HAL open science

Optimisation d'un test d'activité du facteur tissulaire sur les microvésicules

Loris Vallier

To cite this version:

Loris Vallier. Optimisation d'un test d'activité du facteur tissulaire sur les microvésicules. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02332739

HAL Id: dumas-02332739

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02332739v1

Submitted on 25 Oct 2019

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.

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 21 octobre 2019

Par M. **VALLIER Loris**
Né le 28.07.1991

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Optimisation d'un test d'activité du facteur tissulaire sur les microvésicules

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

Membres : Mme le Docteur Maude ARPIN

M. le Professeur Pierre-Antoine BONNET

M. le Docteur Philippe PONCELET

M. le Docteur Romaric LACROIX

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

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

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, 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
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

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.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

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-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
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 Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
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	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	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

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
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-LEDDET 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. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, tout d'abord, ma directrice de thèse, le Pr Françoise Dignat-George pour m'avoir accueilli pendant 5 ans dans son équipe et de m'avoir permis de soutenir cette thèse.

Je remercie également le Dr Romaric Lacroix dont les conseils et le soutien au cours de cette thèse m'ont été précieux.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie l'ensemble de la MP team. Sylvie Cointe pour son soutien. Corinne Chareyre dont la présence au quotidien a été importante pour moi et m'a permis de progresser. Stéphane Robert qui a non seulement été important dans mon travail, mais qui est aussi devenu un ami. Coralie Judicone et Évelyne Abdili pour leur aide et leur bonne humeur.

Durant ces années de thèse, j'ai eu la chance de créer des liens d'amitié au sein du laboratoire. Merci à Mathilde, Estelle, Xavier, Marie, Léa, Anne-Line, Pauline. Je n'oublierai jamais tous les bons moments que l'on a passés ensemble.

Je remercie l'équipe de Biocytex : Philippe Poncelet, Tarik Bouriche et Corentin Franco pour leur soutien et leurs conseils.

Un grand merci également à tout le service d'hématologie et d'immunologie de l'hôpital de la conception ainsi que le service de thérapie cellulaire pour leur aide dans mes expériences.

Je remercie toute ma famille pour leurs encouragements permanents et tout le soutien qu'ils m'apportent : mes parents, Mélissa, ma grand-mère, ma marraine, mes oncles et tantes et mes cousins dont il faudrait probablement une autre thèse pour écrire tout le bien qu'ils m'apportent.

Je souhaite également remercier mes amis de longue date. Loïc, mon meilleur ami de toujours, merci pour ta présence et ton soutien permanent. Alex, pour ta bonne humeur, ta sincérité et ta présence malgré la distance qui nous a souvent séparés. Gaelle, pour ton énergie inépuisable et ta

volonté de toujours te dépasser. Jérôme et Charlotte dont les moments passés ensemble ont été tellement importants pour moi. Florent pour ton amitié qui sera toujours importante pour moi.

À mes amis de fac « les zizous » : Bastien, Sylvain, Francesc, Pierrot, David, Nico et Tom pour toutes ces années passées ensemble.

Merci également à mes amis internes : Maxime et Stéphanie pour nos samedis soir passés à refaire le monde, Damien pour m'avoir supporté en colocation pendant 2 ans, mais également Jordan, Léa, Clémence, Estelle et tous les internes, pour tous ces bons moments passés.

Enfin, Amandine pour m'aider, me soutenir, me supporter au quotidien dans le travail et dans la vie et pour tout l'amour que tu m'apportes.

