelial progenitor cells on in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting. *Intern Med* 2006;45:581-7.
- [112] Egan CG, Lavery R, Caporali F, Fondelli C, Laghi-Pasini F, Dotta F, et al. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1296-305.
- [113] Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007;56:666-74.
- [114] Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, et al. Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci* 2006;102:96-102.
- [115] Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1449-57 [see comment].
- [116] Loomans CJ, de Koning EJ, Staaf FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:195-9.
- [117] Pirro M, Schillaci G, Menecali C, Bagaglia F, Paltriccia R, Vaudo G, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens* 2007;25:2093-9.
- [118] Oliveras A, Soler MJ, Martinez-Estrada OM, Vazquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Human Hypertens* 2008;22:183-90.
- [119] Schlieper G, Hristov M, Brandenburg V, Kruger T, Westenfeld R, Mahnken AH, et al. Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2611-8.
- [120] Chan CT, Li SH, Verma S. Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of impaired endothelial progenitor cell biology in end-stage renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F679-84.
- [121] de Groot K, Bahlmann FH, Bahlmann E, Menne J, Haller H, Fliser D. Kidney graft function determines endothelial progenitor cell number in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005;79:941-5.
- [122] Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1246-52.
- [123] Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolemia. *Clin Sci* 2004;107:273-80.
- [124] Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006;187:423-32.
- [125] Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1442-7.
- [126] Tao J, Wang Y, Yang Z, Tu C, Xu MG, Wang JM. Circulating endothelial progenitor cell deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age. *J Human Hypertens* 2006;20:490-5 [see comment].
- [127] Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007;102:847-52 [see comment].
- [128] Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Arch Med Res* 2006;37:484-9.

ORIGINAL ARTICLE

Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?

S. ROBERT,* P. PONCELET,† R. LACROIX,* ‡ L. ARNAUD,‡ L. GIRAUDO,‡ A. HAUCHARD,† J. SAMPOL* ‡ and F. DIGNAT-GEORGE* ‡

*Unité Mixte de Recherche S 608 (UMR-S 608), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de la Méditerranée, Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Pharmacie, Marseille, France; †Biocytex, Marseille, France; and ‡Laboratoire d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France

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

Summary. *Background:* Platelet microparticles (PMPs) have proved useful to identify patients with vascular risk. However, PMP counting, which is currently done by flow cytometry (FCM), needs to be standardized. *Objectives:* The objectives were (i) to standardize FCM settings for PMP counts on a routine instrument (Cytomics FC500) using size-calibrated fluorescent beads; (ii) to determine intra-instrument and interinstrument reproducibility; and (iii) to establish PMP values in healthy subjects. *Methods:* Using a blend of size-calibrated fluorescent beads (0.5 and 0.9 μm) in a fixed numerical ratio (Megamix), we gated PMPs in a restricted size window. To test intra-instrument and inter-instrument reproducibility, annexin V and CD41 coexpression were used to count PMPs in frozen aliquots of the same platelet-free plasma (PFP) over 4 months and in PFP from 10 healthy subjects on three independent flow cytometers. *Results:* This calibrated-bead strategy allowed full long-term control of the FCM-based microparticle protocol and reproducible PMP counts over time [coefficient of variation (CV) < 10%]. Optimal settings were easily transferred from one instrument to another, using Megamix as a stable template. Similar PMP counts (CV < 12%) were obtained using the three instruments. With such a standardized FCM protocol, PMP values were established in healthy subjects ($n = 60$) with significantly higher levels in women than in men [median (1st quartile to 3rd quartile): $1775 \mu\text{L}^{-1}$ ($1014\text{--}3039 \mu\text{L}^{-1}$) vs. $656 \mu\text{L}^{-1}$ ($407\text{--}962 \mu\text{L}^{-1}$)]. *Conclusions:* The present strategy provides a new

option for PMP count standardization and thus opens the way for multicenter studies.

Keywords: beads, flow cytometry, megamix, microparticles, standardization.

Introduction

Platelet microparticles (PMPs) are submicrometer fragments resulting from the remodeling of the platelet membrane in response to numerous conditions, including activation and apoptosis [1]. Microparticles (MPs) from different cell types are found in human plasma and, in healthy subjects, PMPs are believed to represent the major population of circulating MPs [2,3]. PMP levels are increased in several prothrombotic and inflammatory disorders, including cardiovascular diseases, autoimmune and infectious diseases, and cancer [4–14]. In these clinical settings, PMP counts have proved useful for identifying patients with vascular risk and for monitoring response to treatment [7]. However, their clinical use is not fully established, because standardized methodologies for PMP counting are lacking.

Flow cytometry (FCM) is the most commonly used method for MP analysis, due to its ability to distinguish the cellular origin of MPs by specific antibodies. However, the data on PMP analysis by FCM are difficult to compare, because FCM protocols are heterogeneous in terms of instrument settings and resolution. As an illustration, PMP values for healthy individuals vary from 100 to $4000 \times 10^3 \text{ PMPs mL}^{-1}$ in the literature [2,15–20].

The working definition of blood-derived PMPs is based on several criteria: (i) rapid centrifugation of platelet-poor plasma to deplete small platelets and cell debris; (ii) expression of specific antigens such as glycoprotein (GP)IIb/IIIa or GPIb with or without phosphatidylserine expression; and (iii) size from 0.1 to 1 μm . However, this working definition is debated.

Correspondence: Stephane Robert, UMR-S 608 INSERM F-Marseille, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, F-Marseille, France.

Tel.: +33 4 91835600; fax: +33 4 91835602.

E-mail: stephane.robert@pharmacie.univ-mrs.fr

Received 28 May 2008, accepted 11 October 2008

In particular, the definition of MP size varies because of FCM technical constraints. The most appropriate parameter with which to analyze MP size range in FCM is forward scatter (FS). Identification of MPs on the basis of size using FS challenges the sensitivity limit of flow cytometry. Even though the last generation of digital flow cytometers have a threshold for particle detection below 500 nm [21], measurements at this level of sensitivity remain uncertain in routine practice.

In the extreme conditions required for the enumeration of submicrometer particles, the limit of resolution on FS between instrument noise and MPs depends on fine optical adjustments and both fluidics and optics cleanliness. It may thus vary with time, and it depends on maintenance for a single instrument, and therefore may differ among multiple platforms. Tools and strategies are therefore needed to manage the lowest size-related FS limit allowing reliable MP counting.

The objectives of the present study were: (i) to standardize FCM settings for PMP counts on a routine instrument (Cytomics FC500) using size-calibrated fluorescent beads; (ii) to determine intra-instrument and inter-instrument reproducibility; and (iii) to establish PMP values in healthy subjects.

Materials and methods

Blood samples

After clean puncture of an antecubital vein with a 21 gauge needle, venous blood was drawn (first 3 mL not kept) without applying venostasis. Blood from healthy donors ($n = 60$, 44 ± 18 years old, sex ratio = 1) who had not taken any drugs affecting platelet function was collected into 0.129 mol L^{-1} sodium citrate Vacutainer[®] tubes (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA). Samples were drawn between 9 and 11 a.m. and processed between 2 and 4 h postdrawing. On one occasion, 500 mL of plasma was obtained from a patient through plasmapheresis. In addition, aliquots of 44 frozen samples prepared the same way during a previous study on diabetes [22] were also available for analysis. Both patients and healthy donors provided written informed consent.

MP preparation and labeling

Platelet-free plasma (PFP) samples were prepared as previously described [22], using serial centrifugations (15 min at $1500 \times g$, 2 min at $13\,000 \times g$), frozen in 1.5-mL tubes as 500- μL aliquots, and stored at -80°C until use.

For PMP labeling, 10 μL of CD41-phycoerythrin (PE) ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$ IgG₁, clone PL2-49, BioCytex, Marseille, France) and 10 μL of annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) prediluted 1 : 2 in binding buffer (rh annexin V-FITC kit, AbCys, Paris, France) were added to 30 μL of freshly thawed PFP. After 30 min of incubation at room temperature, samples were diluted in 500 μL of annexin V kit binding buffer (AbCys). Concentration-matched isotype antibodies (IgG₁-PE, $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ IgG₁, clone 2DNP-2H11, BioCytex) or Annexin

V-FITC with phosphate-buffered saline without calcium were used as controls.

For control experiments, PFPs from 10 healthy volunteers were prepared as described above. PMPs were analyzed as annexin V-FITC/CD41-PE-positive events in the MP region. PFPs were then ultracentrifuged at $70\,000 \times g$ for 90 min, and PMPs remaining in the supernatants were counted according to the same procedure.

Flow cytometric analysis

Analyses were performed on three Cytomics FC500 flow cytometers (Beckman-Coulter, Villepinte, France), each in a different laboratory. To limit background noise from dust and crystals, all three instruments were operated using a 0.22 μm -filtered sheath fluid (IsoflowTM; Beckman-Coulter). CXP ACQUISITION and CXP ANALYSIS software packages (Beckman-Coulter) were used for data acquisition and analysis, respectively.

Standardization of the 'PMP protocol' was achieved using a blend of monodisperse fluorescent beads (Megamix, BioCytex) of three diameters (0.5, 0.9 and 3 μm). FS and side scatter (SS) parameters were plotted on logarithmic scales to best cover a wide size range. Single staining controls were used to check fluorescence compensation settings and to set up positive regions. PMPs were here defined as dual-positive Phosphatidylserin (PS)+/CD41+ events, as seen in dual-color fluorescence plots after staining with annexin V-FITC and CD41-PE. Thirty microliters of counting beads with an established concentration close to $1000 \text{ beads } \mu\text{L}^{-1}$ (Flow CountTM Fluorospheres; Beckman-Coulter) was added to each sample in order to express MP counts as absolute numbers per microliter of PFP [22].

Intra-instrument and inter-instrument reproducibility

'Control' PFP was prepared from a plasmapheresis bag and frozen as multiple 500- μL aliquots. Over a 4-month period, 21 aliquots were tested for PMP counts on the same instrument.

For inter-instrument reproducibility, 10 PFPs from healthy subjects were tested on three closely located FC500 instruments, similarly set up for MP analysis with Megamix as detailed in Results. Samples were first stained for PMP in appropriate amounts, and then split and analyzed on each cytometer with a delay not exceeding 2 h from the end of staining.

Statistical analysis

For statistical analysis, all data were analyzed with GRAPH PAD PRISM software v.4.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For reproducibility studies, data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The coefficient of variation (CV, %) was calculated as $100 \times \text{SD}/\text{mean}$. Grubb's test was applied to detect outliers in the dataset of intra-instrument reproducibility.

For normal PMP values, the descriptive statistical parameters were median (first quartile to third quartile) rather than mean and SD, because of the presence of out-of-range values. To test for a statistical difference between values from men and women (two independent datasets), a Mann–Whitney test was used.

