



**HAL**  
open science

# Cytométrie en flux des microparticules : application à la thrombopénie induite par l'héparine

Shirley Fritz

► **To cite this version:**

Shirley Fritz. Cytométrie en flux des microparticules : application à la thrombopénie induite par l'héparine . Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01630932

**HAL Id: dumas-01630932**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01630932>**

Submitted on 8 Nov 2017

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

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

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 09 octobre 2017

Par Mme **FRITZ Shirley**  
Né(e) le 09 mai 1989

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Cytométrie en flux des microparticules :  
Application à la thrombopénie induite par l'héparine**

----oOo----

**JURY :**

Président : Mme le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE  
Membres : M. le Professeur Pierre MORANGE  
M. le Docteur Philippe PONCELET  
Directeur de thèse : M. le Docteur Romaric LACROIX

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 09 octobre 2017

Par Mme **FRITZ Shirley**  
Né(e) le 09 mai 1989

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Cytométrie en flux des microparticules :  
Application à la thrombopénie induite par l'héparine**

----oOo----

**JURY :**

Président : Mme le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE  
Membres : M. le Professeur Pierre MORANGE  
M. le Docteur Philippe PONCELET  
Directeur de thèse : M. le Docteur Romaric LACROIX

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT  
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI  
M. Thierry AUGIER  
M. Edouard LAMY  
Mme Alexandrine BERTAUD  
Mme Claire CERINI  
Mme Edwige TELLIER  
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN  
Mme Dominique ARNOUX  
Mme Aurélie LEROYER  
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET  
M. Michel DE MEO  
Mme Anne DAVIN-REGLI  
Mme Véronique ROUX  
M. Fadi BITTAR  
Mme Isabelle PAGNIER  
Mme Sophie EDOUARD

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO  
M. Aurélien DUMETRE  
Mme Magali CASANOVA  
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Henri PORTUGAL  
Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –  
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT  
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE  
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

**PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)**

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL  
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY  
Mme Catherine DEFOORT  
M. Alain NICOLAY  
Mme Estelle WOLFF  
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC  
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA  
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT  
Mme Caroline DUCROS  
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE  
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS  
M. Christophe CURTI  
Mme Julie BROGGI  
M. Nicolas PRIMAS  
M. Cédric SPITZ  
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS  
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER  
Mme Sok Siya BUN  
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE  
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

**AHU**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

**ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

**ATER**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---



## **CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE**

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire  
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1<sup>er</sup> décembre 2015

# REMERCIEMENTS

---

Je remercie le Pr. Françoise Dignat-George de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire d'Hématologie de la Conception et pour avoir œuvré afin que je puisse poursuivre ma formation.

Je remercie le Dr Romaric Lacroix pour le soin mis à la correction de ce travail mais également pour son énergie incroyable et ses précieux enseignements quotidiens qui m'ont beaucoup éclairé tout au long de cette année. Merci pour votre implication dans ma formation et votre disponibilité.

Je remercie le Professeur Pierre Morange d'avoir accepté de juger ce travail ainsi que le Docteur Philippe Poncelet dont les travaux ont largement été utilisés comme support tout au long de ce manuscrit.

Je remercie le Docteur Stéphane Robert qui a grandement contribué à ce travail en étant très présent ainsi que pour son soutien et sa gentillesse.

Je remercie Evelyne et Coralie pour leur travail sur la cohorte TIH présentée dans cette thèse mais également pour leur aide au quotidien, pour leurs éclats de rires communicatifs et pour avoir répondu à chacune de mes (parfois trop nombreuses) questions. Je remercie pour cela Laurent qui a souvent pris le temps de me répondre.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire : Tout d'abord un grand merci à Corine pour sa patience et pour son rôle dans mon apprentissage de cette discipline très technique, je remercie évidemment Anne, Marie-lou, Nathalie, Fanny, Audrey et Stéphanie qui participent chaque jour à ma formation et avec qui c'est un réel plaisir de travailler chaque jour. Merci à toute l'équipe du « phéno » de m'avoir accueillie. Je remercie également Sylvie, qui a partagé avec moi ces expériences, m'a beaucoup conseillée et à qui je souhaite de s'épanouir dans sa nouvelle vie de maman. Je remercie enfin Maud et Yaël pour la transmission de leur savoir ainsi que pour leurs qualités professionnelles qui ont enrichis et continueront d'enrichir ma formation ainsi que celle de nombreux autres internes.

A mes parents, vous avez toujours été à mes côtés, Vous m'avez toujours soutenu mes choix, vous avez toujours trouvé les mots réconfortant et surtout vous avez toujours œuvré pour que je poursuive ces longues études. Alors aujourd'hui ce n'est pas seulement ma thèse mais c'est aussi la vôtre car sans vos valeurs, vos encouragements et votre courage je n'en serais pas là. Pour reprendre votre métaphore même si comme vous le dites je prends mon envol, sachez que j'ai prévu de venir me reposer au nid prochainement.

A mon *Choubichou*, ma petite sœur, je profite de cet instant pour te dire à quel point je suis fière de toi. Tu m'en as fait voir de toutes les couleurs étant petite mais aujourd'hui tu es une mini-femme pleine de vie et de projets. Je te souhaite de continuer à t'épanouir et de suivre ta voie. Où que ça te mène je serais là mais si c'est sur une île paradisiaque ce serait encore mieux. Petite pensée à Merlin, merci de rendre ma sœur heureuse.

A papi et mamie, vous avez parcouru des centaines de kilomètres chaque week-end pour me suivre sur toutes sortes de compétitions. Vous avez toujours été fiers de moi et avez toujours été d'un grand réconfort alors je vous remercie du fond du cœur pour toutes ces attentions. J'ai hâte de venir fêter ça avec vous. Je vous embrasse fort. Merci

A mamie mimi, je suis heureuse de t'avoir à mes côtés aujourd'hui, tu as toujours des paroles pleines de sagesse à me transmettre. Je te remercie toi et Jo d'être présents aujourd'hui.

A tata, tonton Biou et Amanda, merci pour vos encouragements et votre bonne humeur. Chaque fois que j'en ai eu besoin, j'ai pu compter sur vous. Faites chauffer les motos !!!!

A la famille « Garcia », Pascale, Serge, Julie et Celia, pour vos nombreuses attentions, pour m'avoir acceptée, et pour les excellents moments passés avec vous.

A Romain, la première impression n'est pas toujours la bonne, tu en es la preuve ! Nous avons partagé nos années collèges, les compétitions et beaucoup de moments mémorables. Tu restes le meilleur à mes yeux et je suis heureuse de pouvoir retrouver notre complicité de temps en temps quand nos rythmes nous le permettent.

A toute « la bande » Maité, Antoine, Sylvie, Éric et Carole, vous m'avez vu grandir un peu comme si vous étiez une deuxième famille, vous m'avez vu dans tous mes états et avez suivi mon parcours de près. Ça y est ! Éric, maintenant tu pourras dire « Docteur » je n'aurais plus d'arguments pour m'y opposer. Après toutes ces années (et les nombreuses soirées) je suis contente de vous avoir à mes côtés aujourd'hui.

A Aurore, « ma binômette de TP », nous avons formé une équipe de choc de la P2 à la préparation du concours. Imbattables question timing ! Merci d'être toujours présente aujourd'hui. On va pouvoir ressortir les rollers !

A Jérôme, voisin de banc de fac et un peu binôme de TP aussi, on en a passé des heures à papoter et à rire de ce que j'appelle « Les mésaventures de Jérôme ». Il faut dire que tu es tombé sur tout un tas de personnages hors-norme. Il va falloir que tu me racontes les derniers épisodes.

A Christelle, copine de boulot, copine de running, puis aujourd'hui amie. Ça fait un bout de temps que l'on se connaît maintenant...Un petit mot pour te dire merci pour tous tes mots encourageants. Je suis désolée de ne pas avoir été là pour fêter tes 30 ans alors « Joyeux anniversaire ma Christelle ». A Jess qui vient de loin pour l'occasion, merci d'être là. Vu que maintenant tu as pris goût aux randonnées, c'est le moment d'en programmer une.

A Kaka, Soso et Raqui, mes trois premières co-internes, mais nous avons depuis longtemps dépassé ce stade. Vous m'avez chacune beaucoup appris...

Kaka, avec toi j'ai découvert, d'abord l'hémato, les soirées à l'internat, des mots (impossible de les écrire ici), et aussi que le shopping pouvait être une science. Ta répartie unique m'a bien souvent fait rire mais tu sais aussi être très attachante. A Omar, toujours partant pour les soirées « entre filles », les encouragements sont de circonstance !!! On remet ça vendredi !!!

Soso, comment ai-je pu passer tant de temps dans ta promo sans te rencontrer plus tôt ? Je suis heureuse que nos chemins se soient enfin croisés, tu as su me faire découvrir et même aimer Marseille. Tu as une force incroyable mais je sais aussi que sur certains points tu me ressembles. De notre groupe tu es la seule qui poursuit alors sache que désormais j'aurais le temps d'aller boire toutes les bières dont tu auras besoin !!!

Raqui, j'ai eu la chance de pouvoir partir en Argentine et à Cuba avec toi, quels fabuleux souvenirs !!! Aujourd'hui je comprends entièrement ton besoin d'ailleurs et même si tu vas me manquer ici, je suis heureuse de savoir que tu réalises ton rêve. De toute façon je compte bien venir visiter chaque pays où tu t'installeras.

A Mathieu et Anne-So, et Clément, j'ai passé d'excellents moments à vos côtés. Même les manip « longues et fastidieuses » ont été l'occasion de fous-rires en parasito. Petite mention spéciale à ma chinoise préférée avec qui j'ai eu le plaisir de partager un PSM situé dans un placard chauffé à 40°C. Finalement un super souvenir! Et merci aux garçons pour leurs talents de styliste, grâce à vous j'ai eu une super blouse « Harley-Davidson ». Merci !

A tous mes co-internes : Constance, Pascal, Lisa et Noémie, vous formez un peu ma promo d'adoption. Je vous remercie pour les moments passés ensemble et vos encouragements surtout ces derniers temps. Petite pensée à Pascal pour la dernière ligne droite.

A Loris et Amandine pour avoir été présent au moment où j'ai eu besoin de coup de pouce surtout concernant la partie expérimentale.

A celles et ceux que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces cinq dernières années (et je sais que j'en oublie encore ...): Stéphanie et Lucie, je vous remercie de m'avoir activement soutenue lors de mon M2. Lucie je te souhaite que ton nouveau boulot ça le fasse ! Garde ton énergie ! Stéphanie, et pierre, c'est plutôt des supers voyages que j'ai envie de vous souhaiter.

A Tracy ma co-interne actuelle, qui a absorbé une grande part du travail pour que je puisse me consacrer à l'écriture de ce travail et avec qui je suis heureuse d'avoir partagé mes six derniers mois d'internat. A Estelle, un sacré petit bout de femme, je suis ravie de t'avoir rencontré au labo. Toujours partante pour aller boire un verre. A Elo, Emilie, Robin, Armel, Thomas, JB, Mélanie et Emma pour les bons moments passés et pour ceux à venir.

A Vince, celui sur qui je peux compter, mon soutien à toute épreuve, celui qui en toute situation est capable de me rendre heureuse. Je te remercie d'être entré dans ma vie. Tu as été une évidence depuis le jour où je suis (littéralement) tombée sur toi. Je suis heureuse d'entamer un nouveau chapitre de ma vie à tes côtés et j'espère pouvoir réaliser tous nos beaux projets. A mon tour de prendre soin de toi <3.

Merci à tous d'être venu me soutenir.

## ABREVIATIONS

---

APC : allophycocyanine  
APD : photodiodes à avalanche  
BB : Binding buffer  
CMF : Cytométrie en flux  
Endo-MP : microparticules endothéliales  
EPCR : récepteur de la protéine C  
EVs : vésicules extracellulaires  
FITC : Fluorescéine isothiocyanate  
FS : Forward Scatter  
FT : facteur tissulaire  
GAG : glycosaminoglycanes  
Gran-MP : MP-granulocytaires  
ISX : ImagestreamX  
Leuco-MP: microparticules leucocytaires  
miR : micro-ARN  
Mono-MP : microparticules monocytaires  
MP : microparticule  
NETs : Neutrophil Extracellular Traps  
PAF : facteur d'activation plaquettaire  
PC5 : PE-Cyanine 5  
PC7 : PE-Cyanine 7  
PE : phycoérythrine  
PF4 : facteur plaquettaire 4  
PFP : plasma appauvri en plaquettes  
PL : phospholipides  
PMP : microparticules plaquettaires  
PMT : photomultiplicateurs  
PS : phosphatidylsérine  
SD-CMF : cytomètre standard  
SEC : Chromatographie d'exclusion de taille  
SI : Index de séparation  
SS : Side scatter  
SSC : Side Scatter canal  
TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire  
TGT : test de génération de thrombine  
TM : Thrombomoduline  
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène  
v-SSC : violet : Side Scatter canal

# TABLE DES MATIERES

---

## PARTIE I : LES MICROPARTICULES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>I) DEFINITION</b>	<b>12</b>
<b>II) FORMATION ET COMPOSITION DES MP</b>	<b>13</b>
<b>III) ROLES BIOLOGIQUES DES MICROPARTICULES</b>	<b>15</b>
A) ROLE PROTHROMBOTIQUE DES MP	15
1) <i>MP, Phosphatidylsérine et Facteur Tissulaire</i>	15
2) <i>MP, facteurs contacts, polyphosphates et NETs</i>	16
B) ROLE ANTI THROMBOTIQUE DES MP	16
C) ROLE DANS L'INFLAMMATION	18
<b>IV) ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE DES MICROPARTICULES EN PATHOLOGIE : EXEMPLE DE LA THROMBOPENIE INDUITE A L'HEPARINE (TIH)</b>	<b>19</b>
A) PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TIH	20
B) LA TIH : UNE REACTION IMMUNITAIRE ATYPIQUE	21
C) MECANISMES THROMBOTIQUES	22
1) <i>Activation plaquettaire et microparticules</i>	22
2) <i>Activation monocytaire, endothéliales et microparticules</i>	23
3) <i>Implication des microparticules leucocytaires</i>	25
D) DIAGNOSTIC	26
1) <i>Les tests immunologiques</i>	26
2) <i>Les tests fonctionnels d'activation plaquettaire</i>	27
<b>V) ROLE DES MICROPARTICULES COMME BIOMARQUEUR</b>	<b>28</b>
<b>VI) ANALYSE DES MICROPARTICULES</b>	<b>29</b>
A) LES TESTS FONCTIONNELS	30
1) <i>Activité procoagulante associée aux phospholipides</i>	30
2) <i>Test fonctionnel d'activité procoagulante associée au FT</i>	31
3) <i>Test de capture</i>	31
B) LES METHODES DE DETECTION	32
1) <i>méthodes non-optiques</i>	32
2) <i>methodes optiques</i>	33

## PARTIE II: MICROPARTICULES ET CYTOMETRIE EN FLUX

<b>I)</b>	<b>DEVELOPPEMENT HISTORIQUE DE LA CMF</b>	<b>37</b>
<b>II)</b>	<b>PRINCIPES GENERAUX DE CYTOMETRIE EN FLUX</b>	<b>39</b>
A)	COMPOSITION D'UN CYTOMETRE EN FLUX	39
B)	PARAMETRES OPTIQUES ANALYSES	43
1)	<i>Paramètres optiques intrinsèques : La diffusion lumineuse</i>	43
2)	<i>Paramètres optiques induits : la fluorescence</i>	44
C)	DETECTION ET TRAITEMENT DU SIGNAL	47
1)	<i>Du signal lumineux au signal électronique</i>	47
2)	<i>Du signal électronique au signal analogique</i>	48
<b>III)</b>	<b>CYTOMETRIE DE FLUX POUR L'ANALYSE DES MP</b>	<b>48</b>
A)	AVANTAGES DE LA CMF POUR L'ANALYSE DES MP	48
B)	LIMITES DE L'ANALYSE DES MICROPARTICULES PAR CMF	49
1)	<i>Résolution et limites de détection</i>	49
2)	<i>Bruit de fond</i>	50
3)	<i>limite de détection</i>	52
4)	<i>Sensibilité de fluorescence</i>	52
C)	DE LA CYTOMETRIE STANDARD (SD-CMF) A LA CYTOMETRIE DE HAUTE SENSIBILITE (HS-CMF)	54
1)	<i>Optimisation du signal</i>	54
2)	<i>Réduction du bruit de fond</i>	61
3)	<i>Optimisation de la Résolution et système fluidique</i>	63
4)	<i>Combinaison technologique</i>	65
<b>IV)</b>	<b>STRATEGIES D'ANALYSE</b>	<b>66</b>
A)	DECLENCHEMENT PAR DIFFRACTION LUMINEUSE	66
B)	DECLENCHEMENT EN FLUORESCENCE	67
C)	COMPARAISON DES STRATEGIES	68
<b>V)</b>	<b>ARTEFACTS DE MESURE DE MP PAR CMF</b>	<b>70</b>
A)	ARTEFACTS PRE-ANALYTIQUES	70
B)	INTERFERENCES ANALYTIQUES	71
1)	<i>sources d'interférences (échantillon)</i>	71
2)	<i>Limitations des interférences</i>	73
3)	<i>Problèmes de quantification DES MP</i>	76
<b>VI)</b>	<b>STANDARDISATION</b>	<b>77</b>
A)	NECESSITE DE STANDARDISATION	77
B)	OUTILS DE STANDARDISATION	78
1)	<i>Standardisation basée sur la diffraction lumineuse</i>	78
2)	<i>Standardisation avec paramètre de déclenchement par fluorescence</i>	80



## PARTIE III: DETECTION DES MICROPARTICULES PAR CYTOMETRIE FLUO-SENSIBLE

<b>I) CONTEXTE ET OBJECTIFS</b>	<b>81</b>
<b>II) MATERIELS ET METHODES</b>	<b>82</b>
A) LES ECHANTILLONS	82
B) LES CYTOMETRES	82
C) REACTIFS	83
<b>III) MISE EN PLACE DU PROTOCOLE</b>	<b>84</b>
A) MAPPING DES MP-LEUCOCYTAIRE	84
B) PROTOCOLE DE MULTI-MARQUAGE DES MP	84
C) STRATEGIE DE QUANTIFICATION	86
D) STRATEGIE DE DECLenchEMENT « TRIGGERING » ET D'ANALYSE	86
<b>IV) RESULTATS</b>	<b>89</b>
A) EVALUATION DES PERFORMANCES INTRINSEQUES DU CYTOFLEX S	89
1) <i>Tests des paramètres de diffraction</i>	89
2) <i>Tests des paramètres de fluorescence</i>	90
B) EVALUATION DU CYTOFLEX S EN CONDITION PLASMATIQUE	91
1) <i>Test fluidique</i>	91
2) <i>Tests de répétabilité en condition plasmatique</i>	93
3) <i>comparaison des numérations de MP par cytometrie fluo-sensible (Cytoflex) comparé au cytomètre Gallios</i>	95
C) APPLICATION A LA THROMBOPENIE INDUITE A L'HEPARINE.	97
1) <i>Difficultés rencontrées</i>	97
2) <i>Résultats préliminaires sur les patients atteints de TIH positifs</i>	102

# RESUME

---

Les microparticules (MP) circulantes, issues de la vésiculation des cellules en réponse à un stimulus, par les molécules qu'elles vectorisent, sont impliquées dans le transfert horizontal d'information et dans une multitude de processus biologiques. Depuis quelques années, leur potentiel de biomarqueur suscite un intérêt croissant. En revanche leur petite taille, comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ , rend difficile leur détection.

Les progrès technologiques de ces dernières années ont permis le développement d'outils performants adaptés à l'étude des MP comme par exemple la cytométrie de flux (CMF). En effet la CMF offre un fort potentiel d'analyse des MP en permettant une analyse multiparamétrique, rapide, de milliers d'évènements par seconde et présente des caractéristiques de spécificité et sensibilité intéressantes.

Cependant cet outil initialement développé pour l'étude cellulaire, doit faire l'objet d'adaptation afin de permettre la détection des MP, de façon précise et standardisée, dans le cadre de leur utilisation dans le domaine clinique.

Les objectifs de ce travail ont été sur le plan bibliographique de montrer l'évolution et les spécificités de la CMF adaptée à l'étude des MP et sur le plan expérimental d'évaluer les performances d'un nouveau cytomètre fluo-sensible (le CytoFLEX S, Beckman-Coulter) dans la mesure des MP en condition physiologique et pathologique en prenant des plasmas de sujets sains et de patients présentant une thrombopénie induite par l'héparine (TIH) comme modèles.

Nous avons, dans un premier temps, montré la supériorité des performances du CytoFLEX S en comparaison à un cytomètre classiquement utilisé dans la détection des MP, le Gallios(Beckman-Coulter). Dans un deuxième temps des tests en condition plasmatique sur des sujets sains ont prouvé la faisabilité de l'utilisation de ce nouveau cytomètre en condition clinique ainsi qu'un gain de détection de MP chez des sujets sains. Enfin l'application à la cohorte clinique de sujets atteints de TIH a permis de mettre en évidence une augmentation significative des concentrations de MP leucocytaires chez les sujets pathologiques. En revanche cette étape a également mis en évidence qu'un gain en sensibilité de fluorescence pouvait conduire à une variabilité de détection des MP, en réalité lié à la détection d'évènements non spécifiques.

En conclusion, les résultats de notre étude montrent une amélioration de la détection et caractérisation des MP par CMF avec le cytomètre fluo-sensible CytoFLEX mais montrent également les difficultés liées à la détection de petites MP en raison de leur proximité avec le bruit de fond de fluorescence. Ceci représente donc un nouveau challenge pour la CMF des MP avec la nécessité de développer de nouveaux outils et stratégies pour permettre un dosage à la fois sensible, spécifique et reproductible. Ces développements méthodologiques sont nécessaires pour permettre une meilleure définition de l'intérêt des MP en tant que biomarqueur en clinique.

# CYTOMETRIE EN FLUX DES MICROPARTICULES: APPLICATION A LA THROMBOPENIE INDUITE A L'HEPARINE

---

## **INTRODUCTION**

Les vésicules extracellulaires (EVs) désignent l'ensemble des vésicules émises par les cellules eucaryotes ou procaryotes quelque soit leur mécanisme de formation ou leur composition. Elles regroupent les corps apoptotiques, les exosomes et les microvésicules également nommées microparticules (MP). Par les molécules qu'elles vectorisent, elles sont impliquées dans le transfert horizontal d'information et dans une multitude de processus biologiques. Depuis quelques années, leur potentiel de biomarqueur suscite un intérêt croissant.

En revanche, la taille des EVs rend leur détection difficile et le manque de standardisation freine leur développement comme biomarqueurs et des méthodologies adaptées sont nécessaires. Parmi ces méthodologies, la cytométrie en flux (CMF) développée initialement pour l'étude cellulaire est aujourd'hui un outil de choix pour la quantification et la qualification des EVs de grosse taille à savoir les MP et les corps apoptotiques.

Après une brève introduction sur les MP, la partie bibliographique de ce travail s'attachera à montrer l'évolution et les spécificités de la CMF adaptée à l'étude des MP. La partie expérimentale de ce travail a pour objectif d'évaluer les performances d'un nouveau cytomètre fluo-sensible (le CytoFLEX S, Beckman-Coulter) dans la mesure des MP en condition physiologique et pathologique en prenant des plasmas de sujets sains et de patients présentant une thrombopénie induite par l'héparine (TIH) comme modèles.

# PARTIE I : LES MICROPARTICULES

## I) DEFINITION

Historiquement les microvésicules décrites par Wolf (Wolf 1967) pour leur propriété procoagulante étaient nommées microparticules (MP), c'est donc le terme que nous avons choisi d'employer tout au long de ce manuscrit.

Brièvement, les MP sont des vésicules extracellulaires dont la taille est comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  (avec un pic autour de 200 nm) issues d'un remodelage de la membrane plasmique appelé ectocytose. Toutes les cellules sont capables de produire ce type de vésicules à l'état basal. Ce phénomène est amplifié par stimulation. Le tableau 1 résume les caractéristiques des MP en termes de mécanisme de formation, de composition et de taille les comparant à celles des exosomes et des corps apoptotiques.

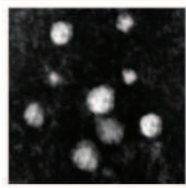
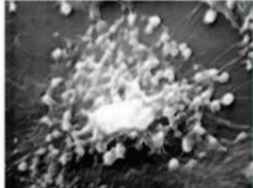

	Exosomes	Microparticules, Ectosomes, Microvésicules					Corps apoptotiques
							
Taille	30-300 nm	0,1-1 $\mu\text{m}$					0,5-4 $\mu\text{m}$
Morphologie	Arrondies	Hétérogènes					Hétérogènes
Marqueurs	CD81 Syntenine-1 TSG101 ADAM10 EHD4	PMP	ERY-MP	GRAN-MP	MONO-MP	ENDO-MP	Histones, ADN
		CD42 CD31 CD41 CD61 CD62P	CD235a	CD45 CD11b CD66b CD15*	CD14 HLA-DR*	CD146 CD144 CD31 CD62E CD105	
PS	-	+					-
Origine	Exocytoses	Vésiculation					Mort cellulaire
Composition	Protéines, ARNm, $\mu\text{ARN}$	Protéines, ARNm, $\mu\text{ARN}$					Protéines, ARNm, $\mu\text{ARN}$ , ADN
Centrifugation	> 100 000g	<100 000g					<10 000g

Tableau 1: Caractéristiques des vésicules extracellulaires. PMP: MP plaquettaire; Ery-MP: MP érythrocytaire; Gran-MP: MP-granulocytaire; Mono-MP: MP Monocytaire; Endo-MP: MP endothéliale; PS: phosphatidylsérine. Tableau de (Balducci et al. 2012) adapté selon (Kowal et al. 2016) \*Données obtenues au laboratoire

## **II) FORMATION ET COMPOSITION DES MP**

Les MP sont émises par vésiculation à partir des cellules en réponse à différents stimuli ou lors de l'apoptose. La membrane cellulaire est composée d'une bicouche phospholipidique qui est asymétrique au repos. Les PL cationiques tels que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont concentrés sur le feuillet externe tandis que les PL anioniques comme la phosphatidylsérine (PS) sont séquestrés sur le feuillet interne. La formation et la libération des MP nécessite un remaniement de la membrane plasmique conduisant classiquement à une surcharge de PS sur le feuillet externe de la membrane aboutissant au bourgeonnement cellulaire. Les mouvements de phospholipides entre feuillets internes et externes sont assurés par des activités transportrices de phospholipides tels que des flippases, des floppases et des scramblases dont certaines sont maintenant bien identifiées comme la molécule TMEM16F pour l'activité scramblase (Ridger et al. 2017). La plupart de ces activités sont dépendantes de la concentration calcique. Des mécanismes indépendants de l'externalisation de la PS ont également été décrits.

En parallèle, l'augmentation de calcium intra-cytoplasmique active un clivage protéolytique du cytosquelette par des enzymes comme les calpaïnes et une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation des chaînes légères de myosine. Ainsi, la combinaison du détachement local de la membrane plasmique avec le cytosquelette et la contraction de celui-ci aboutit à la libération de la MP. Ces mécanismes ont récemment été détaillés par Florence Toti (Ridger et al. 2017)(Figure1) .

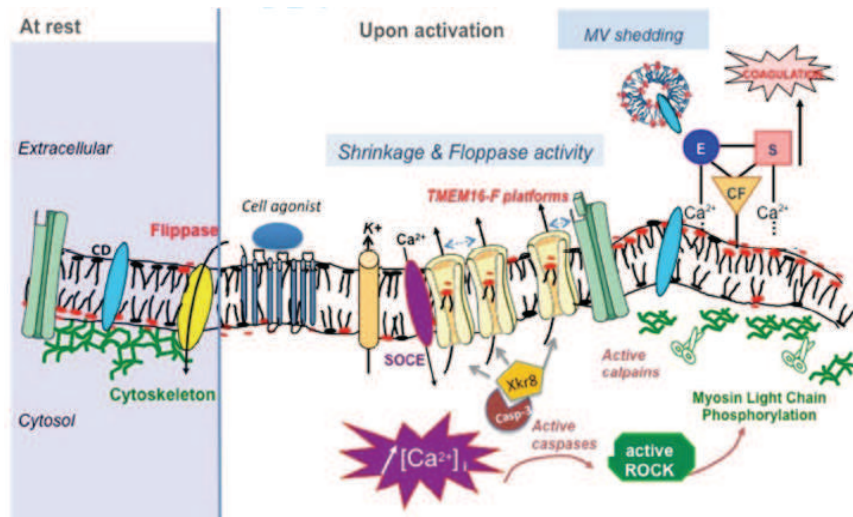


Figure 1: Au repos, la PS est concentrée à la membrane interne par l'activité de la flippase. Lors de l'activation cellulaire et de l'inhibition de la flippase dépendante du calcium, la PS est retrouvée sur le feuillet externe conduite par TMEM-16F. La concentration élevée de calcium en partie dû aux canaux SOCE favorisent la constitution des plateformes TMEM16-F par oligomérisation. Un déséquilibre transitoire des phospholipides associé à la protéolyse du cytosquelette par les calpaïnes et / ou les caspases conduit au relargage de MP. Le PS exposée catalyse l'assemblage des complexes de coagulation sanguine à la surface de la cellule et de la MP. (E: Enzyme, S: substrat, cofacteur CF)  
Extrait de Ridger et al 2017

Les MP formées à partir du bourgeonnement cellulaire emportent au moment de la vésiculation une partie de la membrane plasmique et du contenu de la cellule dont elles sont issues. De ce fait elles sont principalement constituées de lipides, de protéines mais également vectorisent des acides nucléiques. Les MP d'un sujet sain contiennent une majorité de PL dont 60% de phosphatidylcholine mais exposent également de la sphingomyéline, phosphatidyléthanolamine et de la PS (Weerheim et al. 2002). Cette composition dépend essentiellement de l'état de la cellule d'origine au moment du phénomène de vésiculation donc non seulement de sa nature mais également du stimulus qui a provoqué la vésiculation.

Parmi les protéines emportées au moment de la vésiculation on retrouve par exemple des intégrines, des molécules du complexe d'histocompatibilité, des protéines de régulation de l'apoptose ou des enzymes (Nielsen et al. 2017). La localisation sur la membrane plasmique et le mode d'attachement au cytosquelette influent sur la probabilité pour une molécule d'être emportée sur les MP.

Ainsi ces dernières sont enrichies en molécules issues des zones riches en cholestérol (lipid rafts) ou attachées par une ancre glycosylphosphatidylinositol.

Enfin, les acides nucléiques contenus dans le cytoplasme cellulaire comme les ARNm ou les micro-ARN (miR), peuvent être emportées par les MP qui participent au transfert d'informations génétiques induisant des changements phénotypiques transitoires ou persistants sur des cellules receveuses.

### **III) ROLES BIOLOGIQUES DES MICROPARTICULES**

Dû au large panel de molécules qu'elles sont capables de vectoriser, les MP sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques tels que la coagulation, l'inflammation, l'angiogénèse ou la dysfonction endothéliale. Leur implication dans la coagulation et l'inflammation pose la question de leur rôle dans la thrombose.

Dans la cadre de cette thèse, je me limiterais à développer leur action dans l'hémostase et l'inflammation afin de mieux appréhender leurs potentielles implications dans la thrombopénie induite à l'héparine (TIH).

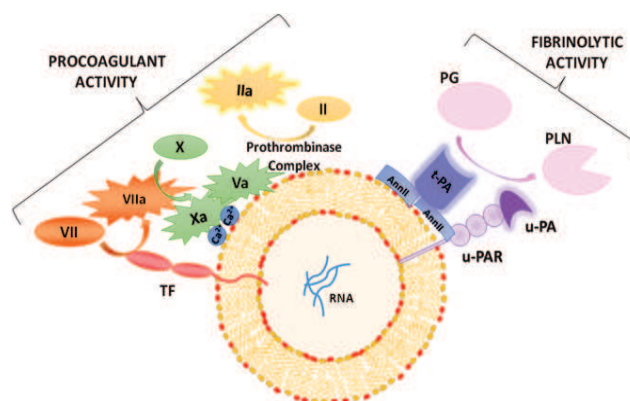
#### **A) ROLE PROTHROMBOTIQUE DES MP**

##### **1) MP, PHOSPHATIDYLSERINE ET FACTEUR TISSULAIRE**

L'expression de PS et de facteur tissulaire (FT) par les MP sert de base à leur effet procoagulant (Owens et al Circ Res 2012). La PS facilite l'assemblage des complexes calcium-dépendant de la coagulation. Le FT est le principal initiateur de la coagulation. Il forme un complexe avec le facteur VII et le facteur X pour générer du facteur Xa. La PS et le FT ne sont pas indépendants l'un de l'autre. En effet, la PS est nécessaire à la pleine activation du FT. Ainsi, c'est la combinaison des deux molécules sur une surface restreinte qui aboutit à la formation de MP très procoagulantes comme par exemple les MP issues de monocytes, d'endothélium activés (Figure 2), ou les MP cancéreuses. La présence de FT à la surface de MP plaquettaires a fait débat dans la littérature mais provient probablement d'un transfert de FT par des MP d'origine monocyttaire ou endothéliale.

De nombreux modèles animaux de thrombose ont montrés que l'injection de MP exogènes ou certaines MP endogènes s'accumulaient sur le site de lésion vasculaire et participaient à la croissance des thrombi (Mege et al. 2016).

Figure 2 : Représentation des MP vectorisant des acteurs moléculaires impliqués dans l'Hémostase (Vallier et al. 2017)



## 2) MP, FACTEURS CONTACTS, POLYPHOSPHATES ET NETS

A côté de ces mécanismes classiquement décrits, de nouvelles voies procoagulantes ont également été avancées pour expliquer la contribution des MP à la thrombose. Le groupe de Thomas René a mis en évidence la présence de FXIIa sur les PMP et MP érythrocytaires (Ery-MP) et leur capacité à initier la génération de thrombine par la voie endogène de la coagulation. De manière intéressante, ils ont également montré que les souris KO pour le FXII, FXI et le kininogène étaient protégées contre la mortalité provoquée par l'infusion de MP dérivés du cancer de la prostate sur un modèle d'embolie pulmonaire (Nickel et al. 2015, 2016). Ces MP exposent également des polyphosphates qui sont des activateurs du FXII inorganiques stockés dans les plaquettes et libérés lors de leur activation. Ceci suggère que les tumeurs pourraient générer des MP riches en polyphosphates qui activeraient la phase contact favorisant ainsi la formation du thrombus.

Récemment il a également été montré que les MP pouvaient contribuer à la thrombose en provoquant la formation de Neutrophil Extracellular Traps (NETs) (Leal et al Sci Report 2017).

## B) ROLE ANTI THROMBOTIQUE DES MP

Nous venons de décrire la fonction procoagulante des MP, cependant il a également été montré qu'elles pouvaient avoir un rôle anticoagulant. Des molécules anticoagulantes sont vectorisées par les MP comme l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la thrombomoduline (TM) ou les protéines C et S. Par exemple, les MP endothéliales, monocytaires et tumorales peuvent porter du TFPI. Ceci a été décrit par exemple chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde et de diabète (Steppich et al. 2005; Tsimmerman et al. 2011; Koshiar et al. 2014).