Cette thèse est dédiée à mon grand-père

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 8

SOMMAIRE 12

LISTE DES FIGURES 14

LISTE DES TABLEAUX 14

PRINCIPALES ABREVIATIONS 15

I-INTRODUCTION 16

II-PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE 18

Chapitre 1 : Introduction sur les vésicules extracellulaires **18**

1.1. Corps apoptotiques 18

1.2. Exosomes 19

1.3. Microvésicules 20

1.4. Fonctions des microvésicules 22

1.5. Microvésicules, biomarqueur en pathologie humaine et notion de biopsie liquide 25

Chapitre 2. Rôle des microvésicules dans l'hémostase **29**

2.1. Rappels d'hémostase 29

2.2. Rôle des microvésicules dans la coagulation 35

2.3. Microvésicules associées au risque de thrombose en clinique 38

Chapitre 3. Méthodes de mesure des activités procoagulantes des microvésicules **41**

3.1. Variables préanalytiques impactant sur la mesure des microvésicules 41

3.2. Techniques de purification des microvésicules 44

3.3. Méthodes de caractérisation des microvésicules 45

3.4. Caractérisation des activités procoagulantes 46

3.5. Tests viscoélastométriques 48

3.6. Limites des tests procoagulants 49

3.7. Comparaison et standardisation des essais mesurant l'activité procoagulante 50

3.8. Conclusion/Perspectives 51

III-TRAVAIL PERSONNEL 52

Article : Augmenter la sensibilité de mesure de l'activité du facteur tissulaire portée par les microvésicules 54

IV-DISCUSSION 65

V-CONCLUSION/PERSPECTIVES 70

ANNEXE 71

BIBLIOGRAPHIE 83

SERMENT DE GALIEN 98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des différentes fonctions attribuées aux microvésicules dans l'inflammation 23

Figure 2 : Mécanismes impliqués dans la modulation de l'angiogenèse par les microvésicules 24

Figure 3 : Principales différences entre la biopsie tissulaire et la biopsie classique 26

Figure 4 : Biomarqueurs circulants du cancer et concept de biopsie liquide..... 27

Figure 5 : Schéma du modèle de la coagulation en cascade 31

Figure 6 : Schéma du modèle cellulaire de la coagulation 32

Figure 7 : Bases moléculaires de l'activité procoagulante décrites chez les microvésicules 36

Figure 8 : Étapes du processus préanalytique pouvant influer sur le dosage des microvésicules 43

Figure 9 : Principe des tests (A) TEG® et (B) ROTEM® 49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des vésicules extracellulaires 21

Tableau 2 : Protocole préanalytique recommandé pour l'analyse des microvésicules circulantes 44

Tableau 3 : Comparaison des différentes techniques de purification des microvésicules..... 45

Tableau 4 : Méthodes utilisées pour caractériser les microvésicules 46

Tableau 5 : Tests procoagulants dépendants des microvésicules. 47

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

AT : AntiThrombine

CA : Corps Apoptotiques

CAT : Thrombose Associée au Cancer

CD : Cluster de Différenciation

EX : Exosomes

FT : Facteur Tissulaire

GP : GlycoProtéine

ISEV : International Society for Extracellular Vesicles

ISTH : International Society of Thrombosis and Haemostasis

MV : Microvésicules

MV-FT : Microvésicules portant le facteur tissulaire

NO : Oxyde nitrique

PAR : Protease-Activated Receptor

PFP : Platelet Free Plasma

PolyPs : PolyPhosphates

PS : PhosphatidylSérine

TEV : ThromboEmbolie Veineuse

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

VE : Vésicules Extracellulaires

vWF : Facteur Willebrand

I-INTRODUCTION

Les vésicules extracellulaires (VE) constituent une population hétérogène de petites structures entourées d'une membrane libérées dans le milieu extracellulaire par la plupart des types cellulaires. Elles peuvent être divisées en sous-populations en fonction de caractéristiques spécifiques telles que leur biogenèse, leur taille, leur contenu ainsi que leurs fonctions biologiques. Il existe 3 catégories principales en fonction de leur mécanisme de formation. Les exosomes sont générés par la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane. Les microvésicules (MV) proviennent du bourgeonnement des membranes cellulaires alors que les corps apoptotiques sont issus des derniers stades de l'apoptose cellulaire [1,2]. Une fois libérées par les cellules, les MV circulent dans une variété de fluides corporels et vectorisent les informations vers de multiples cellules cibles dans l'organisme [3]. Les MV sont extrêmement diverses en fonction de l'inducteur qui déclenche leur biogenèse et de leur cellule mère. Elles sont considérées à la fois comme une signature moléculaire des cellules dont elles sont originaires et comme un support d'informations biologiques importantes pouvant être échangées avec des cellules voisines [4]. L'origine diverse des MV est responsable de l'hétérogénéité des structures, de la composition des lipides, des protéines et des acides nucléiques tels que les ARNm et les miARN, ce qui entraîne une multitude de fonctions. En raison de la sélection de molécules qu'elles portent, les MV ont été impliquées dans différents processus physiopathologiques tels que la coagulation, l'inflammation, l'angiogenèse ou le dysfonctionnement endothélial [5,6].