Results

Definition of the instrument FS resolution limit

The intrinsic resolution limit in FS was tested on our instruments by very homogeneous (so-called ‘monodisperse’) fluorescent beads of various diameters, namely 0.3, 0.5, 0.9 and 3 μm . Acquisition was first operated with a discriminator set on FL1 fluorescence, in order to avoid the background coming from all non-fluorescent particles. High gain settings were selected for the analysis of submicrometer particles, as illustrated by the position of the 3 μm bead in the last log decade (Fig. 1). In these conditions, the instrument provided sharp FS distributions for 0.9 and 3 μm microbeads, and a wide gap between the 0.5 and 0.9 μm bead peaks. The obvious overlap between the 0.3 and 0.5 μm bead histograms indicated that the instrument would not be able to reliably discriminate and individually count submicrometer particles with diameters between 0.3 and 0.5 μm and, therefore, particles with lower scatter signal levels. Consequently, to reproducibly define the instrument FS resolution limit, the 0.3 μm bead was excluded from our standardized bead suspension; the smallest subset of Megamix was the 0.5 μm bead, and a method to reproducibly begin the analysis at this nominal diameter was designed.

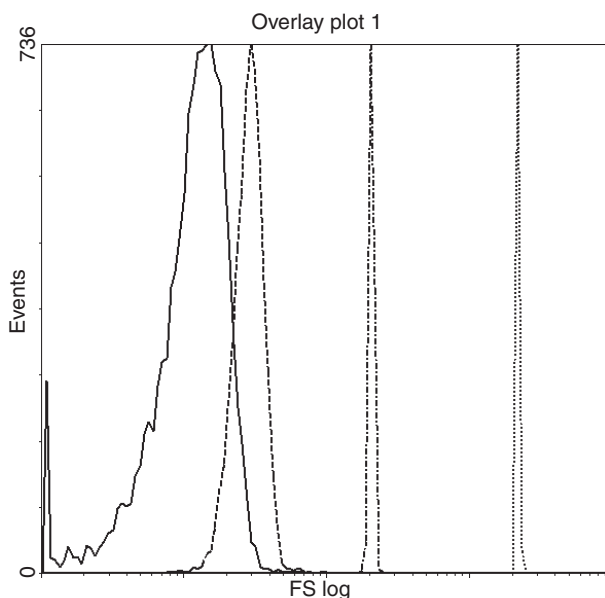


Fig. 1. Forward scatter (FS) resolution testing. Fluorescent beads with various nominal diameters (0.3, 0.5, 0.9 and 3 μm) were analyzed in FS using a fluorescence-based discriminator. The corresponding histograms are shown here superimposed from left to right respectively.

Standardization of an FCM-based protocol for PMP analysis using calibrated beads

The standardization protocol was set up as detailed in Table 1.

(1) First step: bead detection.

Megamix beads were detected and gated using FL1 and SS parameters (with FL1 as triggering signal) (Fig. 2A). The FS histogram of the distribution of the 0.5 μm and 0.9 μm beads (included in the targeted size range) was then built (Fig. 2B).

(2) Second step: definition of a size-related MP window.

(a) To define the lower limit of the MP size window, the discriminator was switched to FS. Then, this parameter was set up as follows. The numerical ratio between beads being well defined (2 : 1, 0.5 μm /0.9 μm beads respectively), any change of sensitivity during the set-up process was easily monitored using the 0.5 μm bead peak percentage (Fig. 2B). This percentage could vary from 0% to 66% (0.5 μm bead/0.9 μm bead ratio 2 : 1), depending on FS sensitivity, without any modification of the 0.9 μm bead peak. Thus, this last bead subset was used as an internal reference. Settings showing 50% of 0.5 μm beads were chosen because the 0.5 μm bead distribution was cut at its median level and therefore at the nominal diameter of the beads. This threshold level was selected as the lower limit for MP analysis (Fig. 2C).

(b) The upper limit of the MP window was defined by the envelope of the 0.9 μm beads, automatically drawn using the ‘autogate’ function in the CXP software (Fig. 2C). This limit is close to 1 μm , as checked with 1 μm beads (data not shown).

(3) Third step: biological validation of the MP protocol.

To validate our choice of the 0.5- μm cut-off, the effect of changing FS settings on PMP counts was evaluated. The same double-labeled CD41-PE/annexin V-FITC PFP sample was analyzed in eight conditions, involving 0.5 μm bead

Table 1 Flow chart for flow cytometry platelet microparticle protocol construction

First step

- Run Megamix beads with discriminator on FL1
- Gate each individual bead subset on SS \times FL1 cytogram (Fig. 2A)
- Build FS histogram for 0.5 and 0.9 μm beads (Fig. 2B)

Second step

- Run Megamix beads with discriminator on FS
- Monitor percentage of 0.5 μm beads (left peak) and optimize FS settings to approach 50% as in Fig. 2B
- Visualize SS \times FS cytogram (Fig. 5A). Create/actualize an elliptical autogate on 0.9 μm beads. Set up the MP gate to tangent the autogate

Final step

- Run plasma sample stained with annexin V-FITC/CD41-PE
- Condition FL1 \times FL2 cytogram on the MP gate (Fig. 3) and measure PMP counts

SS, side scatter; FS, forward scatter; MP, microparticle; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PMP, platelet microparticle.

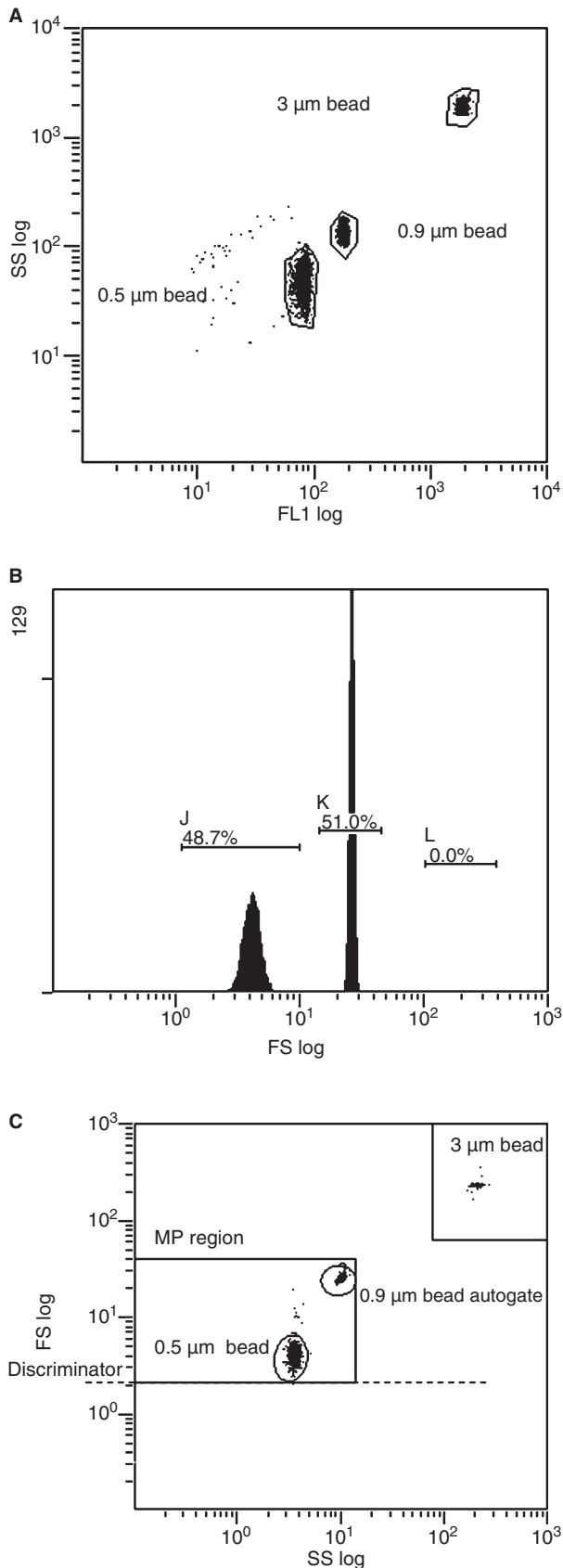


Fig. 2. Construction of microparticles Flow cytometry protocol. (A) Selection of Megamix bead subsets. To adjust forward scatter (FS) parameter, bead subsets were first recognized on the basis of their side scatter (SS) and FL1 fluorescence properties. A gate was designed to select singlet beads in each subset (e.g. 0.5, 0.9 and 3 μ m beads). (B) FS distribution of the Megamix submicrometer beads. In this bimodal histogram gated on the union of singlets from the 0.5 and 0.9 μ m beads, the percentage of 0.5 μ m beads (region 'J') varies with FS settings. The value of 48.7% shown here corresponds to a cut-off about half of the 0.5 μ m bead. It is of note that a maximal value of \sim 66% (all 0.5 μ m beads detected) may be observed when triggering the analysis on FL1 or when triggering on FS with very high sensitivity. (C) Construction of the microparticle (MP) region in the MP protocol. On an FS log \times SS log cytogram, the MP region is limited in the lower part by the FS cut-off (discriminator, shown here as a dotted line), set up using the 0.5 μ m bead percentage, and in the upper part by the 0.9 μ m bead autogate.

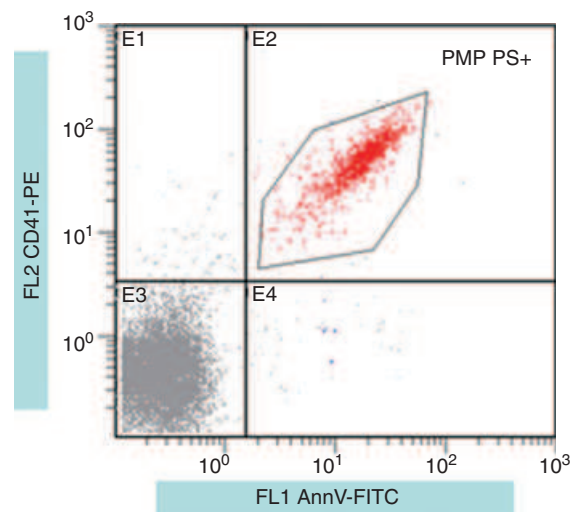


Fig. 3. Platelet microparticle (PMP) analysis in the microparticle (MP) protocol. Dual fluorescence analysis of a platelet-free plasma stained with annexin V (AnnV)-fluorescein isothiocyanate (FITC) (FL1) and anti-CD41-phycoerythrin (PE) (FL2). PS+ PMPs are represented as red dots, and background noise or other MPs as gray dots.

percentages from 2% to 66%, and PMPs were counted as illustrated in Fig. 3. Figure 4 shows that PMP counts were rather stable over a wide range of percentages (10–55%) and that they decreased only below 10%. In contrast, when very high FS sensitivity was used ($>$ 55%), PMP counts reached unexpectedly high values. In this case, the discrimination between non-specific background events and dual-stained PMPs was arbitrary, impeding standardization of PMP counts. The best compromise between optimal PMP detection and background excess was found with FS settings providing a 0.5 μ m bead percentage near 50% (48–52% accepted range). These results confirmed the choice of the 0.5 cut-off as lower limit of the MP window.