D'autres MP participent à la régulation de la génération de thrombine par expression de TM par les Mono-MP et du récepteur de la protéine C (EPCR) par les Endo-MP. Les Ery-MP vectorisent les protéines C et S, impliquées dans la régulation de génération de thrombine.

Plus récemment, il a été montré que l'action anticoagulante des MP peut également provenir de l'action de miR transportés par les MP et transférés à des cellules cibles. Ainsi les MP porteuses de miR-19b et miR-223 interfèrent avec la synthèse du FT par les cellules endothéliales (Li et al. 2014).

D'autre part, des MP fibrinolytiques vectorisant l'urokinase (u-PA) ou l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ont été rapportées dans la circulation de sujets sains et dans diverses circonstances pathologiques (Lacroix et la JTH 2013).

Ainsi le rôle des MP dans l'hémostase pourrait résulter d'une balance entre leur activité procoagulante et anticoagulante/fibrinolytique (Figure 3). Cependant, le fait même ou les circonstances dans lesquelles le côté anticoagulant ou fibrinolytique pourrait compenser le côté procoagulant sont encore inconnus.

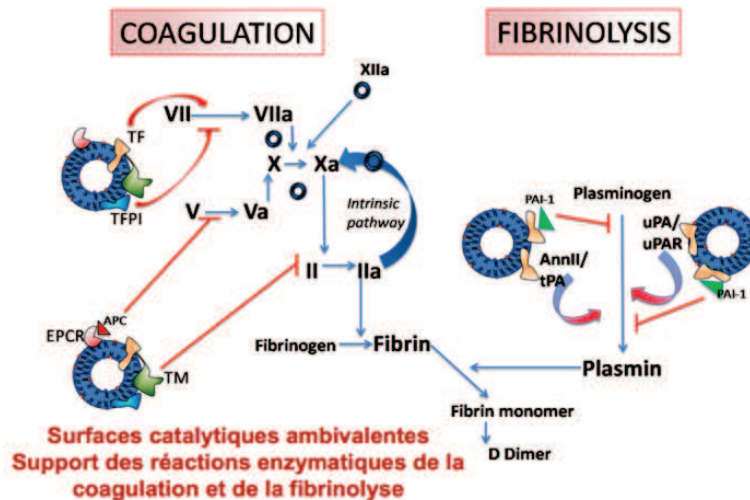


Figure 3 : Les microparticules sont des supports de la coagulation et de la fibrinolyse. Adapté de (Lacroix et al. 2013).

## **C) ROLE DANS L'INFLAMMATION**

La modulation de l'inflammation par les MP est complexe et a été décrite dans de nombreux travaux. Elles agissent par exemple en vectorisant des molécules de l'inflammasome comme les phospholipides oxydés capables d'activer les récepteurs du facteur d'activation plaquettaire (PAF) présents sur les cellules endothéliales et les leucocytes (Watanabe et al. 2003). Elles constituent un substrat pour la phospholipase A2, aboutissant à la synthèse d'acide lysophosphatidique, puissant médiateur pro-inflammatoire et agoniste plaquettaire (Barry et al. 1999).

Les MP favorisent également les interactions entre leucocytes et endothélium et participent au recrutement des cellules immunitaires par exemple en induisant l'expression d'ICAM-1 sur l'endothélium secondaire à l'apport d'acide arachidonique qu'elles vectorisent (Barry et al. 1997, 1998). De même, les MP plaquettaires peuvent faciliter le recrutement de nombreuses cellules immunes (monocytes, lymphocytes T et B, cellules NK) (Forlow et al. 2000; Ogura et al. 2001; Baj-Krzyworzeka et al. 2002).

Les MP agissent aussi en provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par interactions avec les cellules endothéliales (IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1) ou monocytaires (IL-1b, TNFa, IL-8) (Mesri and Altieri 1998, 1999; Nomura et al. 2001; Distler et al. 2005).

Il est important de souligner que le lien étroit existant entre inflammation et coagulation est en parti supporté par l'action des MP.

Par exemple il a récemment été décrit que l'activation de macrophages induite par l'ATP extracellulaire (signal de dommage cellulaire) provoquait une vésiculation de MP procoagulantes exprimant du FT via l'activité caspase 1 (Rothmeier et al. 2015).

En résumé, les MP servent de cargo transportant des molécules effectrices d'une cellule vers l'autre influençant ainsi diverses réactions physiopathologiques et participant à la communication intercellulaire. Les molécules vectorisées dépendent de la cellule dont sont issues les MP et de l'état initial de la cellule. De ce fait il est important de bien définir le profil d'action biologique de chaque sous-population de MP pour identifier précisément leurs rôles au plan physiologique et pathologique (Figure 4).

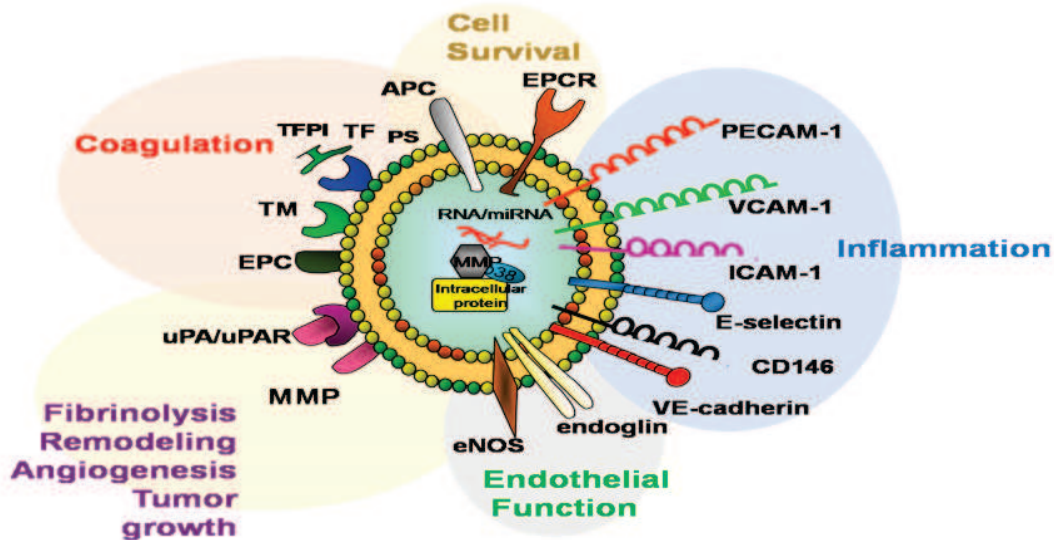


Figure 4 : Microparticules : Cellules miniatures aux multiples facettes-Exemple de MP endothéliales- (Dignat-George and Boulanger 2011)

APC : protéine C activée ; eNOS : nitric oxide synthase endothéliale ; EPCR : récepteur endothélial de la protéine C ; ICAM-1: molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; MMP : metalloprotease matricielle ; PECAM-1 : molécule d'adhésion plaquettes/endothélium 1 ; PS : phosphatidylserine ; FT : facteur tissulaire ; TM : thrombomoduline ; uPA : urokinase ; uPAR : récepteur de l'urokinase ; VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1

## IV) RÔLE PHYSIOPATHOLOGIQUE DES MICROPARTICULES EN PATHOLOGIE : EXEMPLE DE LA THROMBOPENIE INDUITE A L'HEPARINE (TIH)

Les thrombopénies induites par l'héparine (TIH) sont des complications immunes des héparinothérapies causées par la synthèse d'anticorps reconnaissant les complexes formés par l'héparine (H) fixée au facteur plaquettaire 4 (PF4).

Le développement de TIH dépend du type d'héparines prescrites mais dépend également du contexte clinique. Leurs survenues sont favorisées dans les indications chirurgicales notamment cardiaques avec circulation extracorporelle (CEC) ou en chirurgie orthopédique où l'étendue des lésions majorent le risque de développer une TIH (Gruel et al. 2014).

La TIH de type I consiste en une thrombopénie aiguë survenant dans les minutes post-héparinothérapies causée par l'agglutination des plaquettes induites par l'héparine. La TIH de type II associe paradoxalement thrombopénie et thromboses et les plaquettes remontent dès l'arrêt du traitement (Arepally 2017).

## A) PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TIH

L'héparine (chargée négativement) et le PF4 (chargé positivement) forment des complexes par interactions électrostatiques induisant une modification de la structure tridimensionnelle du PF4 qui est alors reconnu par le système immunitaire induisant la production d'anticorps dirigés contre le complexe PF4-Héparine (PF4 /H) (Figure 5).

Le PF4 est une chemokine cationique physiologiquement exprimée par les mégacaryocytes, stockée sous forme complexée à la chondroïtine sulfate appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) anioniques dans les granules  $\alpha$  des plaquettes. Les GAG sont des longues chaînes polymérisées de polysides chargées négativement que l'on retrouve à la surface des cellules hématopoïétiques et vasculaires. Le PF4 peut interagir avec les GAG entraînant la formation de complexe antigénique à la surface des plaquettes, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et des cellules endothéliales.

8 à 17% des patients traités par HNF et 2 à 8% des patients traités par HBPM ou Fondaparinux développent des anticorps anti-PF4/H (Arepally 2017). La fréquence d'apparition de ces anticorps, inhabituellement élevée, soutient l'hypothèse d'une interaction entre le PF4 et les GAG bactériens. Le PF4 aurait alors un rôle dans la défense antibactérienne et les TIH pourraient être le résultat d'une réaction immunitaire mal dirigée des anticorps anti-PF4/GAG bactériens contre les complexes PF4/H (Krauel et al. 2011).

*Figure 5: Modèle schématique de l'activation plaquettaire dans les thrombopénies induites à l'héparine. L'activation plaquettaire résulte de la fixation des IgG anti-PF4/H couplées à leur antigène en surface plaquettaire via le récepteur Fc aux immunoglobulines de type IIa. Adapté de Warkentin et al. 1996 Transfusion medicine reviews.*



## B) LA TIH : UNE REACTION IMMUNITAIRE ATYPIQUE

Les caractéristiques de la réaction immunitaire humorale de la TIH ne correspondent pas à un profil d'allo-immunisation classique primaire ni secondaire.

En effet, contrairement à ce qui est observé dans les réactions immunitaires primaires, lors d'une TIH les IgG, IgA et IgM apparaissent simultanément sans être associées à une commutation isotypique et apparaissent entre le 3<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour. Pour plus de deux tiers des patients les anticorps anti-PF4/H apparaissent entre le 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour (Greinacher et al. 2009)(Figure 6). De plus, les IgG anti-PF4/H présentent une plus faible réactivité que celles observés lors de réaction immune secondaire et ne persistent pas au-delà de 3 mois (Pötschke et al. 2012).

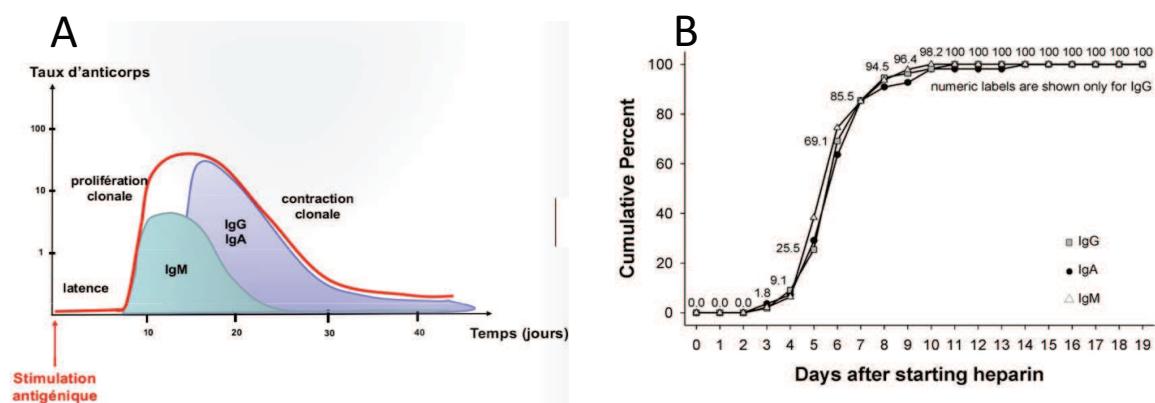


Figure 6: Comparaison de la cinétique de réponse humorale primaire classique et lors de la TIH de type II par Greinacher et al. Blood 2009.

Greinacher évoque la possibilité d'une réponse secondaire impliquant une exposition préalable des patients au complexe PF4/H ou du moins à des antigènes d'origines environnementaux ou microbiens entraînant une réaction croisée. Seules les IgG semblent être impliquées dans la pathogénèse de la TIH car seul cet isotype est capable d'induire l'activation plaquettaire (Warkentin et al. 2009). Bien que les IgA et IgM soient fréquemment détectées lors de TIH leur rôle est largement débattu. Ces immunoglobulines n'ont pas la capacité de se fixer aux plaquettes et n'induisent pas d'activation plaquettaire. Une étude rapporte tout de même 12 cas de patients présentant une TIH clinique probable en l'absence de détection d'IgG anti-PF4/H (Amiral et al. 1996).

## **C) MECANISMES THROMBOTIQUES**

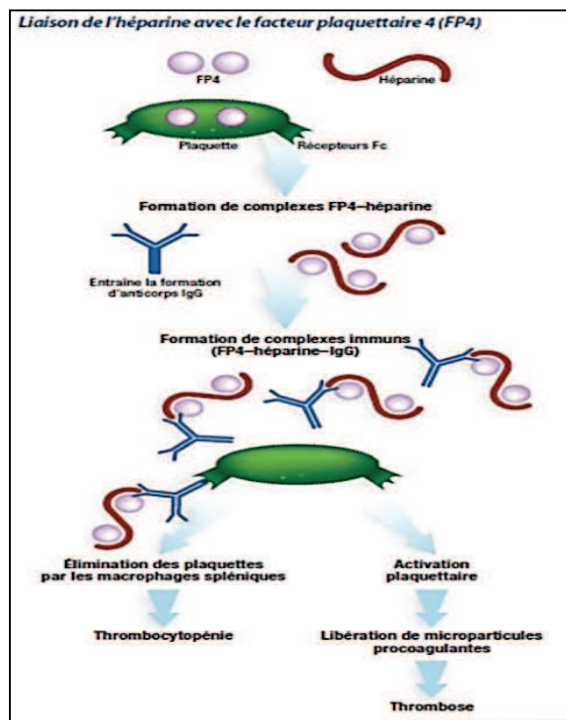
L'activation intravasculaire des plaquettes, des leucocytes et de l'endothélium conduisent à un état d'hypercoagulabilité responsable de thromboses.

### **1) ACTIVATION PLAQUETTAIRE ET MICROPARTICULES**

Les IgG anti-PF4/H reconnaissent d'une part le complexe PF4/H présent en surface plaquettaire et d'autre part le Fc $\gamma$ RIIa impliqué dans l'activation plaquettaire. L'activation intracellulaire est responsable de la production d'ADP et de TxA2 ainsi que de l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  favorisant l'agrégation plaquettaire.

D'autre part la reconnaissance des plaquettes par des anticorps augmente leur clairance expliquant la thrombopénie observée. L'activation plaquettaire induit la sécrétion de plus de PF4 et des agrégats de plaquettes activées se forment via l'intégrine activée  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Les plaquettes deviennent procoagulantes par expression membranaire de PS et produisent des MP (Madeeva et al. 2016) (Figure 7). En effet, dès 1994, Warkentin utilise la CMF et des tests d'activité sur des plasmas de patients atteints de TIH et montre une stimulation de la formation de PMP en présence d'héparine ainsi que leur activité procoagulante. Dans les mêmes conditions, aucun sérum issu de patients atteints de thrombocytopénie induite par la quinine n'a généré de MP. Il émet l'hypothèse que les PMP participent à la formation des thrombus dans les TIH (Warkentin et al. 1994). En 2000, une analyse morphologique soutient cette hypothèse en montrant la présence de PMP à la surface des plaquettes activées des patients atteints de TIH à l'aide de la microscopie électronique (Hughes et al. 2000).



1. Liaison de l'héparine au PF4 issus des granules plaquettaires formant l'antigène PF4/H immunogène.
2. Formation du complexe immun par les IgG anti-PF4/H dans la circulation.
3. Fixation du complexe immun aux plaquettes via le récepteur Fc aux IgG
4. Activation plaquettaire (et monocytaire) et libération de plus de PF4
5. Élimination des plaquettes fixées par les IgG par les macrophages spléniques = thrombopénie
6. Libération de MP plaquettaires et monocytaires procoagulantes impliquées dans les thromboses.

Figure 7: Formation du complexe PF4-Héparine reconnu par les anticorps pathogènes aboutissant à l'activation plaquettaire

## 2) ACTIVATION MONOCYTAIRE, ENDOTHELIALES ET MICROPARTICULES

Traditionnellement l'activation plaquettaire est reconnue comme l'élément précoce et indispensable du déclenchement de la TIH. Cependant l'activation monocytaire, joue un rôle important dans la pathogénèse, elle est due à la reconnaissance des complexes PF4/GAG monocytaire par les IgG anti-PF4/H circulants et à la liaison de ces complexes sur le récepteur FcγRI. Les GAG monocytaire (sulfate d'héparane et du sulfate de dermatane) ont une affinité pour le PF4 supérieure à celle de la chondroïtine sulfate présente sur les plaquettes. Cette différence d'affinité est à l'origine d'un transfert du PF4 des plaquettes vers les monocytes lorsque les taux restent faibles. Les complexes PF4/GAG monocytaires sont précocement reconnus par les anticorps anti-PF4/H. En parallèle lorsque l'amplification de l'activation plaquettaire atteint un seuil suffisant pour générer des taux élevés de PF4, les plaquettes deviennent la cible principale des anticorps.

Une fois activés, les monocytes expriment du facteur tissulaire (FT) (Pouplard et al. 2001) impliqué dans la génération de thrombine. Les MP-monocytaires produites suite à l'activation cellulaire expriment elles aussi du FT. Ces MP ont été retrouvées dans les thrombi formés, ainsi les monocytes et MP FT+ participent à la formation des thrombi.



De plus la génération de thrombine en surface des monocytes activés (exprimant le FT) provoque l'activation plaquettaire via les récepteurs Protease Activated Receptor (PAR) couplés aux protéines G. Cette boucle d'amplification favorise l'agrégation plaquettaire (Figure 8).

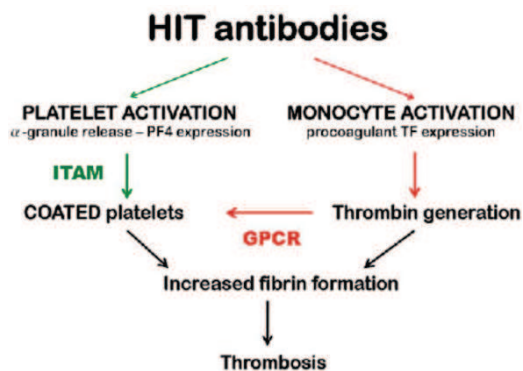


Figure 8: Rôle des monocytes dans la thrombopénie induite à l'héparine (issu de Madeeva et al. 2016)

En 2012, une expérience in vitro prouve la production de MP-FT+ par les monocytes activés en présence de PF4, d'héparine et d'anticorps monoclonaux d'origine murin spécifique du complexe PF4/H (Kasthuri et al. 2012). Cette activation est médiée par le FcγRI et requiert l'activation de la voie de signalisation MEK1-ERK1/2.

Récemment une étude a rapporté la présence de MP portant du PF4 (MP-PF4+) dans la circulation des patients atteints de TIH. Par ailleurs chez les patients atteints de TIH, un taux élevé de MP-FT+ semble être corrélé à la survenue de complications thrombotiques (Campello et al. 2017). Ainsi, les MP pourraient permettre l'identification des sujets atteints de TIH présentant un fort risque thrombotique et de monitorer la prise en charge thérapeutique.

Les cellules endothéliales forment la monocouche cellulaire intra-luminale des vaisseaux sanguins et jouent un rôle dans la régulation du flux vasculaire ainsi que dans l'homéostasie vasculaire et participent au contrôle de la formation des thromboses. Une altération de l'endothélium expose le sous-endothélium procoagulant et prédispose aux thromboses.

A l'état physiologique l'endothélium est recouvert par le glycocalyx jouant le rôle de gaine composé de glycoprotéines, de protéoglycanes, et de GAG (principalement d'héparane sulfate, HS). Le PF4 se lie à l'HS, ces complexes sont reconnus par les anticorps-anti-PF4/H.

La fixation du PF4 neutralise les charges négatives des GAG et rend possible l'interaction entre plaquettes et cellules endothéliales (Madeeva et al. 2016).



Le PF4 se fixe également sur la thrombomoduline (TM) à la surface de l'endothélium accélérant la production de Protéine C inhibant la génération de thrombine. La présence d'anticorps anti-PF4/H lors des TIH bloque l'interaction entre le PF4 et la TM freinant la production de protéine C activé et favorisant la coagulation (Kowalska et al. 2011).

Par ailleurs l'activation endothéliale entraîne la libération d'IL-6 et de facteurs d'adhésion qui favorisent le recrutement des monocytes, dont le rôle dans la formation de thromboses a été exposé précédemment (Madeeva et al. 2016).

### 3) IMPLICATION DES MICROPARTICULES LEUCOCYTAIRES

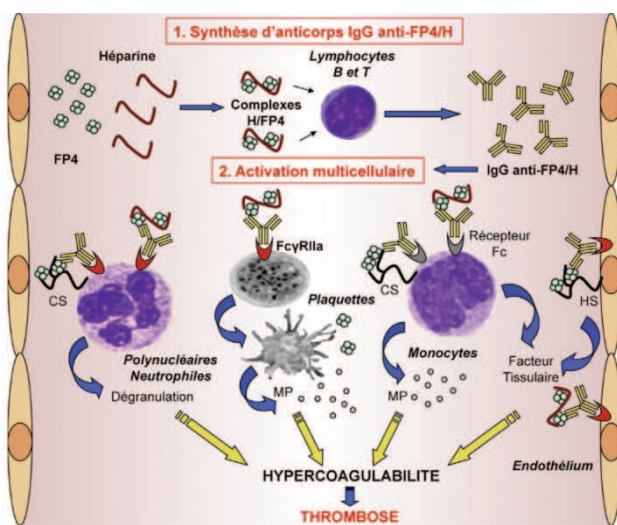


Figure 9: physiopathologie des thrombopénies induite par l'héparine. FP4: facteur plaquettaire 4, HS: Héparane sulfate, CS: chondroïtine sulfate. Image tirée de La revue de médecine interne Gruel et al. 2014

La physiopathologie de la TIH n'est pas totalement élucidée. Les MP semblent jouer un rôle dans le développement de la TIH et notamment dans le mécanisme conduisant à la thrombose, principale complication de la TIH (Figure 9). Une meilleure compréhension du rôle des MP pourrait conduire à les utiliser comme cible thérapeutique comme marqueur biologique dans le cadre du diagnostic de la TIH.

## **D)DIAGNOSTIC**

La principale manifestation biologique observée est paradoxalement la décroissance plaquettaire potentiellement associée à des complications thromboemboliques extrêmement délétères. La TIH peut être évoquée devant des manifestations cliniques atypiques de type nécrose cutanée, hypotension, amnésie, dyspnée secondaire à l'injection d'héparine (Gruel et al. 2014). Le score « 4Ts » (pour « Thrombocytopenia, Timing, Thrombosis and oTher cause of thrombocytopenia ») a été proposée par Warkentin et a récemment été actualisé (Linkins et al. 2012). Ce score est un pré-test basé sur le taux de plaquettes, le délai de survenue des signes de TIH, la survenue ou non de thrombose et la présence d'explications alternatives à thrombopénie. Il permet de classer le risque de TIH en 3 catégories. Ce test possède une bonne valeur prédictive négative (VPN = 0,998) en cas de risque faible (<3) mais une mauvaise valeur prédictive positive en cas de risque intermédiaire (VPP= 0,14) et élevé (VPP= 0,64). Afin d'éviter le sur-diagnostic un groupe d'expert a développé le score « HIT expert probability» qui semble être mieux corrélé aux tests biologiques (Cuker et al. 2010).

Le diagnostic de certitude de TIH repose sur la mise en évidence des anticorps anti-PF4/H par des tests immunologiques de type ELISA et des tests fonctionnels d'activation plaquettaire. La prescription de ces tests est orientée en fonction du score 4Ts. Pour les patients présentant un risque faible de TIH, les tests ne sont pas recommandés.

### **1) LES TESTS IMMUNOLOGIQUES**

Les tests immunologiques détectent la présence d'anticorps anti-PF4 /H dans le sérum des patients. Les tests ne détectent pas tous les mêmes classes d'immunoglobulines : soit IgG, IgA et IgM, soit IgG seuls, et utilisent différentes cibles antigéniques. Globalement, ils présentent l'avantage d'être simples, rapides et ont montré une bonne sensibilité (>99%). En revanche la spécificité de ces tests n'est pas satisfaisante (comprise entre 30 à 70%). Ce manque de spécificité est en partie expliqué par le taux élevé de séroconversion asymptomatique (Arepally 2017).

## 2) LES TESTS FONCTIONNELS D'ACTIVATION PLAQUETTAIRE

Le test de libération de la sérotonine, le test d'agrégation plaquettaire et les tests de cytométrie de flux sont des tests diagnostic basés sur l'activation plaquettaire. Ils démontrent la capacité des anticorps à fixer les Fc $\gamma$ R11a. Ces tests ont une bonne spécificité mais une mauvaise sensibilité (Arepally 2017). Des plaquettes de sujets sains sont incubées en présence d'héparine et de plasma ou sérum du patient. La sensibilité dépend de la méthode de mesure choisie (agrégométrie < cytométrie de flux < signal radioactif).

Le test de libération de sérotonine radiomarquée au C<sup>14</sup> est le test de référence, mais l'emploi de C<sup>14</sup> limite son utilisation (Sheridan et al. 1986). Des plaquettes témoins radiomarquées sont incubées en présence du plasma à tester et d'héparine. En présence d'IgG anti-PF4/H, les plaquettes sont activées et de la sérotonine radiomarquée est relarguée dans le surnageant. La radioactivité mesurée à partir du surnageant permet de démontrer l'activation plaquettaire et donc la présence d'IgG anti-PF4/H.

Le test d'agrégation plaquettaire induite à l'héparine (TAP) mesure l'agrégation de plaquettes témoins en présence d'héparine et de plasma du patient par agrégométrie. Un blocage de l'agrégation par un anticorps monoclonal anti-CD32 (Fc $\gamma$ R11a) permet de confirmer la positivité du test. Il est le plus utilisé des tests fonctionnels.

Il existe également un test de cytométrie en flux basé sur la mise en évidence de P-selectine (CD62a) comme marqueur d'activation plaquettaire.

De manière intéressante, un test basé sur la génération de PMP utilisable en routine a été proposé (Mullier et al. 2014a) (Figure 10). Dans ce test des plaquettes de sujets sains sont incubées en présence de plasma déplaquettés du patient en présence de 1UI/mL d'héparine. Dans un second temps des numérations de PMP sont effectuées par CMF. La génération de PMP est le témoin de la présence de complexe IgG-PF4-H. La spécificité de ce test est confirmée par l'inhibition de génération de PMP en présence de fortes doses d'héparine qui dissocie les complexes présents dans le plasma du patient. Ce test utilisable en routine montre des résultats comparables à ceux obtenus avec le test de libération de sérotonine radiomarquée au C<sup>14</sup>.

Ces résultats dans la TIH illustrent à la fois le rôle physiopathologique que peuvent avoir les MP en tant que vecteur d'information et d'activité (procoagulante dans ce cas) et le potentiel de biomarqueurs que nous allons maintenant aborder dans le chapitre suivant.

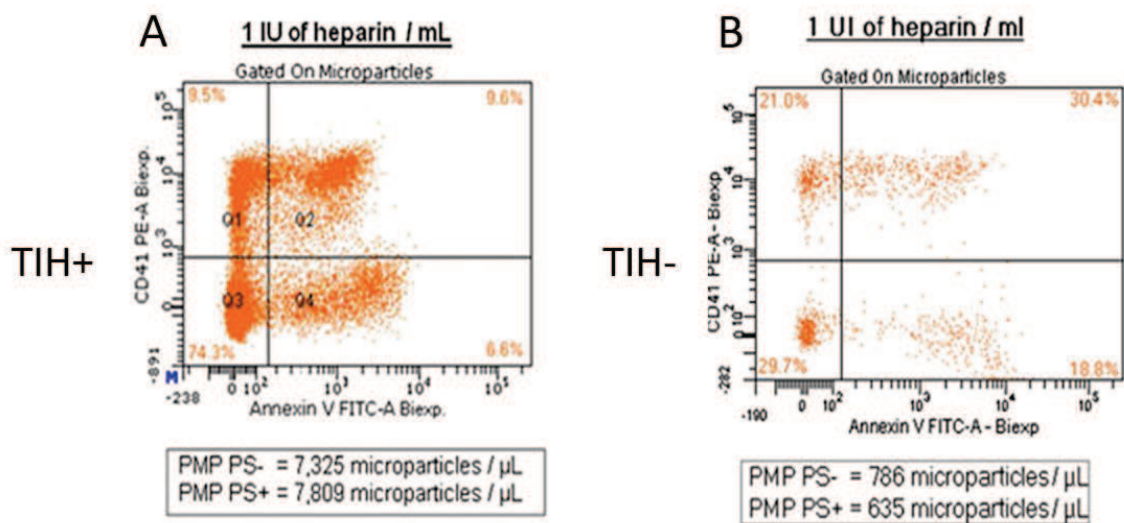


Figure 10: Résultat d'un test de génération de MP (A) chez un sujet atteint de TIH, (B) chez un sujet sain (Mullier et al. 2014b).

## V) RÔLE DES MICROPARTICULES COMME BIOMARQUEUR

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, pathologiques ou pharmacologiques en réponse à une intervention thérapeutique. Le biomarqueur doit subir un processus de développement précis afin de valider sa valeur en tant qu'indicateur d'un état biologique. Le développement d'un biomarqueur est donc un travail innovant, effectué en partenariat avec des industriels et nécessitant un moyen de mesure standardisé permettant des comparaisons multicentriques.

Les MP sont des témoins de l'état cellulaire facilement accessibles (une prise de sang suffit) et leur implication dans de nombreux processus physiologiques en font des biomarqueurs potentiels notamment dans les domaines vasculaires et tumoraux.

Leur détection peut intervenir à différents niveaux ; dépistage, diagnostic, pronostic et suivi thérapeutique. Par exemple, le taux plasmatique d'Endo-MP permet l'identification des patients coronariens les plus à risque de développer des événements cardiovasculaires (Nozaki et al. 2009). De même dans la pathologie tumorale, la mise en évidence dans les liquides biologiques de MP d'origine tumorale suscite un intérêt croissant (Zocco et al. 2014).

De nombreuses études montrant l'intérêt des MP comme biomarqueurs ont été publiées (Tableau 2) : Les MP-FT+ auraient un rôle pronostic dans la thrombose chez le patient atteint de cancer (surtout pancréas et cerveau)(Zwicker et al. 2009), les MP leucocytaires pourraient servir dans la prédiction de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose chez les patients avec sténose carotidienne (Sarlon-Bartoli et al. 2013), les MP GFRv3+ pourraient servir pour le diagnostic et le suivi de glioblastome (Shao et al. 2012), les MP exprimant le glypican pourraient permettre d'établir un diagnostic précoce des cancers du pancréas (Melo et al. 2015), enfin les MP présentes dans les liquides pleuraux pourraient améliorer la sensibilité dans le diagnostic des pleurésies malignes (Roca et al. 2016).

<b>Biomarqueurs</b>	<b>Cancer</b>	<b>Indication</b>	<b>Liquide biologique</b>
PSA	Prostate	Dépistage	Urine
PSA	Prostate	Dépistage	Plasma
EGVRvIII	Glioblastome	Diagnostic précoce	Sérum
(phospho)Met	Mélanome	Diagnostic précoce/ pronostic	Plasma
Caveolin-1	Mélanome	Diagnostic précoce	Plasma
Survivin	Prostate	Diagnostic précoce	Plasma
CD24	Sein	Diagnostic précoce	Sérum
EGFR	Poumon	Diagnostic/ Médecine personnalisée	Sérum

Tableau 2: Exemple de marqueurs tumoraux exprimés par les MP dans différents cancers (adapté de zocco et al 2014)

## **VI) ANALYSE DES MICROPARTICULES**

L'utilisation des MP comme biomarqueur en pathologies humaines est cependant limitée par la nécessité de conditions pré-analytiques contraignantes et des difficultés méthodologiques. Les recommandations concernant le pré-analytique des MP initialement proposée par notre laboratoire (Lacroix et al JTH 2012) ont récemment été mises à jour par un panel d'experts (Coumans et al Circ Res 2017).

Au sujet de la partie analytique, les difficultés de détection des MP sont expliquées par leur petit diamètre et donc la faible quantité d'antigène présent à leur surface.

Une méthode idéale permettrait la détection des vésicules de façon individuelle avec une limite de détection connue d'au moins 50nm, une quantification et également un immunotypage informant sur l'origine cellulaire. Si actuellement, la plupart des techniques ne détectent pas les plus petites MP, des améliorations progressives dans la sensibilité des techniques ont vu le jour dans les 15 dernières années. Des méthodes fonctionnelles ont également été développées.

## **A) LES TESTS FONCTIONNELS**

La plupart des tests fonctionnels rapportés dans la littérature mesurant une activité dépendante des MP dans des échantillons biologiques sont focalisées sur leur activité procoagulante (Coumans et al. 2017).

Cependant d'autres tests permettent par exemple d'évaluer leur capacité de génération de plasmine. La plasmine est générée par l'incubation du plasminogène avec les MP capturées par des billes magnétiques et peut être révélée à l'aide d'un substrat chromogène spécifique de la plasmine.

### **1) ACTIVITE PROCOAGULANTE ASSOCIEE AUX PHOSPHOLIPIDES**

L'activité procoagulante dépendante des PL peut être mesurée soit par un temps de coagulation après ajout de facteur de coagulation Xa (FXa), ce test est commercialisé sous le nom de STA<sup>®</sup>-procoag PPL<sup>®</sup> (Diagnostica Stago) ou par un test de génération de thrombine (Coumans et al. 2017). Le STA<sup>®</sup>-procoag PPL<sup>®</sup> (Diagnostica Stago) mesure le temps de coagulation d'un plasma déplaqué par assemblage du complexe prothrombinase en l'absence d'apport de PL (Figure 11). Ce test est rapide (4 min), simple, reproductible et automatisé.

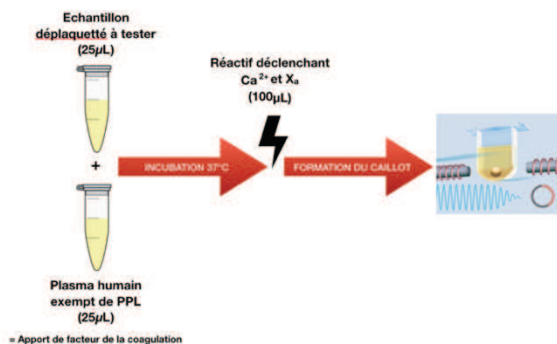


Figure 11: Principe du test principe du test STA Procoag PPL<sup>®</sup>. PPL : phospholipides ; Ca<sup>2+</sup> : Calcium ; X<sub>a</sub> : Facteur X activé

Le test de génération de thrombine (TGT) est un test global du processus de coagulation. Le Calibrated Automated Thrombogram® (Thrombinoscope BV, Maastricht, NL and Diagnostica Stago, Asnières, F) peut être utilisé avec un plasma riche en plaquettes pour mesurer l'action procoagulante des plaquettes.