Ce profil coagulo-inflammatoire a conduit logiquement au cours des dernières années à la question de leur implication dans la thrombose. Pour aborder la question du rôle des MV dans la thrombose associée au cancer (CAT), les MV doivent être intégrées dans leur environnement vasculaire complexe avec tous les partenaires contribuant à la formation du thrombus, y compris les cellules immunitaires innées telles que les cellules polymorphonucléaires et les monocytes, les cellules endothéliales, des plaquettes et aussi des cellules tumorales. Les partenaires supplémentaires résultant de l'activation cellulaire incluent également les pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs) et les polyphosphates (PolyPs) [7]. De plus, les MV provenant de cellules normales et tumorales contribuent à la CAT, expliquant que des mécanismes communs et spécifiques du cancer sont impliqués. Des données mécanistiques dans des modèles murins démontrent la contribution du facteur tissulaire (FT) sur les MV (MV-FT) dans la formation de thrombus. En effet, chez l'homme, des taux

plasmatiques élevés de MV-TF ont été associés à un risque accru de développer une thromboembolie veineuse (TEV) chez les patients cancéreux. [8–13]. Cependant, l'association entre les niveaux d'activité des MV-FT et de la TEV a été démontrée seulement chez les patients atteints d'un cancer du pancréas. Cela peut être dû à différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation de TEV dans le cancer [14], mais également à une sensibilité limitée des tests mesurant l'activité du FT.

Dans un premier temps, nous ferons une revue de la bibliographie comprenant une description générale des VE, de brefs rappels sur l'hémostase, puis nous montrerons l'implication des MV dans la coagulation et leur association avec le développement de la thrombose clinique en prenant comme exemple la CAT. Cette partie s'appuiera sur une revue publiée à laquelle j'ai contribué et qui se nomme « Microvesicles and Cancer Associated Thrombosis » publiée dans « Seminar in Thrombosis and Hemostasis » en 2019. Nous parlerons également des différentes méthodes de mesure de l'activité procoagulante des MV. Dans un second temps nous parlerons de mon travail personnel qui étudie la mesure de l'activité MV-FT. Ce travail a récemment fait l'objet d'un article publié en 2019 dans Thrombosis Research.

II-PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Introduction sur les vésicules extracellulaires

Les VE sont des structures submicroniques libérées à partir de la membrane cellulaire et formées d'une bicouche phospholipidique, généralement de forme sphérique. Ces structures extracellulaires sont présentes chez tous les êtres vivants et dans la plupart des fluides de l'organisme tels que le sang, l'urine, le LCR, la salive, le liquide pleural, les liquides articulaires ou l'humeur vitrée. Il existe 3 types de VE décrites à ce jour, différenciables par leur taille, leur mécanisme de production, leur composition ainsi que leurs méthodes d'étude (Table 1).