The protocol described above allowed us to focus our analysis on MPs in a reproducible size range (0.5–1 μ m). To provide evidence that measured particles are truly MPs, PMP counts in healthy subjects' PFP were compared before and after

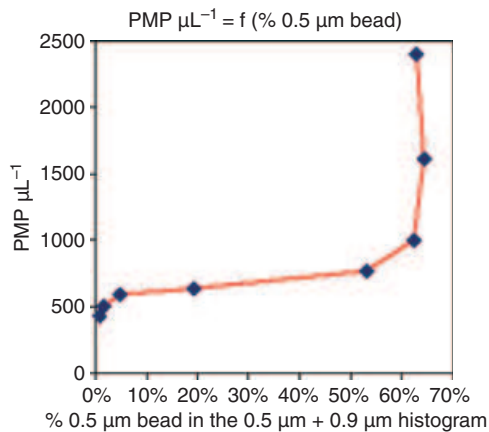


Fig. 4. Variation of platelet microparticle (PMP) counts as a function of forward scatter (FS) sensitivity. FS sensitivity is shown by the percentage of Megamix 0.5 μm beads as shown in Fig. 2B. All events passing the discriminator and falling in the PMP region shown in Fig. 3 are counted as PMPs.

ultracentrifugation ($70\,000 \times g$, 1.5 h). In these conditions, more than 95% of the MPs in the initial PFP were removed (data not shown), showing that events counted by the cytometer are specific.

Application of the standardized protocol

PMPs from over 100 plasma samples were analyzed with these standardized FS settings and MP gate [$n = 60$ healthy controls (see below), and $n > 40$ samples from diabetic patients]. As illustrated with a representative case in Fig. 5A,B, the PMP size distribution (red cloud and green histogram) was included within the MP region. Interestingly, the same kind of unimodal, Gaussian-like FS distribution was found with all tested samples ($n > 100$), obtained from both healthy donors and patients, as in each case $> 90\%$ events were included in the MP size region (as illustrated in Fig. 5B).

Intra-instrument and inter-instrument reproducibility

To test intra-instrument reproducibility, multiple aliquots of the same PFP preparation were tested for PMP counts, as described above, over a 4-month period on the same instrument, whose set-up was standardized before each test using Megamix. In total, 21 tests were carried out at regular time intervals. The mean (\pm SD) value was $335 \text{ PMPs } \mu\text{L}^{-1}$ ($\pm 33 \text{ PMPs } \mu\text{L}^{-1}$), with a CV of 9.9%. Interestingly, no outlier was detected according to Grubbs' test.

Inter-instrument reproducibility was tested after transfer of the same protocol into two other Cytomics FC500 instruments (Fig. 6).

Ten independent preparations obtained from healthy persons were tested in parallel on the three instruments. As illustrated in Table 2, similar values were obtained for each preparation on the three cytometers, with a CV ranging from 2% to 11%.

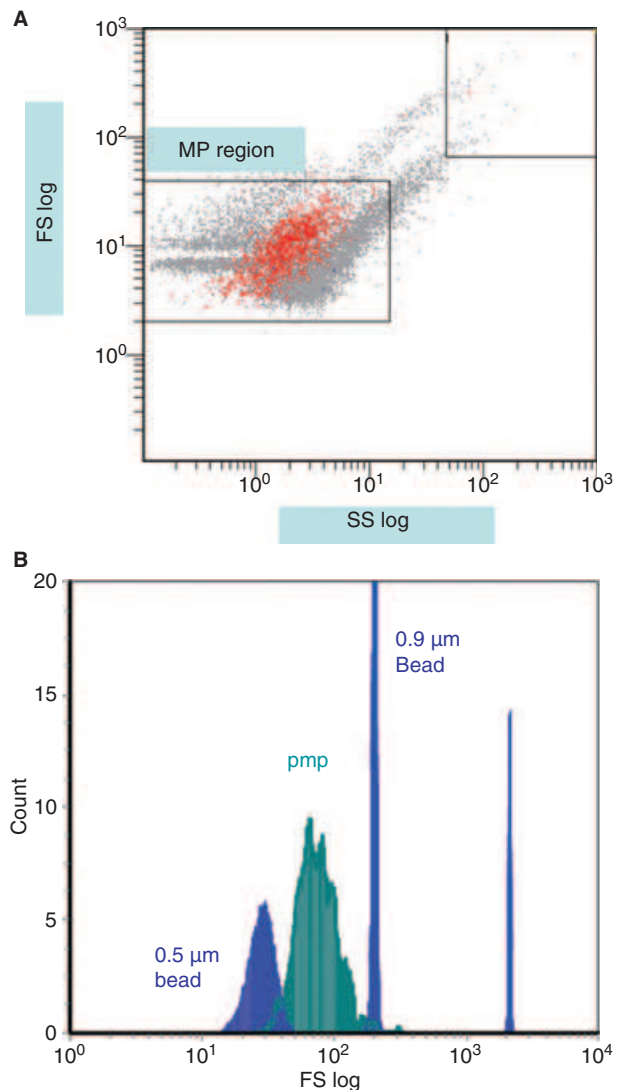


Fig. 5. PS+ platelet microparticle (PMP) size distribution. PS+ PMPs are seen in (A) as red dots among background (gray dots). Their forward scatter (FS) histogram [green curve in the middle of (B)] is shown superimposed over the histograms of Megamix beads. Most PMPs are located between the 0.5 μm peak (left blue peak) and the 0.9 μm peak (middle blue peak). MP, microparticle; SS, side scatter.

PMP values in healthy subjects

After standardization of PMP counts with Megamix beads, PMPs were determined in 60 healthy participants. The mean PMP count in the population was $1350 \pm 1089 \text{ PMPs } \mu\text{L}^{-1}$ (Fig. 7). The median (interquartile) concentration for women was significantly higher than for men [$1775 \mu\text{L}^{-1}$ ($1014 \mu\text{L}^{-1}$ first quartile to $3039 \mu\text{L}^{-1}$ third quartile) vs. $656 \mu\text{L}^{-1}$ ($407 \mu\text{L}^{-1}$ first quartile to $962 \mu\text{L}^{-1}$ third quartile)] ($P < 0.001$, Mann–Whitney test).

Discussion

This study describes a new method for counting MPs by FCM in a reliable and reproducible manner. Based on a bead

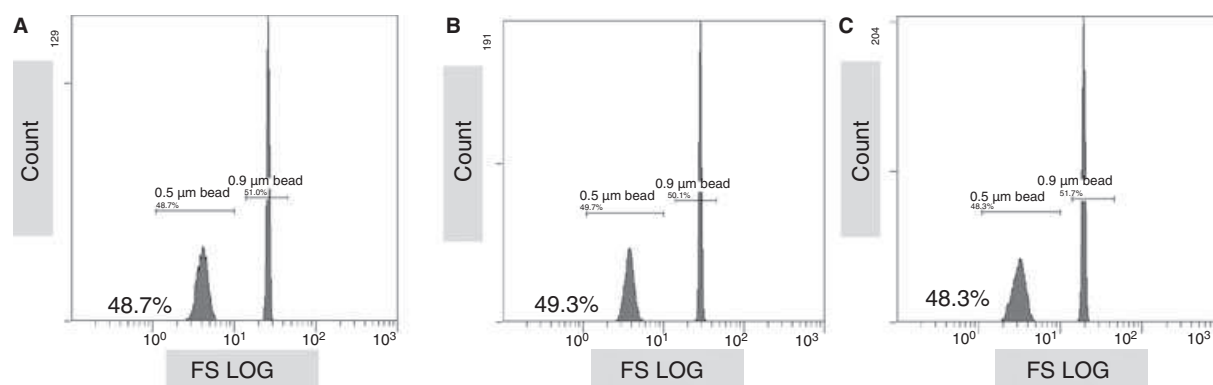


Fig. 6. Microparticle flow cytometry protocol adjustment with Megamix for inter-instrument reproducibility. The three instruments (A, B, and C) were adjusted to detect the same proportion of 0.5 μm beads among the submicrometer beads (0.5 μm percentage close to 50% in each case). FS, forward scatter.

Table 2 Interinstrument reproducibility of the standardized microparticle (MP) flow cytometry protocol

Sample	PS + PMP counts in MPs μL^{-1}			Mean	SD	CV (%)
	Instrument A	Instrument B	Instrument C			
S1	1198	1064	1320	1194	128	11
S2	1361	1260	1513	1378	127	9
S3	2360	2417	2448	2408	45	2
S4	952	884	1104	980	112	11
S5	1728	1645	1824	1732	90	5
S6	769	889	857	838	62	7
S7	923	876	963	921	43	5
S8	2846	2877	3345	3023	280	9
S9	523	484	585	531	51	10
S10	419	429	477	442	31	7

PMP, platelet microparticle; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation; PS. Ten platelet-free plasmas (PFPs) from healthy volunteers were tested simultaneously on three FC500 cytometers. PFPs were thawed, stained with annexin V–fluorescein isothiocyanate and anti-CD41–phycoerythrin, and then split into three tubes and analyzed in parallel. The three instruments were adjusted to detect the same proportion of 0.5 μm beads as shown in Fig. 5.

suspension calibrated in terms of both diameters and relative amounts, the proposed strategy ensures long-term control of instrument settings and resolution, and shows good longitudinal intra-instrument and inter-instrument reproducibility ($CV < 10\%$ and $CV < 12\%$, respectively), both conditions constituting major prerequisites for future multicenter studies.

Several strategies based on submicrometer-sized beads have been previously proposed for calibration of MP counts [14,21,23–25]. The scatter distributions, however, most often lacked the sharpness needed to provide adequate resolution and to define the lower limit of MP analysis. The large amount of background noise observed when using the highest sensitivity FS settings, which allowed inclusion in the analysis of all 0.5 μm beads (and of some 0.3 μm beads), and the overlap between these beads impede reliable counting of MPs under 0.5 μm , even using last-generation flow cytometers.