Avec un plasma pauvre en plaquettes, son utilisation permet de mesurer l'activité procoagulante des MP. Selon le réactif utilisé l'activité procoagulante dosée provient soit des PL soit du FT. La révélation se fait en utilisant un substrat fluorogène de la thrombine.

## **2) TEST FONCTIONNEL D'ACTIVITE PROCOAGULANTE ASSOCIEE AU FT**

Outre le test TGT, d'autres tests plus spécifiques du dosage de l'activité du FT peuvent être utilisés. Certains de ces tests proposent de concentrer les MP des échantillons par ultracentrifugation. Les MP sont incubées soit avec un anticorps inhibiteur monoclonal anti-FT bloquant l'activité du FT soit en présence d'un anticorps isotypique contrôle. L'ajout de FVIIa et de FX déclenche la cascade de la coagulation. Le FXa généré est mesuré à l'aide d'un substrat chromogène. La quantité de FT est déterminée à l'aide d'une courbe de calibration (Woodhams 2014). Une version plus sensible de ce test a récemment été proposée par Biocytex. Il diffère du test précédemment décrit par l'ajout de FVII non activé et utilise un substrat fluorogène du FXa breveté permettant une lecture de fluorescence en microplaque sur Fluoroskan (CAT instrument, Stago). La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de FXa produit. Un facteur de correction est apporté par la mesure en présence de l'inhibiteur du FT. Les données sont exprimées en FT (fmol) par rapport à une courbe d'étalonnage (Agouti et al. 2015).

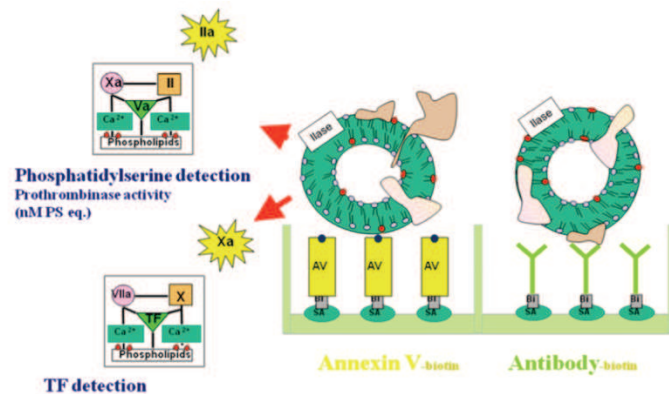
## **3) TEST DE CAPTURE**

Ces tests fonctionnels étudiant la voie des PL ou du FT peuvent être associés à des tests de capture comme le « Zymuphen MP activity assay » (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) qui propose une première étape de capture des MP sur un support solide (plaques ELISA) fonctionnalisés avec de l'Annexine V ou par des anticorps monoclonaux (Figure 12). Les MP sont ensuite incubées en présence des facteurs Xa, Va et de prothrombine afin de tester l'activité prothrombinase ou en présence de facteur X et FVIIa pour tester l'activité du FT.



La thrombine formée est révélée par un substrat chromogène en spectrophotométrie. La quantité de thrombine formée est proportionnelle à la quantité de PL ou à l'activité FT des MP présentes dans l'échantillon.

Figure 12: 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 JM. Freyssinet).



## **B) LES METHODES DE DETECTION**

Les principales caractéristiques des méthodes de détection sont résumées dans le Tableau 3.

### **1) METHODES NON-OPTIQUES**

#### **a) TUNING RESISTIVE PULSE SENSING (TRPS)**

Le TRPS mesure la variation d'impédance (principe Coulter) produite par le passage de vésicules en suspension à travers un nanopore. Le signal détecté renseigne sur la taille, la charge et la concentration des vésicules. En revanche cette méthode ne permet pas la distinction entre les MP et autres particules de même taille. De plus l'obstruction fréquente du pore par accumulation de molécules de haut poids moléculaires constitue un inconvénient majeur. (Van Der Pol et al. 2014).

#### **a) LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)**

La RMN est une technique récente qui permet une analyse sensible, rapide et précise des MP dans des échantillons biologiques et utilise des anticorps couplés à des nanoparticules magnétiques. La miniaturisation du système de résonance magnétique nucléaire ( $\mu$ RMN) permet de mesurer la différence magnétique entre l'échantillon biologique et les MP. Cette technique ne nécessite qu'un petit volume de sang, elle est simple d'utilisation et économique (Rho et al. 2013). La  $\mu$ RMN a été employée pour la détection des MP comme biomarqueur dans le glioblastome (Shao et al. 2012).



## **2) METHODES OPTIQUES**

### **a) LE « NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS » (NTA)**

Cette méthode mesure les mouvements browniens individuels de vésicules en suspension exposées à une lumière laser. La diffraction de la lumière est visualisée par microscopie et les mouvements Browniens sont enregistrés en temps réel. Le volume des vésicules est déduit par l'équation d'Estein-Strocke. Théoriquement, des sondes fluorescentes peuvent être utilisées afin de typer les vésicules. Cette méthode est caractérisée par une bonne sensibilité qui permet la détection de vésicules < 100nm mais une faible résolution. En effet une différence sera visualisée si leur taille diffère de 1,5 fois.

Cette méthode est également limitée par son manque de spécificité pour les vésicules biologiques. (Gardiner and Dragovic 2014)

### **b) MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM)**

La microscopie à force atomique (AFM), développée en 1986, est une technique de microscopie à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon basé sur l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes fournissant un signal électrique. Des images en trois dimensions sont obtenues par un logiciel après analyse point par point des vésicules fixées à l'aide d'anticorps sur une surface plane de type mica.

Ce microscope peut mesurer la distribution de vésicules classées selon leur taille relative. Le rendement de fixation des vésicules aux anticorps étant inconnu, la concentration de vésicules contenues dans l'échantillon à analyser ne peut être déterminée avec précision. La préparation des échantillons et la lecture peut prendre plusieurs heures cependant la détermination de la taille des vésicules est très précise puisque les résolutions latérale et verticale sont respectivement de 3nm et inférieure à 0,1 nm (Van Der Pol et al. 2014). Bien que chronophage une étude de Yuana et al, publiée en 2010, a montré que la résolution de cette technologie permet la détection de 1000 fois plus de PMP que la cytométrie de flux (cytomètre utilisé *FACS Calibur* capable de détecter les billes de polystyrène *Fluka* de 0.2, 0.5 and 1  $\mu\text{m}$ )(Yuana et al. 2010).

**c) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**

Les microscopes électroniques emploient un faisceau d'électrons dont la longueur d'onde appelée « longueur d'onde de Broglie », beaucoup plus faible que celle d'un photon, permet la création d'une image de haute résolution. C'est le Gold standard des méthodes de détection des MP permettant l'obtention d'informations précises sur la taille et la structure tridimensionnelle des MP. L'utilisation de cet outil requiert une préparation minutieuse de l'échantillon qui doit être rapidement congelé et déposé sur des surfaces adaptées. En cryo-microscopie électronique, des sections encore plus fines d'échantillons (<200nm) peuvent être obtenues par congélation à -80°C et directement analysées en préservant la forme native de la MP.

L'emploi de nanoparticules d'or associées à l'Annexine V ou des anticorps spécifiques permet d'ajouter une analyse phénotypique. Bien que très sensible cette technique est difficile à mettre en œuvre (Van Der Pol et al. 2014).

**d) IMAGERIE PAR RESONNANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPRi)**

Plus récemment une technique d'imagerie par résonance plasmonique de surface combinée à la technologie microarray a été appliquée dans le domaine des MP. La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique sensible de détection en temps réel sans marquage détectant les interactions entre molécules se situant à proximité d'une surface de métal précieux. Des anticorps imprimés sur une surface d'or selon la technologie microarray de protéines capturent les MP selon leur phénotype, cette interaction induit un changement d'indice de réfraction permettant la détection des MP (Zhu et al. 2014a).

Cette technique permet d'étudier les MP en fonction de la taille (SPR est sensible à la masse) et du phénotype (détection d'anticorps). Lors de l'illumination de la puce, les changements d'indice de réfraction sont détectés et traduisent la fixation de MP.

La SPRi présente un fort potentiel d'application pour l'étude des MP au sein d'un fluide biologique (Pugholm et al. 2015).

e) LA CYTOMETRIE EN FLUX

La CMF permet une analyse multiparamétrique rapide de milliers d'évènements par seconde (van der Pol et al. 2014). La mesure de MP par CMF repose sur la combinaison de leurs propriétés de dispersion lumineuse, l'expression de PS et d'antigènes spécifiques détectés par fluorescence. La CMF offre un fort potentiel d'analyse des MP. En effet, l'analyse de particules individuelles permet de détecter les sous-ensembles de MP, l'analyse multiparamétrique améliore la spécificité et une dimension quantitative peut être ajoutée. La vitesse de cette technique contraste avec les techniques de microscopie sensibles qui sont chronophages. Cette technologie est transposable en laboratoire de routine.

Au fil des dernières décennies, des améliorations technologiques ont permis d'améliorer sa sensibilité pour la mesure des MP jusqu'à en faire la méthode la plus prometteuse.

Nous allons maintenant nous attacher dans une deuxième partie de ce document à développer l'intérêt et les limites de cette méthodologie pour la mesure des MP ainsi que les améliorations effectuées après avoir rappelé son principe de fonctionnement.

	OPTIQUE					NON OPTIQUE	
	CMF	NTA	AFM	ME	SPRI	TRPS	RMN
<i>Principe physique</i>	Diffraction Fluorescence	Mvts Browniens	Interaction atomique	$\lambda$ de Broglie	Résonance plasmonique	Coulter, Impédance	Différence magnétique
<i>Détection MP</i>	Individuelle	Multiple	Individuelle	Individuelle	Sous-population	Multiple	Individuelle
<i>Limite de détection</i>	100nm*	80nm	3nm	5nm	70 nm	80 nm	/
<i>Quantification</i>	OUI	C°	OUI	OUI	OUI	C°	/
<i>Spécificité pour MP</i>	OUI	OUI / NON	OUI	OUI	OUI	NON	OUI
<i>Avantages</i>	Rapide	/	Topographie 3D	Morphologie	Rapide, Sensible	/	Rapide, Simple Economique
<i>Limites</i>	Résolution	Chronophage, Résolution	Chronophage	Préparation échantillon	/	Obstruction du pore	/

Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes de détection des microparticules. CMF : cytométrie en flux, NTA : nanoparticle tracking analysis, AFM: microscopie à force atomique, ME : microscopie électronique, SPRI : imagerie par résonance plasmonique de surface, TRPS : Tuning resistive pulse sensing, RMN : résonance magnétique nucléaire \*discutable

# PARTIE II : MICROPARTICULES ET CYTOMETRIE EN FLUX

---

## I) DEVELOPPEMENT HISTORIQUE DE LA CMF

*« Flow cytometry, was envisioned as an ideal method for counting and eventually for classifying cells »*

HOWARD M. SHAPIRO. 1995. PRATICAL FLOW CYTOMETRY, P.43

Le développement de la CMF fut initié par Moldavan en 1934 par la création de son compteur de cellule, composé d'un microscope et d'un capillaire dans lequel passaient les cellules en suspension. La détection était assurée par un capteur photoélectrique, placé sur l'oculaire. En 1940, l'ingénieur électricien américain, Wallace H Coulter, expose le principe Coulter, et le développe en 1953 pour créer le premier dispositif de comptage cellulaire basé sur la variation d'impédance provoquée par le passage d'une cellule au travers d'un orifice calibré au sein d'un flux. Le courant transitoire ainsi créé est proportionnel à la taille de la cellule (Mattern et al. 1957). Le Coulter Counter A commercialisé en 1954 fut le premier hémocytomètre basé sur ce principe, aujourd'hui les automates d'hématologie utilisent encore d'une certaine manière le Principe Coulter.

Dès 1960 la CMF fut développée :

- Création de la « flow cell » par Göhde toujours utilisée aujourd'hui. Elle forme un point focal qui permet aux cellules ou aux particules d'être analysées individuellement.
- Description de la mesure de l'intensité de fluorescence (Van Dilla et al. 1969).
- Développement d'instruments combinant des mesures de fluorescence à deux couleurs qui ouvre la voie à la mise en place de cytomètres de flux multiparamétriques.
- Développement du principe de tri cellulaire par Mack Fulwyler repris par Leonard Herzenberg de l'Université de Stanford aboutissant au premier trieur capable de purifier des cellules vivantes à l'aide d'une mesure de fluorescence. Ce fut la naissance du premier cytométrie de flux de fluorescence appelé FACS-1 qui fut ensuite commercialisé en 1974 (Hulett et al. 1969). C'est grâce aux trieurs ayant permis la confirmation de la nature des cellules rendues par cytométrie (Salzman et al. 1975), que cette technologie a réellement été acceptée.

- Utilisation de laser comme source lumineuse proposée par Dan Villa en 1969, qui permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité du chromatisme.
- Utilisation de la diffraction lumineuse sous deux angles de détection par Salzeman en 1975 afin de dissocier trois populations de leucocytes: les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes (Salzman et al. 1975).
- Emploi d'anticorps monoclonaux par Hoffman en 1980, Hoffman intégra l'usage d'anticorps monoclonaux dans ces études afin de dissocier les sous-populations lymphocytaires T Helpers et T Cytotoxiques (Hoffman et al. 1980).

Entre les années 1960 et 1980, ces avancées ont permis la construction des premiers cytomètres de flux et la naissance des futurs leaders industriels dans ce domaine : ICP 11 (1968/69), Cytograph (1970), Cytofluorograph (1971), PAS 8000 (1973) de Partec, le premier instrument FACS de Becton Dickinson (1974), l'Hemalog D (1974) de Technicon (plus tard : Bayer Diagnostics), ICP 22 (1975) de Partec / Phywe et Epics de Coulter (1977/78), ICP 22 (1977) d'Ortho et enfin le PAS-II (1979) de Partec.

A la suite des premiers cas d'infection par le virus de l'Immunodéficience Humaine en 1981 (Gottlieb et al. 1981), la CMF fut largement employée du fait de la nécessité de suivre les numérations de lymphocytes TCD4 et TCD8 chez les patients séropositifs. Le premier cytomètre de flux dédié à la routine fut le « FACS scan » commercialisé par Becton-Dickinson. Il était composé d'un analyseur à trois couleurs et d'une source laser à Argon (15mW) pour accroître la sensibilité de détection.

Depuis, d'autres sources lumineuses ont été développées comme le laser à diode violette (395 à 415 nm) décrit pour la première fois lors du congrès de la société internationale pour l'avancement en cytométrie en flux en 2000 (ISAC crée en 1971 et renommée en 2006), les lasers YG émettant à 532 nm ou encore des lasers semi-conducteurs doublés émettant à 488 et à 492 nm. Les diodes et les lasers à semi-conducteurs sont désormais disponibles sous forme de sources ultraviolettes (350 à 375 nm).

Ces améliorations couplées à des progrès importants dans la chimie des fluorochromes ont permis de significativement augmenter la capacité multiparamétrique des instruments et donc le nombre d'antigène détectable sur une même cellule en passant de quelques unités à plusieurs dizaines.

Aujourd'hui la CMF employée en routine permet l'analyse multiparamétrique et individuelle d'un grand nombre de cellules simultanément dans un temps restreint. D'autre part, le gain en sensibilité et en résolution ont permis de passer progressivement de l'analyse de cellules mesurant entre 6 et 20  $\mu\text{m}$  à l'analyse d'éléments de plus en plus petit comme les plaquettes mesurant entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  (Lazarchick et al. 1984; Lazarus et al. 1995) puis des microorganismes mesurant en moyenne 1  $\mu\text{m}$  (Davey 2002).

Un des challenges actuels de la CMF est de pouvoir détecter des éléments dont la taille est environ 100 fois inférieure à celles des cellules afin de mesurer les MP.

## II) PRINCIPES GENERAUX DE CYTOMETRIE EN FLUX

### A) COMPOSITION D'UN CYTOMETRE EN FLUX

Les cytomètres permettent l'analyse qualitative et quantitative multiparamétriques d'éléments en suspension dans un liquide et sont utilisés dans de nombreux domaines d'applications comme par exemple l'immunophénotypage, l'analyse du cycle cellulaire, le comptage des cellules, la mesure de l'activation plaquettaire ou encore la mesure d'expression de protéines fluorescentes.

Un cytomètre en flux se compose donc de cinq systèmes :

- Le **système fluide** comprend un liquide de gaine pressurisé qui entraîne l'échantillon jusqu'à la chambre d'analyse selon un flux laminaire non turbulent. Un gradient de pression est instauré pour affiner le diamètre du flux d'échantillon. Ce phénomène, appelé **focalisation hydrodynamique**, permet de faire passer les éléments en suspension un par un dans la chambre d'analyse afin d'obtenir des données individuelles sur l'élément analysé.
- La **chambre analytique** est le lieu d'interaction entre les éléments amenés un par un par le flux et la lumière provenant du laser. Initialement des capillaires de quartz ou des systèmes « jet-in-air » étaient utilisés.

Les systèmes « jet-in-air » présentent des propriétés optiques non optimales mais sont conservés sur certains trieurs pour la plus grande vitesse de tri qu'ils procurent. Aujourd'hui des cuvettes de quartz permettent une baisse du bruit de fond optique car elles réfractent peu la lumière et n'interfèrent pas avec les paramètres de fluorescence. Certaines cuvettes sont recouvertes de gel optimisant leurs propriétés optiques.

- **Le système optique** comprend la source lumineuse puissante habituellement un laser et un jeu complexe de miroirs et filtres qui dirigent la lumière vers les différents photodétecteurs.
  - Un laser émet une lumière monochromatique à une longueur d'onde fixe correspondant à une énergie précise. Les sources d'excitation lasers généralement utilisées sont le laser bleu (Argon : 488 nm) et le laser rouge (Hélium - Néon ou diode électroluminescente : 633 nm). Les lasers à gaz initialement employés ont été remplacés par des lasers solides. Le laser YG (530 ou 560 nm) ou des lasers UV ou violets émettant à 325nm peuvent être adjoints. Aujourd'hui quasiment toutes les longueurs d'ondes peuvent être produites à moindre coûts.
  - La puissance des lasers utilisés est comprise entre 10 à 25 mW mais certains lasers ont une puissance de plusieurs centaines de mW. L'augmentation de puissance des lasers impacte la sensibilité des instruments.
  - Aujourd'hui un cytomètre de banc possède au moins deux/trois lasers cependant des instruments à 7-10 lasers existent. Un cytomètre à trois lasers peut exciter et analyser jusqu'à 16 marqueurs simultanément. L'ajout de laser permet d'atteindre les longueurs d'ondes d'excitation auparavant inaccessibles, de multiplier le nombre de sondes utilisables et d'affiner les capacités d'excitation pour améliorer la sensibilité (Telford 2011).
  - Le faisceau laser est concentré grâce à une lentille de focalisation avant de pénétrer dans la chambre analytique. Une seconde lentille de focalisation permet de diriger les rayons lumineux vers un ensemble de filtres et miroirs dichroïques qui séparent les différentes longueurs d'onde. Ce jeu de filtre optique permet de diriger la lumière de chaque région spectrale vers le photodétecteur approprié. Plus le nombre de paramètres analysés augmente plus le jeu de miroirs et filtres se complexifie.



Les filtres optiques absorbent certaines longueurs d'onde et transmettent les autres. Ces filtres peuvent être passe-haut, passe-bas et bande-passe. Les miroirs dichroïques laissent passer la lumière au-dessus d'une certaine longueur d'onde et réfléchissent la lumière de longueur d'onde inférieure vers d'autres filtres. Les configurations optiques varient selon les cytomètres. Par exemple, Beckman-Coulter développe des CMF de configuration linéaire (FC500 ou Gallios/Navios) (Figure 13) et BD propose des configurations en étoile comme sur le LSRII.

- Le **système électronique** permet de convertir la lumière en signaux électroniques proportionnellement à la quantité de lumière reçue. Ces signaux sont amplifiés puis convertis sous forme numérique pour être analysés par le système informatique. Ceci est réalisé par des photodétecteurs. Il en existe plusieurs types dont principalement les photodiodes et les photomultiplicateurs (PMT). Les photodiodes, moins sensibles que les PMT, sont généralement utilisées pour la détection de la lumière diffractée et les photomultiplicateurs (PMT) pour les rayons fluorescents. Cependant ces derniers peuvent également être utilisés pour les paramètres de diffraction. Chaque signal lumineux est capté par son propre photodétecteur. La multiplication des canaux de fluorescence et des photodétecteurs sur les CMF modernes permet l'intégration simultanée d'un grand nombre de paramètres de fluorescence.

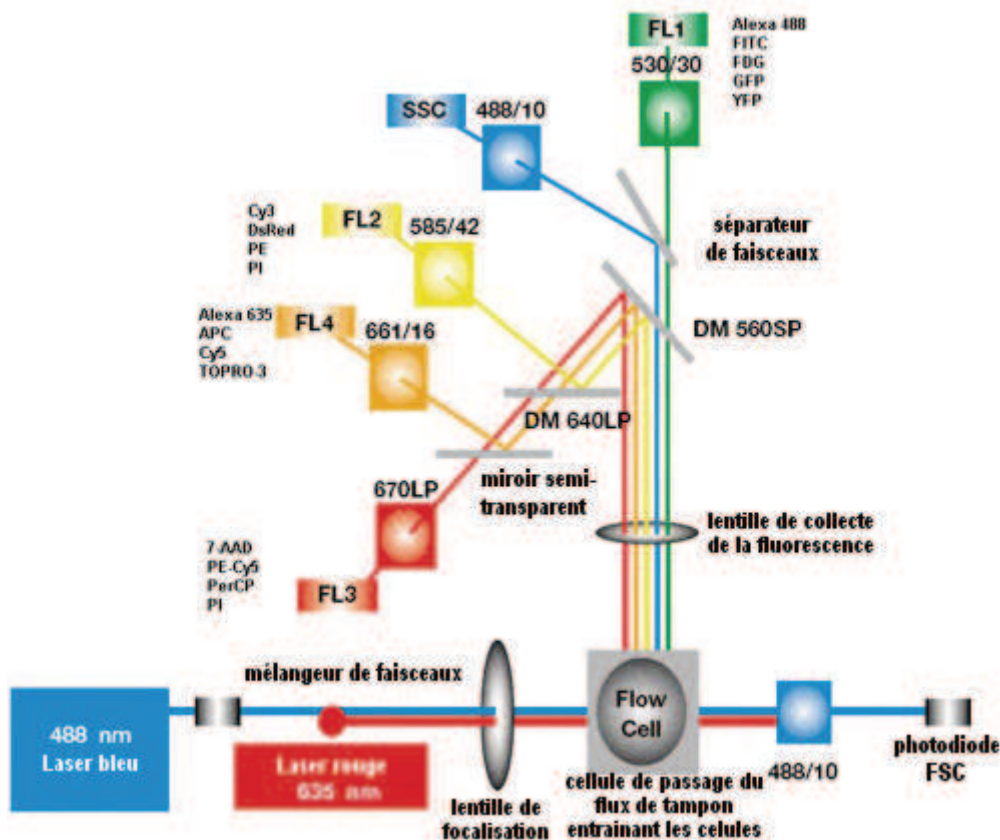


Figure 13 : Exemple de configuration linéaire: Système optique du FACS Calibur. Ce schéma indique les deux lasers et les différents détecteurs (FSC, SSC, FL1 à 4) présents dans le cytomètre et autorisant une analyse multiparamétrique. Les filtres optiques utilisés sont également figurés. Les fluorochromes détectables sont indiqués à côté de chaque détecteur de fluorescence.

- Le **système informatique** converti les données statistiques obtenues à partir de données brutes nommées « fichiers en mode liste » en histogrammes et/ou cytogrammes interprétables. Le fichier de référence internationale est le FCS (Flow Cytometry Standard), il contient les datas brutes de chaque évènement, ainsi que les paramètres utilisés tels que réglages et compensations. Le LMD (List Mode Data) contient aussi des masques d'analyses (histogrammes et cytogrammes) fait sur le logiciel d'acquisition.

## **B) PARAMETRES OPTIQUES ANALYSES**

Les propriétés des éléments en suspension sont déduites à partir des signaux recueillis et dépendent de leurs propriétés optiques intrinsèques et induites.

### **1) PARAMETRES OPTIQUES INTRINSEQUES : LA DIFFUSION LUMINEUSE**

Au moment du passage d'un élément au travers du faisceau laser, la lumière est diffusée dans toutes les directions. La diffraction varie selon la taille, la structure interne mais également selon l'indice de réfraction de l'élément. Deux angles de diffusion lumineuse sont classiquement mesurés :

- **La diffraction vers l'avant ou axiale appelée « Forward Scatter » (FS)** mesurée dans les faibles angles de décalage par rapport à l'axe du faisceau laser (par exemple de 1 à 8° ou de 1 à 19°) est collectée par une lentille connue sous le nom de canal de diffusion vers l'avant (FSC). La lumière est focalisée vers le photodétecteur généralement une photodiode, se trouvant derrière une barre de d'obturation qui bloque la lumière incidente provenant directement du laser. L'intensité du FSC dépend principalement de la **taille relative** de la particule mais également de son **indice de réfraction**. A indice de réfraction égal, les grands éléments diffusent plus la lumière.
- **La diffusion de lumière latérale appelée « Side Scatter » (SS)**, mesurée autour de 90° par rapport à la lumière incidente, est collectée par le canal de dispersion latérale (SSC). C'est le résultat de la lumière réfractée et réfléchi. Ce paramètre est un indicateur de **granularité interne**, ainsi que des irrégularités ou des **topographies de surface / membrane** mais dépend également de l'indice de réfraction.

L'analyse bi-paramétrique des signaux lumineux obtenus en FS et SS permet de discriminer diverses sous-populations cellulaires dans un échantillon hétérogène et permet également d'identifier des cellules viables ainsi que les débris cellulaires basé sur la taille, la granularité et la topographie de la surface cellulaire (Jaroszeski and Radcliff 1999). C'est un des principes sur lequel sont basés les hémocytomètres pour distinguer les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires présents dans le sang.

## 2) PARAMETRES OPTIQUES INDUITS : LA FLUORESCENCE

L'utilisation de la fluorescence ajoute une dimension analytique modulable dépendante des sondes et fluorochromes choisis. Il existe un grand nombre de sondes commerciales pour détecter les molécules de surface ou internes comme les anticorps monoclonaux couplées à des fluorochromes. L'anticorps assure la spécificité de la liaison par reconnaissance de son antigène et le fluorochrome permet l'émission de fluorescence.

### a) PRINCIPES DE FLUORESCENCE ET FLUOROCHROMES

La lumière peut être considérée comme une énergie électromagnétique qui se déplace sous forme d'ondes caractérisées par leur fréquence et leur longueur. La longueur d'onde détermine la couleur de la lumière émise. Cette lumière peut être mesurée par les photodétecteurs. Principe physique de fluorescence (Howard M. Shapiro 2003):

Les fluorochromes sont des structures capables d'absorber et de réémettre de l'énergie sous forme lumineuse appelée fluorescence. Lorsque la lumière est absorbée par un fluorochrome, ses électrons passent d'un état basal à un état excité correspondant à un niveau d'énergie maximal. La quantité d'énergie nécessaire pour le passage des électrons d'un état basal à excité est spécifique de chaque fluorochrome. Cet état instable ne dure qu'une dizaine de nanosecondes, temps durant lequel le fluorochrome subit un second changement de conformation interne provoquant la libération sous forme de chaleur d'une partie de l'énergie absorbée. Enfin les électrons retournent à leur état fondamental en libérant l'énergie restante sous forme de photons détectés par les photodétecteurs (Figure 14).

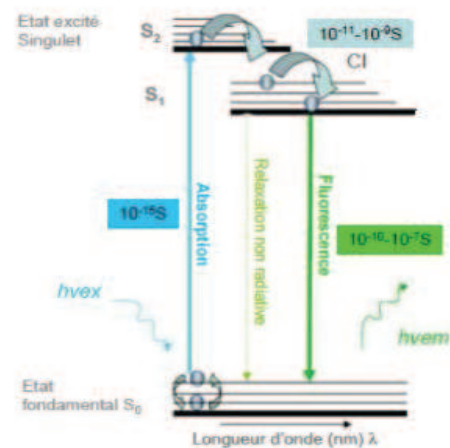


Figure 14 : Principe de fluorescence

## **b) CARACTERISTIQUES DES FLUOROCHROMES**

Les fluorochromes sont donc caractérisés par un grand décalage de Stokes, un fort coefficient d'extinction molaire, un fort rendement quantique et une courte durée de vie de l'état excité :

- **Le décalage de Stokes** est la différence entre la longueur d'onde d'excitation et d'émission permettant de distinguer la lumière incidente et émise. La longueur d'onde d'émission d'un fluorochrome, inversement proportionnelle à l'énergie de l'onde lumineuse, sera donc toujours plus longue que la longueur d'onde d'excitation. Pour chaque fluorochrome un maximum d'absorption et d'émission peuvent être définis.
- **Le coefficient d'extinction (ou absorption molaire) «  $\epsilon$  »** reflète la probabilité d'absorption de lumière d'une molécule à une longueur d'onde donnée.
- **Le rendement quantique** correspond à l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation. C'est le rapport entre le nombre de photons émis et absorbés. La plupart des fluorochromes utilisés ont un rendement supérieur à 50% mais il est important de préciser que ce rendement dépend de l'environnement chimique. En effet, cette énergie peut être transmise par un **phénomène de quenching** à une molécule extrêmement proche présente dans l'environnement du fluorochrome ou transmise à un autre fluorochrome c'est ce qu'on appelle le **transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET)**.

L'emploi de CMF multicanaux, comportant plusieurs photodétecteurs, autorise l'utilisation de protocoles de multi-marquage augmentant la spécificité des informations recueillies. Cependant le chevauchement potentiel des spectres d'émission des différents fluorochromes complexifie la situation. Comme cela est illustré sur la Figure 15a pour les principaux fluorochromes, un fluorochrome sera excité par un laser donné et émettra un spectre de lumière représenté par une courbe gaussienne dont le maximum d'émission correspond à une bande étroite de longueur d'onde détectée par canal fluorescent spécifique. Cependant, les fluorochromes émettent aussi dans une moindre mesure dans les régions spectrales en dehors de la plage de longueur d'onde utilisée pour la détection. Si cette émission plus faible est dans la plage détectée pour un autre canal fluorescent, les cellules marquées avec le fluorochrome seront détectées dans différents canaux simultanément. Une forte intensité sera détectée dans le canal approprié et une faible intensité sera détectée dans un canal inapproprié. La Figure 15b illustre ce scénario.

Le chevauchement spectral est un problème lors de l'analyse multicolore, car un élément étiqueté avec un seul fluorochrome peut être détecté par l'optique du cytomètre comme fluorescence dans plusieurs canaux différents (Jaroszeski and Radcliff 1999). Ce phénomène est réduit à l'aide de matrices de compensation préalablement réglées pour chaque protocole qui permettent de tenir compte de ce phénomène et de soustraire a posteriori la quantité de lumière contaminante d'un canal vers un autre.

Figure 15a (ci-contre): Fluorochromes les plus utilisés (Chattopadhyay et al. 2008). Pour chaque fluorochrome, le laser optimal est indiqué par une ligne plus sombre (violet = 405 nm, bleu = 488 nm, vert = 532 nm, rouge = 633 nm). Chaque longueur d'émission est indiquée par une bande grise/noire, noire étant la bande d'émission maximale

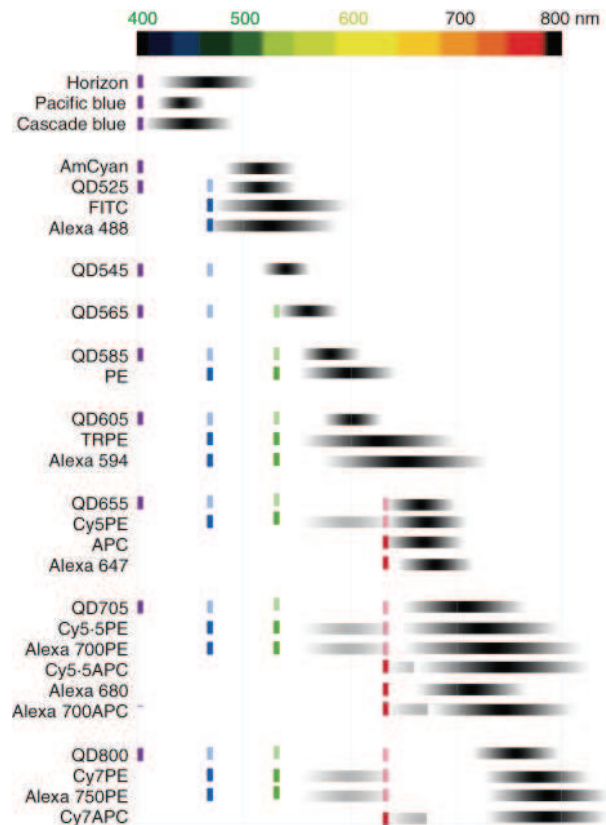
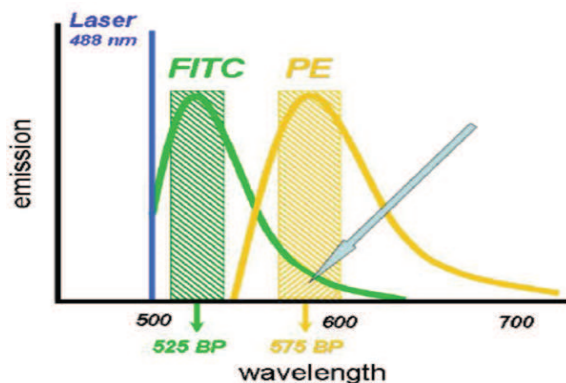


Figure 15b (ci-dessous): Exemple de chevauchement des spectres d'émission de fluorescence (Figure fournie par Graeme Chapman, et Beckman Coulter)



### c) LES SONDÉS

Le plus souvent la fluorescence d'une sonde provient d'un fluorochrome auquel elle est couplée. Les sondes se fixent sur des motifs spécifiques et les fluorochromes permettent l'émission de fluorescence nécessaire à la détection. Différentes catégories de sondes sont disponibles: des sondes liant l'ADN utilisées pour les analyses de cycles cellulaires, des sondes liant des protéines, des sondes dépendantes du calcium ou du pH... La plupart des sondes actuelles sont des anticorps monoclonaux. En 1975, Georges Köhler et César Milstein ont publié dans Nature une technique de production d'**anticorps monoclonaux** à partir d'hybridomes qui leur rapporta le prix Nobel de médecine en 1984. Cette découverte a entraîné la production d'un large éventail de marquages différents utilisés en CMF.