Normal values of plasmatic PS + PMP

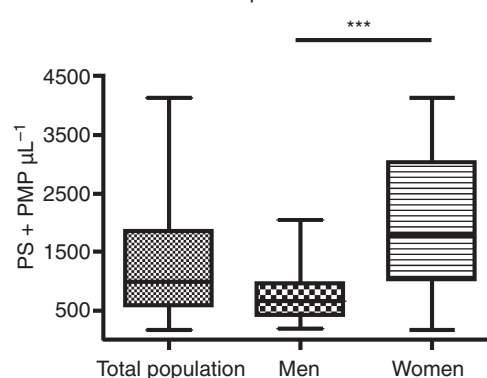


Fig. 7. Normal plasmatic platelet microparticle (PMP) values in the standardized microparticle protocol. Sixty platelet-free plasmas (PFPs) (30 men, 30 women) were tested on the same instrument, whose settings were checked with Megamix before each series. PFPs were thawed, stained with annexin V–fluorescein isothiocyanate and anti-CD41–phycoerythrin, and then immediately analyzed. ***Significant difference ($P < 0.0001$, Mann–Whitney test). PS.

The limits of PMP counting are technologically driven, as recently highlighted in the last report of ISTH Scientific and Standardization Committees (Subcommittee, Vascular Biology, 2007 minutes and annual reports, Geneva). One option to solve this problem is to focus only on MPs $\geq 0.5 \mu\text{m}$ beads. However, it is not clear whether this nominal bead diameter corresponds exactly to the same limit in terms of MP diameter. Indeed, the use of plastic beads for size calibration in FCM remains an imperfect model, especially for diameters close to the laser wavelength (0.488 μm), and it provides only a rough approximation of size for cell-derived MPs. Nevertheless, the definition of a reproducible cut-off based on bead FS signal is very useful. By using an autogate that draws a contour around the peak of 0.9 μm beads, one can delineate the size equivalent to about 1 μm without the need for 1 μm beads, which will fall partly in and partly out of the MP gate. This choice provides for a reproducible and user-independent approximation of a maximal size of 1 μm .

The strategy presented here mainly ensures that the instrument(s) will always similarly cut the theoretical MP size range, expected to range from 0.1 to 1 μm according to electron microscopy studies [26]. Thus our approach uses restricted size criteria to define circulating PMPs in order to preserve specificity while certainly sacrificing sensitivity.

Our choice of the cut-off at 0.5 μm was based on the following points. First, in the region of the curve shown in Fig. 4 where PMP counts only slightly vary with FS settings, the 50% value provided the highest PMP values while keeping the user out of the highly variable conditions (55% and over). Second, when working at the peak of the 0.5 μm bead Gaussian distribution histogram, the variations of the 0.5 μm bead percentage were the most sensitive to any fluctuation in FS settings. Third, this optimization of the settings could be easily operated in real time before each series of MP analyses, a useful feature for routine use.

The ease of use came from the specific feature of the Megamix tool, in which the two submicrometer beads were mixed in a preset numerical ratio of 2 : 1 (0.5 μm /0.9 μm ratio). The percentage of the 0.5 μm beads among the submicrometer beads provided real-time guidance to the operator for optimizing FS settings.

The standardizing potential of this approach was illustrated by the consistency of PMP counts both over time on a single apparatus and between multiple instruments of the same type (Beckman Coulter Cytomics FC500). The CV lower than 10% observed in our time-dependent reproducibility study included variations due to the fluctuations of instrument and those associated with the preanalytical step. The inter-instrument variation (CV < 12%) indicated that new-generation instruments of the same type could be used interchangeably. This is a first useful step towards multicenter studies.

Interestingly, using back-gating and colorization FCM functions, we observed that the scatter distribution of PMPs was always Gaussian-like, indicating that the size range chosen may include a large-diameter PMP subset while ignoring a lower-size one. Our observations support the concept that PMPs are composed of subsets with distinct size ranges, as previously suggested by Bode *et al.* [27]. In that study on PMPs released in the supernatant of stored platelet concentrates (PCs), the authors showed that the predominant population of PMPs analyzed by FCM was larger than 0.5 μm relative to monodisperse beads. The generation of this 'large' PMP 'subpopulation' in PCs was specifically inhibited by platelet activation inhibitors [27]. Moreover, PMPs released under collagen stimulation of platelets have been shown to be composed of at least two different populations, one with an apparent diameter from 0.4 to 0.6 μm and the other with an apparent diameter from 0.08 to 0.2 μm [28].

Thus, the size distribution of PMPs resembles a two-part floating body whose head is the only part that can be reproducibly measured using FCM, because it is above the water surface. The proportion between the (measurable) head and the (submerged) bottom remains an open

question, and will require technological improvements to be investigated.

Using this standardized method, we observed a significant difference in PMP counts between men and women. Our observation is in agreement with the recent report of gender-specific differences in circulating MPs [29], showing that women had higher PMP counts and variability along with PMP increases during the menstrual cycle, especially in the luteal phase. These differences are consistent with sex-related differences in platelet counts and estrogen dependency of proplatelet formation by megakaryocytes [30].

Besides providing additional support for hormonal control of PMP counts, these gender differences should be now considered in clinical practice. Future research directions are also to examine the effect of other covariables on PMP numbers (age, pre-menopausal/post-menopausal status, estrogen use, ethnic origin, or circadian rhythms) and to study other less prevalent microparticles (endothelial-, leukocyte- and erythrocyte-derived).

Conclusions

We propose a compromise solution to control the size-related limits of flow cytometry during MP analysis. This original calibrated-beads approach provides an appropriate strategy for standardizing FCM-based PMP counts and new options for multicenter studies, at least using a specific type of flow cytometer. The next step is now to validate this methodology on other types and brands of flow cytometer.

Acknowledgements

We thank Beckman-Coulter Company for technical support.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1180**: 1–8.
- Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, Schifferli J, Guillevin L, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 2006; **69**: 1416–23.
- Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* 2007; **137**: 36–48.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; **21**: 157–71.
- Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; **48**: 180–6.
- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; **34**: 392–401.

- 7 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 2594–604.
- 8 Galli M, Grassi A, Barbui T. Platelet-derived microvesicles in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 427–31.
- 9 Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; **96**: 188–94.
- 10 Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 334–45.
- 11 Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; **137**: 398–407.
- 12 Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet–leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma* 2001; **50**: 801–9.
- 13 Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 184–91.
- 14 Tesselaar ME, Romijn FP, Van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 520–7.
- 15 Tan KT, Tayebjee MH, Lim HS, Lip GY. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabet Med* 2005; **22**: 1657–62.
- 16 Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007; **97**: 119–23.
- 17 Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Mascardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006; **95**: 94–9.
- 18 Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006; **20**: 1–26.
- 19 Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3381–8.
- 20 van der Zee PM, Biro E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem* 2006; **52**: 657–64.
- 21 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**: 38–45.
- 22 Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; **51**: 2840–5.
- 23 Dale GL, Remenyi G, Friese P. Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2081–8.
- 24 Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1296–302.
- 25 Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004; **125**: 804–13.
- 26 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**: 3791–9.
- 27 Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood* 1991; **77**: 887–95.
- 28 Sandberg H, Bode AP, Dombrose FA, Hoehli M, Lentz BR. Expression of coagulant activity in human platelets: release of membranous vesicles providing platelet factor 1 and platelet factor 3. *Thromb Res* 1985; **39**: 63–79.
- 29 Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, Friese K, Thaler CJ. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. *Platelets* 2007; **18**: 515–21.
- 30 Segal JB, Moliterno AR. Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. *Ann Epidemiol* 2006; **16**: 123–30.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2003;145:962-970.
2. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1296-1302.
3. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol*. 2003;123:896-902.
4. Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;102:2678-2683.
5. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2004;91:667-673.
6. Brogan PA, Shah V, Brachet C, et al. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum*. 2004;50:927-936.
7. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8:2360-2367.
8. Amabile N, Heiss C, Real WM, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1268-1275.
9. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3381-3388.
10. Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation*. 2004;110:3599-3603.
11. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1622-1630.
12. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002;51:2840-2845.
13. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003;41:211-217.
14. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2004;125:804-813.
15. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, et al. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3676-3679.
16. Schulze M. Ein heizbarer objektisch und seine verwendung bei untersuchung des bluttes. *Arch Mikroskop Anat*. 1861;1:1.
17. Weed RI. Disorders of red cell membrane: history and perspectives. *Semin Hematol*. 1970;7:249-258.

18. Weed RI, LaCelle PL, Merrill ET. Erythrocyte metabolism and cellular deformability. *Vox Sang.* 1969;17:32-33.
19. Weed RI, LaCelle PL, Merrill EW. Metabolic dependence of red cell deformability. *J Clin Invest.* 1969;48:795-809.
20. Weed RI, Weiss L. The relationship of red cell fragmentation occurring within the spleen to cell destruction. *Trans Assoc Am Physicians.* 1966;79:426-438.
21. Weed RR, CF. On the relation of erythrocyte fragmentation to cellular destruction. *Blood.* 1965;26:894.
22. Michel FW. The Occurrence of Blood-Group Specific Material in the Plasma and Serum of Stored Blood. *Vox Sang.* 1964;9:471-475.
23. Cooper RA, Jandl JH. The selective and conjoint loss of red cell lipids. *J Clin Invest.* 1969;48:906-914.
24. MacDonald RMR. Assembly of phospholipid vesicles bearing sialoglycoprotein from erythrocyte membrane. *J Biol Chem.* 1975;250:9206-9214.
25. Martin FJ, MacDonald RC. Lipid vesicle-cell interactions. III. Introduction of a new antigenic determinant into erythrocyte membranes. *J Cell Biol.* 1976;70:515-526.
26. Martin FJ, MacDonald RC. Lipid vesicle-cell interactions. I. Hemagglutination and hemolysis. *J Cell Biol.* 1976;70:494-505.
27. Martin FJ, MacDonald RC. Lipid vesicle-cell interactions. II. Induction of cell fusion. *J Cell Biol.* 1976;70:506-514.
28. Bessis M, Mandon P. [Microspherulation and myelinic forms of erythrocytes. Comparative examination with the scanning and transmission electron microscope]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1972;12:443-454.
29. Bessis M, Prenant M. [Topography of spike appearance in crenated erythrocytes (echinocytes)]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1972;12:351-364.
30. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166:189-197.
31. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13:269-288.
32. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 1982;60:834-840.
33. Campbell AK, Morgan BP. Monoclonal antibodies demonstrate protection of polymorphonuclear leukocytes against complement attack. *Nature.* 1985;317:164-166.
34. Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J Immunol.* 1987;138:246-253.
35. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J.* 1991;274 (Pt 2):381-386.
36. Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994;153:3245-3255.
37. 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;99:1546-1554.
38. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem.* 1990;265:3809-3814.

39. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999;104:93-102.
40. Pierce GB, Jr., Midgley AR, Jr., Ram JS, Feldman JD. Parietal yolk sac carcinoma: clue to the histogenesis of Riechert's membrane of the mouse embryo. *Am J Pathol.* 1962;41:549-566.
41. Mao P, Molnar JJ. The fine structure and histochemistry of lean-induced renal tumors in rats. *Am J Pathol.* 1967;50:571-603.
42. Tarin D. Sequential electron microscopical study of experimental mouse skin carcinogenesis. *Int J Cancer.* 1967;2:195-211.
43. Tarin D. Fine structure of murine mammary tumours: the relationship between epithelium and connective tissue in neoplasms induced by various agents. *Br J Cancer.* 1969;23:417-425.
44. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta.* 1977;81:237-245.
45. van Blitterswijk WJ, Emmelot P, Hilkmann HA, Hilgers J, Feltkamp CA. Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumour-associated surface antigens (MLr), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL). *Int J Cancer.* 1979;23:62-70.
46. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature.* 1980;283:139-146.
47. Poste G, Nicolson GL. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:399-403.
48. Anderson HC. Mineralization by matrix vesicles. *Scan Electron Microsc.* 1984:953-964.
49. Scolding NJ, Morgan BP, Houston WA, Linington C, Campbell AK, Compston DA. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature.* 1989;339:620-622.
50. Lee TL, Lin YC, Mochitate K, Grinnell F. Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. *J Cell Sci.* 1993;105 (Pt 1):167-177.
51. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105:632-640.
52. Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993;100:943-949.
53. Pascual M, Steiger G, Sadallah S, et al. Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med.* 1994;179:889-899.
54. Aoki N, Jin-no S, Nakagawa Y, et al. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. *Endocrinology.* 2007;148:3850-3862.
55. Schecter AD, Spirn B, Rossikhina M, et al. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000;87:126-132.
56. Cramer EM, Norol F, Guichard J, et al. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood.* 1997;89:2336-2346.

57. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*. 2003;17:33-42.
58. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 2005;118:2849-2858.
59. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20:847-856.
60. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1053-1067.
61. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999;99:348-353.
62. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2857-2866.
63. Mutschler DK, Larsson AO, Basu S, Nordgren A, Eriksson MB. Effects of mechanical ventilation on platelet microparticles in bronchoalveolar lavage fluid. *Thromb Res*. 2002;108:215-220.
64. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009;119:2808-2817.
65. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, et al. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes*. 2010;59:694-701.
66. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21:157-171.
67. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009;101:439-451.
68. Davizon P, Lopez JA. Microparticles and thrombotic disease. *Curr Opin Hematol*. 2009;16:334-341.
69. Greco V, Hannus M, Eaton S. Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*. 2001;106:633-645.
70. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010.
71. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*. 1999;163:4564-4573.
72. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010.
73. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6:267-283.
74. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33:967-978.
75. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 2006;140:13-21.
76. Thery C, Boussac M, Veron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166:7309-7318.

77. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104:2761-2766.
78. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6:21-29.
79. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*. 1993;294 (Pt 1):1-14.
80. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol Chem*. 1998;379:973-986.
81. Daleke DL, Huestis WH. Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry*. 1985;24:5406-5416.
82. Seigneuret M, Devaux PF. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3751-3755.
83. Seigneuret M, Zachowski A, Hermann A, Devaux PF. Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry*. 1984;23:4271-4275.
84. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem*. 1992;267:19412-19417.
85. Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*. 2003;44:233-242.
86. Dekkers DW, Comfurius P, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry*. 1998;37:14833-14837.
87. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. 1996;87:507-517.
88. Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem*. 1997;272:18240-18244.
89. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*. 2001;86:266-275.
90. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*. 2000;2:399-406.
91. Nandi S, Ma L, Denis M, et al. ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J Lipid Res*. 2009;50:456-466.
92. Liu ML, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE, Williams KJ. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:430-435.
93. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*. 2002;99:2569-2577.

94. Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martinez MC. Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:19876-19881.
95. Tellier E, Canault M, Rebsomen L, et al. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res.* 2006;312:3969-3980.
96. Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors. *Biochemistry.* 1995;34:11625-11634.
97. Bergmeier W, Oh-Hora M, McCarl CA, Roden RC, Bray PF, Feske S. R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets. *Blood.* 2009;113:675-678.
98. Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med.* 1979;67:206-213.
99. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1636:119-128.
100. Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Fressinaud E, Toti F, Freyssinet JM, Nurden AT. Aminophospholipid exposure, microvesiculation and abnormal protein tyrosine phosphorylation in the platelets of a patient with Scott syndrome: a study using physiologic agonists and local anaesthetics. *Br J Haematol.* 1997;99:959-967.
101. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood.* 1996;87:1409-1415.
102. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol.* 1997;96:458-463.
103. Kamp D, Sieberg T, Haest CW. Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry.* 2001;40:9438-9446.
104. Freyssinet JM, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res.* 2010;125 Suppl 1:S46-48.
105. Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, et al. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2005;106:542-549.
106. Brooks MB, Catalfamo JL, Etter K, Brisbin A, Bustamante CD. Exclusion of ABCA-1 as a candidate gene for canine Scott syndrome. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1608-1610.
107. Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood.* 2002;99:4030-4038.
108. Bateman A, Finn RD, Sims PJ, Wiedmer T, Biegert A, Soding J. Phospholipid scramblases and Tubby-like proteins belong to a new superfamily of membrane tethered transcription factors. *Bioinformatics.* 2009;25:159-162.
109. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature.* 2010.
110. O'Connell DJ, Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation. *Biochemistry.* 2005;44:6361-6370.

111. 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;111:483-493.
112. Zhang Y, Gao F, Popov VL, Wen JW, Hamill OP. Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2000;523 Pt 1:117-130.
113. Cunningham CC. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol.* 1995;129:1589-1599.
114. Keller H, Rentsch P, Hagmann J. Differences in cortical actin structure and dynamics document that different types of blebs are formed by distinct mechanisms. *Exp Cell Res.* 2002;277:161-172.
115. Knowles DW, Tilley L, Mohandas N, Chasis JA. Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12969-12974.
116. Basse F, Gaffet P, Bienvenue A. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochim Biophys Acta.* 1994;1190:217-224.
117. Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, Dachary-Prigent J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res.* 1996;82:509-522.
118. Murphy WG, Moore JC, Kelton JG. Calcium-dependent cysteine protease activity in the sera of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1987;70:1683-1687.
119. Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG, Moore JC. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood.* 1992;80:2246-2251.
120. Wiedmer T, Shattil SJ, Cunningham M, Sims PJ. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry.* 1990;29:623-632.
121. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* 1993;364:685-692.
122. Raucher D, Stauffer T, Chen W, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell.* 2000;100:221-228.
123. Hyvonen M, Macias MJ, Nilges M, Oschkinat H, Saraste M, Wilmanns M. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* 1995;14:4676-4685.
124. Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature.* 1992;359:150-152.
125. Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 1999;274:34507-34510.
126. O'Toole PJ, Morrison IE, Cherry RJ. Investigations of spectrin-lipid interactions using fluoresceinphosphatidylethanolamine as a membrane probe. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1466:39-46.
127. Niggli V, Kaufmann S, Goldmann WH, Weber T, Isenberg G. Identification of functional domains in the cytoskeletal protein talin. *Eur J Biochem.* 1994;224:951-957.

128. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 2001;3:339-345.
129. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 2001;3:346-352.
130. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.* 2009;19:1875-1885.
131. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;30:111-142.
132. Siljander P, Farndale RW, Feijge MA, et al. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: Involvement of p38 MAP kinase and calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:618-627.
133. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem.* 1988;263:18205-18212.
134. Horstman LL, Jy W, Schultz DR, Mao WW, Ahn YS. Complement-mediated fragmentation and lysis of opsonized platelets: ender differences in sensitivity. *J Lab Clin Med.* 1994;123:515-525.
135. Nomura S, Imamura A, Okuno M, et al. Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. *Thromb Res.* 2000;98:257-268.
136. Untch B, Ahmad S, Jeske WP, et al. Prevalence, isotype, and functionality of antiheparin-platelet factor 4 antibodies in patients treated with heparin and clinically suspected for heparin-induced thrombocytopenia. The pathogenic role of IgG. *Thromb Res.* 2002;105:117-123.
137. Nomura S, Yanabu M, Kido H, et al. Antiplatelet autoantibody-related microparticles in patients with idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol.* 1991;62:103-107.
138. Piguet PF, Vesin C. Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice. *Eur J Haematol.* 2002;68:253-261.
139. Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood.* 2000;96:2520-2527.
140. Allan D, Thomas P, Limbrick AR. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *Biochem J.* 1980;188:881-887.
141. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion.* 2006;46:143-152.
142. Willekens FL, Werre JM, Groenen-Dopp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, de Pauw B, Bosman GJ. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol.* 2008;141:549-556.
143. Lutz HU, Liu SC, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *J Cell Biol.* 1977;73:548-560.
144. Lutz HU, Lomant AJ, McMillan P, Wehrli E. Rearrangements of integral membrane components during in vitro aging of sheep erythrocyte membranes. *J Cell Biol.* 1977;74:389-398.

145. Nomura S, Yanabu M, Kido H, et al. Significance of cytokines and CD68-positive microparticles in immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 1995;55:49-56.
146. Gauley J, Pisetsky DS. The release of microparticles by RAW 264.7 macrophage cells stimulated with TLR ligands. *J Leukoc Biol.* 2010;87:1115-1123.
147. Itakura Sumi Y, Ogura H, Tanaka H, et al. Paradoxical cytoskeleton and microparticle formation changes in monocytes and polymorphonuclear leukocytes in severe systemic inflammatory response syndrome patients. *J Trauma.* 2003;55:1125-1132.
148. Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, Gruaz L, Dayer JM, Burger D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol.* 2008;83:921-927.
149. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, Mekori YA. T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J Immunol.* 2010;185:4206-4212.
150. Szotowski B, Antoniuk S, Goldin-Lang P, et al. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2007;73:806-812.
151. Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol.* 2002;3:11.
152. Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation.* 2002;106:2372-2378.
153. Sapet C, Simoncini S, Lloriod B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood.* 2006;108:1868-1876.
154. Del Turco S, Basta G, Lazzarini G, et al. Parallel decrease of tissue factor surface exposure and increase of tissue factor microparticle release by the n-3 fatty acid docosahexaenoate in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2007;98:210-219.
155. Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost.* 2006;4:566-573.
156. Wang JM, Wang Y, Huang JY, et al. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res.* 2007;44:241-248.
157. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, et al. Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2010;104.
158. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009;7:701-709.
159. Simoncini S, Njock MS, Robert S, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res.* 2009;104:943-951.
160. Aupeix K, Toti F, Satta N, Bischoff P, Freyssinet JM. Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells. *Biochem J.* 1996;314 (Pt 3):1027-1033.
161. Ullal AJ, Pisetsky DS. The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis.* 2010;15:586-596.

162. Piguet PF, Vesin C, Da Kan C. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine*. 2002;18:222-230.
163. Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 2005;3:888-896.
164. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H, et al. Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;945:93-102.
165. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, et al. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:2184-2189.
166. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000;96:170-175.
167. Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost*. 2002;88:1033-1038.
168. Kubikova I, Konecna H, Sedo O, et al. Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin. *Cytotherapy*. 2009;11:330-340, 331 p following 340.
169. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol*. 2007;137:36-48.
170. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2594-2604.
171. Losy J, Niezgodna A, Wender M. Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions. *J Neuroimmunol*. 1999;99:169-172.
172. Schwarz M, Katagiri Y, Kotani M, et al. Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa (alphaIIb beta3, CD41/CD61). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:1002-1011.
173. George JN, Pickett EB, Saucerman S, et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest*. 1986;78:340-348.
174. Tschoepe D, Spangenberg P, Esser J, et al. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry*. 1990;11:652-656.
175. von Ahsen N, Ehrlich B, Scott CS, Riggert J, Oellerich M. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with the CD61 immunoplatelet count. *Clin Chem*. 2001;47:1858-1860.
176. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007;110:2440-2448.
177. Jin M, Drwal G, Bourgeois T, Saltz J, Wu HM. Distinct proteome features of plasma microparticles. *Proteomics*. 2005;5:1940-1952.
178. Banfi C, Brioschi M, Wait R, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics*. 2005;5:4443-4455.
179. Sander TL, Ou JS, Densmore JC, et al. Protein composition of plasminogen activator inhibitor type 1-derived endothelial microparticles. *Shock*. 2008;29:504-511.
180. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res*. 2005;4:1516-1521.

181. Miguet L, Pacaud K, Felden C, et al. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics*. 2006;6:153-171.
182. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang*. 2008;95:288-297.
183. Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost*. 2007;97:67-80.
184. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1019-1028.
185. Peterson DB, Sander T, Kaul S, et al. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics*. 2008;8:2430-2446.
186. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost*. 2009;102:711-718.
187. Choi DS, Lee JM, Park GW, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res*. 2007;6:4646-4655.
188. Alcazar O, Hawkridge AM, Collier TS, et al. Proteomics characterization of cell membrane blebs in human retinal pigment epithelium cells. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:2201-2211.
189. Smalley DM, Ley K. Plasma-derived microparticles for biomarker discovery. *Clin Lab*. 2008;54:67-79.
190. Abdullah NM, Kachman M, Walker A, et al. Microparticle surface protein are associated with experimental venous thrombosis: a preliminary study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15:201-208.
191. Ramacciotti E, Hawley AE, Wroblewski SK, et al. Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis. *Thromb Res*. 2010;125:e269-274.
192. Miguet L, Bechade G, Fornecker L, et al. Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res*. 2009;8:3346-3354.
193. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2434-2443.
194. Fourcade O, Simon MF, Viode C, et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995;80:919-927.
195. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem*. 2002;302:191-198.
196. Huber J, Vales A, Mitulovic G, et al. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:101-107.
197. Fritzscheing B, Schwer B, Kartenbeck J, Pedal A, Horejsi V, Ott M. Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol*. 2002;169:5531-5537.
198. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1998;102:136-144.

199. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost.* 2006;95:94-99.
200. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2311-2315.
201. Muller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003;17:476-478.
202. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2561-2568.
203. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106:1604-1611.
204. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood.* 2002;99:3962-3970.
205. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1590-1596.
206. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood.* 2008;112:2327-2335.
207. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004;114:447-453.
208. Celi A, Lorenzet R, Furie BC, Furie B. Microparticles and a P-selectin-mediated pathway of blood coagulation. *Dis Markers.* 2004;20:347-352.
209. Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med.* 2003;9:1020-1025.
210. Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med.* 1992;119:334-345.
211. Morel O, Jesel L, Chauvin M, Freyssinet JM, Toti F. Eptifibatid-induced thrombocytopenia and circulating procoagulant platelet-derived microparticles in a patient with acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2685-2687.
212. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol.* 2000;130:947-962.
213. Brisset AC, Terrisse AD, Dupouy D, et al. Shedding of active tissue factor by aortic smooth muscle cells (SMCs) undergoing apoptosis. *Thromb Haemost.* 2003;90:511-518.
214. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-843.
215. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359:938-949.
216. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood.* 2004;104:3190-3197.
217. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* 2003;197:1585-1598.

218. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg.* 2003;38:1075-1089.
219. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med.* 2004;10:171-178.
220. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004;11:156-164.
221. Key NS, Chanrathammachart P, Moody PW, Chang JY. Membrane microparticles in VTE and cancer. *Thromb Res.* 2010;125 Suppl 2:S80-83.
222. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6830-6840.
223. Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res.* 2008;122:604-609.
224. Davila M, Amirhosravi A, Coll E, et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1517-1524.
225. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med.* 2009;206:1913-1927.
226. Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol.* 1997;96:534-542.
227. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schomig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2005;93:35-39.
228. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood.* 2005;105:1515-1522.
229. Boulanger CM. Microparticles, vascular function and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19:177-180.
230. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension.* 2006;48:180-186.
231. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;104:2649-2652.
232. Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E, Kublickiene KR. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:1686-1693.
233. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock.* 2006;26:464-471.
234. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1910-1915.
235. Essayagh S, Brisset AC, Terrisse AD, et al. Microparticles from apoptotic vascular smooth muscle cells induce endothelial dysfunction, a phenomenon prevented by beta3-integrin antagonists. *Thromb Haemost.* 2005;94:853-858.

236. Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation*. 2004;109:1653-1659.
237. Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension*. 2004;43:428-433.
238. Tesse A, Martinez MC, Hugel B, et al. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2522-2527.
239. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1004-1009.
240. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J*. 2007;21:2735-2741.
241. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*. 2006;108:3012-3020.
242. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999;274:7545-7556.
243. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, et al. Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem*. 2003;278:33161-33168.
244. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1997;99:2118-2127.
245. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001;15:825-835.
246. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158:277-287.
247. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*. 1998;161:4382-4387.
248. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999;274:23111-23118.
249. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3337-3348.
250. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, et al. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma*. 2001;50:801-809.
251. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000;95:1317-1323.
252. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002;30:450-459.

253. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1512-1518.
254. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood.* 2004;104:2543-2548.
255. Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol.* 2006;36:648-660.
256. Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005;10:731-741.
257. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* 2002;62:6312-6317.
258. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 2004;10:502-509.
259. Boulanger CM, Tedgui A. Dying for attention: microparticles and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2005;67:1-3.
260. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;67:30-38.
261. Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol.* 2004;124:376-384.
262. Lok CA, Van Der Post JA, Sargent IL, et al. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2008;27:344-360.
263. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis.* 2009;30:580-588.
264. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One.* 2010;5:e12688.
265. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1302-1311.
266. Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1106-1114.
267. Pirro M, Schillaci G, Paltriccia R, et al. Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2530-2535.
268. Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, et al. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17:131-140.
269. Dolo V, Ginestra A, Ghersi G, Nagase H, Vittorelli ML. Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1994;26:173-180.

270. Hagglof P, Bergstrom F, Wilczynska M, Johansson LB, Ny T. The reactive-center loop of active PAI-1 is folded close to the protein core and can be partially inserted. *J Mol Biol.* 2004;335:823-832.
271. Dolo V, Ginestra A, Cassara D, et al. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58:4468-4474.
272. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* 1998;18:3433-3437.
273. Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.* 1999;19:3439-3445.
274. Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, et al. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem.* 1997;272:17216-17222.
275. Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18:163-170.
276. Millimaggi D, Festuccia C, Angelucci A, et al. Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2006;28:909-914.
277. Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res.* 2004;64:7045-7049.
278. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002;160:673-680.
279. Distler JH, Jungel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2892-2897.
280. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, et al. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia.* 2007;9:349-357.
281. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;113:752-760.
282. Pilzer D, Fishelson Z. Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis. *Int Immunol.* 2005;17:1239-1248.
283. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, et al. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res.* 2003;63:5573-5581.
284. Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost.* 2007;98:1096-1107.
285. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* 2003;63:4331-4337.
286. Diamant M, Tushuizen ME, Abid-Hussein MN, et al. Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Thromb Haemost.* 2008;100:489-497.

287. Nomura S. Statin and endothelial cell-derived microparticles. *Thromb Haemost.* 2008;100:377-378.
288. Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia MV, El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:34-38.
289. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:55-63.
290. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol.* 2006;169:2127-2136.
291. Bedford P, Garner K, Knight SC. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol.* 1999;11:1739-1744.
292. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood.* 2008;111:5028-5036.
293. Angelot F, Seilles E, Biichle S, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica.* 2009;94:1502-1512.
294. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19:43-51.
295. Majka M, Kijowski J, Lesko E, Gozdik J, Zupanska B, Ratajczak MZ. Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells--implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45:27-32.
296. Kirsch T, Woywodt A, Beese M, et al. Engulfment of apoptotic cells by microvascular endothelial cells induces proinflammatory responses. *Blood.* 2007;109:2854-2862.
297. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, et al. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol.* 2010;38:233-245.
298. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3:e3694.
299. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One.* 2009;4:e4722.
300. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009;2:ra81.
301. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000;6:769-775.
302. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1010-1020.
303. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10:619-624.

304. Ray DM, Spinelli SL, Pollock SJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thromb Haemost.* 2008;99:86-95.
305. Prokopi M, Pula G, Mayr U, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood.* 2009;114:723-732.
306. Court FA, Hendriks WT, Macgillavry HD, Alvarez J, van Minnen J. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J Neurosci.* 2008;28:11024-11029.
307. Li YC, Li YN, Cheng CX, et al. Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. *Neurosci Res.* 2005;53:298-303.
308. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2008;180:817-824.
309. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7:4-13.
310. Forsgren M, Raden B, Israelsson M, Larsson K, Heden LO. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett.* 1987;213:254-260.
311. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 1980;43:77-89.
312. Banyai L, Patthy L. Importance of intramolecular interactions in the control of the fibrin affinity and activation of human plasminogen. *J Biol Chem.* 1984;259:6466-6471.
313. Cockell CS, Marshall JM, Dawson KM, Cederholm-Williams SA, Ponting CP. Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem J.* 1998;333 (Pt 1):99-105.
314. Tranqui L, Prandini MH, Suscillon M. Structure of fibrinogen and its derivatives: an electron microscope study. *Thromb Haemost.* 1979;41:655-661.
315. Weisel JW, Nagaswami C, Korsholm B, Petersen LC, Suenson E. Interactions of plasminogen with polymerizing fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linker and electron microscopy. *J Mol Biol.* 1994;235:1117-1135.
316. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 2005;93:647-654.
317. Mangel WF, Lin BH, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science.* 1990;248:69-73.
318. Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem.* 1981;256:7035-7041.
319. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, et al. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature.* 1983;301:214-221.
320. Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1982;257:2920-2925.
321. Lijnen HR, Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Haemost.* 1991;66:88-110.
322. Rijken DC. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol.* 1995;8:291-312.