## **C) DETECTION ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Les signaux lumineux bruts sont convertis en signaux électroniques par les photodétecteurs puis en signaux analogiques interprétables par le système informatique.

### **1) DU SIGNAL LUMINEUX AU SIGNAL ELECTRONIQUE**

La première étape de conversion, c'est à dire du signal lumineux en signal électronique est réalisée par des photodétecteurs capables de transformer une énergie lumineuse incidente fournie par des photons en courant électronique. Il existe plusieurs types de photodétecteurs (Howard M. Shapiro 2003) :

- **Les photodiodes** sont des détecteurs solides qui permettent de capter les photons et émettent des électrons en échange. En moyenne, 5 électrons sont émis pour 10 photons collectés par une photodiode en silicium. Ces photodétecteurs ont donc un rendement de 50%. Ces photodiodes en silicium sont habituellement utilisées pour mesurer des signaux lumineux forts.
- **Les photomultiplicateurs en tube (PMT)** sont des photodétecteurs de haute sensibilité fonctionnant sur le même principe que les photodiodes mais dont l'amplification électronique permet un gain de  $10^6$  électrons. Les photons frappent une photocathode et donnent un photoélectron. Ce photoélectron est soumis à un voltage accélérant sa course au sein d'un tube vide d'air et est dirigé vers une dynode, l'impact entraîne la libération de plusieurs électrons. La répétition de ce cycle améliore le signal électronique sans élévation du bruit de fond. Ces capteurs sont plus grands, plus complexes et plus chers que les photodiodes mais plus sensibles. Ce type de détecteur est nécessaire pour garantir une sensibilité suffisante et détecter les signaux émis latéralement (SSC ou FL) généralement plus faibles que ceux obtenus vers l'avant mais peut aussi être utilisé en FSC. En effet, la diffusion latérale représente environ 10% du signal lumineux émis et n'est donc pas aussi lumineuse que la diffusion vers l'avant (Jaroszeski and Radcliff 1999). L'amplification peut être ajustée (voltage appliqué) par l'opérateur afin de rendre le PMT plus ou moins sensible à la lumière collectée. Pour améliorer la détection de lumière en SSC et en fluorescence l'idéal serait de collecter la lumière émise ou diffractée dans toutes les directions. Cependant si le signal augmente dans ces conditions, le bruit de fond augmente également.

## **2) DU SIGNAL ELECTRONIQUE AU SIGNAL ANALOGIQUE**

Le passage des particules devant le laser au sein de la chambre analytique dure moins de 10 $\mu$ s (Howard M. Shapiro 2003), durant ce temps les photodétecteurs fournissent un bref courant électronique convertit en voltage par des préamplificateurs. Le signal donné par une particule est représenté sous la forme d'une courbe Gaussienne constituant le signal analogique.

Ce signal est caractérisé par la hauteur de pic, l'aire, et la largeur de pic. L'amplitude est nommée « H » pour Height ou « P » pour Peak. La surface est nommée « A » pour Area ou « I » pour Intégrale. La Largeur est nommée « W » pour Width ou « TOF » pour Time Of Flight. La durée du signal dépend du temps d'exposition de la particule au laser et le signal varie durant le passage car la particule n'est pas exposée de la même façon au laser en début, milieu et fin de course. On comprend alors que l'émission ou la diffraction lumineuse diffère durant la course de la particule au sein de la chambre analytique.

La digitalisation du signal est effectuée par des logiciels d'analyse spécifiques de plus en plus complexes et performants qui doivent permettre l'analyse rapide d'un grand nombre de données afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus.

## **III) CYTOMETRIE DE FLUX POUR L'ANALYSE DES MP**

### **A) AVANTAGES DE LA CMF POUR L'ANALYSE DES MP**

Parmi les techniques disponibles pour l'analyse des MP, la CMF offre de nombreux avantages :

- L'analyse particule par particule permet de détecter des sous-populations de MP.
- L'aspect multiparamétrique permet d'améliorer la spécificité de l'analyse.
- Les concentrations de MP peuvent être déterminées sur une gamme très large.
- La vitesse de cette technologie rend réaliste l'analyse de cohorte d'échantillons cliniques dans une pratique courante de laboratoire en contraste avec les analyses de microscopie par exemple.
- La CMF est déjà présente dans de nombreux laboratoires non seulement de recherche mais également cliniques



- La CMF est la seule méthode d'analyse des MP bénéficiant actuellement d'un effort de standardisation.

Cependant la détection des microparticules, de par leurs caractéristiques, représente un véritable challenge pour les cytométristes.

## **B) LIMITES DE L'ANALYSE DES MICROPARTICULES PAR CMF**

Les MP présentent pour la plupart une petite taille (majorité aux alentours de 200nm) ce qui implique une faible quantité absolue d'antigène présent à leur surface. A cela se rajoute un faible indice de réfraction de par leur nature constituée principalement d'eau et de lipides. Ces caractéristiques limitent leur détectabilité. En effet, les MP ne génèrent qu'un faible signal de diffraction lumineuse ainsi qu'un faible signal de fluorescence émis en comparaison des cellules. De plus, la complexité de l'environnement plasmatique où d'autres liquides biologiques contenant un grand nombre de protéines et autres vésicules, interfère lors de la détection des MP. D'autre part, les MP, du fait de leur adhésivité peuvent également se lier entre-elles ou aux cellules présentes dans le milieu ce qui limite notre capacité de les détecter. Enfin, la rareté apparente de certaines sous-populations de MP complique leur détection.

Au cours de ce chapitre nous exposerons plus en détails ces limites ainsi que les évolutions technologiques et méthodologiques qui ont permis d'améliorer la détection des MP par CMF.

### **1) RESOLUTION ET LIMITES DE DETECTION**

La **résolution** correspond à la capacité d'un cytomètre à émettre des signaux différents pour deux populations d'évènements étudiées de taille différentes afin de les distinguer l'une de l'autre. Meilleure est la résolution, mieux les sous-populations seront détectées. Concernant l'étude des MP, ce paramètre est primordial car leurs tailles varient entre 100nm et 1 $\mu$ m.

L'évaluation de la résolution des CMF nécessite l'emploi de billes calibrées de différentes tailles en suspension comme par exemple avec les billes Megamix-Plus (Biocytex, Marseille, France) dans l'exemple ci-dessous (Figure 16).

L'« index de séparation » ou « S.I » (Mullier et al. 2011) est alors calculé par la formule ci-dessous : (exemple entre les billes de 0,5 $\mu$ m et les billes de 0,3 $\mu$ m)

$$SI_{0,5-0,3} = (Md_{0,5} - Md_{0,3}) / (SD_{0,5} + SD_{0,3}) \quad (VN \text{ SI} > 3,0)$$

$Md_{0,5}$  = médiane FSC de la bille de 0,5  $\mu\text{m}$

$SD_{0,5}$  = Déviation Standard sur l'histogramme FSC de la bille 0,5  $\mu\text{m}$

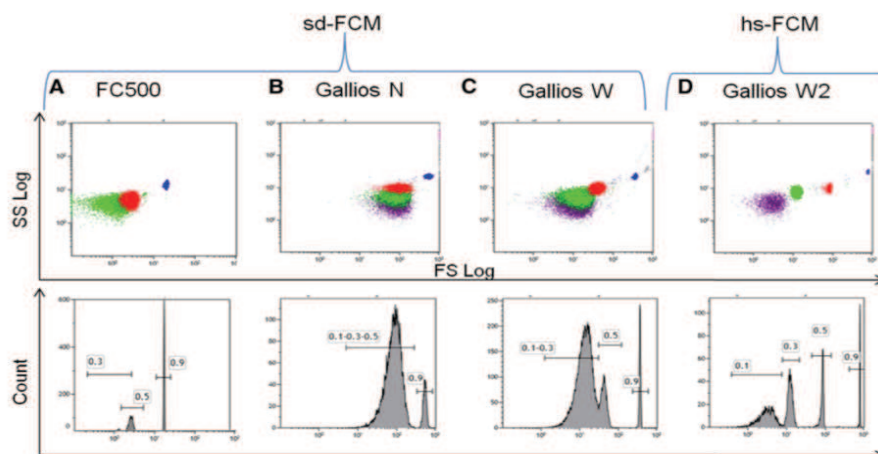


Figure 16 : Exemple de résolution obtenue en diffraction par différents cytomètres. Le FC500 (SD-CMF) permet la détection de deux populations de billes du mélange Megamix-Plus alors que le Gallios W2 permet de distinguer clairement quatre ensembles de billes. (Robert et al. 2012)

La résolution dépend non seulement des propriétés intrinsèques des instruments mais aussi des conditions d'analyse comme le débit, l'analyse du signal en pic plutôt qu'en aire sous la courbe (Poncelet et al. 2015), l'alignement du laser, le positionnement de la barre d'obturation, le retrait de filtre neutre présent sur certains cytomètres comme le FACS Aria par exemple ou encore en augmentant les gains des photodétecteurs notamment en FSC (Lacroix et al. 2010b). Assurer une bonne résolution permet en partie, avec le contrôle du bruit de fond, de garantir une limite de détection la plus basse possible.

## 2) BRUIT DE FOND

Le bruit de fond est un élément important à prendre en considération lors de l'étude des MP. En effet les signaux lumineux (diffraction et fluorescence) détectés lors de l'analyse des MP peuvent se confondre en partie avec le bruit de fond des cytomètres en raison d'un manque de résolution ou de la détection d'évènements non spécifiques de différente nature. Il faut distinguer plusieurs types de bruit de fond : le bruit de fond électronique, fluide, optique et provenant de l'échantillon.

- Le **bruit de fond électronique** correspond au bruit apporté par les photodétecteurs qui génèrent spontanément de faibles signaux.

- Le **bruit de fond fluïdique** est apporté par les liquides de gaine, les solutions tampons utilisées pour suspendre les cellules, les liquides de maintenance des instruments ainsi que le vieillissement des tubulures et réservoirs. Ces liquides doivent être exempts de particules et de solutés fluorescents pour apporter le plus faible niveau de bruit de fond possible. Au cours des mesures, protéines et particules peuvent s'accrocher aux parois du système fluïdique, y compris au point d'observation participant au bruit de fond (Recktenwald 1993).
- Le **bruit de fond optique**, multifactoriel, est le plus conséquent : il est en partie dû à une diffusion non-spécifique de la lumière le long du trajet optique. Il peut être évalué par l'utilisation d'un « LED pulser » afin de déterminer en l'absence de flux quel canal lumineux présente le plus faible bruit de fond et donc la meilleure option de détection. Les dépôts de particules sur les parois extérieures de la cellule analytique peuvent également entraîner une diffusion lumineuse non-spécifique pouvant être réduite en atmosphère filtrée et éliminée par une simple maintenance des bords externes de la chambre analytique (Lacroix et al. 2010b). Dans certains cas le mauvais alignement d'un laser ou le positionnement non optimal de la barre d'obturation peut entraîner une diffusion de lumière non spécifique participant au bruit de fond optique. Les filtres optiques peuvent également affecter la performance des systèmes. Lorsque les surfaces des filtres dichroïques s'altèrent, sont rayées ou brûlées par la lumière ou la chaleur, le filtre laisse passer la lumière en dehors de la bande de transmission initiale conduisant à une augmentation du signal lumineux dans des canaux de façon non spécifique (Recktenwald 1993).
- **Bruit de fond dû à l'échantillon** : Les protocoles d'analyse des MP ne permettant pas facilement d'étapes de lavage qui entraînent une perte significative de MP. Ainsi, le bruit de fond échantillon, dû aux composants du milieu et des réactifs présents en excès, peut être très important. Il correspond à la détection de vésicules, le plus souvent de natures lipidiques, ou de protéines présentes dans le milieu et est fortement accentué par les anticorps présents en excès dans le mélange réactionnel. Un niveau élevé de bruit de fond entraîne une perte de discrimination des MP. A l'inverse, minimiser le bruit de fond équivaut à élever le ratio signal/bruit de fond déterminant la sensibilité d'un instrument.

### **3) LIMITE DE DETECTION**

La limite de détection tient compte à la fois des capacités résolutive des instruments et de leur bruit de fond. La limite de détection des instruments commercialisés avant la fin des années 2000 que nous appellerons cytomètres standard (SD-CMF) permet au mieux d'analyser des MP dont la taille est supérieure à 400nm (Lacroix et al. 2014) voire proche du micromètre d'après les calculs contestables d' E. Van der Pol qui intègrent l'impact d'un index de réfraction de l'ordre de 1,40 pour les MP dans la comparaison des tailles d'évènements de différente nature. Or la microscopie cryo-électronique suggère que plus de 75% des vésicules extracellulaires dont les MP ont une taille inférieures à 500nm (Arraud et al. 2014). Par conséquent les SD-CMF ne détectent que les MP les plus larges voire en fait uniquement des évènements qui ne sont pas des MP comme des plaquettes dégranulées ou des globules rouges entièrement vidés de leur hémoglobine appelés "ghosts". Cette limite de détection a fait naître une controverse concernant le choix de la CMF pour mesurer les MP en 2010 (van der Pol et al. 2010). Cependant les avancées technologiques ont permis d'abaisser cette limite de détection remplaçant la CMF comme une méthodologie de choix dans le domaine des MP.

### **4) SENSIBILITE DE FLUORESCENCE**

La sensibilité de fluorescence est définie comme la capacité de discrimination d'un cytomètre entre le signal émis par une particule faiblement marquée et le bruit de fond. La sensibilité est étroitement liée à la résolution. Pour déterminer la sensibilité de fluorescence, on peut mesurer à la fois l'efficacité de détection,  $Q$ , et le bruit de fond,  $B$ .

Ces deux facteurs affectent la capacité de dissociation des sous-populations faiblement fluorescentes, et sont requis pour caractériser la performance d'un cytomètre de flux. En utilisant  $Q$  et  $B$ , il est possible de déterminer l'intensité de fluorescence minimale qui peut être discriminée du bruit de fond ou d'une autre sous-population.

$Q$  est le nombre de photoélectrons générés par le détecteur par molécule de fluorochrome traversant le faisceau d'excitation.

Les facteurs qui influencent  $Q$  sont : l'alimentation du laser, la taille du spot laser, le temps passé par une particule dans le faisceau laser et l'efficacité des lentilles optiques, des filtres et des détecteurs (PMT ou diode).

B est le bruit optique que produit le détecteur, que l'on passe ou non une particule dans la zone d'illumination. Les facteurs qui influencent B comprennent les molécules de fluorochrome non liées à partir d'échantillons non lavés, la dispersion de Raman due à l'eau, la luminescence des composants optiques et le chevauchement spectral indésirable.

Q et B peuvent être exprimés par équivalence à la fluorescence générées par des molécules solubles « MESF » et sont déterminés à l'aide de billes dont la fluorescence est calibrée (Hoffman and Wood 2007). La sensibilité de fluorescence est donc la résolution obtenue entre une population non marquée (bille blanche) et une population faiblement marquée (bille dim). Les MP qui génèrent des signaux très faibles demandent une adaptation des outils classiquement utilisés en CMF pour quantifier ces niveaux de fluorescence.

La Figure 17 illustre l'effet de l'efficacité de détection et du bruit de fond sur la sensibilité de fluorescence. On remarque dans cet exemple que Q a un impact considérable sur la sensibilité de fluorescence puisqu'à bruit de fond égal une efficacité de détection 10 fois supérieure permet d'obtenir une bonne résolution entre la population faiblement marquée et la population non-marquée. Inversement à efficacité de détection égale une élévation du bruit de fond entraîne une perte de résolution entre deux populations.

La détermination de Q et B peut être un bon outil de comparaison de la capacité des cytomètres à détecter des particules faiblement marquées comme le sont les MP et pourrait servir au développement d'outils de standardisation de fluorescence qui apparaissent aujourd'hui comme une nécessité dans le domaine des MP.

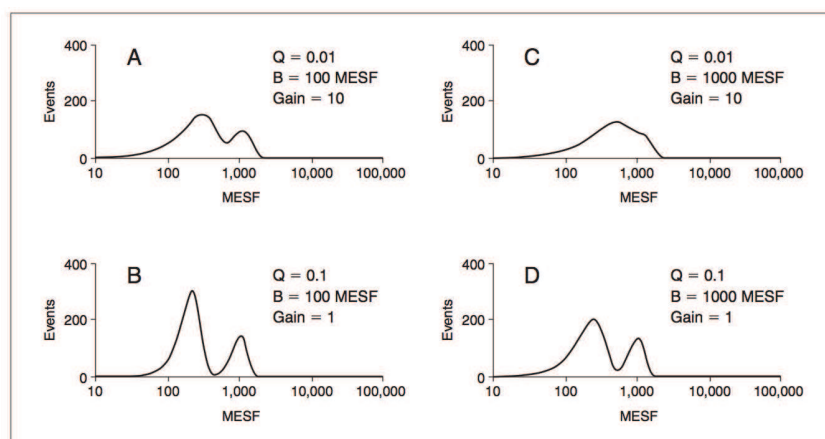


Figure 17 : Effet de l'efficacité de détection et du bruit de fond sur la sensibilité de fluorescence. Extrait de Hoffman 2007-Characterization of Flow Cytometer Instrument

## **C) DE LA CYTOMETRIE STANDARD (SD-CMF) A LA CYTOMETRIE DE HAUTE SENSIBILITE (HS-CMF)**

Pour permettre une amélioration de l'analyse des MP par CMF, il est nécessaire d'optimiser les performances du cytomètre ainsi que le protocole d'analyse dans le but d'assurer une intensité de signal suffisante, de réduire le bruit de fond et d'optimiser la résolution.

### **1) OPTIMISATION DU SIGNAL**

Rappelons ici que l'intensité d'un signal fluorescent est la résultante de 3 facteurs :

- Les réactifs : nombre de molécules fluorescentes fixées sur la particule, caractéristiques du fluorochrome : coefficient d'extinction molaire, rendement quantique, longueur d'onde excitation et émission, concentration réactionnelle de la sonde lors du marquage
- Les caractéristiques du laser : la puissance de laser et la qualité d'alignement optique.
- Les caractéristiques du photodétecteur : la sensibilité du photodétecteur

#### **a) LES REACTIFS**

##### **i) Les sondes générales**

Afin de sortir les MP du bruit de fond, une sonde générale capable de marquer de manière efficace toutes les MP a été recherchée sans succès jusqu'à présent en raison de leur hétérogénéité. Parmi les sondes les plus utilisées, l'annexine V se fixe en présence de taux physiologique de calcium sur les aminophospholipides tel que la PS abondamment retrouvée en surface des MP. L'existence de MP n'exprimant pas l'annexine V a été rapportée et des études n'employant pas ce réactif ont détecté des concentrations 30 fois plus élevées que lors de détection des MP par marquage par l'annexine V (Horstman et al. 2004). Cependant l'analyse de tampons sans filtration préalable a également conduit à la détection de MP en l'absence d'annexine V qui sont en réalité causées par le bruit de fond (Dey-Hazra et al. 2010). Si l'annexine V ne marque pas toutes les MP, elle assure une bonne intensité de marquage ainsi qu'une bonne spécificité pour la détection de celles-ci. Un autre inconvénient de l'annexine V est la nécessité d'utilisation d'un tampon calcique qui peut induire la coagulation de l'échantillon. Ce phénomène peut être toutefois prévenu par l'emploi d'hirudine dans le tampon (Poncelet et al. 2015).

Alternativement, la lactadherine peut également être employée du fait de sa forte avidité pour la PS indépendamment de la concentration en calcium. Cette protéine est cependant très peu utilisée car très coûteuse (Shi et al. 2004). Le bio-maléimide a suscité l'intérêt dans le marquage des MP en raison de sa propension à attacher des membranes biologiques via des résidus cystéine et des groupes thiol dans les protéines. Sa nature fluorescente permet son utilisation en cytométrie de flux. Ce marqueur a prouvé sa capacité à fixer les PMP (Dale et al. 2005). La calceïne AM est un marqueur non fluorescent qui devient fluorescent lors du clivage par les estérases cytosoliques, qui marquent uniquement les MP et cellules intactes (Bratosin et al. 2005; Bernimoulin et al. 2009). Des carbohydrates marquant les lectines et permettant des agglutinations de MP ont été testés (Kelly et al. 2006) mais ont montrés un intérêt modéré. En revanche des anticorps dirigés contre les molécules GPI ancrées pourraient avoir un intérêt du fait de la fréquence de ces antigènes sur les MP.

## *ii) Les sondes spécifiques*

La plus grande majorité des sondes spécifiques utilisées en CMF sont des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. Les antigènes ciblés sont choisis en fonction de l'origine des MP qu'il est nécessaire d'analyser dont les principaux sont représentés dans la Figure 18. Le choix des sondes ne doit pas être uniquement basé sur l'expérience cellulaire. En effet les MP peuvent ne pas exprimer des antigènes présents sur la cellule dont elles proviennent ou les expriment en une trop faible quantité pour que l'on puisse les détecter. Afin d'optimiser le signal, les marqueurs spécifiques choisis, sont ceux fixant les antigènes les plus représentés à la surface des MP à analyser.

Les sondes spécifiques habituellement utilisées sont listées ci-dessous :

	Antigènes	Spécificité	Sensibilité (Intensité de fluorescence in vitro)
PMP	CD41	+++	+++
	CD42 (a ou b)	+++	+++
	CD61	++	++
Ery-MP	CD235a	+++	+++
Leu-MP	CD45	+++	+
	CD11b*	+++	++
	CD14	+++	+
	CD66b	+++	++
Endo-MP	CD144	+++	±
	CD146-LeuMP	++	+++
	CD105-LeuMP	++	++
	CD31-PMP	+	+++
	CD62E	+++	+

Figure 18 : principaux anticorps utilisés pour la détection des sous-populations de MP (basé sur Lacroix et al 2010).

### iii) Les fluorochromes

Il n'existe pas de fluorochrome spécifique de l'étude des MP cependant certains fluorochromes sont plus brillants que d'autres. La **brillance du fluorochrome** est le produit du coefficient d'extinction molaire par le rendement quantique (Howard M. Shapiro 2003).

La phycoérythrine (PE) est généralement le fluorochrome le plus brillant et donc celui qui donnera le meilleur signal de fluorescence. Cependant étant donné que la plupart des protocoles pour la mesure des MP sont sans lavage, les fluorochromes les plus brillants ne sont pas forcément ceux qui permettent d'obtenir le meilleur signal sur bruit. En effet, le bruit de fond généré par les fluorochromes brillants sera également plus important.

Un paramètre très important est la qualité de préparation des réactifs en termes de pureté (absence d'agrégat de fluorochrome) qui dépend de la préparation industrielle et notamment de la largeur des pics d'anticorps sélectionnée en sortie de purification par chromatographie. Le ratio rendement/pureté est important à considérer pour les réactifs adaptés à la mesure des MP.

### b) LES SOURCES LUMINEUSES

La multiplicité des lasers et des longueurs d'ondes d'émissions permet d'optimiser les configurations optiques et ainsi gagner en sensibilité et résolution. C'est par exemple le cas pour le CytoFLEX de Beckman-Coulter qui propose un laser violet, fortement énergétique, pour le paramètre de diffraction lumineuse v-SSC.



Cependant à longueur d'onde égale, l'augmentation de puissance des lasers permet une augmentation d'intensité de lumière influençant la sensibilité de détection. Plusieurs stratégies ont été proposées sur cette idée comme par exemple :

- Le développement de laser à fibre optique, comme par exemple sur l'Aria Fusion de BD.
- L'emploi de laser à haute puissance proposée par BD sur l'Influx utilisé par l'équipe de Van der Vlist qui comporte un laser 488nm fournissant 200mW contre habituellement 25mW (Van der Vlist et al. 2012).

Dans le domaine des MP, cela est d'autant plus bénéfique que la densité antigénique est faible.

### c) LES PHOTODETECTEURS

Les photodiodes anciennement utilisées ne permettent pas d'obtenir une efficacité de détection suffisante et ont progressivement été remplacées par de nouveaux photodétecteurs.

**Les photomultiplicateurs en tube (PMT)** sont des photodétecteurs de haute sensibilité qui amplifient le signal. Les photons frappent une photocathode et donnent un photoélectron soumis à un voltage accélérant sa course au sein d'un tube vide d'air. Le photoélectron est ainsi dirigé vers une dynode, l'impact entraîne la libération de plusieurs électrons. Ce cycle est répété plusieurs fois améliorant ainsi le signal électronique sans élévation du bruit de fond. Les PMT peuvent être couplés à une lentille qui possède une grande ouverture ainsi qu'un grand facteur de grossissement.

La sensibilité d'un photodétecteur peut être améliorée en augmentant la surface de détection et donc l'angle de détection. Par exemple, la lumière diffractée vers l'avant peut être collectée selon un angle plus large, appelé « wide-angle FSC », permettant une meilleure détection des particules de faible taille. Cependant le bruit de fond augmente également, c'est la raison pour laquelle, les cytomètres sont réglés pour détecter la lumière selon un paramètre nommé « reduced wide-angle FSC » défini par l'angle de collecte permettant d'obtenir un rapport signal/bruit de fond le plus élevé possible (van der Vlist et al. 2012).

**Les variations d'angle de détection** sont très bien illustrées sur le cytomètre Gallios (Beckman-Coulter) (Figure 19). Le Gallios N utilisé principalement pour l'analyse cellulaire est classé parmi les SD-CMF.

Le développement d'instruments dédiés à l'étude des MP a conduit au Gallios W puis au Gallios W2. Premièrement l'élargissement de l'angle de détection de la lumière en FSC a permis le passage du Gallios N au Gallios W pour lesquels la lumière est collectée entre 1 et 8° et entre 1 et 19° respectivement. Dans un second temps le Gallios W2 a été équipé de deux détecteurs amplifiant différemment les signaux selon l'angle de détection (1-8°) et (9-19°) (Poncelet et al. 2015). Le gain de résolution en FSC est démontré par Robert et al (2012) qui conclut que le Gallios W2 (HS-CMF) est la seule configuration à permettre la distinction de billes de latex de 0.1 et 0.3  $\mu\text{m}$  composant le mélange Megamix (Biocytex). Cependant soulignons que le signal FS ainsi détecté sera plus fortement dépendant de l'indice de réfraction. De cette façon la variation du signal entre billes et MP sera plus grande (Robert et al. 2012).

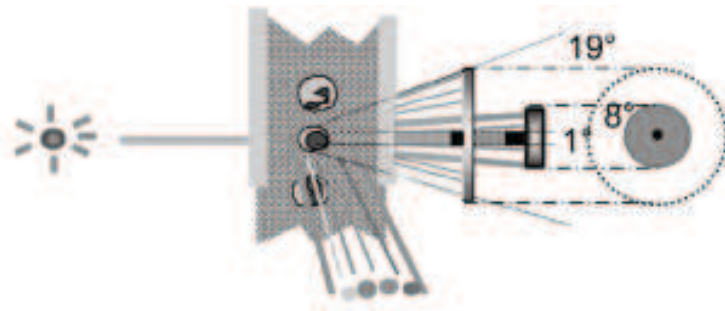


Figure 19 : Schéma de l'unité de détection du forward scatter. La lumière émise par le laser est bloquée par une barre d'obturation, la lumière diffusée est classiquement collectée entre 1 et 8° sur les SD-CMF. Une option du Gallios / Gallios W permet la détection de lumière entre 1 et 19°, et le Gallios W2 propose une amplification différentielle entre ces deux angles afin d'obtenir la meilleure détection de lumière et le moins de bruit de fond provenant de la diffusion non spécifique dans l'axe du laser (Poncelet et al. 2015).

Des comparaisons de numérations de MP obtenues à partir d'un même échantillon à petit angle ou avec l'option W2 ont montrées que le W2 permettait de détecter un nombre supérieur de PMP. En effet comme le montre la Figure 20 lorsque 2000 MP/ $\mu\text{L}$  sont détectées en SD-CMF, un HS-CMF détecte 3000 MP/ $\mu\text{L}$ . La même observation a été faite concernant les autres sous-populations de MP: Ery-MP, Leu-MP et Endo-MP (Robert et al. 2012).

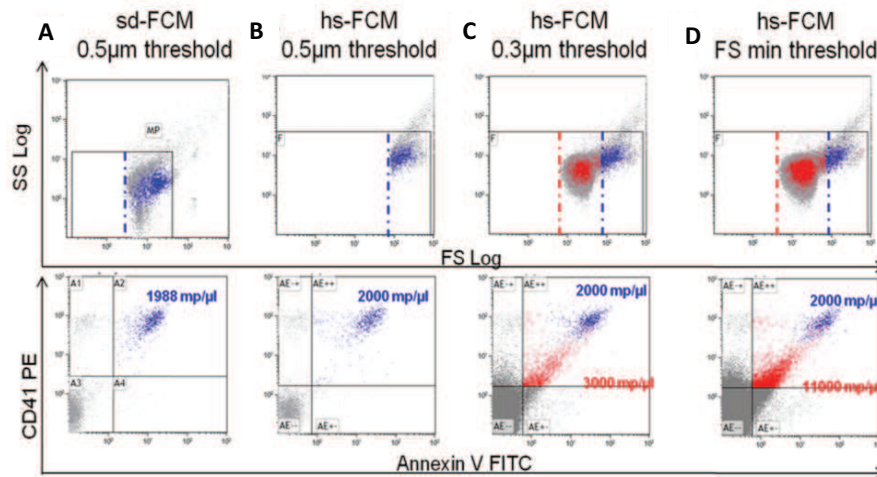


Figure 20 : Acquisition faite sur SD-CMF et HS-CMF à l'aide de billes de calibration Megamix-Plus (BioCytex, Marseille, France) (A) avec un seuil en FS placé sur la bille 0.5µm. La ligne bleue correspond au seuil FS placé sur la bille de 0.5µm et la population bleue correspond aux PMP détectés avec ce seuil. (B) Même condition qu'en (A) obtenue sur un HS-CMF. (C) Acquisition avec seuil FS placé sur la bille 0.3µm. (D) Résultats obtenus avec un seuil FS minimal à environ 0.2µm. Pour chaque condition les cytogrammes (en bas) notifient le nombre de PMP, évènements doublement marqués Annexine V-FITC+/CD41-PE+ PMP en bleu quand ils sont détectables avec un seuil FS à 0.5µm et en rouge lorsqu'ils sont détectables avec le seuil est à 0.3µm. Le gain de résolution obtenu sur les HS-CMF permet un gain de numération des MP. Extrait de (Robert et al. 2012)

**Les photodiodes à avalanche (APD)** sont des photodétecteurs en silicium initialement utilisés pour les télescopes ou dans la téléphonie pour leur grande sensibilité. Elles sont composées de nombreuses microcellules composées d'APD constituées d'une couche électroniquement instable soumise à une surtension. Lorsqu'un photon vient arracher un électron, celui-ci est dirigé la zone d'avalanche et produit une décharge Geiger, arrachant un grand nombre d'électrons qui produisent un fort courant. Le gain de signal ( $> 10^5$ ) est important car un seul électron entraîne un flux de courant important. L'efficacité quantique est la capacité intrinsèque d'un détecteur à convertir les photons en électrons. Il est exprimé comme le rapport des électrons générés aux photons incidents en pourcentage. Les APD ont une efficacité quantique élevée de 80% entre 400 nm à 1100 nm contre 30% pour les PMT dont l'efficacité de détection décroît rapidement et est très limitée au-delà de 800 nm (Figure 21).

La différence la plus importante entre PMT et APD est l'impact du bruit total sur la performance du détecteur. En effet, l'APD a un bruit plus bas que le PMT. La faible détection de bruit associé à un meilleur rendement quantique des APD expliquent que celles-ci rendent un signal supérieur aux PMT pour un gain plus faible et assurent un rapport signal /

bruit élevé et donc une haute résolution optique particulièrement intéressante lors de mesure de petites particules ou de détection de faible fluorescence (Howard M. Shapiro 2003). Ces détecteurs présentent donc un grand intérêt pour la mesure des MP. Les nouveaux instruments (comme par exemple le CytoFLEX) commencent à être équipés de ce type de détecteur.

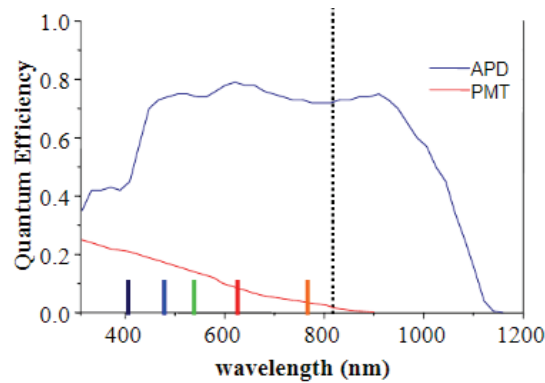


Figure 21 : Efficacité quantique des APD et PMT à différentes longueur d'onde données.(Lawrence et al. 2008)

Il existe également un module de détection des particules de petites tailles adaptable sur plusieurs cytomètres (ARIA, Fortessa, Influx) proposé par BD qui améliore la détection en FS à l'aide d'un détecteur couplé avec une lentille de microscope à grande ouverture, un trou d'épingle et un tube PMT. Le trou d'épingle réduit la quantité de lumière parasite atteignant le détecteur et empêche la saturation du PMT.

D'autres technologies ont été développées comme sur le NanoFCM qui quantifie la lumière élastiquement dispersée à partir de nanoparticules et permet la caractérisation multiparamétrique de nanoparticules dont la taille est comprise entre 40 et 500 nm. Une haute résolution comparable à celle du microscope électronique peut être atteinte en combinant la détection de diffusion de lumière et de fluorescence (Zhu et al. 2014b).

## 2) REDUCTION DU BRUIT DE FOND

### a) BRUIT DE FOND FLUIDIQUE

#### i) Filtration du liquide de gaine et tampons

Le liquide de gaine est souvent un tampon phosphaté qui sert à l'isofocalisation de l'échantillon. Il peut être préfiltré à  $0,22\mu\text{m}$  ou même à  $0,1\ \mu\text{m}$  ainsi que les autres tampons employés lors des essais afin de limiter la présence d'éléments responsables de diffusion lumineuse non spécifique. Certains instruments ont des filtres intégrés comme l'Influx de BD. Une altération du filtre du liquide de gaine, la réutilisation d'un liquide de gaine « maison », le vieillissement des tubules conduisant le liquide du réservoir jusqu'à l'analyseur et la présence de bulles qui peuvent être formées lorsque le liquide froid rentre en contact avec l'analyseur à température ambiante peuvent être responsable d'une élévation du bruit de fond (Poncelet et al. 2015).

#### ii) Diamètre et débit

Le débit impacte le diamètre de passage de l'échantillon. Un diamètre de flux échantillon fin, obtenu par un faible débit de passage de l'échantillon, permet de réduire le bruit de fond de fluorescence non spécifique en diminuant le nombre d'anticorps non liés passant simultanément avec les MP (Figure 22). Ce paramètre impacte également sur la résolution de l'instrument.

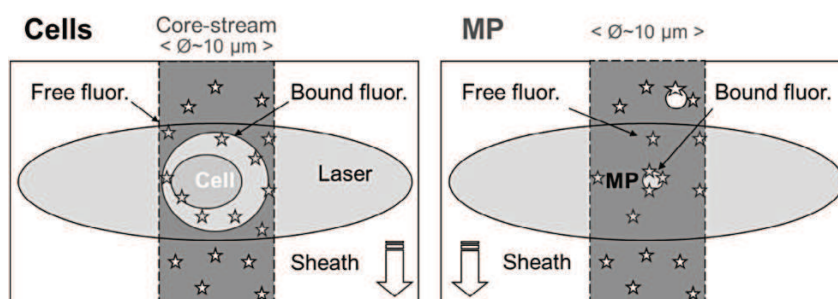


Figure 22 : Représentation de l'impact du diamètre du flux de l'échantillon sur l'analyse des MP. (Poncelet et al. 2015)

**b) BRUIT DE FOND OPTIQUE**

**i) Alignement des lasers**

Un réglage précis de l'alignement des lasers associé au positionnement parfait de la barre d'obturation garantissent une diffusion de la lumière non spécifique minimale. Il est donc nécessaire de vérifier régulièrement ces réglages pour ne pas induire une élévation du bruit de fond optique ou de faire appel à un technicien expérimenté. L'alignement doit être contrôlé avant chaque manipulation par l'évaluation de la résolution par exemple à l'aide de billes fluorescentes.

**ii) Dépôts**

Des MP et des particules non-spécifiques peuvent se fixer aux parois de la chambre analytique il est donc recommandé de nettoyer les cuvettes en quartz régulièrement.

**iii) Anticorps libres**

Pour limiter le problème de l'excès d'anticorps libre, la solution proposée consiste à déterminer avant chaque protocole la concentration saturante optimale de réactif c'est-à-dire la concentration de réactif minimal induisant le signal maximal. Pour cela une titration de chaque anticorps doit être effectuée par des dilutions en cascades. En raison de ce phénomène les courbes de titration des anticorps sur les MP ont fréquemment un profil plus en cloche que lorsque l'anticorps est utilisé pour des cellules. En aucun cas, les concentrations utilisées pour les cellules ne doivent être directement transposées aux MP. Par ailleurs l'utilisation de technique comme la chromatographie d'exclusion de taille permet de retirer les anticorps libres du milieu analytique. Néanmoins les rendements variables de ces techniques ne permettent pas d'effectuer de comparaison de résultat et limitent leur intérêt dans le cadre d'étude clinique.

**c) BRUIT DE FOND PROVENANT DE L'ÉCHANTILLON**

Les solutions concernant le traitement du bruit de fond provenant de l'échantillon seront développées ultérieurement dans la partie optimisation pré-analytique.

### 3) OPTIMISATION DE LA RESOLUTION ET SYSTEME FLUIDIQUE

Outres les paramètres d'optimisation du signal et de réduction du bruit de fond présentés ci-dessus il est possible d'optimiser la résolution grâce à la modulation du système fluidique. Cette partie a largement été inspirée de l'article publié par P. Poncelet (Poncelet et al. 2015)

Les **systèmes d'écoulement lent**, avec des temps d'observation de l'ordre de la milliseconde plutôt que la microseconde, sont utiles lors d'analyse de haute précision par exemple pour les bactéries, les virus et les macromolécules (Chou et al. 1999). Dans un système de focalisation hydrodynamique le **débit** de l'échantillon est fonction de la pression induite par le liquide de gaine, paramètre intrinsèque de l'instrument fixé par le fabricant, et de la pression dû à l'échantillon, paramètre dépendant de la vitesse de passage de l'échantillon, choisie par le manipulateur au moment de la lecture.

Comme l'illustre la Figure 23, un débit lent implique un faible diamètre du flux de passage de l'échantillon. Or contrairement à l'analyse des cellules, les MP sont des objets submicroniques qu'il est difficile de séparer dans le flux. Une meilleure séparation des MP sera donc obtenue à faible débit et le phénomène de « swarm detection » (détection de plusieurs particules simultanément) sera limité. Par conséquent l'analyse des MP ne permet pas l'accélération du débit et nécessite un allongement du temps d'acquisition.

Par ailleurs la réduction du bruit de fond de fluorescence non spécifique obtenue par un diamètre d'échantillon fin participe à une meilleure discrimination du signal spécifiquement dû aux MP.

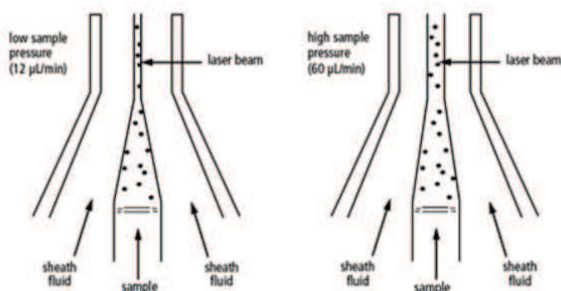


Figure 23 : Lien entre diamètre et vitesse de passage de l'échantillon sur les systèmes fluidiques (focalisation hydrodynamique BD sciences, FACS Canto II)

Il existe d'autres systèmes permettant d'aligner les MP avant leur entrée dans la chambre analytique : Par exemple le système de **focalisation acoustique** retrouvé sur l'Attune (Figure 24) utilise des ondes sonores afin d'aligner parfaitement les cellules au centre du liquide de gaine avant leur entrée dans la chambre analytique.

Ainsi la position des particules analysées est parfaitement centrée et régulière quel que soit le diamètre du flux de passage de l'échantillon. De cette façon il n'est pas nécessaire de réduire le débit de passage de l'échantillon pour obtenir les conditions optimales d'écoulement de l'échantillon. Ce système entraîne un gain de résolution et de temps particulièrement appréciable pour l'analyse d'événement rare.

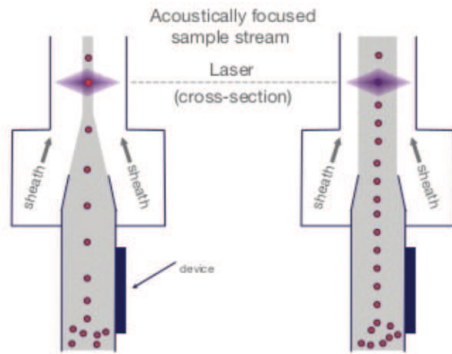


Figure 24 : La focalisation acoustique permet d'aligner les cellules sans réduction du débit de l'échantillon (Thermo Fisher Scientific, Acoustic Focusing Technology Overview)

Il existe aussi des systèmes dit « jet-in-air » s'opposant aux cytomètres à cuvette de quartz. Ils sont surtout utilisés pour les trieurs-analyseurs comme l'Influx (BD) ou l'Astrios (Beckman Coulter). Habituellement ces systèmes utilisés pour le tri phénotypique ont une moins bonne résolution que les CMF à cuvettes. Cependant ils ne sont pas sensibles à la perte de résolution consécutive au dépôt de particules sur les parois responsables d'une diffusion non spécifique de la lumière.

D'autres part, les variations de positionnement des MP dans le flux entraînent des variations d'illumination par le laser et donc des différences de signaux lumineux. Comme le montre la Figure 25, quel que soit le processus de focalisation il est primordial d'assurer l'alignement parfait des MP.

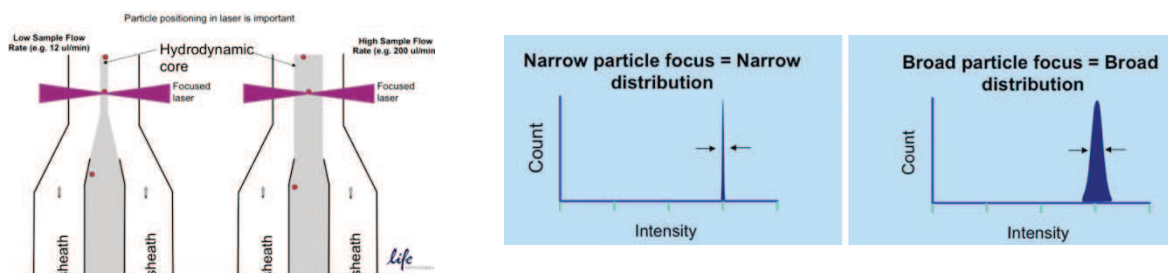


Figure 25 : Conséquences de mauvais alignement des MP au sein du flux sur le signal lumineux détecté (Thermo Fischer)



#### 4) COMBINAISON TECHNOLOGIQUE

La CMF peut être combinée à d'autres technologies afin d'isoler et/ou détecter les MP et obtenir des informations complémentaires.

- L'**imagestreamX**<sup>™</sup> (ISX) (EMD Millipore, Inc, Seattle, WA) est le premier CMF de haute résolution couplée à la technologie « imaging » capable de prendre une photo d'une seule MP lors de son passage dans la chambre d'analyse. Cette technique permet théoriquement de discerner billes, débris et MP par l'ajout d'une dimension morphologique à la CMF classique (Erdbrügger and Lannigan 2016). Avec cet instrument des liposomes de 200 nm sont clairement identifiées (Erdbrügger et al. 2014) et jusqu'à 10 fois plus de MP ont été détectées en ISX comparée à la CMF classique (FACSCalibur<sup>™</sup> et FCMFortessa<sup>™</sup>). Cette technologie présente une sensibilité de fluorescence supérieure (Ortyn et al. 2006). L'intérêt de l'ISX réside dans sa capacité à détecter des éléments de très faible taille que les CMF ne parviennent pas à différencier du bruit de fond. Il faut cependant tenir compte de la résolution optique de l'objectif utilisé qui limite la qualité des images obtenus rendant difficile l'interprétation des images obtenues.
- La **cytométrie de masse** a été testée sur des suspensions cellulaires marquées par des anticorps couplés avec des métaux lourds non fluorescents. Elle consiste à associer de la cytométrie de flux avec de la spectrométrie de masse, les cellules sont séparées et injectées une par une dans une chambre d'ionisation où les métaux liés aux anticorps sont identifiés par leurs caractéristiques de temps de vol (TOF ou time of flight). Cette technologie est peu utilisée et est difficile à mettre en place mais certains chercheurs pensent qu'il sera possible de tester simultanément jusqu'à 100 marqueurs dans chaque cellule par cytométrie de masse (Bandura et al. 2009). Cette technologie présente un potentiel intéressant pour l'analyse des MP.

## IV) STRATEGIES D'ANALYSE

L'amélioration de la détection des MP en cytométrie dépend non seulement des progrès technologiques tels qu'exposés précédemment mais également des stratégies d'analyses choisies en fonction des performances des instruments. Ces stratégies comprennent les stratégies de seuillage (ou de déclenchement) et de « gating ».

Différents paramètres de déclenchement peuvent être choisis pour la détection des MP. Le déclenchement peut être basé soit sur la diffraction de lumière (FSC ou SSC) soit sur un paramètre de fluorescence (FL). Plus récemment des stratégies d'analyses combinant les deux stratégies ont vu le jour.

### A) DECLENCHEMENT PAR DIFFRACTION LUMINEUSE

Les MP peuvent être détectées par leur capacité de diffraction de la lumière en FSC ou SSC. Dans cette stratégie d'analyse, le discriminant, c'est à dire le seuil de détection est fixé par l'expérimentateur.

L'analyse des propriétés fluorescentes intervient dans un second temps au sein de la fenêtre d'analyse fixée par les paramètres de diffraction.

L'optimisation de la CMF pour les MP, en particulier en ce qui concerne la collecte des signaux de diffraction, nécessite une compréhension de la relation entre petites particules de diamètres variables, indices de réfraction et dispersion de la lumière qu'elles produisent. Cependant au sein d'une population hétérogène comme c'est le cas des MP la distribution des signaux fournis en FSC et SSC ne sont pas totalement élucidés. Des modèles ont été développés afin de normaliser la distribution de la diffraction lumineuse. Ils tiennent compte du diamètre, de la surface, de l'indice de réfraction, et de la géométrie de collecte du signal lumineux (circulaire / rectangulaire). Deux théories principales sont admises aujourd'hui :

La première, appelée « théorie de Mie » a été publiée pour la première fois en 1908 par Gustav Mie et repose sur les équations de Maxwell elle a été adaptée pour la détection des MP en 2012. Cette théorie s'applique à la fois aux petites particules sphériques qu'elles soient absorbantes ou non. Selon la théorie de Mie, les particules sphériques dont le diamètre est supérieur à la longueur d'onde d'illumination diffractent la lumière préférentiellement vers l'avant. Ainsi l'emploi du FS semble un outil de déclenchement de choix.

De plus, selon cette théorie, plus la longueur d'onde d'illumination est courte plus la section transversale d'une particule augmente et meilleure sera la résolution de taille entre deux populations.

En revanche, pour le cas des particules de diamètre inférieur à la longueur d'onde d'illumination la théorie de Mie n'est plus applicable et c'est le modèle de dispersion de Rayleigh qui modélise ce phénomène. Dans ce cas la lumière n'est plus préférentiellement diffractée vers l'avant mais diffusée de façon isotropique (dans toutes les directions) à 360°.

En résumé pour des évènements de taille supérieure à la longueur d'onde du laser, le FS permet une meilleure détection et une estimation de la taille de l'évènement assez précise. Inversement les plus petites particules (dont le diamètre est en dessous de la longueur d'onde du laser) seront mieux détectées en SS.

Cependant l'utilisation du W2 (FS) sur le Gallios a montré que l'on pouvait différencier des particules (billes de polystyrène) de tailles inférieures à la longueur d'onde du laser de façon précise et robuste (Robert et al. 2012).

En revanche l'utilisation du SS comme paramètre de déclenchement doit être considéré avec précaution car il est bien plus sensible aux variations d'IR que le FS. De ce fait l'analyse de taille relative faite à l'aide du SS et de billes ne fournira pas une bonne indication de la taille des MP détectées. Historiquement notre laboratoire a décidé d'utiliser le FS en priorité comme paramètre de déclenchement en se positionnant au seuil de résolution minimal reproductible sur des CMF de type Gallios W2. Cependant le choix du paramètre de déclenchement dépend en priorité du type de cytomètre choisi, les performances de résolution en diffraction étant très variable d'un instrument à l'autre.

## **B) DECLENCHEMENT EN FLUORESCENCE**

Une deuxième stratégie propose de fixer **un seuil de fluorescence** comme discriminant, et de s'intéresser aux FSC et SSC dans un second temps. Les MP n'étant pas pourvue de qualité d'auto-fluorescence cette stratégie implique de disposer d'un marqueur spécifique présent sur l'ensemble des MP à analyser. Une des caractéristiques des HS-CMF est leur sensibilité de fluorescence accrue rendant possible la détection de faibles signaux de fluorescence idéale pour la détection des MP.

Cependant une part des MP n'expose pas la PS en surface et rendant l'annexine V inutilisable (Arraud et al. 2014). L'absence de marqueur exhaustif et spécifique des MP limite l'emploi de cette stratégie.

De même le faible signal de fluorescence provoqué par le passage d'une MP marquée devant le laser est très proche du bruit de fond de l'instrument. Le positionnement du discriminant doit être précis et s'effectue à l'aide d'un contrôle isotypique permettant de définir la hauteur du signal de fluorescence obtenue en absence de MP.

### **C) COMPARAISON DES STRATEGIES**

Une étude présentée à l'occasion des sous-comités de standardisation de l'ISTH SSC en 2012 par Micah Mooberry compare les différentes stratégies de « gating » sur plusieurs cytomètres (Mooberry 2012). Les résultats de numérations de PMP obtenues par ces deux stratégies sur des cytomètres optimisés en FSC sont semblables. En revanche des résultats variables ont été observés sur des cytomètres optimisés en SSC. Ces cytomètres offraient tout de même une meilleure sensibilité de détection permettant de doubler les numérations de PMP. Cette étude a permis de montrer une plus grande sensibilité de détection en utilisant un déclenchement par fluorescence (Annexine V-FITC) mais ces résultats ont été discutés en raison du risque de détection de signaux non spécifique.

Arraud publie en 2016 des résultats de numérations de MP obtenues à partir de PFP sur le Gallios en comparant ces deux stratégies de déclenchement (en fluorescence par l'Annexine V marquée et FSC). Il retrouve 40 fois plus d'évènements Annexine V+ en fluorescence qu'en FSC (Arraud et al. 2016) mais ces résultats sont critiquables de par leur manque de spécificité. Toutefois, la limite de taille inférieure de détection des MP est estimée autour de 200nm en utilisant un déclenchement en diffraction lumineuse (Chandler 2016) et autour de 100nm en déclenchement par fluorescence (Nolte-'t Hoen et al. 2012).

D'autres marqueurs peuvent être employés pour cette stratégie comme le colorant de membrane lipidique PKH67 (van der Vlist et al. 2012; Nolte-'t Hoen et al. 2012) ou encore d'autres anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de lignée mais ils ne sont pas nécessairement utilisables dans les échantillons biologiques.

Comme le montre la Figure 26 (ci-dessous), le déclenchement de fluorescence présente l'avantage d'une plus grande sensibilité par rapport aux mesures de diffraction de la lumière aboutissant à la détection de MP de plus petite taille. La détection de MP par fluorescence abaisse la limite de détection aux alentours de 100 à 200 nm (van der Vlist et al. 2012; Nolte-'t Hoen et al. 2012; Arraud et al. 2014, 2016).

Outre l'absence de marqueur universel à ce jour, la problématique de la standardisation limite également l'emploi de cette stratégie. Bien que plus sensible la méthode de déclenchement par fluorescence pose deux questions.

Comment standardiser les numérations obtenues en déclenchement par fluorescence ? Puisqu'aucun marqueur à la fois spécifique et exhaustif ne semble disponible (van der Vlist et al. 2012; Arraud et al. 2016).

Quel marqueur utiliser ?

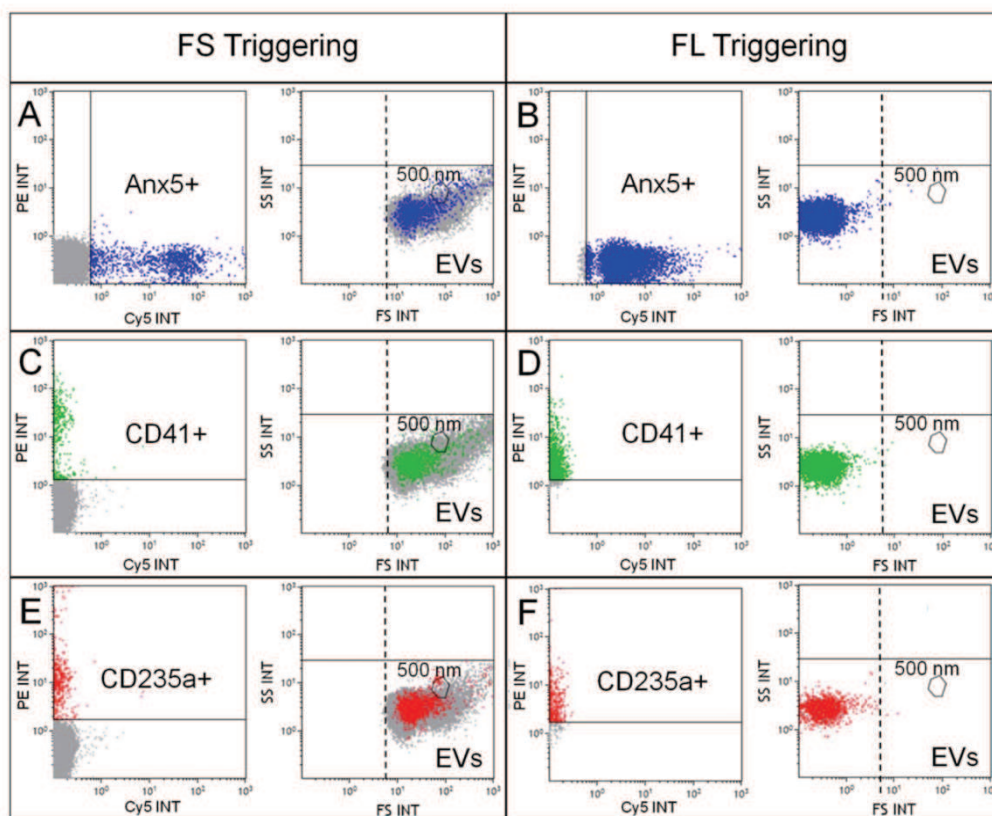


Figure 26: Comparaison des stratégies de gating en fluorescence et en diffraction (Extrait de Arraud 2016 ; **Fluorescence Triggering: A General Strategy for Enumerating and Phenotyping Extracellular Vesicles by Flow Cytometry**). FS triggering: détection en FS; FL triggering: détection en fluorescence. Les monomarquages par annexine V-Cy5, anti CD41-PE et anti CD235a- PE apparaissent en bleu, vert et rouge respectivement. Le bruit de fond est représenté en gris. On observe qu'en FSC les EVs annexine V+, CD41+ et CD235a+ sont superposées au bruit de fond de l'instrument. Au contraire ces EVs apparaissent très clairement dissociées du bruit de fond lors du gating en fluorescence.

En somme, il n'existe pas de consensus sur le choix de la stratégie de « gating ». Bien que plus sensible, l'absence de standardisation de la stratégie par fluorescence ne permet pas son utilisation lors d'étude multicentrique et les stratégies basées sur la diffraction lumineuse dépendent des performances intrinsèques de l'instrument utilisé.

L'arrivée d'instruments présentant de meilleures résolutions en diffraction combinée à l'utilisation de billes de tailles calibrées font de la stratégie de « gating » basée sur la diffraction lumineuse une stratégie de choix. Cette stratégie est donc actuellement la plus utilisée dans la littérature. Cependant cette vision pourrait rapidement évoluer et aboutir à des stratégies combinant les 2 stratégies.

## **V) ARTEFACTS DE MESURE DE MP PAR CMF**

### **A) ARTEFACTS PRE-ANALYTIQUES**

Les paramètres pré-analytiques influent fortement sur la mesure des MP quelque soit la méthodologie employée (Yuana et al. 2011). La raison principale vient du fait que les MP proviennent de mécanismes d'activation cellulaire qui peuvent facilement être induit *ex vivo*. L'identification de facteurs pré-analytiques impactant les résultats d'analyse des MP a permis de proposer des recommandations et d'améliorer la reproductibilité interlaboratoire de la mesure des MP par CMF (Lacroix et al. 2012, 2013, Witwer et al. 2013). Ces recommandations ont été récemment actualisées par un panel d'expert (Coumans et al. 2017). Celles-ci ne seront que brièvement exposés dans ce chapitre.

Le prélèvement doit être effectué avec une aiguille de diamètre de 19 à 21 gauges, en l'absence de garrot. Le premier millilitre de sang ne doit pas être utilisé par l'analyse des MP. L'échantillon doit être collecté dans des tubes citrates 109mM et l'homogénéisation du prélèvement doit être délicatement. Si un transport est nécessaire, celui-ci doit être en station verticale, sans agitation, à température ambiante, dans un délai rapide, vers le laboratoire afin d'être décanté dans un délai idéalement inférieur à 2h. Le laboratoire doit immédiatement prendre en charge l'échantillon et procéder à une double centrifugation à température ambiante, de 15 min à 2500g afin d'obtenir un plasma très appauvri en plaquette (PFP). Afin d'éviter la perte des MP lors de la centrifugation et pour conserver leurs caractéristiques intactes, l'idéal est de travailler sur des échantillons de plasma frais.

Cependant, du fait de la contrainte que cela représente, il est bien souvent nécessaire de reporter l'analyse, ainsi la conservation des plasmas à -80°C ou dans l'azote liquide est indiquée. La décongélation devra s'effectuer rapidement à 37°C. Dans tous les cas, afin de garantir la qualité des résultats, les contrôles et les échantillons de patients doivent être traités dans les mêmes conditions.

Alternativement des analyses en sang total ou sur sérum ont été rapportées dans la littérature. Ces protocoles s'ils ne remplissent pas les conditions de préservation de la composition de MP circulantes, peuvent toutefois présenter un intérêt lors de la recherche de sous-populations de MP non circulantes chez le sujet sain comme les MP d'origine endothéliale, placentaire ou tumorale ou les autres vésicules extracellulaires pour lesquelles les protocoles recommandés pour les MP ne sont pas nécessairement adaptés.

Ces contraintes pré-analytiques représentent indéniablement une contrainte limitante pour leur utilisation en clinique et devront nécessairement être simplifiés en fonction de l'intérêt particulier soulevé par une sous-population ou activité spécifique de MP dans une indication clinique déterminée. Néanmoins, ces recommandations présentent un "garde fous" contre les résultats artéfactés trop facilement obtenus et rapportés dans la littérature dans ce domaine. Ces considérations s'appliquent également aux aspects analytiques de la mesure des MP par CMF.

## **B) INTERFERENCES ANALYTIQUES**

### **1) SOURCES D'INTERFERENCES (ECHANTILLON)**

#### **a) LES VESICULES LIPIDIQUES**

En ce qui concerne le milieu plasmatique les lipides sont bien connus comme source d'interférence avec les méthodes utilisant la transmission de lumière. En cytométrie de flux, la lipémie, et en particulier les chylomicrons, ont été décrit comme interférences de détection des plaquettes (Cantero et al. 1998). Plus récemment, ils ont aussi été identifiés comme sources d'interférences dans la détection des MP ainsi que d'autres vésicules lipidiques du fait de leur faible indice de réfraction et de leur petite taille. En effet, une analyse d'échantillons enrichis en lipides (*in vitro* et *in vivo*) a montré une réduction du nombre de MP d'origine endothéliale détectées par CMF chez des volontaires sains et des patients atteints de pathologies cardiovasculaires (van Ierssel et al. 2012).

Cette diminution est non linéaire et inversement liée à la concentration en triglycérides du plasma suggérant une interférence lipidique. Cette étude montre la précaution d'interprétation à prendre en compte pour les plasmas lipémiques.

L'échantillon peut également contenir des agrégats protéiques, des macromolécules (polymère de vWF, fibrine ...), des débris cellulaires comme les plaquettes fragmentées, ou des complexes immuns insolubles qui constituent des sources potentielles d'interférences en diffractant la lumière.

Par exemple, il a été montré que des complexes immuns insolubles présents dans les liquides articulaires de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde pouvaient interférer avec la détection de MP (György et al. 2011).

Cependant, la spécificité de l'analyse multiparamétrique rendue possible en CMF permet de faire la distinction entre ces interférences et les vraies MP. De ce fait la CMF est bien moins impactée par ce problème que des techniques comme les NTA ou le RTPS par exemple.

#### **b) LES AGREGATS D'ANTICORPS**

La présence d'agrégats d'anticorps dans les flacons de réactifs peut induire une surestimation des numérations de MP. Par exemple, la présence d'agrégats d'anticorps anti-FT entraîne des résultats faussement positifs de détection de Mono-MP-FT+. La même proportion de Mono-MP –FT+ a été mesurée en condition activées et non activées alors que le dosage de l'activité FT effectué sur les deux échantillons montrait une absence d'activité FT sur les MP provenant de monocytes non activés. (Aass et al. 2011).

Il est donc recommandé de centrifuger à haute vitesse soit 20000g pendant 2 min les suspensions d'anticorps avant leur utilisation. Une filtration à 0,1µm des anticorps permet également d'éliminer efficacement les agrégats d'anticorps. Cette méthode est plus facilement intégrable dans la pratique quotidienne mais entraîne une perte significative de réactif (Inglis et al. 2015).

#### **c) COAGULATION EX VIVO DES PFP**

Les MP portent une activité procoagulante. Ainsi, les échantillons plasmatiques riches en MP peuvent facilement coaguler *in vitro* ce qui fausse les résultats. Certaines situations favorisent la formation de caillot *in vitro* :



- **Concentration calcique élevée** : La liaison Annexine V-PS n'est réalisée qu'en présence de taux calciques physiologiques. Cependant l'apport de calcium est un élément déclencheur de la cascade de la coagulation. L'apport de calcium *in vitro* dans un échantillon de plasma contenant des MP peut entraîner l'activation de la cascade de coagulation. La micro-coagulation des plasmas recalifiés est une source d'erreurs qui n'a été décrite que récemment et a pu conduire à de nombreux résultats erronés par le passé.

Afin d'éviter la coagulation des plasmas induite par la recalcification des échantillons, des protocoles d'analyse en CMF en présence d'héparine ont pu être appliqués sans fausser les résultats (van der Heyde et al. 2011). D'autres équipes préconisent l'hirudine, un antithrombine direct, ou encore l'utilisation d'un ligand du PS, autre que l'Annexine V, calcium-indépendant (Poncelet et al. 2015).

- **La température**: Les facteurs de la coagulation et notamment le FVII peuvent être activés par le froid. Les plasmas contenant du FVIIa peuvent induire une coagulation *in vitro*. La décongélation des plasmas doit être effectuée à 37°C. De plus la lecture d'une préparation de plasmas destinés à l'analyse des MP par CMF contenant déjà de l'Annexine V et son tampon calcique ne doit pas être retardée.

## 2) LIMITATIONS DES INTERFERENCES

### a) PAR PURIFICATION DES MP

Dans le but de limiter les interférences, des purifications de MP peuvent être effectuées en phase pré-analytiques (Coumans et al Circ Res 2017). Même si elles limitent la quantification et la reproductibilité, elles présentent l'avantage de s'affranchir à la fois du bruit de fond échantillon mais également du bruit de fond optique. Il n'existe pas de méthode spécifique isolant seulement les EVs. Des protéines solubles, des agrégats de protéines, des lipoprotéines (en particulier les lipoprotéines de haute et basse densité [HDL et LDL, respectivement]), et d'autres particules, y compris les organites cellulaires et virus peuvent persister dans le mélange. Différentes propriétés physiques et biochimiques portant sur la taille, la densité de masse, la forme, la charge, et l'exposition aux antigènes peuvent servir à isoler les EVs.

**La Centrifugation différentielle** utilise la force centrifuge pour isoler les EVs selon leur taille et leur densité par des centrifugations séquentielles croissantes. Cette méthode chronophage n'achève pas l'isolement des EVs et peut favoriser la présence d'agglomérats.

**La Centrifugation à gradient de densité** isole également les EVs selon taille et densité. L'iodixanol iso-osmotique et peu visqueux permet de raccourcir les temps de centrifugations. La technique de flottation reste à ce jour une des techniques les plus performantes pour purifier les MP et autres EVs mais sa lourdeur de sa mise en œuvre prévient toute utilisation en clinique.

**La précipitation** à base de polyéthylène glycol ajouté et incubé à 4 ° C pendant 15 minutes à 12 heures peut faire précipiter les petites EVs. Mais le niveau de pureté de ces préparations est faible.

**La Chromatographie d'exclusion de taille (SEC)** permet la séparation des EV selon leur taille sur une colonne. Le seuil de taille est déterminé par le choix de la matrice d'exclusion, par exemple, Sepharose 2B, a une taille de pore d'environ 60 nm.

La SEC élimine 99% des protéines plasmatiques solubles et > 95% de HDL à partir de la fraction la plus pure d'EVs, sans induire d'agrégation. Les principaux composants co-isolés sont des particules de taille inférieure au seuil de coupure, des virus, des agrégats de protéines et les protéines très importantes telles que facteur de von Willebrand et chylomicrons et LDL. Cette méthode est rapide et peu coûteuse. Les différentes fractions obtenues contiennent différentes populations d'EVs analysable séparément.

**L'ultrafiltration** permet une séparation des EVs à partir de composants solubles passés à travers un filtre, sous une pression appliquée dans une centrifugeuse. Du fait de la force appliquée les vésicules dont la taille est supérieure à celle des pores peuvent passer le filtre. L'ultrafiltration est une méthode et peut concentrer les EVs jusqu'à 240 fois.

**L'immunocapture** utilise des anticorps monoclonaux immobilisés sur une surface pour capturer des EVs qui exposent un ligand spécifique. Elle peut isoler les sous-populations d'EVs. Cette méthode est actuellement bien utilisée en cytométrie comme moyen de dépasser la limite de détection des instruments pour les MP de petite taille. Les billes couvertes de MP sont analysées en CMF (Melo et al. 2015). Ceci présente donc le double avantage d'éliminer les interférences et de rattraper le défaut de sensibilité des instruments. Des kits de détection de MP ou d'exosomes par CMF sur billes sont déjà commercialisés (par exemple, Exoflow, System Biosciences, Mountain View, CA).

## **b) PAR UTILISATION DE CONTROLES DE SPECIFICITE**

Différents contrôles ont été proposés afin de limiter les interférences dues aux évènements non spécifiques :

En pratique, pour chaque échantillon un contrôle isotypique pour chaque fluorochrome est utilisé dans le but d'évaluer le bruit de fond de fluorescence. Les contrôles isotypiques sont des anticorps monoclonaux de même isotype que celui utilisé dans le panel couplé au même fluorochrome mais non réactif vis-à-vis de l'échantillon.

La difficulté réside dans le fait de trouver le contrôle isotypique adapté et des causes de variabilités dépendantes du contrôle lui-même entrent en considération: i) non-conformité de l'isotype avec l'anticorps, ii) variations de conjugaison conduisant à des différences dans le rapport fluorochrome / protéine, iii) localisation de la liaison au fluorochrome qui peut éventuellement interférer iv) la concentration de l'isotype ne correspond pas exactement à la concentration d'anticorps (Trummer et al. 2008).

Il existe des moyens de vérifier la concordance du couple contrôle isotypique / anticorps : soit en utilisant un plasma exempt de MP soit en utilisant une population de MP non réactive vis à vis de l'anticorps. Ainsi, la concentration du contrôle isotypique sera déterminée de telle façon qu'il génère le même bruit de fond de fluorescence que l'anticorps spécifique. On parlera alors d'anticorps "matchés" en fluorescence. Cette vérification n'est habituellement pas nécessaire pour l'analyse des cellules (Lacroix et al. 2014).

Pour un nouvel anticorps, il est également possible de démontrer la spécificité du marquage par négativation du signal après centrifugation, filtration, compétition avec un anticorps non fluorescent ou par immunocapture. Cette dernière stratégie est illustrée dans la Figure 27, montrant la spécificité du marquage EpCAM sur des MP de pleurésie maligne(Roca et al. 2016).

D'autres contrôles ont été rapportés dans la littérature :

- La phalloïdine qui cible avec une grande affinité la f-actine intracellulaire exposée lorsqu'une membrane est lésée peut être utilisée afin de différencier les PMP, des plaquettes fragmentées (Mobarrez et al. 2010).
- L'ester acetoxyméthylé de la calceïne (calceïn-AM) est un dérivé de la fluorescéine qui est utilisé comme colorant vital.

C'est un composé non-fluorescent qui traverse passivement les membranes phospholipidiques et devient fluorescent après clivage par les estérases cytosoliques.

La calceïn-AM permet alors de marquer les MP viables c'est à dire celles qui ont contenus les estérases au sein de leur cytosol (Bratosin et al. 2005).