323. Melchor JP, Strickland S. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost.* 2005;93:655-660.
324. Jacobsen JS, Comery TA, Martone RL, et al. Enhanced clearance of Abeta in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:8754-8759.
325. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, et al. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med.* 2008;14:731-737.
326. Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S. Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:443-448.
327. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 2004;25:450-455.
328. Lijnen HR, Van Hoef B, Nelles L, Collen D. Plasminogen activation with single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740----Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158----Glu). *J Biol Chem.* 1990;265:5232-5236.
329. de Munk GA, Groeneveld E, Rijken DC. Acceleration of the thrombin inactivation of single chain urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) by thrombomodulin. *J Clin Invest.* 1991;88:1680-1684.
330. Fleury V, Lijnen HR, Angles-Cano E. Mechanism of the enhanced intrinsic activity of single-chain urokinase-type plasminogen activator during ongoing fibrinolysis. *J Biol Chem.* 1993;268:18554-18559.
331. Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1499-1528.
332. Llinas P, Le Du MH, Gardsvoll H, et al. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.* 2005;24:1655-1663.
333. Barinka C, Parry G, Callahan J, et al. Structural basis of interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *J Mol Biol.* 2006;363:482-495.
334. Huai Q, Zhou A, Lin L, et al. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15:422-423.
335. Gyetko MR, Todd RF, 3rd, Wilkinson CC, Sitrin RG. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. *J Clin Invest.* 1994;93:1380-1387.
336. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem.* 1982;257:2912-2919.
337. Thorsen S. The mechanism of plasminogen activation and the variability of the fibrin effector during tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;667:52-63.
338. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 2003;89:409-419.
339. Doolittle RF, Pandi L. Binding of synthetic B knobs to fibrinogen changes the character of fibrin and inhibits its ability to activate tissue plasminogen activator and its destruction by plasmin. *Biochemistry.* 2006;45:2657-2667.
340. Rijken DC, Sakharov DV. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. *Thromb Res.* 2001;103 Suppl 1:S41-49.
341. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:116-124.

342. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*. 1991;30:1682-1691.
343. Hawley SB, Tamura T, Miles LA. Purification, cloning, and characterization of a profibrinolytic plasminogen-binding protein, TIP49a. *J Biol Chem*. 2001;276:179-186.
344. Pluskota E, Soloviev DA, Bdeir K, Cines DB, Plow EF. Integrin alphaMbeta2 orchestrates and accelerates plasminogen activation and fibrinolysis by neutrophils. *J Biol Chem*. 2004;279:18063-18072.
345. Herren T, Burke TA, Das R, Plow EF. Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. *Biochemistry*. 2006;45:9463-9474.
346. Das R, Burke T, Plow EF. Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood*. 2007;110:3763-3772.
347. Hajjar KA, Nachman RL. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *J Clin Invest*. 1988;82:1769-1778.
348. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoid cell surface. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1264-1270.
349. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 2005;129:307-321.
350. Ishii H, Yoshida M, Hiraoka M, et al. Recombinant annexin II modulates impaired fibrinolytic activity in vitro and in rat carotid artery. *Circ Res*. 2001;89:1240-1245.
351. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, et al. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2004;113:38-48.
352. Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006;107:4375-4382.
353. Waisman DM. Annexin A2 may not play a role as a plasminogen receptor. *Br J Haematol*. 2005;131:553-554; author reply 554-556.
354. Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci*. 2005;10:300-325.
355. Gurewich V, Pannell R, Louie S, Kelley P, Suddith RL, Greenlee R. Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and in two animal species. *J Clin Invest*. 1984;73:1731-1739.
356. Ellis V, Dano K. Potentiation of plasminogen activation by an anti-urokinase monoclonal antibody due to ternary complex formation. A mechanistic model for receptor-mediated plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1993;268:4806-4813.
357. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*. 2004;103:955-962.
358. Kilpatrick LM, Harris RL, Owen KA, et al. Initiation of plasminogen activation on the surface of monocytes expressing the type II transmembrane serine protease matriptase. *Blood*. 2006;108:2616-2623.
359. Okumura Y, Hayama M, Takahashi E, et al. Serase-1B, a new splice variant of polyserase-1/TMPRSS9, activates urokinase-type plasminogen activator and the proteolytic activation is negatively regulated by glycosaminoglycans. *Biochem J*. 2006;400:551-561.

360. Moran P, Li W, Fan B, Vij R, Eigenbrot C, Kirchhofer D. Pro-urokinase-type plasminogen activator is a substrate for hepsin. *J Biol Chem.* 2006;281:30439-30446.
361. Weisel JW, Litvinov RI. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008;6:161-180.
362. Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost.* 2007;5:812-817.
363. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* 2000;407:923-926.
364. Kruithof EK. Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme.* 1988;40:113-121.
365. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, et al. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J.* 1986;5:2539-2544.
366. Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol.* 2000;297:683-695.
367. Gils A, Declerck PJ. The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-I in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-I inhibitors. *Thromb Haemost.* 2004;91:425-437.
368. Mottonen J, Strand A, Symersky J, et al. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature.* 1992;355:270-273.
369. Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC, et al. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J Biol Chem.* 1988;263:15454-15461.
370. Declerck PJ, De Mol M, Vaughan DE, Collen D. Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1992;267:11693-11696.
371. De Taeye B, Compennolle G, Dewilde M, Biesemans W, Declerck PJ. Immobilization of the distal hinge in the labile serpin plasminogen activator inhibitor 1: identification of a transition state with distinct conformational and functional properties. *J Biol Chem.* 2003;278:23899-23905.
372. Komissarov AA, Zhou A, Declerck PJ. Modulation of serpin reaction through stabilization of transient intermediate by ligands bound to alpha-helix F. *J Biol Chem.* 2007;282:26306-26315.
373. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987;69:381-387.
374. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood.* 2004;104:3943-3948.
375. Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol.* 2003;10:541-544.
376. Medcalf RL, Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J.* 2005;272:4858-4867.
377. Medcalf RL. Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:132-142.
378. Holmes WE, Nelles L, Lijnen HR, Collen D. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J Biol Chem.* 1987;262:1659-1664.

379. Christensen S, Valnickova Z, Thogersen IB, Olsen EH, Enghild JJ. Assignment of a single disulphide bridge in human alpha2-antiplasmin: implications for the structural and functional properties. *Biochem J.* 1997;323 (Pt 3):847-852.
380. Frank PS, Douglas JT, Locher M, Llinas M, Schaller J. Structural/functional characterization of the alpha 2-plasmin inhibitor C-terminal peptide. *Biochemistry.* 2003;42:1078-1085.
381. Wang H, Yu A, Wiman B, Pap S. Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin. *Eur J Biochem.* 2003;270:2023-2029.
382. Law RH, Sofian T, Kan WT, et al. X-ray crystal structure of the fibrinolysis inhibitor alpha2-antiplasmin. *Blood.* 2008;111:2049-2052.
383. Reed GL, Matsueda GR, Haber E. Platelet factor XIII increases the fibrinolytic resistance of platelet-rich clots by accelerating the crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin. *Thromb Haemost.* 1992;68:315-320.
384. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood.* 2006;107:1397-1404.
385. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, McKee PA. The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity. *Blood.* 2007;109:5286-5292.
386. Wiman B, Boman L, Collen D. On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and a low-molecular-weight form of plasmin. *Eur J Biochem.* 1978;87:143-146.
387. Yepes M, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:173-180.
388. Boulaftali Y, Adam F, Venisse L, et al. Anticoagulant and antithrombotic properties of platelet protease nexin-1. *Blood.* 2010;115:97-106.
389. Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem.* 1991;266:21833-21838.
390. Valnickova Z, Christensen T, Skottrup P, Thogersen IB, Hojrup P, Enghild JJ. Post-translational modifications of human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): evidence for a large shift in the isoelectric point and reduced solubility upon activation. *Biochemistry.* 2006;45:1525-1535.
391. Marx PF, Brondijk TH, Plug T, et al. Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation. *Blood.* 2008;112:2803-2809.
392. Anand K, Pallares I, Valnickova Z, et al. The crystal structure of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) provides the structural basis for its intrinsic activity and the short half-life of TAFIa. *J Biol Chem.* 2008;283:29416-29423.
393. Sanglas L, Valnickova Z, Arolas JL, et al. Structure of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Mol Cell.* 2008;31:598-606.
394. Willemsse JL, Heylen E, Hendriks DF. The intrinsic enzymatic activity of procarboxypeptidase U (TAFI) does not significantly influence the fibrinolysis rate: a rebuttal. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1334-1336.
395. Foley JH, Kim P, Nesheim ME. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor zymogen does not play a significant role in the attenuation of fibrinolysis. *J Biol Chem.* 2008;283:8863-8867.

396. Valnickova Z, Thogersen IB, Potempa J, Enghild JJ. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) zymogen is an active carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2007;282:3066-3076.
397. Buelens K, Hillmayer K, Compennolle G, Declerck PJ, Gils A. Biochemical importance of glycosylation in thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *Circ Res.* 2008;102:295-301.
398. Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277:1021-1030.
399. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270:14477-14484.
400. Marx PF, Dawson PE, Bouma BN, Meijers JC. Plasmin-mediated activation and inactivation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Biochemistry.* 2002;41:6688-6696.
401. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem.* 1996;271:16603-16608.
402. Nesheim M, Bajzar L. The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost.* 2005;3:2139-2146.
403. Wang W, Nagashima M, Schneider M, Morser J, Nesheim M. Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation. *J Biol Chem.* 2000;275:22942-22947.
404. Mao SS, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1999;274:35046-35052.
405. Sakharov DV, Plow EF, Rijken DC. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. *J Biol Chem.* 1997;272:14477-14482.
406. Swaisgood CM, Schmitt D, Eaton D, Plow EF. In vivo regulation of plasminogen function by plasma carboxypeptidase B. *J Clin Invest.* 2002;110:1275-1282.
407. Guimaraes AH, Laurens N, Weijers EM, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Rijken DC. TAFI and pancreatic carboxypeptidase B modulate in vitro capillary tube formation by human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2157-2162.
408. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature.* 1989;339:303-305.
409. Miles LA, Fless GM, Scanu AM, et al. Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells. *Thromb Haemost.* 1995;73:458-465.
410. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci.* 2005;10:1754-1762.
411. Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost.* 2007;97:336-342.
412. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost.* 2005;93:676-681.
413. Tang CH, Wei Y. The urokinase receptor and integrins in cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1916-1932.

414. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1119-1127.
415. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839.
416. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:221-233.
417. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:483-489.
418. Rivera S, Jourquin J, Ogier C, et al. [The MMP/TIMP system in the nervous system]. *Med Sci (Paris).* 2004;20:55-60.
419. Ugwu F, Van Hoef B, Bini A, Collen D, Lijnen HR. Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry.* 1998;37:7231-7236.
420. Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry.* 1998;37:4699-4702.
421. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:163-176.
422. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-21494.
423. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol.* 1998;161:6845-6852.
424. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2000;18:1135-1149.
425. Schedin P, Strange R, Mitrenga T, Wolfe P, Kaeck M. Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 5):795-806.
426. Shanmukhappa K, Matte U, Degen JL, Bezerra JA. Plasmin-mediated proteolysis is required for hepatocyte growth factor activation during liver repair. *J Biol Chem.* 2009;284:12917-12923.
427. Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1068-1078.
428. Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med.* 1995;1:932-937.
429. Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol.* 1990;111:757-763.
430. Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, et al. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol.* 1999;155:841-851.
431. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 2003;278:2750-2757.
432. Hertig A, Berrou J, Allory Y, et al. Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta. *FASEB J.* 2003;17:1904-1906.

433. Rossignol P, Luttun A, Martin-Ventura JL, et al. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. *J Thromb Haemost.* 2006;4:664-670.
434. Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J.* 2003;17:1301-1303.
435. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2146-2154.
436. Rossignol P, Ho-Tin-Noe B, Vranckx R, et al. Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells. *J Biol Chem.* 2004;279:10346-10356.
437. Kapustin A, Shanahan CM. Targeting vascular calcification: softening-up a hard target. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:84-89.
438. Kochtebane N, Choqueux C, Passefort S, et al. Plasmin induces apoptosis of aortic valvular myofibroblasts. *J Pathol.* 2010;221:37-48.
439. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003;1:1655-1662.
440. Bulut D, Tuns H, Mugge A. CD31+/Annexin V+ microparticles in healthy offsprings of patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:17-22.
441. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:601-608.
442. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol.* 2009;66:191-199.
443. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol.* 2008;173:1210-1219.
444. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus.* 2009;18:671-675.
445. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:1820-1825.
446. Georgescu A, Alexandru N, Popov D, et al. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1566-1575.
447. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1467-1471.
448. Helley D, de Latour RP, Porcher R, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica.* 2010;95:574-581.
449. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med.* 2009;13:454-471.
450. Bernard S, Loffroy R, Serusclat A, et al. Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Atherosclerosis.* 2009;203:429-435.
451. Nomura S. Dynamic role of microparticles in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2009;5:245-251.

452. Amabile N, Heiss C, Chang V, et al. Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28:1081-1086.
453. Wang JM, Su C, Wang Y, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 2009;23:307-315.
454. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:112-116.
455. Esposito K, Ciotola M, Giugliano F, et al. Endothelial microparticles correlate with erectile dysfunction in diabetic men. *Int J Impot Res*. 2007;19:161-166.
456. Gonzalez-Quintero VH, Smarkusky LP, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1418-1424.
457. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;56:1319-1324.
458. Heiss C, Amabile N, Lee AC, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1760-1771.
459. Chironi G, Simon A, Hugel B, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2775-2780.
460. Manly DA, Wang J, Glover SL, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res*. 2010;125:511-512.
461. Hron G, Kollars M, Weber H, et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost*. 2007;97:119-123.
462. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007;5:520-527.
463. Amabile N, Boulanger C, Guerin A. Circulating endothelial microparticles: a new biomarker for prediction of subsequent death and cardiovascular events in end stage renal disease. *Circulation*. 2009;Abstract 13384 AHA meeting.
464. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1983-1985.
465. Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2006;4:979-981.
466. Bulut D, Maier K, Bulut-Streich N, Borgel J, Hanefeld C, Mugge A. Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. 2008;14:336-340.
467. Nomura S, Inami N, Kimura Y, et al. Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2007;21:38-44.
468. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Benidipine improves oxidized LDL-dependent monocyte and endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2005;19:551-557.

469. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on endothelial cell-derived microparticles, angiopoietins and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:83-90.
470. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1926.
471. Chamouard P, Desprez D, Hugel B, et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2005;50:574-580.
472. Morel O, Hugel B, Jesel L, et al. Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1118-1126.
473. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Effects of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2004;10:133-141.
474. Morel O, Ohlmann P, Morel N, et al. [Microparticles and cardiovascular disease]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:226-235.
475. Serebruany VL, Malinin AI, Jerome SD, et al. Effects of clopidogrel and aspirin combination versus aspirin alone on platelet aggregation and major receptor expression in patients with heart failure: the Plavix Use for Treatment Of Congestive Heart Failure (PLUTO-CHF) trial. *Am Heart J*. 2003;146:713-720.
476. Goto S, Tamura N, Li M, et al. Different effects of various anti-GPIIb-IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2022-2030.
477. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4:769-774.
478. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33:771-779.
479. Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. *Talanta*. 2010;82:1-8.
480. Hind E, Heugh S, Ansa-Addo EA, Antwi-Baffour S, Lange S, Inal J. Red cell PMVs, plasma membrane-derived vesicles calling out for standards. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399:465-469.
481. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1842-1851.
482. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990;75:128-138.
483. Gemmell CH, Ramirez SM, Yeo EL, Sefton MV. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. *J Lab Clin Med*. 1995;125:276-287.
484. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996;88:3456-3464.
485. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem*. 1991;266:24302-24307.
486. Tocchetti EV, Flower RL, Lloyd JV. Assessment of in vitro-generated platelet microparticles using a modified flow cytometric strategy. *Thromb Res*. 2001;103:47-55.

487. Gritters M, Grooteman MP, Schoorl M, et al. Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorphonuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:153-159.
488. Philippe J, De Logi E, Baele G. Comparison of five different citrated tubes and their in vitro effects on platelet activation. *Clin Chem*. 2004;50:656-658.
489. Kim HK, Song KS, Lee ES, et al. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13:393-397.
490. Nomura S, Suzuki M, Kido H, et al. Differences between platelet and microparticle glycoprotein IIb/IIIa. *Cytometry*. 1992;13:621-629.
491. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1842-1851.
492. Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1842-1851.
493. Nantakomol D, Imwong M, Soontarawirat I, et al. The absolute counting of red cell-derived microparticles with red cell bead by flow rate based assay. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76:191-198.
494. van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, et al. Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res*. 2010;125:332-339.
495. Biro E, Nieuwland R, Sturk A. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1842-1851.
496. Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Recovery and composition of microparticles after snap-freezing depends on thawing temperature. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20:52-56.
497. Sims PJ, Rollins SA, Wiedmer T. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem*. 1989;264:19228-19235.
498. Suzuki M, Kawakatsu T, Miyake T, et al. Platelet-derived microparticles in alloxan-induced diabetes in rabbits. *Haemostasis*. 1996;26:228-232.
499. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*. 1997;96:3534-3541.
500. Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006;107:3537-3545.
501. Wencel-Drake JD, Dieter MG, Lam SC. Immunolocalization of beta 1 integrins in platelets and platelet-derived microvesicles. *Blood*. 1993;82:1197-1203.
502. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*;8:315-323.
503. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds LH, Jr., Niewiarowski S. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost*. 1998;80:225-230.
504. Osumi K, Ozeki Y, Saito S, et al. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost*. 2001;85:326-330.
505. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, et al. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:878-887.

506. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 2003;89:506-512.
507. Ueba T, Haze T, Sugiyama M, et al. Level, distribution and correlates of platelet-derived microparticles in healthy individuals with special reference to the metabolic syndrome. *Thromb Haemost.* 2008;100:280-285.
508. Michelsen AE, Wergeland R, Stokke O, Brosstad F. Development of a time-resolved immunofluorometric assay for quantifying platelet-derived microparticles in human plasma. *Thromb Res.* 2006;117:705-711.
509. Exner T, Joseph J, Low J, Connor D, Ma D. A new activated factor X-based clotting method with improved specificity for procoagulant phospholipid. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;14:773-779.
510. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am J Transplant.* 2009;9:550-557.
511. Macey MG, Bevan S, Alam S, et al. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb Res.* 2010;125:76-81.
512. Gonzalez M, Carlo A, Poncelet P, et al. Sensitivity of 2 functional haemostasis assays to platelet-derived microparticles (PMP). *J Thromb Haemost.* 2009;7:Abstract PP-MO-766.
513. Hugel B, Socie G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood.* 1999;93:3451-3456.
514. Maurer-Spurej E, Brown K, Labrie A, Marziali A, Glatter O. Portable dynamic light scattering instrument and method for the measurement of blood platelet suspensions. *Phys Med Biol.* 2006;51:3747-3758.
515. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2009;96:206-212.
516. Doeuvre L, Plawinski L, Toti F, Angles-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem.* 2009;110:457-468.
517. 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;7:190-197.
518. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:772-777.

Résumé

Les microparticules (MP) sont des vésicules qui résultent du bourgeonnement des membranes des cellules activées ou apoptotiques. Leur capacité à vectoriser des systèmes fonctionnels exprimés par leurs cellules d'origine nous a conduit à explorer, la génération de plasmine à leur surface. Dans un premier travail, nous montrons que les MP dérivées de cellules endothéliales (MPE) sont des surfaces catalytiques capables d'activer le plasminogène par le système de l'urokinase et de son récepteur (uPA/uPAR). Les MPE agissent comme des vecteurs de plasmine constituant une nouvelle voie dans la régulation des activités protéolytiques de l'endothélium. Dans un second travail, nous avons montré que l'uPA portée par les cellules ou par les MPE est spécifiquement impliquée dans un mécanisme reconnaissance du plasminogène lié à une autre surface biologique générant de la plasmine *in situ* avec une grande efficacité. Dans un troisième travail, nous montrons que cette activité fibrinolytique est détectable sur les MP extraites de la circulation sanguine, où elle est plus spécifiquement portée par les sous populations endothéliales et leucocytaires. Cette activité qui est dépendante de l'uPA mais aussi de l'activateur tissulaire du plasminogène, est modulée dans des pathologies cardiovasculaires et auto-immunes. Dans une seconde partie, la pertinence de la mesure des MP comme biomarqueur en pratique clinique nous a amené à nous focaliser sur leurs méthodes d'analyse. En effet, à l'heure actuelle, l'évaluation du bénéfice apporté par les MP est limitée par un manque de standardisation des méthodologies. Dans ce travail, nous présentons une nouvelle stratégie de standardisation de la cytométrie en flux (CMF) et son évaluation dans le cadre d'une étude multicentrique utilisant des microbilles fluorescentes calibrées en taille. Enfin, nous discutons dans une revue les limites actuelles de la CMF et les stratégies ou améliorations technologiques permettant de les dépasser.