- L'utilisation de détergent, comme le triton X-100 ou le sodium dodecyl sulphate, lysant préférentiellement les MP d a été suggéré dans le but de les différencier des complexes immuns circulants (György et al Blood 2011)

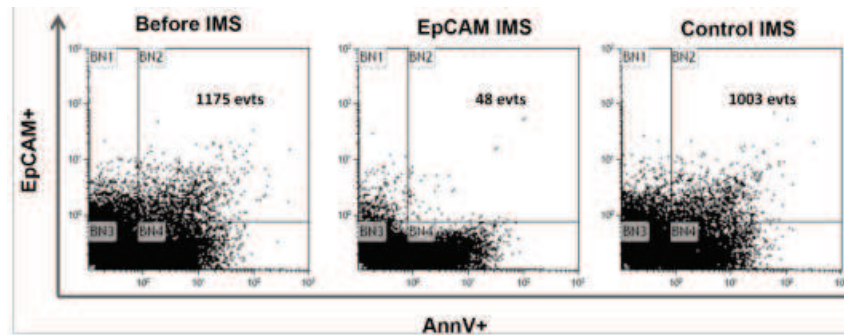


Figure 27 : Détection de MP tumorales par un double marquage annexine V+ / EpCAM+ (extrait de Roca et al Oncotarget 2016). Les histogrammes montrent de gauche à droite les résultats obtenus sur liquide pleural avant immunocapture, sur liquide pleural après immunocapture et sur l'extrait purifié par immunocapture par des billes coatées par un anti-EpCAM. Ces résultats montrent la spécificité du marquage EpCAM sur les MP.

### 3) PROBLEMES DE QUANTIFICATION DES MP

#### a) VARIABILITE FLUIDIQUE

L'instabilité fluidique de la plupart des instruments utilisant un compresseur pour créer un vide qui actionne le système fluidique, ne permet pas une quantification directe des éléments analysés par les cytomètres. En effet, le volume exact d'échantillon passé dans la cellule d'analyse reste inconnu. Il est donc nécessaire d'utiliser une calibration externe pour déduire les concentrations de MP.

Les billes utilisées pour les quantifications cellulaires présentent un signal trop fort qui n'est pas reconnu normalement par les systèmes électroniques des instruments dans des conditions de réglage pour les MP. Des billes adaptées aux MP ont donc été développées comme par exemple les billes MP-Count de 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, fluorescentes en PE commercialisée par Biocytex (Poncelet et al. 2015). Cette stratégie a récemment été testée en association à un protocole de standardisation (Cointe et al. 2017).

Les résultats satisfaisant obtenus à la fois sur des instruments optimisés en FSC et SSC ont permis de valider cette stratégie de quantification absolue.

La pureté des billes de comptage des MP est un facteur déterminant pour éviter une contamination de la mesure par des "fragments" de billes ou des résidus issus de leur préparation.

Par ailleurs ces billes permettent un contrôle du système fluïdique et permettent d'identifier la formation d'un micro-coagulum piégeant les billes en cas de faibles numérations (Poncelet et al. 2015).

### ***b) PROBLEME DE COÏNCIDENCES (SWARMING)***

E. Van der Pol décrit sous le nom de « swarm detection » (van der Pol et al. 2012), le phénomène bien connu de « coïncidence » provoqué par le passage simultané de 2 ou plus évènements devant le système de détection optique. Adapté aux MP, ce phénomène est responsable de la détection d'évènements qui théoriquement n'auraient pas pu être détectés par le CMF de manière individuelle. Le passage concomitant de plusieurs éléments qui pris individuellement aurait produit un signal inférieur au seuil de déclenchement permet leur détection en augmentant artificiellement le signal produit.

La dilution en cascade de l'échantillon permet l'identification de ce phénomène qui est par définition non linéaire. L'analyse d'échantillons suffisamment dilués limite ce phénomène réduisant ainsi les variabilités de quantification.

## **VI) STANDARDISATION**

### **A) NECESSITE DE STANDARDISATION**

Une observation scientifique est le résultat d'une expérience réalisée dans certaines conditions, dans un laboratoire donné à un temps donné. Pour devenir une vérité scientifique cette observation doit être confirmée dans d'autres conditions et d'autres laboratoires. Concernant les MP de nombreuses observations publiées sont contradictoires. C'est le cas des taux de PMP retrouvées dans la circulation de sujet sains estimés entre 2/ $\mu$ L à plus de 500.000/ $\mu$ L selon les études (Shah et al. 2008; Montoro-García et al. 2012). Cette large variabilité de résultat est due au manque de standardisation. Un tel manque de reproductibilité entrave le développement des MP comme biomarqueurs.

Dans le but de comparer des résultats issus d'études multicentriques employant divers types de cytomètres, l'emploi de stratégies standardisées est indispensable.

L'ISTH avec deux sous-comités de standardisation (SSC vascular Biology, and Haemostasis and Malignancy), l'« International Society for the Advancement of cytometry » ISAC, et l'« International Society for Extracellular Vesicles » ISEV participent à un effort commun pour proposer des solutions pour la standardisation de la mesure des MP par CMF. Notre laboratoire a très significativement contribué à ces travaux (Figure 28).

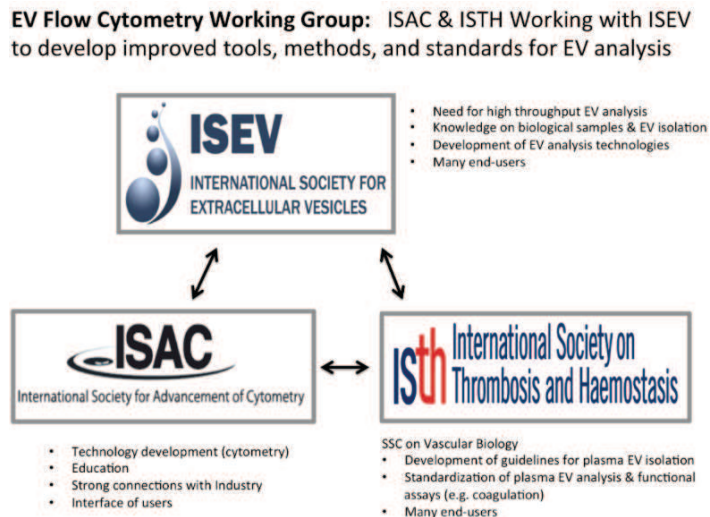


Figure 28 : Groupe de travail constitué de l'ISTH, l'ISEV et l'ISAC pour le développement de la CMF et de la standardisation de l'étude des MP

## **B) OUTILS DE STANDARDISATION**

### **1) STANDARDISATION BASEE SUR LA DIFFRACTION LUMINEUSE**

Les fenêtres d'analyse des MP sont généralement définies par l'utilisation de billes dont la taille est connue. Les premières stratégies de « gating » utilisaient des billes de 1µm afin de délimiter la partie supérieure de la fenêtre d'analyse séparant les MP des plaquettes (Kim et al. 2002). Les signaux provenant des plus petites MP se superposaient au bruit de fond, ainsi la délimitation inférieure était dictée par la limite de détection de l'instrument.

En 2009, Philippe Poncelet a proposé la stratégie Megamix constitué d'un mélange de billes fluorescentes en polystyrène de 0,5 µm et 0,9 µm selon un ratio fixé à 2:1 comme outils de standardisation. La bille de 0,9 µm fixe la limite supérieure. La limite inférieure est fixée à l'aide du ratio entre ces 2 billes.

Plus précisément la limite inférieure est fixée à un seuil qui permet d'inclure dans l'analyse autant de billes de 0,5µm que de billes 0,9µm (soit 50% de la bille de 0,5 µm).

De cette façon la limite inférieure est placée de manière précise et reproductible dans une zone en limite de bruit de fond soumise à de nombreuses variations même sur un même instrument. Cette stratégie de standardisation a été validée par une étude de la variabilité des numérations de PMP sur 3 cytomètres FC500 (SD-CMF). Les coefficients de variation intra- et inter- cytomètres étaient respectivement inférieurs à 10 et 12% (Robert et al. 2009).

En 2010, un premier atelier collaboratif multicentrique international définissait la reproductibilité inter-laboratoire sur 40 laboratoires et 14 types de cytomètres différents en réalisant des numérations de PMP selon la stratégie Megamix (Biocytex, France). Les cytomètres optimisés en paramètre FSC ont obtenus des numérations de PMP comparables ouvrant la voie de la standardisation. En revanche, les résultats obtenus à partir des cytomètres dont la sensibilité était meilleure en SSC étaient discordants. Les billes Megamix représentaient un bon calibrant pour les cytomètres FSC mais ne constituaient pas le calibrant universel recherché (Lacroix et al. 2010a).

Par la suite, deux kits de standardisation ont donc été proposés : « Megamix-Plus FSC » adapté aux instruments optimisés en FSC ou « Megamix-Plus SSC » adapté aux instruments optimisés en SSC. Le réactif **Megamix-Plus FSC** contient des billes de 0,1 µm, 0,3 µm, 0,5 µm et 0,9 µm et le réactif **Megamix-Plus SSC** contient des billes de 0,16 µm, 0,20 µm, 0,24 µm and 0,5 µm. Ces deux jeux de billes calibrées ont été développées afin d'obtenir des résultats comparables entre les CMF type FSC et SSC (Poncelet et al. 2016a). La correspondance entre ces deux jeux de billes a été précisément déterminée de façon à ce que la fenêtre d'analyse entre la bille 0,3 et 0,9 µm sur le kit FSC inclue exactement le même « range » de taille de MP que la fenêtre définie par une limite entre les billes 0,16-0,20 µm et la bille 0,5µm sur le kit SSC.

Cette stratégie intègre ainsi le fait que des éléments de même taille présentant des index de réfraction différents génèrent des signaux d'intensité différente qui varient en fonction de l'angle de détection utilisé. Elle répond donc à la fois aux critiques faites sur l'utilisation de billes synthétiques pour calibrer la mesure des MP et à l'utilisation naïve de ces billes qui entraîne souvent une interprétation inexacte des données.

Cette stratégie basée sur l'emploi de billes, utilisable pour la plupart des instruments disponibles sur le marché a été testé comme outils de standardisation pour l'analyse des MP lors d'un essai multicentrique de l'ISTH coordonné par notre laboratoire.

Dans cet essai, aucune différence significative entre les numérations de PMP n'a été observée entre les familles d'instrument utilisant des systèmes optiques différents prouvant ainsi la faisabilité de la standardisation des numérations de MP entre différents cytomètres (Cointe et al. 2017).

Cette stratégie ne permet toutefois pas la déduction directe de la taille exacte des MP analysées mais plutôt de leur taille relative. (van der Pol et al. 2013).

Plus récemment l'équipe de R. Nieuwland a proposé une approche basée sur la correction de l'impact de l'indice de réfraction pour déduire la taille absolue des MP. Brièvement, les billes de polystyrène dont la lumière diffractée est mesurée puis modélisée selon la théorie des Mie dans le but de déterminer l'effet de la configuration spécifique du cytomètre utilisé et de pouvoir en retour déduire la taille des MP et donc standardiser par la taille la fenêtre d'analyse des MP. Cependant cette stratégie nécessite de poser comme hypothèse une valeur définie pour l'indice de réfraction des MP. La marge d'incertitude est en réalité considérable et cette approche est donc largement débattue.

D'autre calibrant ayant des indices de réfraction plus proches des MP que les billes de polystyrène pourraient constituer une alternative comme les liposomes synthétiques de tailles connues, les virions de taille uniforme ou bactéries (van der Pol et al. 2014). Cependant, les matériaux de référence biologiques manquent de stabilité et de monodispersité. Alternativement, l'utilisation de billes de silice creuses pourrait faciliter le « gating » des vésicules extracellulaires car elles ont un indice de réfraction faible, proche de celui des microvésicules lipidiques. De ce fait certains auteurs pensent que ces billes pourraient constituer une meilleure stratégie (Foladori et al. 2008; Parida et al. 2015). Pour le moment aucun de ces outils n'a été validé par une étude multicentrique cependant concernant les liposomes, une corrélation entre le signal SSC et la taille des liposomes et MP correspondantes a été démontrée (Simonsen 2016).

## **2) STANDARDISATION AVEC PARAMETRE DE DECLENCHEMENT PAR FLUORESCENCE**

La fluorescence est également une source importante de variabilité entre les instruments qui est accentuée par l'arrivée de cytomètres plus sensibles que précédemment. Ceci montre la mise nécessité de développer des outils permettant de standardiser le signal de fluorescence pour la mesure des MP. Si aucune stratégie n'est encore disponible à ce jour, plusieurs travaux sont en cours.



# PARTIE III : DETECTION DES MP PAR CYTOMETRIE FLUO-SENSIBLE

---

## I) CONTEXTE ET OBJECTIFS

Comme introduit dans les parties précédentes de ce manuscrit, la détection des MP par CMF est limitée par la petite taille de ces événements et donc par la faible quantité d'antigène présent à la surface de chaque MP. Des progrès très significatifs ont été réalisés ces dernières années pour la détection des événements de petites tailles par CMF et leur standardisation. Très schématiquement, ces améliorations méthodologiques ont permis de "voir plus petit" cependant une large proportion de ces petites vésicules nouvellement détectées n'est pas identifiable en terme d'origine cellulaire en raison du trop faible signal de fluorescence généré. Le nouveau challenge est donc maintenant d'être capable de "caractériser plus petit" en améliorant la sensibilité de fluorescence. Des expériences préliminaires réalisées dans le laboratoire sur un nouveau cytomètre présentant une haute-sensibilité de détection en fluorescence (CytoFLEX S, Beckman-Coulter) ont montré une détection significativement plus élevée des sous-populations leucocytaires de MP dans des conditions purifiées en comparaison avec le cytomètre Gallios.

**L'objectif de ce travail était donc de tester pour la première fois l'apport et les limites d'un cytomètre fluo-sensible (CytoFLEX S) pour la détection des MP plasmatiques dans les conditions réelles d'échantillon plasmatique.**

Afin de répondre à cet objectif, les performances en terme de stabilité et de sensibilité de fluorescence du nouveau cytomètre ont été vérifiées. Puis, les MP plasmatiques de 12 sujets sains et 22 patients présentant une TIH ont été mesurées sur le cytomètre fluo-sensible sur un protocole multi marquage permettant de discriminer quatre sous-populations de MP (les MP plaquettaires (PMP), granulocytaires (Gran-MP), monocytaires (Mono-MP) et endothéliales (Endo-MP). La faisabilité d'une étude comprenant 190 patients suspects de TIH a été évaluée.

## II) **MATERIELS ET METHODES**

### A) **LES ECHANTILLONS**

Echantillons patients : Au cours de cette étude nous avons travaillé en aveugle sur des échantillons provenant de 190 sujets issus d'une cohorte de patients recrutée sous la responsabilité du Pr B. TARDY (Saint Etienne, France). Tous les patients ont signé un consentement éclairé incluant la mesure de leur MP et l'étude a été autorisée par un comité éthique local à Saint-Etienne.

Echantillons témoins : 12 échantillons obtenus à partir de donneurs volontaires non atteints de TIH ont été prélevés puis traités selon les mêmes conditions décrites ci-dessus. Ces PFP ont permis d'établir des valeurs de référence sur CytoFLEX S, et ont été comparées aux résultats obtenus sur Gallios.

### B) **LES CYTOMETRES**

Le CytoFLEX S est un cytomètre équipé de 4 lasers (violet 405 nm, bleu 488 nm, jaune 585nm, rouge 638 nm) et 13 détecteurs de fluorescence. Il collecte également le FSC, le SSC classique et une diffusion latérale supplémentaire (V-SSC = Violet Side Scatter) à 405 nm. Ce V-SSC-violet utilisé comme paramètre de déclenchement permet une meilleure détection des petites particules. De plus, ce cytomètre possède un système de photodétection constitué de photodiodes à avalanche associé à un banc optique limitant le nombre de filtres ce qui permet théoriquement d'améliorer sa sensibilité en fluorescence. Il permet une très grande vitesse d'analyse (30 000 évènements par seconde). Sa gestion s'effectue grâce au logiciel CytExpert.

La configuration optique de notre cytomètre permet d'exciter la FITC par le laser bleu, la phycoérythrine (PE), PE-Cyanine 5 (PC5) et PE-Cyanine 7 (PC7) par le laser jaune et l'allophycocyanine (APC) par le laser rouge. Le laser jaune présent sur le CytoFLEX S permet une meilleure excitation de la PE et de ces tandems PC5 et PC7. D'autre part l'emploi d'un laser différent entre PE et FITC évite d'avoir à effectuer des compensations de fluorescence entre ces deux fluorochromes et limite le phénomène de dispersion (spreading) du signal de fluorescence. La configuration optique du cytomètre est présentée en annexe 1.

Pour des expériences de comparaison, le cytomètre Gallios a été utilisé. Ce cytomètre comprend 3 lasers et 10 PMT. Etant optimisé en FSC, les mesures MP ont été effectuées selon le protocole standardisé décrit précédemment en utilisant les billes fluorescentes Megamix-Plus selon le protocole publié par S.Robert (Robert et al. 2012).

Tous les retraitements ont été réalisés à l'aide du logiciel Kaluza.

### **C) REACTIFS**

L'annexine V, ainsi que tous les anticorps monoclonaux et isotypes marqués utilisés, présentés dans le tableau 4 proviennent de Beckman-Coulter ainsi que les tubes en polypropylène.

Les billes de comptage sont les MP-Count Beads (Biocytex, Marseille, France) qui sont constituées de billes fluorescentes d'environ 3µm optimisées pour le comptage absolu de MP par cytométrie en flux.

Les billes de calibrations SPHERO™Rainbow Calibration Particles (8-pics) (Spherotec, Chicago, MI) utilisées mesurent environ 3,0 µm et possèdent 8 niveaux de fluorescence différents. Elles sont excitées entre 365 à 650 nm par la plupart des lasers et permettent de déterminer la linéarité et la sensibilité du système en fluorescence. Elles permettent d'évaluer les performances de l'instrument en fluorescence.

Le mélange « Gigamix » (BioCytex), composé des suspensions volume à volume de Megamix-Plus FSC (comprenant les billes : 0.1 µm, 0.3 µm, 0.5 µm and 0.9 µm) et Megamix-Plus SSC (comprenant les billes 0.16 µm, 0.22 µm, 0.24 µm and 0.5 µm) a été utilisé afin d'assurer la reproductibilité entre les expériences.

### **III) MISE EN PLACE DU PROTOCOLE**

Le protocole multi marquage utilisé dans cette étude a spécifiquement été développé pour l'étude des sous-populations de MP en vue d'une application à une cohorte de patients atteints de TIH. Nous avons décidé d'étudier les PMP, les Leuco-MP en dissociant les Mono-MP et les Gran-MP ainsi que les Endo-MP.

#### **A) MAPPING DES MP-LEUCOCYTAIRE**

Afin d'améliorer la détection des MP d'origine leucocytaire un travail préalable a été réalisé dans le laboratoire afin de sélectionner les meilleures spécificités d'anticorps pour mesurer séparément les Gran-MP et les Mono-MP. 64 spécificités myéloïdes ont été testées sur des MP sécrétées *in vitro* par des monocytes et polynucléaires neutrophiles. Parmi les anticorps testés 14 et 9 anticorps ont permis la détection d'au moins 15% des Gran-MP et Mono-MP respectivement. Les meilleures spécificités identifiées ont été le CD15 pour les Gran-MP et HLA-DR pour les Mono-MP.

#### **B) PROTOCOLE DE MULTI-MARQUAGE DES MP**

Basé sur ces résultats récents, nous avons choisi d'appliquer dans notre protocole une combinaison d'annexine V et un marquage des Gran-MP par un anti-CD15 et des Mono-MP par un anti-HLA-DR. Une contamination des MP-Mono par des MP lymphocytaire B ou lymphocytaire T activée n'est pas exclue à ce stade de connaissance. Les PMP sont identifiées par la bi-expression d'Annexine V et du CD41. Les Endo-MP sont définies par le triple marquage : Annexine V, CD31, CD146 en excluant les événements CD41+. La combinaison de ces marqueurs est détaillée dans le tableau 4

Le protocole de marquage prévoit la préparation de 3 tubes (tableau 5) :

- Le premier tube est un tube contrôle constitué d'annexine V et d'un mélange d'anticorps isotypiques. Chaque anticorps de ce mélange a été matché en bruit de fond de fluorescence par rapport à l'anticorps spécifique correspondant. Ce tube permet de définir le seuil de positivité pour l'analyse des sous-populations de MP. Les événements comptabilisés avec ce tube ne doivent pas dépasser des seuils prédéfinis pour chaque sous-population et sont retranchés aux valeurs obtenus par les marquages spécifiques.

- Le second tube permet l'identification des sous populations de PMP, Gran-MP et Mono-MP.
- Le troisième tube est consacré à la détection d'Endo-MP. La détection de cette sous-population a été volontairement séparée du reste en raison de trop fort problème de compensation autour de la PE et ses tandems en utilisant l'anticorps CD146-PC5.

Les concentrations de tous les anticorps ont été déterminées par rapport aux courbes de titration réalisées sur des MP purifiées de chaque sous-population en privilégiant le meilleur signal/bruit. 10µl de PFP est incubé dans chacun des tubes en présence de binding buffer (BB) pour assurer un apport de calcium permettant la fixation de l'annexine V aux MP et d'hirudine pour permettre d'éviter une activation de la coagulation dans le tube.

<b>Laser d'excitation</b>	<b>Fluorochromes</b>	<b>Tube 1 Isotype</b>	<b>Tube 2 PMP/Leuco-MP</b>	<b>Tube 3 Endo-MP</b>
BLEU (488nm)	FITC	Annexine V	Annexine V	Annexine V
JAUNE (585nm)	PE Pc5 Pc7	IgG1 IgG1 IgG1	HLA-DR / CD41	CD31 CD146 CD41
ROUGE (638nm)	APC	IgG1	CD15	/

Tableau 4 : Combinaison d'anticorps. Pour chaque tube les sondes, fluorochromes et lasers d'excitation sont indiqués. Les prises d'essais par patient sont respectivement de 1,7; 0,7 et 4 µL pour l'anticorps anti-CD31-PE, les autres anticorps monoclonaux et l'annexine V.

	<b>Tube 1 Isotype</b>	<b>Tube 2 PMP/Leuco-MP</b>	<b>Tube 3 Endo-MP</b>
<b>Mix (µL)</b>	6.8	6.1	7.0
<b>Plasma (µL)</b>	10	10	10
<b>Incubation</b>	20 min à T° ambiante à l'obscurité		
<b>Tampon</b>	250µL de binding buffer + Hirudine		
<b>Billes de comptage (µL)</b>	10	10	10

Tableau 5 : Protocole de marquage des échantillons. Le Mix correspond au mélange d'anticorps précédemment présenté.

Les lectures ont été réalisées en plaque 96 puits à fond plat. L'acquisition de chaque tube a été effectuée sur une durée de 2 min à un débit minimal (10µl/min). Afin d'éviter une éventuelle contamination inter-puits intervenant au moment de l'agitation, un puits rempli de liquide de gaine a été intercalé entre chaque puits d'échantillon.

### **C) STRATEGIE DE QUANTIFICATION**

Le CytoFLEX S de par son système fluide à valves péristaltiques est équipé d'un système volumétrique permettant de s'affranchir de l'emploi de billes de comptage. Cependant, les premières expériences ont montré un vieillissement accéléré de la ligne échantillons entraînant une perturbation du flux non prise en compte par le système volumétrique. Donc nous avons décidé de maintenir la stratégie de quantification habituellement employée sur Gallios dépourvu de système volumétrique en utilisant des billes de comptage adaptées aux MP.

Afin de calculer le nombre absolu de MP par µL de plasma, le même volume de billes de comptage « MP-Count Beads » (BIOCYTEX,) que de plasma (10µL) ont été ajoutées dans le protocole MP juste avant lecture de l'échantillon. La concentration de MP dans le plasma a ainsi pu être calculée selon la formule:

$$\text{Evénements}/\mu\text{L} = \frac{\text{Double événement positif} \times \text{Concentration du réactif MP} - \text{Count}}{\text{Nombre de billes de comptage détectées par le cytomètre}}$$

### **D) STRATEGIE DE DECLENCHEMENT « TRIGGERING » ET D'ANALYSE**

La stratégie de déclenchement initialement choisie utilisait un seuil de déclenchement en diffraction lumineuse basée sur le paramètre V-SSC placé juste à 10000 (UA) correspondant à la fin du signal obtenu par la bille 0,1µm du Gigamix. Le mélange Gigamix permet de définir une fenêtre d'analyse des MP « MP GATE » de façon reproductible. Cette stratégie en simple seuil est utilisable sur des échantillons purifiés mais il n'a pas été possible de l'utiliser sur des échantillons plasmatiques en raison d'un bruit de fond échantillons trop élevé. En effet, un trop grand nombre d'événements par seconde était enregistré par le cytomètre ne permettant pas une résolution optimale et entraînant un pourcentage d'"abort" électronique trop important.

Une stratégie de déclenchement en double seuil a donc été choisie en fixant un seuil supplémentaire en fluorescence sur le canal FITC. En l'absence de calibrant de fluorescence adapté aux MP, le seuil a été placé de telle façon que les 8 billes du mélange SPHERO 8 Pics soient détectables. La Figure 29 ci-dessous illustre le positionnement de la fenêtre « MP Gate ».

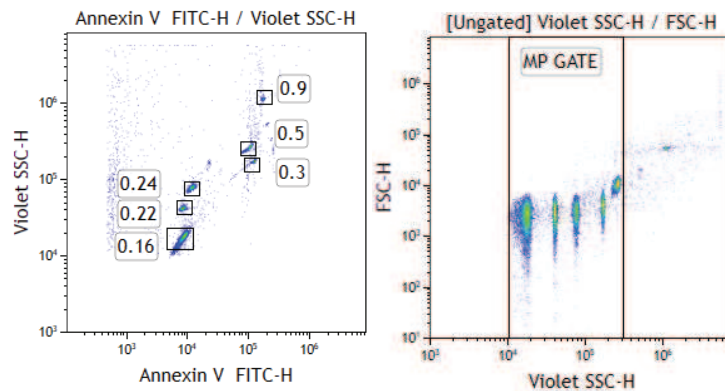


Figure 29: Positionnement de la fenêtre d'analyse « MP GATE » à l'aide du Gigamix. La borne supérieure est fixée en V-SSC à la fin de la bille 0,5  $\mu\text{m}$  bien que cette borne ne corresponde plus à la limite obtenue avec une analyse en SSC classique. La fenêtre n'est pas délimitée en FSC.

Afin de pouvoir discriminer le bruit de fond de fluorescence de l'instrument et le marquage réel des MP par l'annexine V, un plasma a été marqué par de l'annexine V en présence uniquement du PBS -/- exempt de cation bivalent. Les résultats sont présentés dans la Figure 30. Dans nos conditions, le seuil de positivité de l'annexine V-FITC a été fixé à 966 (MFI).

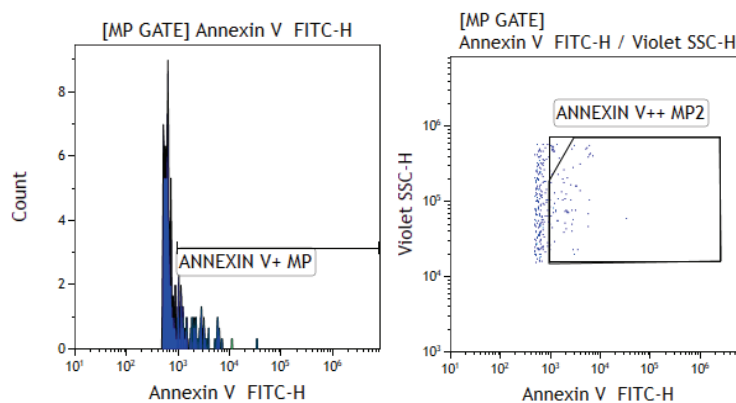


Figure 30 : Détermination du seuil discriminant entre bruit de fond de fluorescence et signal de marquage par l'annexine V-FITC.

La fenêtre annexine V++ MP2 (superposée à la « gate » annexine V++ MP mais biseauté) a été ajoutée dans un second temps. En effet, nous avons remarqué au cours des retraitements une variation du signal du bruit de fond provoquée par le milieu plasmatique

avec un signal dans le canal FITC pour des événements fortement positifs en v-SSC (Figure 31). Nous avons décidé de couper ce bruit de fond par une fenêtre en biseau afin de conserver seulement le signal de marquage spécifique.

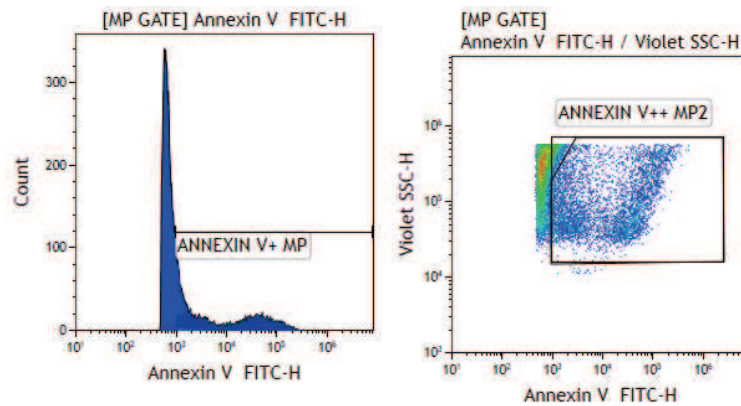


Figure 31: Signal obtenu par le marquage de l'annexine V en condition plasmatique sur CytoFLEX. Illustration du positionnement de la fenêtre d'analyse « Annexin V++ MP2 »

Comme illustré sur la Figure 32, l'ensemble des sous-populations de MP analysées sont conditionnées sur la fenêtre « Annexin V++ MP2 ». Les seuils de positivité sont ensuite positionnés grâce aux contrôles isotypiques sur le tube 1. Ces seuils sont transposés sur les tubes 2 et 3 de marquage. Le même masque a été utilisé pour tous les patients et témoins analysés.

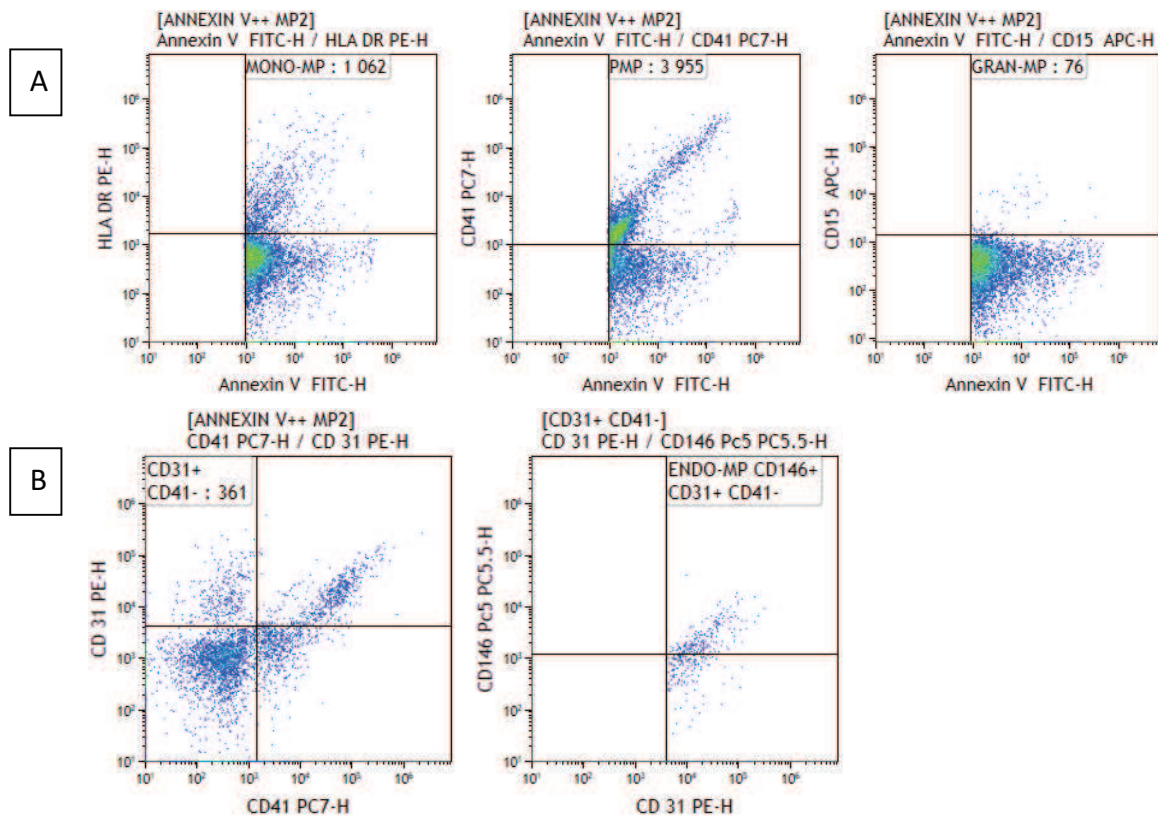


Figure 32 : Masque d'analyse (A) obtenu sur le tube 2 PMP/Leuco-MP, (B) obtenu sur le tube 3 Endo-MP. Données obtenues à partir d'un sujet sain.



## IV) RESULTATS

### A) EVALUATION DES PERFORMANCES INTRINSEQUES DU CYTOFLEX S

Le CytoFLEX S est un cytomètre de haute sensibilité récemment commercialisé que nous avons décidé de tester pour la première fois dans les conditions d'une étude clinique portant sur des sujets sains et une cohorte de sujet atteints de TIH. La première étape consiste donc à la validation des performances de résolution en diffraction et en fluorescence du cytomètre.

#### 1) TESTS DES PARAMETRES DE DIFFRACTION

La résolution du paramètre de diffraction SSC a été évaluée en calculant les index de séparation des billes du mélange Gigamix. La résolution des paramètres SSC (488-SSC) et v-SSC (405-SSC) ont été comparées (Figure 33 – Tableau 6).

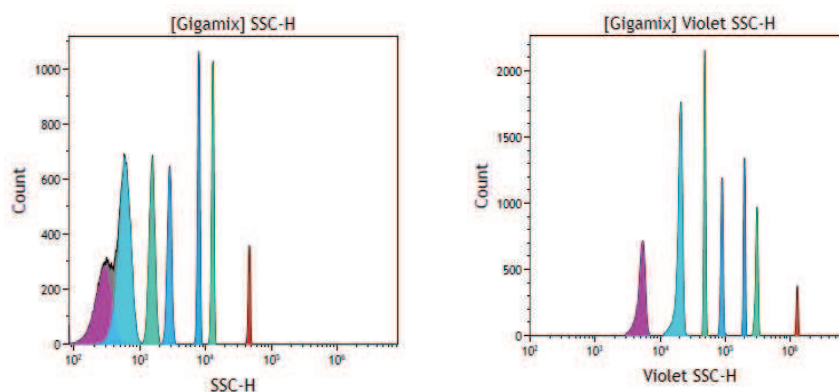


Figure 33 : Résolution des paramètres SSC et v-SSC sur CytoFLEX S obtenues avec les billes Gigamix. Graphiques monoparamétriques SSC (à gauche) et v-SSC (à droite) conditionnées sur une fenêtre composite nommée « Gigamix » comprenant les billes du mélange permettent de comparer la séparation des signaux provenant de chaque sous-population de billes.

Billes	0.1/0.16	0.16/0.22	0.22/0.24	0.24/0.3	0.3/0.5	0.5/0.9
SI SSC	NC	6.53	5.01	9.5	5.28	6.5
SI v-SSC	5.25	7.90	8.06	12.22	5.91	15.40

Tableau 6: Index de séparation entre chaque bille du mélange Gigamix en SSC et v-SSC. Les SI sont calculés selon la formule  $SI_{1-2} = (Md_1 - Md_2) / (SD_1 + SD_2)$

Comme illustré sur la Figure 33, le paramètre SSC permet d'identifier 6 populations de billes mais ne peut pas dissocier clairement les signaux provenant des billes 0.1  $\mu\text{m}$  et 0.16  $\mu\text{m}$  contrairement au v-SSC qui fournit une nette discrimination des signaux provenant de toutes les billes. La résolution obtenue en v-SSC est donc supérieure à celle du paramètre SSC. En effet, elle permet facilement de détecter la plus petite bille de 0,1 $\mu\text{m}$ . De plus, pour les autres tailles de billes nous observons une meilleure séparation des différentes populations avec le paramètre v-SSC qu'avec le SSC visible en comparant les SI entre les billes du Gigamix. **Le laser violet permet un réel gain de résolution en diffraction lumineuse notamment pour les évènements de petite taille.**

## 2) TESTS DES PARAMETRES DE FLUORESCENCE

La **résolution des paramètres de fluorescence** a été évaluée par le calcul du SI entre chaque bille composant le mélange « SPHERO 8 pics » sur l'ensemble des canaux de fluorescence (Figure 34 ci-dessous). Ces résultats ont été comparés aux performances du Gallios (Figure 35).

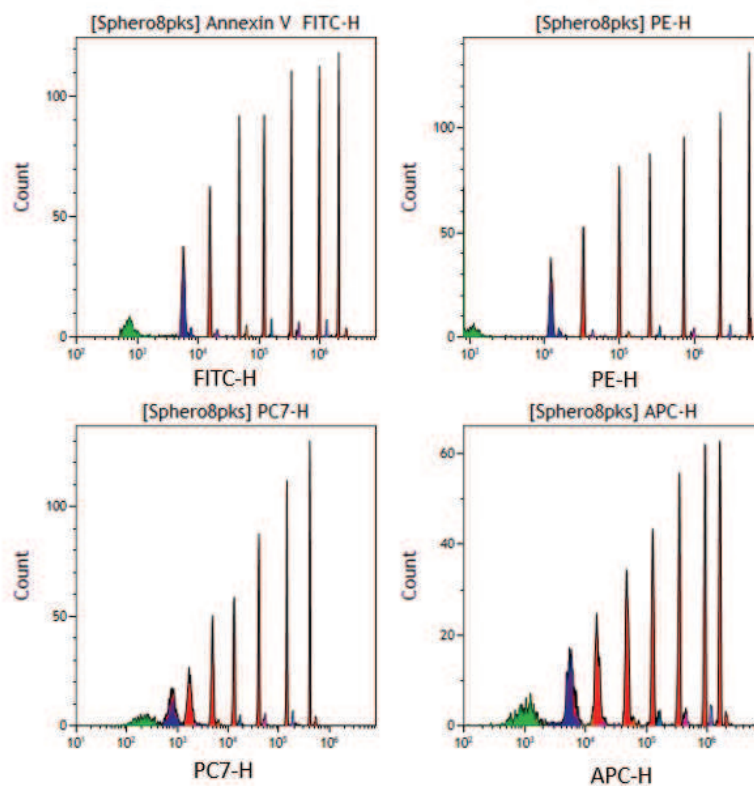


Figure 34: Résolution de fluorescence sur CytoFLEX S obtenue avec les billes « SPHERO 8 pics » en FITC (laser bleu 488nm), PE et PC7 (laser jaune 585 nm), APC (laser rouge 638nm).

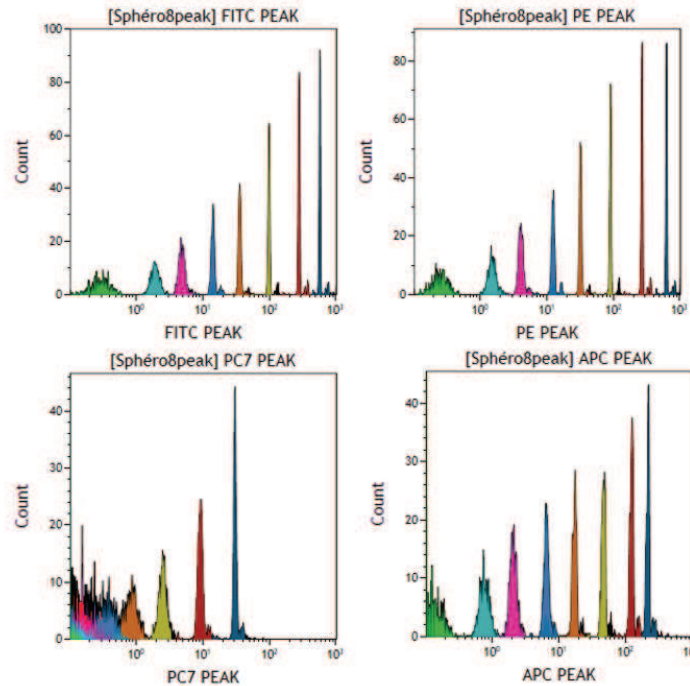


Figure 35: Résolution de fluorescence sur Gallios obtenue avec les billes « SPHERO 8 pics » en FITC, PE et PC7 (laser bleu 488nm), APC (laser rouge 638nm).

Comme observé sur la Figure 34 en comparaison avec la Figure 35, seul le CytoFLEX permet de distinguer les 8 pics correspondant aux billes du mélange « SPHERO 8 pics » dans tous les canaux de fluorescence. **La différence est particulièrement marquante pour les tandems de PE comme la PC7.**

## **B) EVALUATION DU CYTOFLEX S EN CONDITION PLASMATIQUE**

### **1) TEST FLUIDIQUE**

Le système fluidique du CytoFLEX S repose sur le fonctionnement d'une pompe péristaltique dont nous avons évalué la stabilité d'abord en tampon BB puis en présence de plasma + BB dans les conditions de l'étude à bas débit (10 $\mu$ L/min) et à débit moyen (30 $\mu$ L/min).

#### **a) EN ABSENCE DE PLASMA**

Pour cette expérience, 10 $\mu$ L de billes MP-Count ont été mises en suspension en milieu tampon. 6 puits de cette suspension ont été lus pour chaque débit. Un puits d'eau a été intercalé entre chaque puits contenant les billes. Au total, 12 puits ont été analysés.

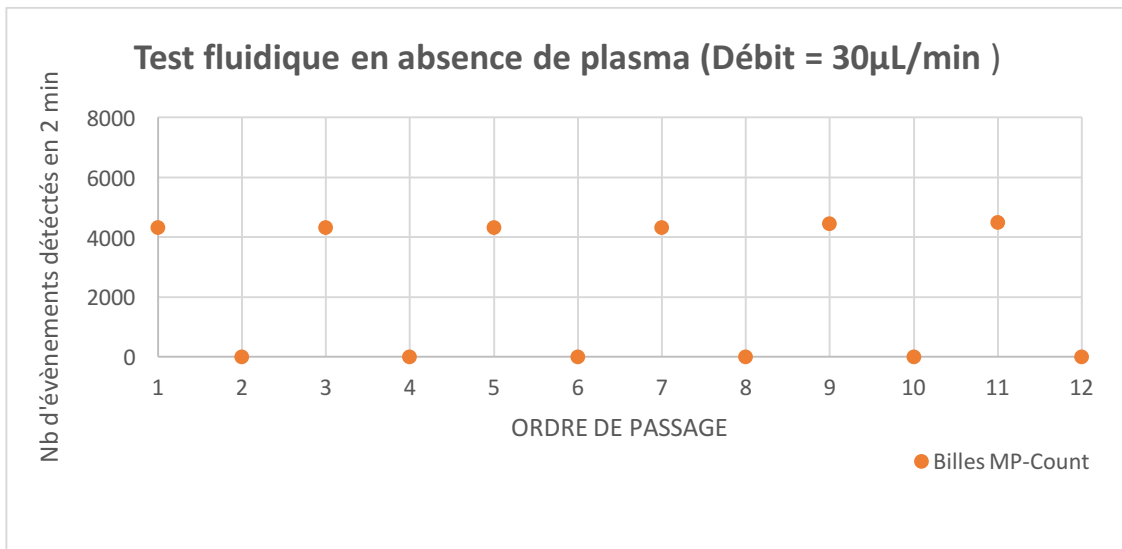


Figure 36 : Représentation des résultats obtenus lors du test fluide en absence de plasma à 30µL/min. Les points orange représentent le nombre de billes détectées par le cytomètre en 2 minutes dans chaque puits.

Les coefficients de variation (CV) du nombre de billes détectées en présence de tampon sans plasma sont de 1,8% à débit moyen (Figure 36) et de 3% à bas débit. Cette expérience montre une absence de variabilité significative du système fluide en absence de plasma quel que soit le débit choisi.

**b) EN PRESENCE DE PLASMA**

Une expérience a été réalisée dans les conditions citées ci-dessus en présence de 10µL de plasma en tampon BB.

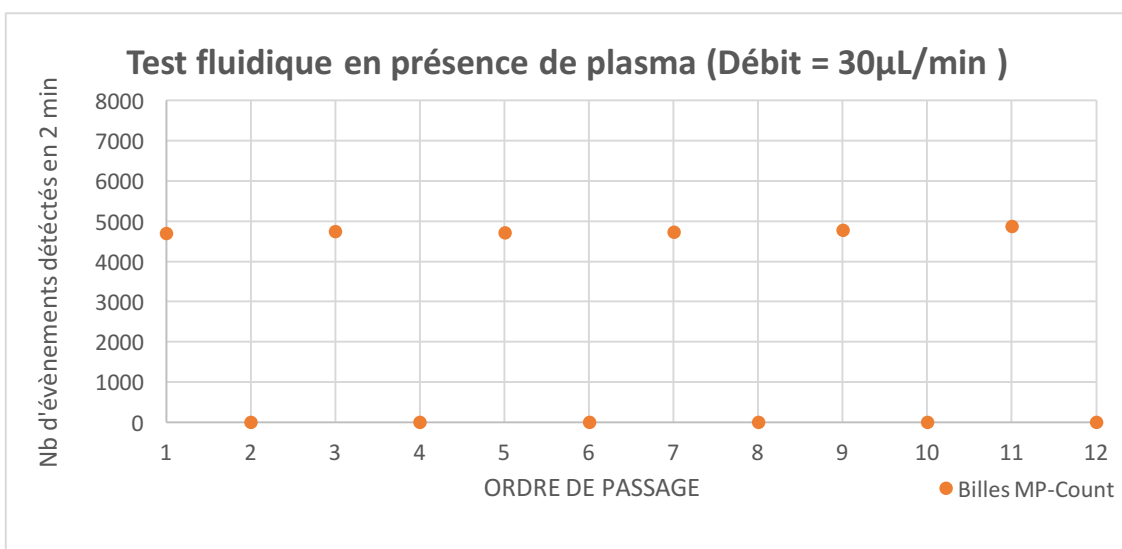


Figure 37 : Représentation des résultats obtenus lors du test fluide en présence de plasma à 30µL/min. Les points orange représentent le nombre de billes détectées par le cytomètre en 2 minutes dans chaque puits

Les CV du nombre de billes détectées en présence de plasma sont de 1,4% à débit moyen (Figure 37) et de 2% à bas débit. **Au final, la stabilité de la mesure des billes de comptage et donc du système fluidique n'est pas impactée par le milieu plasmatique.**

Dans un même temps, ces expériences permettent de valider l'absence significative de contamination inter-puits « carry over » par les billes de comptage. Ceci n'exclut cependant pas une contamination potentielle par des MP. Une expérience parallèle montre en effet la persistance dans les puits d'eau de 270 +/- 60 MP/μl après passage d'un échantillon plasmatique marqué (soit environ 10% des évènements du puits test). Le lavage par un puits d'eau pendant 2 minutes entre chaque test reste donc indispensable bien qu'il chronophage.

## 2) TESTS DE REPETABILITE EN CONDITION PLASMATIQUE

### a) TEST DE REPETABILITE DE LECTURE

La **répétabilité de lecture** en condition plasmatique a été testée à bas débit (10μL/min). Pour cela deux PFP de donneurs volontaires ont été marqués selon le protocole décrit, trois lectures de chaque puits ont été réalisées comme le représente la Figure 38. Les CV moyens du nombre d'évènements détectés obtenus entre les différentes lectures sur les sous-populations analysées PMP, Gran-MP, Mono-MP et Endo-MP sont de 3% ; 6% ; 6% ; et 15% respectivement. Ces résultats montrent une bonne répétabilité de lecture des concernant les évènements spécifiques. En revanche les CV du nombre d'évènements non spécifiques détectés avec les anticorps isotypiques sont plus variables (PMP iso : 22% ; Gran-MP iso : 37%, Mono-MP iso : 17% et Endo-MP : 51%). Ces valeurs de CV élevées sont expliquées par le faible nombre d'évènements détectés.

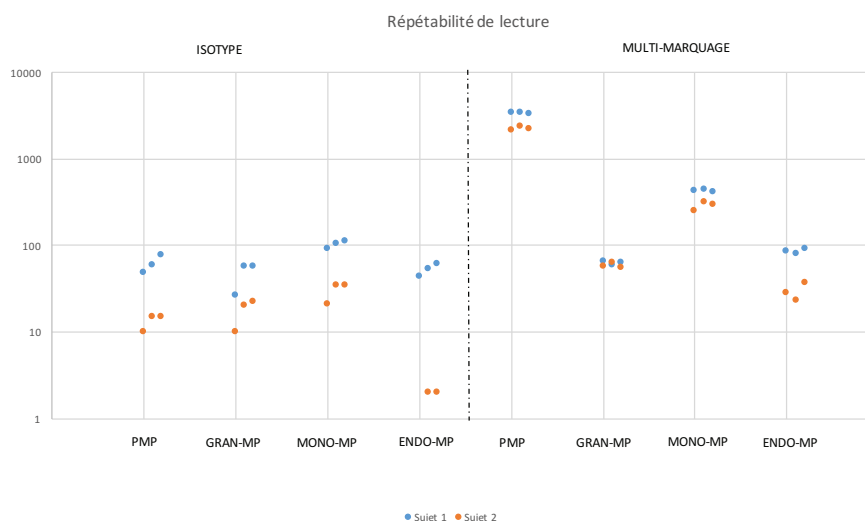


Figure 38 : Représentation des résultats de répétabilité de lecture

**b) TEST DE REPRODUCTIBILITE DU TEST**

La reproductibilité du test a été testée en condition plasmatique à bas débit (10µL/min). Pour cela deux PFP de donneurs volontaires ont été marquées selon le protocole décrit. Pour chaque patient, cinq marquages indépendants ont été effectués. En raison d'un phénomène de coagulation, certains résultats n'ont pas pu être exploités et ne sont donc pas représentés sur la Figure 39. Les CV du nombre d'évènements détectés obtenus pour chaque sous population ont été calculés. Les CV calculés sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous et varient entre 5 et 47%. Le CV moyen est de 23% avec un écart type à 9%.

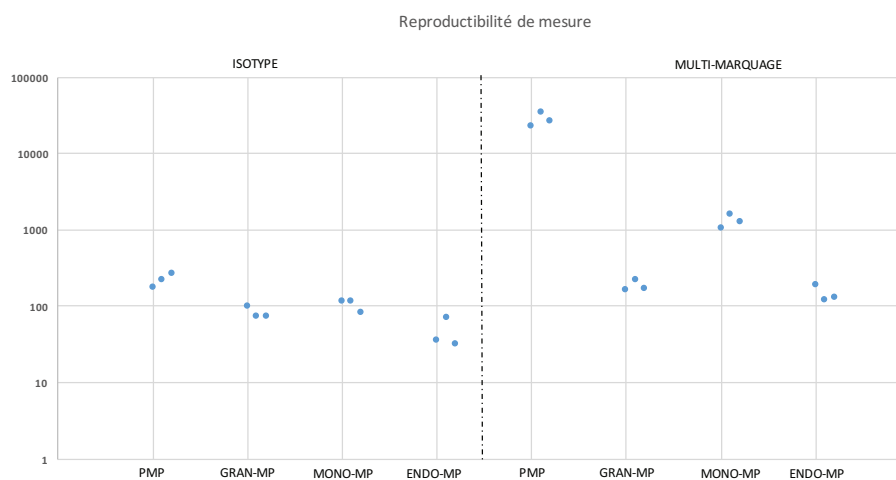


Figure 39 : Représentation des résultats de reproductibilité de mesure

		MP-TOT	PMP	GRAN-MP	MONO-MP	ENDO-MP
SUJET A	Isotype	26	19	17	18	48
	Multi-marquage	24	19	20	18	18

Tableau 7 : Coefficients de variation (%) entre les différentes mesures pour chaque sous-population de MP par patient

Cette étude montre une variation moyenne de 23% des résultats obtenus restant acceptable mais non négligeable à prendre en compte lors de l'analyse des échantillons de la cohorte. Cette variation peut en partie être expliquée par les faibles volumes à pipeter mais surtout une variation importante du bruit de fond dans les faibles valeurs de fluorescence proche du seuil défini en condition plasmatique.

### 3) COMPARAISON DES NUMERATIONS DE MP PAR CYTOMETRIE FLUO-SENSIBLE (CYTOFLEX) COMPARE AU CYTOMETRE GALLIOS

#### a) SUJETS SAINS

Les MP ont été dosées dans le plasma de 12 donneurs volontaires sains âgés de 25 à 55 ans. Par cytométrie fluo-sensible, la concentration médiane de MP totales est de 9960 [6885-23603] événements/μL (ev/μL). Les concentrations médianes de PMP, Gran-MP, Mono-MP et Endo-MP sont respectivement de 5299 [2497-14225], 74 [59-288], 727 [431-993], et 62 [20-212] ev/μL. En accord avec la littérature la population majoritaire est celle des PMP. Ces valeurs ont été comparées aux résultats générés par le protocole habituellement utilisé dans le laboratoire avec le cytomètre Gallios.

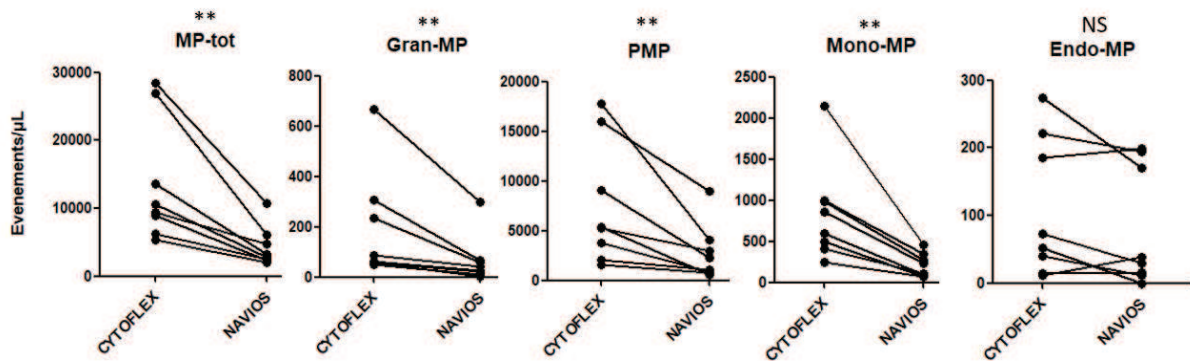


Figure 40: Comparaison des concentrations de MP de 8 sujets sains obtenues par CytoFLEX S et Gallios pour chaque sous-population analysée \*\* différence significative ( $p=0.0078$ ) ; NS = différence non significative calculée selon le test de Wilcoxon (un t test païré non paramétrique) au risque 0.05

Comme le montre la Figure 40, une augmentation significative des concentrations de MP totales a été observée en utilisant le CytoFLEX S comparé au Gallios. Ce résultat est retrouvé pour les sous-populations de PMP, Gran-MP et Mono-MP. Aucune différence significative n'a en revanche été démontrée concernant la sous-population d'Endo-MP.

Nous avons également comparé la répartition des sous-populations de MP pour ces mêmes sujets entre CytoFLEX S et Gallios. Quelque soit le cytomètre utilisé, la population de PMP reste majoritaire. Aucune différence de répartition n'a été retrouvée (Figure 41).

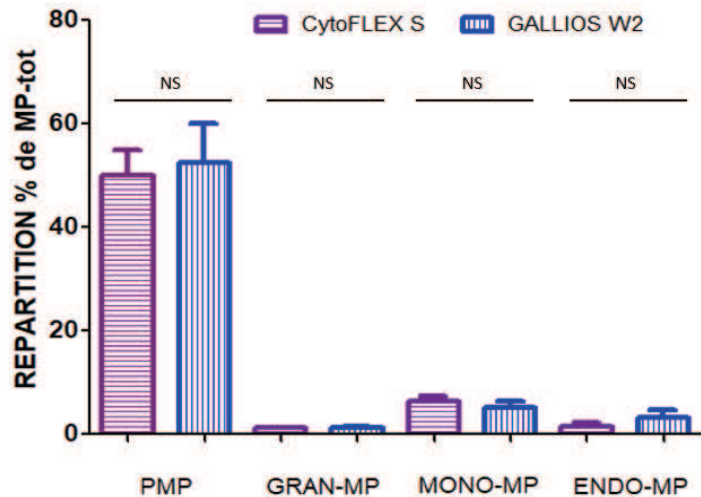


Figure 41: Comparaison des répartitions en % des différentes sous-populations de MP obtenues entre CytoFLEX S et Gallios.

**b) SUJETS DE LA COHORTE TIH**

Comme précédemment, les numérations de sous-population de MP de 8 sujets issus de la cohorte TIH ont été comparées entre CytoFLEX S et Gallios.

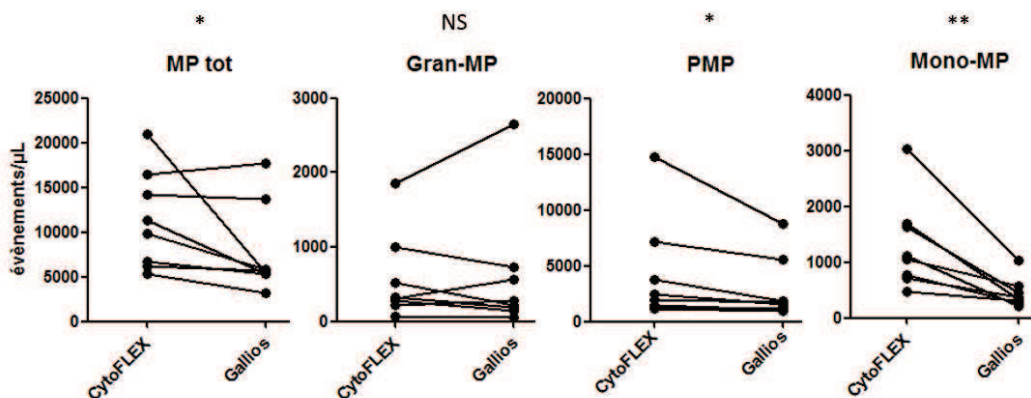


Figure 42: Comparaison des concentrations de MP de 8 sujets issus de la cohorte TIH obtenues par CytoFLEX S et Gallios pour chaque sous-population analysée \*\* différence significative ( $p=0.0078$ ) ; \*différence significative ( $p=0.039$  pour les MP-tot et  $p=0.0156$  pour les PMP) NS = différence non significative calculée selon le test de Wilcoxon (un t test pairé non paramétrique) au risque 0.05.

Comme le montre la Figure 42 une augmentation significative des concentrations de MP totales a été observée en utilisant le CytoFLEX S comparé au Gallios. Ce résultat est retrouvé pour les sous-populations de PMP et Mono-MP. Cependant nous n'avons pas confirmé lors de ce test une augmentation significative de la détection de Gran-MP ni Endo-MP par le CytoFLEX S.



## **C) APPLICATION A LA THROMBOPENIE INDUITE A L'HEPARINE.**

La mise en pratique de ce protocole sur la cohorte TIH de 190 patients a soulevé un certain nombre de difficultés. Nous avons tenté de répondre point par point aux problèmes nouvellement rencontrés avec l'utilisation du cytomètre fluo-sensible.

### **1) DIFFICULTES RENCONTREES**

#### **- Problèmes liés à l'échantillon:**

La phase de préparation pré-analytique influençant largement les numérations de MP obtenus, chaque échantillon a visuellement été contrôlé. Aucun échantillon coagulé n'a été observé.

#### **- Accrochage non spécifique :**

Des seuils d'acceptabilité de nombre d'évènements dans le tube contrôle ont été définis par rapport aux valeurs obtenues chez les sujets sains. Environ 13% (n=25) des plasmas ont présenté un accrochage non spécifique objectivé par la mise en évidence d'une forte concentration d'évènements non spécifiques au-dessus des seuils définis dans le tube contrôle isotypique (tableau 8).

Isotype	IgG1-PC7	IgG1-PC5	IgG1-PE	IgG1-APC
Seuils acceptés	<180	<10	<120	<60

*Tableau 8: Seuil d'acceptabilité du niveau d'accrochage non spécifique pour chaque anticorps*

Ces accrochages sont reproductibles sur un nouveau test. Ce taux d'accrochage est plus important que celui habituellement observé sur le Gallios. Il provient sans doute d'une plus grande sensibilité aux éléments non spécifiques avec un faible niveau de fluorescence (complexes de fluorochrome libres par exemple). Un repositionnement de la fenêtre d'analyse v-SSC/annexine V-FITC permet toutefois de résoudre une partie de ces problèmes au dépend d'une parfaite standardisation.

- Perte de stabilité du système fluidique

Nous avons calculé le nombre de billes que le cytomètre devait avoir détecté au cours de l'acquisition en tenant compte de la concentration de la suspension de billes de comptage utilisées (1900 billes/ $\mu\text{L}$ ) du débit de passage de l'échantillon (10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ), du temps d'acquisition (2 min) ainsi que de la dilution des billes dans le milieu réactionnel. Un total de d'environ 1380 billes est théoriquement enregistré au cours de l'analyse pour chaque tube. Sur l'ensemble de la cohorte, le compte moyen de bille était de 1367+/-410 billes (n=190) soit un CV d'environ 30%. La médiane du nombre de billes observées sur l'ensemble de la cohorte est de 1186 [1063-1468].

Au final, 10% (n=20) des prélèvements ont présenté un nombre de bille < 960 billes sur au moins un des trois tubes analysés. Cette chute du nombre de billes analysées lors de la lecture d'échantillon marqué peut provenir d'un phénomène de microcoagulation malgré la présence d'hirudine dans le tampon entraînant un bouchage de l'appareil ; une erreur de prise d'essai des billes ne peut toutefois par être exclue.

On notera que l'utilisation intensive du CytoFLEX S entraîne une usure relativement rapide (environ 3 mois) de la ligne échantillon entraînant des blocages de flux de plus en plus fréquent.

- Variations intra-individuelles du nombre d'évènements annexine V+

Pour chaque patient, trois concentrations de MP-Annexine V totales sont mesurées (une pour chacun des tube analysé). Pour 12% des échantillons (n=25) nous avons mis en évidence des CV supérieurs à 25% entre les différentes concentrations de MP-Annexine V totales obtenues. Ces variations ne sont pas retrouvées lors d'un passage d'un même échantillon sur le cytomètre Gallios. Une ré-analyse des profils de ces échantillons montre que cette variabilité est limitée aux évènements de très faible fluorescence indépendamment d'un accrochage non spécifique sur le tube isotype contrôle. Le bruit de fond échantillon étant théoriquement identique entre ces 3 tubes, nous avons émis l'hypothèse que le mélange réactionnel pouvait impacter significativement la détection des évènements de faible fluorescence. Une solution serait de volontairement s'éloigner lors de l'analyse de cette zone non standardisable au détriment d'un gain de sensibilité.

- Variabilité du bruit de fond :

Nous avons remarqué de façon systématique une variation importante du bruit de fond au cours d'une même acquisition. Un graphique monoparamétrique non conditionné du nombre d'évènement en fonction du temps montre un grand nombre de détection durant les 30 premières secondes d'acquisition qui diminue par la suite.

Ce phénomène de variation du niveau de bruit de fond en fonction du temps pendant l'analyse d'un même échantillon est sans doute lié au fonctionnement de la pompe péristaltique. Il peut impacter la numération des MP comme illustré sur la Figure 43 et rend d'autant plus difficilement la standardisation la zone d'analyse proche du bruit de fond.

Une solution est également de s'éloigner de cette zone sensible au moment de retraitement des résultats.

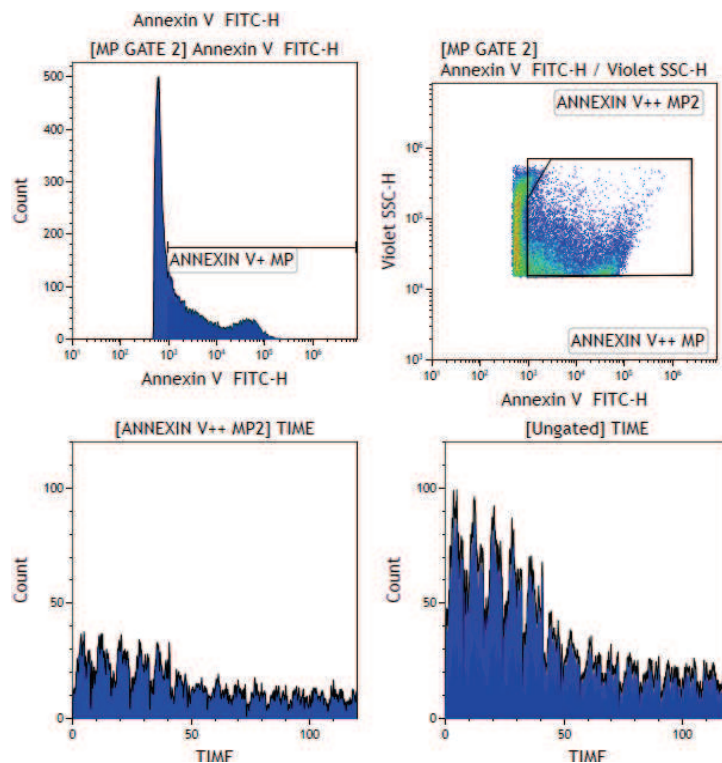


Figure 43 : Variation du bruit de fond au cours de l'acquisition

- Anomalie de traitement du signal

Une anomalie de traitement de signal encore mal identifiée a été relevée sur environ 9% des échantillons (n=17) (Figure 44). Cette anomalie se traduit par une absence d'évènement de petite taille (à gauche du graphe FSC/SSC), une absence de détection d'évènements annexine V mais un passage normal des billes de comptage.

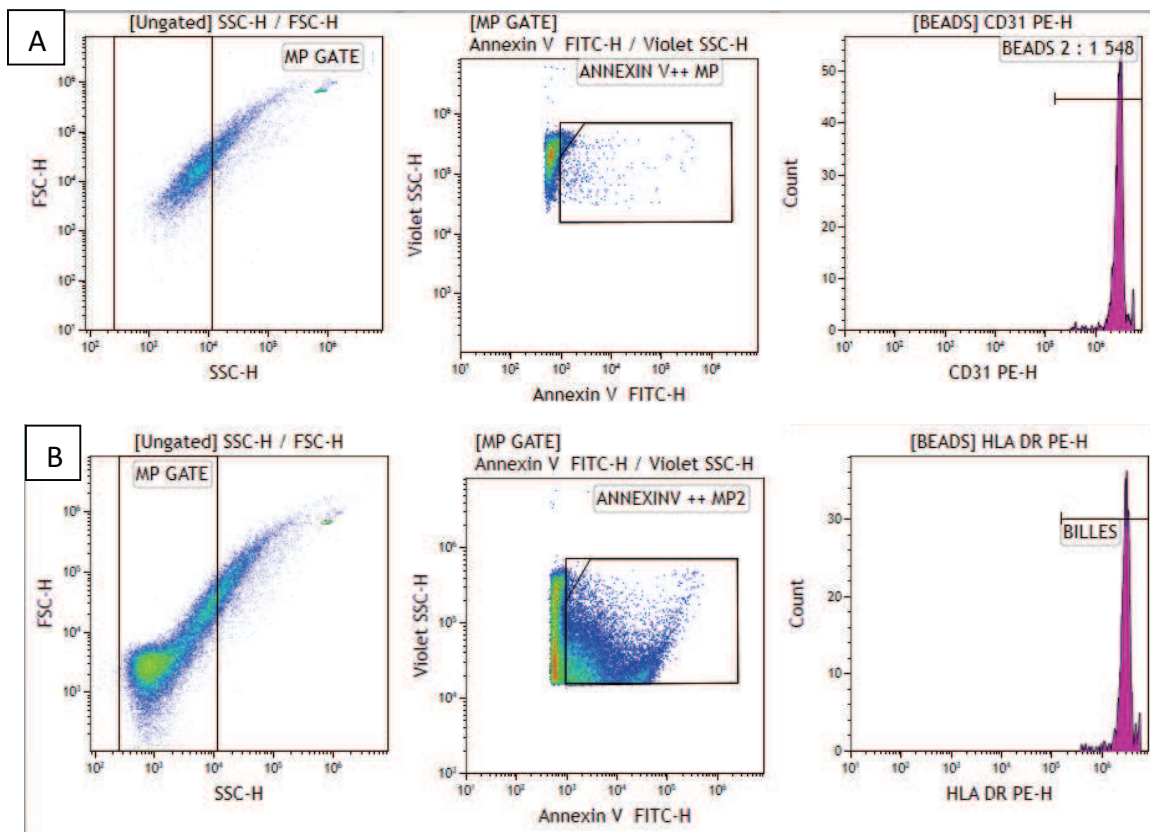


Figure 2: Exemple d'anomalie de traitement du signal. **A gauche** : le graphique A en comparaison du graphique B montre un décalage de signal vers la droite. **Au centre** ; le graphique A montre l'absence d'évènements annexine V+ : **A droite** le graphique montre le signal issu des billes en PE

- Standardisation du v-SSC

L'analyse des MP en utilisant le paramètre v-SSC permet une plus forte diffraction de la lumière par les MP comme démontré précédemment. Cependant son utilisation entraine une modification significative du positionnement des populations de MP par rapport aux billes de calibration (Gigamix).

En effet, comme illustré dans l'exemple ci-dessous (Figure 45), certaines grosses MP se retrouvent exclues de l'analyse en employant le v-SSC. Ceci devra être pris en compte dans une perspective de standardisation.

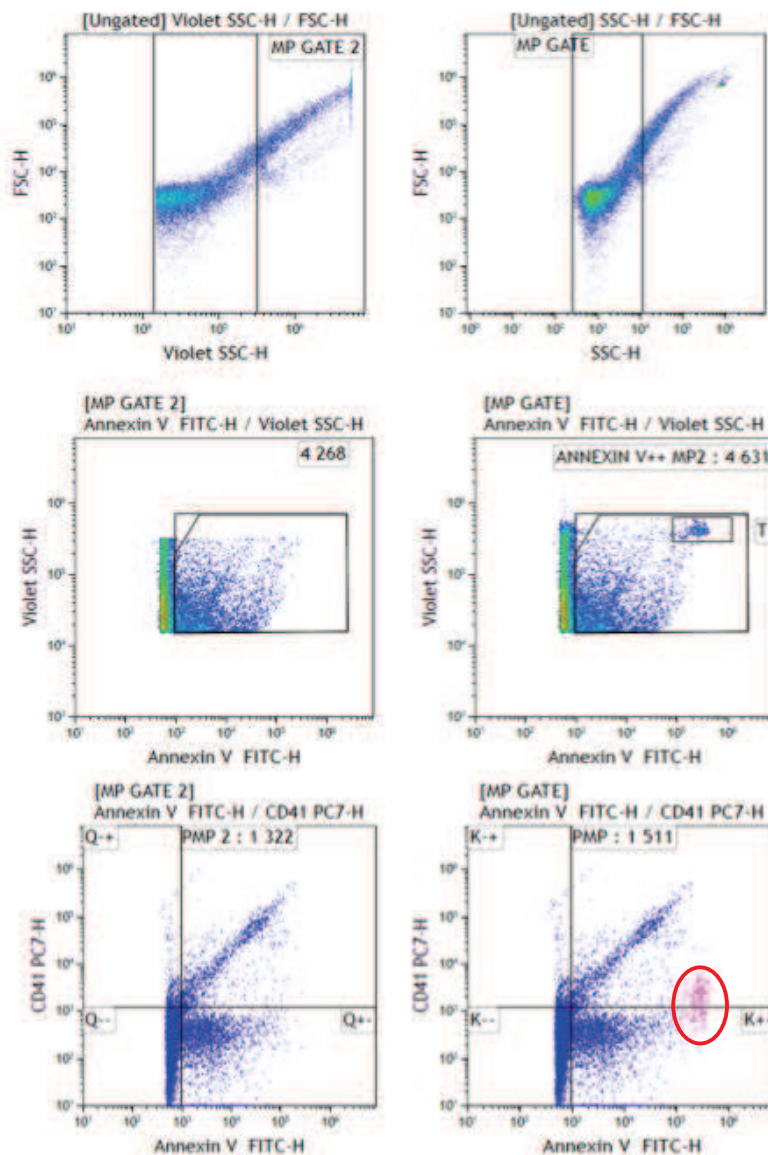


Figure 45 : Exemple de la modification du positionnement de la « MP GATE » entre SSC et v-SSC. On constate une disparition en v-SSC de la population « T » (colorée en rose) observée en SSC.

## 2) RESULTATS PRELIMINAIRES SUR LES PATIENTS ATTEINTS DE TIH POSITIFS

Les résultats valides de 22 patients atteints de TIH sont présentés ici et comparés à la cohorte aux sujets sains. Comme le montre la figure x, nous observons une élévation significative des concentrations de Gran-MP et Mono-MP sans augmentation de la sous-population de PMP. En revanche, une diminution significative a été observée pour la population Endo-MP chez les sujets atteints de TIH ( $p < 0.0001$ ). Ces résultats seront à confirmer sur l'ensemble de la cohorte.

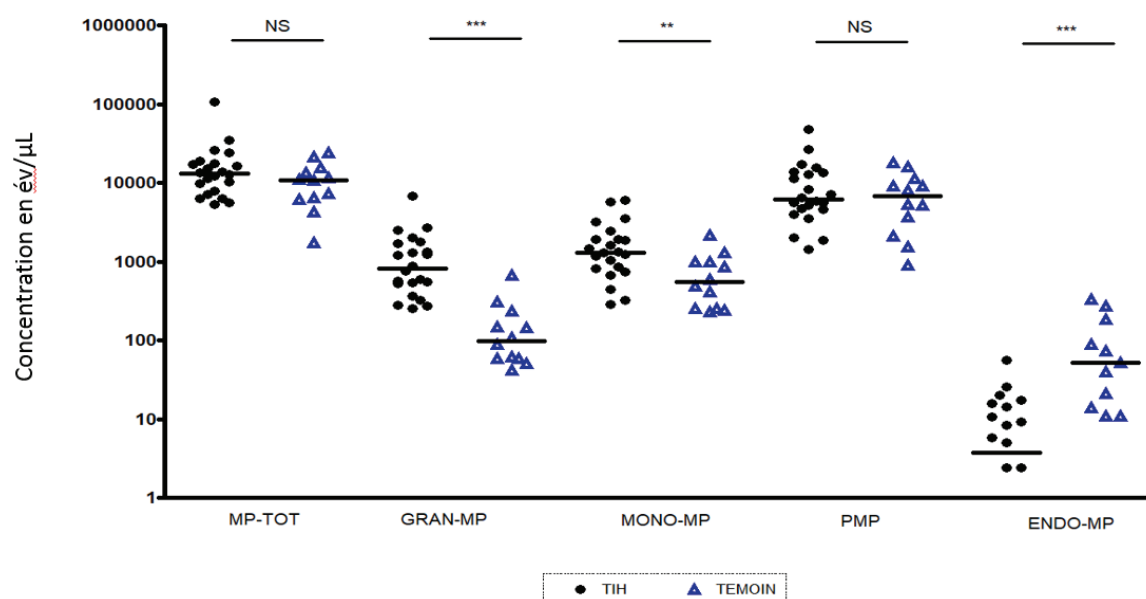


Figure 46: Comparaison des sous-populations de MP en concentrations entre sujets sains et sujets atteints de TIH (\*\*\*différence significative avec  $p < 0.0001$ , \*\* différence significative avec  $p = 0.0058$ , NS=Absence de différence significative ; calculs effectués selon un test statistique Mann-Whitney effectué à l'aide du logiciel PRISM)

## DISCUSSION

---

Notre travail montre une amélioration significative de la résolution en diffraction lumineuse latérale et de la sensibilité de fluorescence du cytomètre fluo-sensible CytoFLEX S. Ces performances permettent une meilleure détection de la plupart des sous-populations de MP de petites tailles dans les échantillons plasmatiques de sujet sains ou pathologiques (TIH). Cependant, l'utilisation, pour la première fois, de cet instrument pour la numération des MP dans les conditions réelles d'une étude clinique, montre que ce gain de sensibilité entraîne en parallèle une difficulté d'analyser de manière reproductible les événements présentant une faible fluorescence en raison d'une variabilité du bruit de fond de fluorescence. Ceci se traduit par une reproductibilité médiocre de la numération des MP (supérieure à 20%) et une contamination de l'analyse par des événements non spécifiques plus fréquente sur les échantillons pathologiques. Les performances du cytomètre fluo-sensible permettent néanmoins de mettre en évidence avec une meilleure sensibilité que les instruments actuellement utilisés, une augmentation significative de sous-populations de MP leucocytaires (monocytaires et granulocytaires) chez des patients TIH.

Comme exposé dans la partie bibliographique de ce travail, des avancées technologiques significatives sur les cytomètres ont permis une amélioration progressive de la détection des MP et de ses sous-populations par CMF. L'accélération récente de ces évolutions est sans doute liée en partie à un plus grand intérêt du monde industriel pour les vésicules extracellulaires dans leur ensemble. Les éléments de preuve de leur intérêt comme biomarqueurs en pathologie humaine mais aussi les premiers essais cliniques chez l'homme de vésiculothérapie ne sont pas étrangers à ces changements. L'utilisation de la CMF a en effet montré son intérêt pour la numération des MP par CMF dans les domaines cardiovasculaires (Nozaki et al. 2009; Sarlon-Bartoli et al. 2013) ou de la cancérologie (Melo et al. 2015; Roca et al. 2016). La visibilité du domaine est également renforcée par une plus grande collaboration internationale rassemblant des spécialistes d'horizon très divers au travers de l'ISEV, de l'ISTH et de l'ISAC. Dans ce contexte, les nouveaux cytomètres permettent de détecter des MP de plus petites tailles.



Cependant, la faible quantité d'antigène présent à la surface de ces petites MP rend difficile leur identification précise à cause du faible signal de fluorescence généré. Les améliorations technologiques incluses sur le cytomètre fluo-sensible CytoFLEX présente donc un grand intérêt pour une meilleure définition clinique du biomarqueur MP. Ce travail confirme la très bonne sensibilité en fluorescence de l'instrument et une amélioration de la détection des MP de petite taille (Poncelet et al. 2016b; Wisgrill et al. 2016). Parmi les éléments identifiés contribuant à ce gain de sensibilité, nous pouvons citer : (1) le système optique (Wavelength Division Multiplexer) qui relie les fibres optiques des lasers au filtre passe band en minimisant les pertes par réflexion lors du trajet optique, (2) les détecteurs à photodiode à avalanche qui ont un excellent rendement quantique, (3) le laser jaune qui permet une meilleure excitation de la PE et de ses tandems et réduit au passage significativement les besoins en compensation et les effets de spreading, (4) la possibilité de collecter le paramètre SSC après excitation par le laser violet (v-SSC) qui permet de délivrer une énergie plus importante que le laser bleu. Ces caractéristiques font du CytoFLEX l'instrument le plus sensible en fluorescence actuellement avec un impact positif réel sur la numération des MP non seulement en conditions purifiées (données de A. Bonnifay et S. Robert dans le laboratoire) mais également sur les échantillons plasmatiques de sujets sains ou pathologiques comme le montre ce travail. Le nombre de MP détectées est en effet significativement augmenté comparé au cytomètre Gallios qui est lui même déjà considéré comme un HS-CMF. Il faudra cependant évaluer par la suite si ce gain de sensibilité permet réellement d'améliorer l'information clinique associée à ce biomarqueur.

L'utilisation du cytomètre fluo-sensible pour le dosage des MP dans une cohorte de 190 patients fournie par le CHU de Saint-Etienne (Pr Brigitte Tardy) a cependant permis dans ce travail de montrer un certain nombre de limites. En effet, le gain en sensibilité de l'instrument est associé à une plus grande difficulté de séparer les événements de petite taille du bruit de fond optique de l'instrument. De nombreux éléments non spécifiques apportés par le plasma (vésicules lipidiques, agrégats protéiques...) ou par les réactifs (anticorps libres, complexes de fluorochrome libre) sont également mieux détectés. Ceci nous a contraint à devoir utiliser un double seuil de détection en ajoutant au seuil SSC, un nouveau seuil en fluorescence. La zone de détection autour de ce seuil est très instable et fortement impactée par toute variation de l'environnement échantillon.



Ceci entraîne une variabilité des résultats observés sur le bruit de fond de fluorescence et les numérations de MP faiblement fluorescentes. Ces résultats soulignent la nécessité d'adapter les protocoles dans l'analyse des MP et les outils qui les accompagnent à ces nouvelles contraintes. Des solutions pré-analytiques pour améliorer la séparation entre les MP et le bruit de fond pourraient être envisagées telles qu'une purification des MP ou du moins un protocole de lavage des MP marquées par chromatographie d'exclusion stérique (Yuana et al. 2015), par immunocapture ou nanofiltration. Des résultats préliminaires du laboratoire ont montré qu'un pré-traitement par colonne SEC des échantillons marqués permettait une réduction du bruit de fond de fluorescence pouvant dépasser 1 log de MFI en fonction de la concentration de l'anticorps testé.

Les résultats de notre travail soulignent également la nécessité de développer des outils de standardisation de la fluorescence adaptés au MP. En effet, l'accroissement des différences de sensibilité en fluorescence des instruments entraîne un facteur de variabilité supplémentaire entre les instruments. En conséquence, une standardisation des paramètres de dispersion lumineuse n'est plus suffisante mais doit être associée à une standardisation de la fluorescence. Cette notion a déjà été abordée dans le dernier atelier collaboratif de standardisation des MP par CMF de l'ISTH en incluant une bille avec un niveau de fluorescence connue pour construire le protocole standardisé en plus de l'outil de standardisation Megamix testé (Cointe et al. 2017). La faisabilité du développement de billes calibrées avec de très faibles niveaux de fluorescence a été prouvée (Poncelet, Franco et al. Cyto 2017). La validation de stratégie de standardisation de fluorescence pour les MP est d'ailleurs l'objectif principal du groupe collaboratif ISTH-ISEV-ISAC.

A côté des difficultés de travailler avec de très faibles niveaux de fluorescence, le système fluidique du CytoFLEX n'est pas sans défaut. L'écrasement répété de la ligne échantillon par les valves du système péristaltique entraîne un vieillissement rapide de celle-ci. En conséquence, le système volumétrique de l'instrument peut être mis en défaut. Nous avons donc choisi de maintenir le système de numération des MP par bille de comptage habituellement utilisé.

D'autre part, si la stabilité et la linéarité de mesure de bille de calibration a été prouvée (Poncelet et al. 2016b; Wisgrill et al. 2016), le bruit de fond varie significativement au cours du temps pendant une même analyse sur des périodes assez longues de plusieurs dizaines de secondes. Ceci rajoute une difficulté pour définir précisément les seuils de positivité dans les conditions très sensibles de l'analyse.

Une contamination inter-puits par des MP a également été observée et nécessite d'intercaler les mesures avec un passage d'eau. Ceci allonge très significativement les temps d'analyses.

En tenant compte des considérations techniques évoquées, l'analyse d'un échantillonnage réduit de patient ayant développé une TIH a montré une élévation significative des MP leucocytaires (granulocytaires et monocytaires) en comparaison à la cohorte de sujets sains. Ces résultats laissent envisager une implication des MP leucocytaires dans le mécanisme physiopathologique de la TIH. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur l'ensemble de la cohorte cependant certaines données de la littérature soutiennent leur cohérence. En effet, très récemment une étude du microparticulosome de la TIH, a rapporté une augmentation significative des MP leucocytaires et notamment monocytaires identifiées par CMF par l'expression d'annexine V, de L-Selectine et de FT (Campello et al. 2017). En revanche aucune donnée portant sur les MP granulocytaires n'est publiée à ce jour à notre connaissance. L'élévation de cette sous-population, mise en évidence pour la première fois dans notre étude, semble être en accord avec l'observation de leucocytes dans les caillots de sujets atteints de TIH (Rauova et al. 2010). De plus, l'activation des granulocytes dans la pathogénèse de la TIH a déjà été discutée (Xiao et al. 2008).

La ré-analyse de la cohorte entière en tenant compte des limites observées dans ce travail est en cours et permettra de confronter les résultats valides aux données cliniques en posant les questions suivantes : Existe-t-il une association entre une élévation d'une sous-population de MP avec la survenue de thromboses chez ces patients TIH ? Le profil des sous-populations de MP est-il différent entre les patients TIH présentant des IgG anti-PF4 ou possédant uniquement des IgA ou des IgM ce dernier profil étant très peu associé à la survenue de thromboses ?

En conclusion, les résultats de notre étude montrent une amélioration de la détection et caractérisation des MP par CMF avec le cytomètre fluo-sensible cytoFLEX mais montrent également les difficultés liées à la détection de petites MP en raison de leur proximité avec le bruit de fond de fluorescence. Ceci représente donc un nouveau challenge pour la CMF des MP avec la nécessité de développer de nouveaux outils et stratégies pour permettre un dosage à la fois sensible, spécifique et reproductible. Ces développements méthodologiques sont nécessaires pour permettre une meilleure définition de l'intérêt des MP en tant que biomarqueur en clinique.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Aass HCD, Øvstebø R, Trøseid A-MS, et al (2011) Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 79:990–999. doi: 10.1002/cyto.a.21147
- Agouti I, Cointe S, Robert S, et al (2015) Platelet and not erythrocyte microparticles are procoagulant in transfused thalassaemia major patients. *Br J Haematol* 171:615–624. doi: 10.1111/bjh.13609
- Amiral J, Wolf M, Fischer A, et al (1996) Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 92:954–959.
- Arepally GM (2017) Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 129:2864–2872. doi: 10.1182/blood-2016-11-709873
- Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR (2016) Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:184–195. doi: 10.1002/cyto.a.22669
- Arraud N, Linares R, Tan S, et al (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost JTH* 12:614–627. doi: 10.1111/jth.12554
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30:450–459.
- Balducci E, Cointe S, Lacroix R, et al (2012) Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Rev Francoph Lab* 2012:29–38. doi: 10.1016/S1773-035X(12)71499-5
- Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al (2009) Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 81:6813–6822. doi: 10.1021/ac901049w
- Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA (1999) 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* 274:7545–7556.
- Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA (1997) Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 99:2118–2127.
- Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 102:136–144.

- Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al (2009) Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost JTH* 7:1019–1028. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03434.x
- Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, et al (2005) Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 66:78–84. doi: 10.1002/cyto.a.20152
- Campello E, Radu CM, Duner E, et al (2017) Activated platelet-derived and leukocyte-derived circulating microparticles and the risk of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia: A role for pf4-bearing microparticles? *Cytometry B Clin Cytom.* doi: 10.1002/cyto.b.21507
- Cantero M, Conejo JR, Parra T, et al (1998) Interference of chylomicrons in analysis of platelets by flow cytometry. *Thromb Res* 91:49–52.
- Chandler WL (2016) Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 90:326–336. doi: 10.1002/cyto.b.21343
- Chattopadhyay PK, Hogerkorp C-M, Roederer M (2008) A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 125:441–449. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02989.x
- Chou HP, Spence C, Scherer A, Quake S (1999) A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11–13.
- Cointe S, Judicone C, Robert S, et al (2017) Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost JTH* 15:187–193. doi: 10.1111/jth.13514
- Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al (2017) Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res* 120:1632–1648. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417
- Cuker A, Arepally G, Crowther MA, et al (2010) The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *J Thromb Haemost JTH* 8:2642–2650. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04059.x
- Dale GL, Remenyi G, Friese P (2005) Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost* 3:2081–2088. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01528.x
- Davey HM (2002) Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci Off J Soc Vitro Biol* 24:91–97.
- Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, et al (2010) Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag* 6:1125–1133. doi: 10.2147/VHRM.S13236

- Dignat-George F, Boulanger CM (2011) The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:27–33. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.218123
- Distler JHW, Pisetsky DS, Huber LC, et al (2005) Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 52:3337–3348. doi: 10.1002/art.21350
- Erdbrügger U, Lannigan J (2016) Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:123–134. doi: 10.1002/cyto.a.22795
- Erdbrügger U, Rudy CK, Etter ME, et al (2014) Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 85:756–770. doi: 10.1002/cyto.a.22494
- Foladori P, Quaranta A, Ziglio G (2008) Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter into biovolume. *Water Res* 42:3757–3766. doi: 10.1016/j.watres.2008.06.026
- Forlow SB, McEver RP, Nollert MU (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 95:1317–1323.
- Gardiner C, Dragovic R (2014) Nanoparticle Tracking Analysis. In: *Extracellular vesicles in health and disease*. Pan Stanford Publishing,
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305:1425–1431. doi: 10.1056/NEJM198112103052401
- Greinacher A, Kohlmann T, Strobel U, et al (2009) The temporal profile of the anti-PF4/heparin immune response. *Blood* 113:4970–4976. doi: 10.1182/blood-2008-08-173062
- Gruel Y, Rollin J, Leroux D, Pouplard C (2014) Les thrombocytopénies induites par l'héparine : données récentes.
- György B, Módos K, Pállinger E, et al (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117:e39-48. doi: 10.1182/blood-2010-09-307595
- Hoffman RA, Kung PC, Hansen WP, Goldstein G (1980) Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4914–4917.
- Hoffman RA, Wood JCS (2007) Characterization of flow cytometer instrument sensitivity. *Curr Protoc Cytom Chapter 1:Unit1.20*. doi: 10.1002/0471142956.cyo120s40
- Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, et al (2004) New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 53:210–230.

- Howard M. Shapiro (2003) *Practical flow cytometry*, Fourth edition, John Wiley and Sons.
- Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, et al (2000) Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 96:188–194.
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166:747–749.
- Inglis HC, Danesh A, Shah A, et al (2015) Techniques to improve detection and analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 87:1052–1063. doi: 10.1002/cyto.a.22649
- Jaroszeski MJ, Radcliff G (1999) Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 11:37–53. doi: 10.1007/BF02789175
- Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, et al (2012) PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood* 119:5285–5293. doi: 10.1182/blood-2011-06-359430
- Kelly TL, Lam MCW, Wolf MO (2006) Carbohydrate-labeled fluorescent microparticles and their binding to lectins. *Bioconjug Chem* 17:575–578. doi: 10.1021/bc050339g
- Kim HK, Song KS, Lee ES, et al (2002) Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 13:393–397.
- Koshlar RL, Somajo S, Norström E, Dahlbäck B (2014) Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation. *PloS One* 9:e104200. doi: 10.1371/journal.pone.0104200
- Kowal J, Arras G, Colombo M, et al (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113
- Kowalska MA, Krishnaswamy S, Rauova L, et al (2011) Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) inhibit activated protein C generation: new insights into the prothrombotic nature of HIT. *Blood* 118:2882–2888. doi: 10.1182/blood-2011-02-335208
- Krauel K, Pötschke C, Weber C, et al (2011) Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 117:1370–1378. doi: 10.1182/blood-2010-08-301424
- Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, et al (2013a) Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 11:24–35. doi: 10.1111/jth.12268
- Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, et al (2013b) Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost JTH*. doi: 10.1111/jth.12207

- Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al (2012) Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost JTH* 10:437–446. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
- Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al (2010a) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost JTH* 8:2571–2574. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04047.x
- Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F (2010b) Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* 36:807–818. doi: 10.1055/s-0030-1267034
- Lacroix R, Robert S, Sabatier F, Dignat-George F (2014) Extracellular vesicles in health and disease-Flow Cytometry-Chapter 8.
- Lawrence WG, Varadi G, Entine G, et al (2008) A comparison of avalanche photodiode and photomultiplier tube detectors for flow cytometry. *International Society for Optics and Photonics*, p 68590M
- Lazarchick J, Genco PV, Hall SA, et al (1984) Detection of platelet antibodies by flow cytometric analysis. *Diagn Immunol* 2:238–241.
- Lazarus AH, Wright JF, Blanchette V, Freedman J (1995) Analysis of platelets by flow cytometry. *Transfus Sci* 16:353–361.
- Li S, Ren J, Xu N, et al (2014) MicroRNA-19b functions as potential anti-thrombotic protector in patients with unstable angina by targeting tissue factor. *J Mol Cell Cardiol* 75:49–57. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.017
- Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, et al (2012) Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141:e495S–e530S. doi: 10.1378/chest.11-2303
- Madeeva D, Cines DB, Poncz M, Rauova L (2016) Role of monocytes and endothelial cells in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 116:806–812. doi: 10.1160/TH16-02-0162
- Mattern CF, Brackett FS, Olson BJ (1957) Determination of number and size of particles by electrical gating: blood cells. *J Appl Physiol* 10:56–70.
- Mege D, Mezouar S, Dignat-George F, et al (2016) Microparticles and cancer thrombosis in animal models. *Thromb Res* 140 Suppl 1:S21-26. doi: 10.1016/S0049-3848(16)30094-9
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al (2015) Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523:177–182. doi: 10.1038/nature14581



- Mesri M, Altieri DC (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol Baltim Md* 1950 161:4382–4387.
- Mesri M, Altieri DC (1999) Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 274:23111–23118.
- Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, et al (2010) A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. *Thromb Res* 125:e110–e116. doi: 10.1016/j.thromres.2009.10.006
- Montoro-García S, Shantsila E, Orenes-Piñero E, et al (2012) An innovative flow cytometric approach for small-size platelet microparticles: influence of calcium. *Thromb Haemost* 108:373–383. doi: 10.1160/TH12-02-0120
- Mooberry M (2012) 58th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting SSC minutes Liverpool UK.
- Mullier F, Bailly N, Chatelain C, et al (2011) More on: calibration for the measurement of microparticles: needs, interests, and limitations of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based quantification of biological microparticles. *J Thromb Haemost JTH* 9:1679-1681; author reply 1681-1682. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04386.x
- Mullier F, Minet V, Bailly N, et al (2014a) Platelet microparticle generation assay: a valuable test for immune heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. *Thromb Res* 133:1068–1073. doi: 10.1016/j.thromres.2013.12.009
- Mullier F, Minet V, Bailly N, et al (2014b) Platelet microparticle generation assay: a valuable test for immune heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. *Thromb Res* 133:1068–1073. doi: 10.1016/j.thromres.2013.12.009
- Nickel KF, Labberton L, Long AT, et al (2016) The polyphosphate/factor XII pathway in cancer-associated thrombosis: novel perspectives for safe anticoagulation in patients with malignancies. *Thromb Res* 141 Suppl 2:S4-7. doi: 10.1016/S0049-3848(16)30353-X
- Nickel KF, Ronquist G, Langer F, et al (2015) The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood* 126:1379–1389. doi: 10.1182/blood-2015-01-622811
- Nielsen CT, Østergaard O, Rasmussen NS, et al (2017) A review of studies of the proteomes of circulating microparticles: key roles for galectin-3-binding protein-expressing microparticles in vascular diseases and systemic lupus erythematosus. *Clin Proteomics* 14:11. doi: 10.1186/s12014-017-9146-0
- Nolte-t Hoen ENM, van der Vlist EJ, Aalberts M, et al (2012) Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 8:712–720. doi: 10.1016/j.nano.2011.09.006

- Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, et al (2001) High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 158:277–287.
- Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, et al (2009) 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* 54:601–608. doi: 10.1016/j.jacc.2009.05.022
- Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, et al (2001) Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma* 50:801–809.
- Ortyn WE, Hall BE, George TC, et al (2006) Sensitivity measurement and compensation in spectral imaging. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 69:852–862. doi: 10.1002/cyto.a.20306
- Parida BK, Garrastazu H, Aden JK, et al (2015) Silica microspheres are superior to polystyrene for microvesicle analysis by flow cytometry. *Thromb Res* 135:1000–1006. doi: 10.1016/j.thromres.2015.02.011
- Poncelet P, Robert S, Bailly N, et al (2015) Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis* 53:110–126. doi: 10.1016/j.transci.2015.10.008
- Poncelet P, Robert S, Bouriche T, et al (2016a) Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytometry A* 89:148–158. doi: 10.1002/cyto.a.22685
- Poncelet P, Robert S, Bouriche T, et al (2016b) Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:148–158. doi: 10.1002/cyto.a.22685
- Pötschke C, Selleng S, Bröker BM, Greinacher A (2012) Heparin-induced thrombocytopenia: further evidence for a unique immune response. *Blood* 120:4238–4245. doi: 10.1182/blood-2012-04-419424
- Pouplard C, Lochmann S, Renard B, et al (2001) Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 97:3300–3302.
- Pugholm LH, Revenfeld ALS, Søndergaard EKL, Jørgensen MM (2015) Antibody-Based Assays for Phenotyping of Extracellular Vesicles. *BioMed Res Int*. doi: 10.1155/2015/524817
- Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, et al (2010) Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 116:5021–5031. doi: 10.1182/blood-2010-03-276964

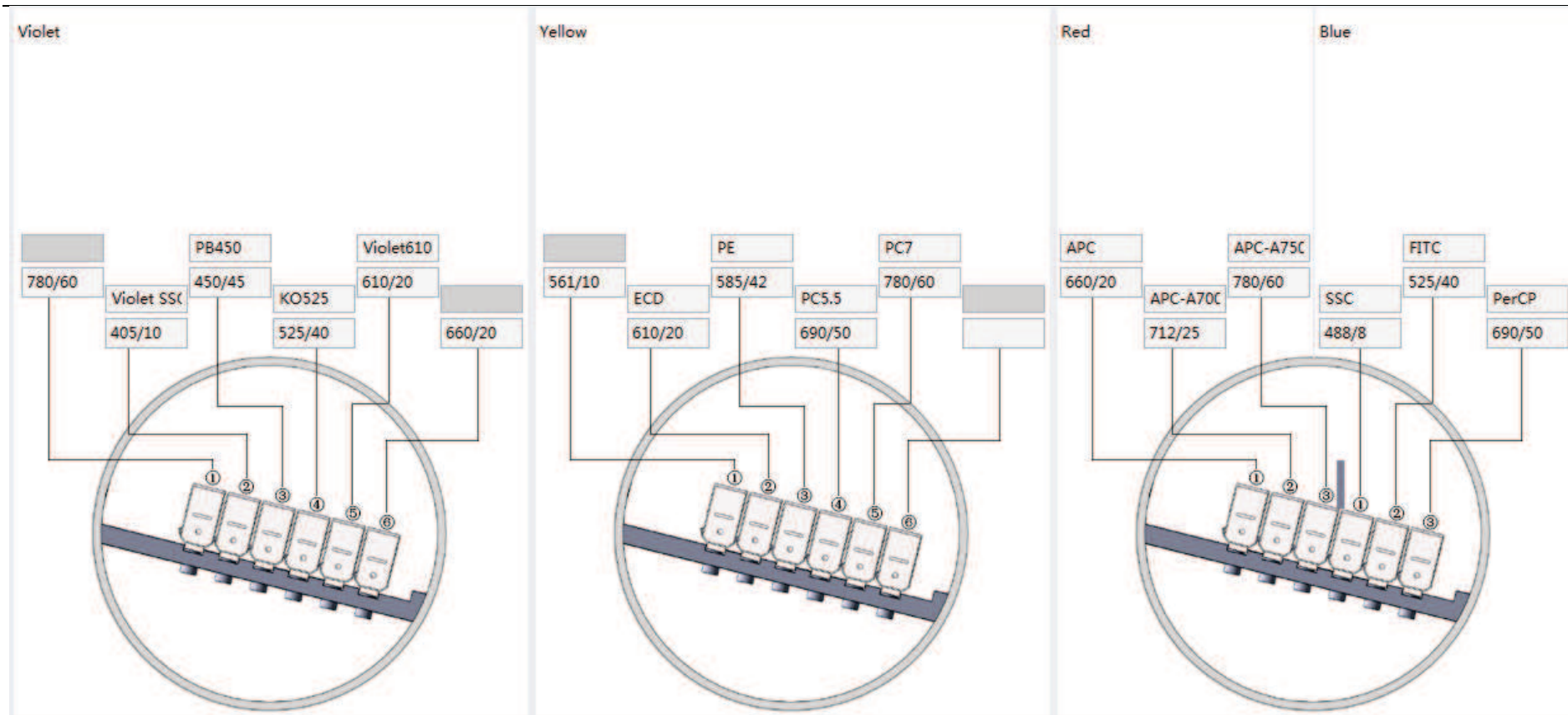
- Recktenwald DJ (1993) Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration. *J Hematother* 2:387–394. doi: 10.1089/scd.1.1993.2.387
- Rho J, Chung J, Im H, et al (2013) Magnetic nanosensor for detection and profiling of erythrocyte-derived microvesicles. *ACS Nano* 7:11227–11233. doi: 10.1021/nn405016y
- Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, et al (2017) Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb Haemost* 117:1296–1316. doi: 10.1160/TH16-12-0943
- Robert S, Lacroix R, Poncelet P, et al (2012) High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1054–1058. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244616
- Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al (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 JTH* 7:190–197. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x
- Roca E, Lacroix R, Judicone C, et al (2016) Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: A new approach to mini-invasively identify patients with malignant pleural effusions. *Oncotarget* 7:3357–3366. doi: 10.18632/oncotarget.6581
- Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, et al (2015) Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. *J Clin Invest* 125:1471–1484. doi: 10.1172/JCI79329
- Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, et al (1975) Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol* 19:374–377.
- Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, et al (2013) Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol* 62:1436–1441. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.078
- Shah MD, Bergeron AL, Dong J-F, López JA (2008) Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 19:365–372. doi: 10.1080/09537100802054107
- Shao H, Chung J, Balaj L, et al (2012) Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 18:1835–1840. doi: 10.1038/nm.2994
- Sheridan D, Carter C, Kelton JG (1986) A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 67:27–30.

- Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE (2004) Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta* 1667:82–90. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.09.006
- Simonsen JB (2016) A liposome-based size calibration method for measuring microvesicles by flow cytometry. *J Thromb Haemost JTH* 14:186–190. doi: 10.1111/jth.13176
- Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, et al (2005) Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 93:35–39. doi: 10.1160/TH04-06-0393
- Telford WG (2011) Lasers in flow cytometry. *Methods Cell Biol* 102:375–409. doi: 10.1016/B978-0-12-374912-3.00015-8
- Trummer A, De Rop C, Tiede A, et al (2008) Isotype controls in phenotyping and quantification of microparticles: a major source of error and how to evade it. *Thromb Res* 122:691–700. doi: 10.1016/j.thromres.2008.01.005
- Tsimmerman G, Roguin A, Bachar A, et al (2011) Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. *Thromb Haemost* 106:310–321. doi: 10.1160/TH10-11-0712
- Vallier L, Cointe S, Lacroix R, et al (2017) Microparticles and Fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 43:129–134. doi: 10.1055/s-0036-1592301
- van der Heyde HC, Gramaglia I, Combes V, et al (2011) Flow cytometric analysis of microparticles. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 699:337–354. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5\_16
- van der Pol E, Coumans F a. W, Grootemaat AE, et al (2014) Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost JTH* 12:1182–1192. doi: 10.1111/jth.12602
- van der Pol E, Coumans F, Varga Z, et al (2013) Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost JTH* 11 Suppl 1:36–45. doi: 10.1111/jth.12254
- van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost JTH* 8:2596–2607. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x
- van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, et al (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost JTH* 10:919–930. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04683.x
- Van Der Pol E, van Leeuwen TG, Nieuwland R (2014) An overview of Novel and Conventional Methods to Detect Extracellular Vesicles. In: *Extracellular vesicles in Health and Disease*. Pan Stanford Publishing,
- van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen ENM, Stoorvogel W, et al (2012) Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis

- by high-resolution flow cytometry. *Nat Protoc* 7:1311–1326. doi: 10.1038/nprot.2012.065
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR (1969) Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163:1213–1214.
- van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, et al (2012) Endothelial microparticles (EMP) for the assessment of endothelial function: an in vitro and in vivo study on possible interference of plasma lipids. *PloS One* 7:e31496. doi: 10.1371/journal.pone.0031496
- Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, et al (1994) Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 84:3691–3699.
- Warkentin TE, Sheppard J-AI, Moore JC, et al (2009) Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 113:4963–4969. doi: 10.1182/blood-2008-10-186064
- Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, et al (2003) Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem* 278:33161–33168. doi: 10.1074/jbc.M305321200
- Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R (2002) Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 302:191–198. doi: 10.1006/abio.2001.5552
- Wisgrill L, Lamm C, Hartmann J, et al (2016) Peripheral blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature, and anticoagulants. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:663–672. doi: 10.1002/cyto.a.22892
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360
- Wolf P (1967) The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* 13:269–288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
- Woodhams BJ (2014) Procoagulant assays. In: *Extracellular vesicles in health and disease*. Pan Stanford Publishing,
- Xiao Z, Visentin GP, Dayananda KM, Neelamegham S (2008) Immune complexes formed following the binding of anti-platelet factor 4 (CXCL4) antibodies to CXCL4 stimulate human neutrophil activation and cell adhesion. *Blood* 112:1091–1100. doi: 10.1182/blood-2008-04-153288
- Yuana Y, Bertina RM, Osanto S (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost* 105:396–408. doi: 10.1160/TH10-09-0595

- Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al (2010) Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost JTH* 8:315–323. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x
- Zhu L, Wang K, Cui J, et al (2014a) Label-free quantitative detection of tumor-derived exosomes through surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* 86:8857–8864. doi: 10.1021/ac5023056
- Zhu S, Ma L, Wang S, et al (2014b) Light-scattering detection below the level of single fluorescent molecules for high-resolution characterization of functional nanoparticles. *ACS Nano* 8:10998–11006. doi: 10.1021/nn505162u
- Zocco D, Ferruzzi P, Cappello F, et al (2014) Extracellular Vesicles as Shuttles of Tumor Biomarkers and Anti-Tumor Drugs. *Front Oncol*. doi: 10.3389/fonc.2014.00267
- Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al (2009) Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 15:6830–6840. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0371

# ANNEXE 1



Configuration optique du CytoFLEX S utilisée dans l'étude