1.1. Corps apoptotiques

Les corps apoptotiques (CA) sont exclusivement formés pendant la mort programmée de la cellule (apoptose). Des expériences de microscopie électronique ont montré que les CA possédaient une taille, supérieure aux autres vésicules, comprise entre 1 et 5 µm [15]. Après l'induction de l'apoptose, la cellule subit une série de modifications morphologiques caractérisées par 1/ la formation de structures en forme de ballonnet [16] [17] 2/ la formation de longues protrusions membranaires sur la surface cellulaire [18–20] 3/ la fragmentation de ces protrusions pour former les CA [21]. Les CA jouent un rôle dans la clairance cellulaire et la communication intercellulaire. Il a été montré que pendant l'apoptose, la fragmentation cellulaire en CA permettait de générer des petits morceaux de cellules facilement éliminables par les cellules phagocytaires [22,23]. En effet, les CA encapsulent de nombreux composés de la cellule en état de mort programmée et leur clairance rapide va permettre d'éliminer des composés potentiellement délétères pour l'environnement cellulaire. Un CA peut contenir une large variété de composants cellulaires tels que du cytosol, des protéines dégradées, des fragments d'Acide Désoxyribonucléique (ADN) ou encore des organelles intactes [24].

1.2. Exosomes

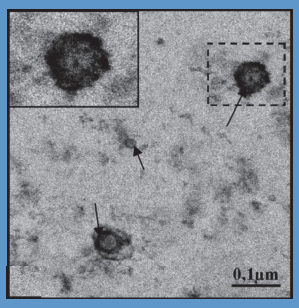
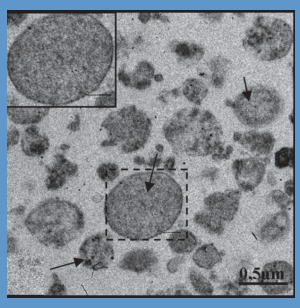
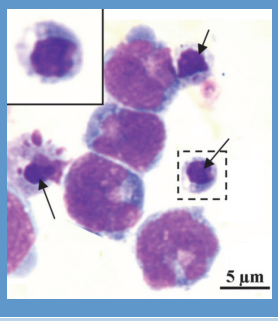
Les exosomes (EX), également appelés vésicules intraluminales, sont des petites vésicules mesurant entre 30 et 150 nm avec une bicouche lipidique et une densité entre 1,15 et 1,19 g/mL [25] ce qui les différencie des autres vésicules à forme plus irrégulière qui sont retrouvées dans des zones de plus haute densité (>1.23 g/mL) [26]. Les EX sont issus du système endosomal et ont donc une origine intracellulaire. Ils se développent dans les endosomes précoces formés après bourgeonnement vers l'intérieur de la cellule, ceux-ci vont maturer en corps multivésiculaire après un nouveau bourgeonnement vers l'intérieur (aboutissant à la formation des EX). Puis ils fusionnent avec la membrane plasmique et relarguent ainsi les EX dans l'espace extracellulaire [27]. En 2002, Mobius et coll. ont montré, avec l'utilisation d'un dérivé du cholestérol biotinylé en microscopie électronique, l'importance d'une concentration importante en cholestérol dans la sécrétion des EX [28]. Le mode de production et de sécrétion des EX permet d'anticiper la composition en protéines de ces vésicules. En effets, ils contiennent en majorité des protéines issues du système endosomal par rapport aux protéines de la membrane plasmique [29]. Il existe 2 types de protéines, spécifiques au mode de formation des EX, décrites dans la littérature : les protéines liées au système ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) tel que HRS (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate), STAM1 (Signal Transducing Adaptor Molecule-1), TSG101 (Tumor susceptibility gene 101)[30] et CHMP4 (Charged multivesicular body protein-4) [31] ainsi que les protéines accessoires également impliquées dans ce système tel que ALIX (ALG-2 Interacting Protein X)[30] et VPS4 (Vacuolar protein sorting-associated protein 4)[31] et les protéines non liées au système ESCRT qui seraient dépendant d'une enzyme appelée sphingomyélinase telle que le céramide [32], la flotilline-2 [33] et la phospholipase 2 (PLD2) [34]. Les EX contiendraient également des clusters de différenciation (CD) tels que le CD63 [35], des molécules de la famille des tétraspanines comme le CD9 et le CD81 [36], à l'origine décrites comme des molécules spécifiques des EX, mais qui depuis ont également été retrouvées dans les MV et les CA. À l'inverse, la phosphatidylsérine (PS) a longtemps été détectée uniquement sur les MV, mais il semble aujourd'hui évident que les EX en possèdent [37–39], mais en quantité moins importante que les MV [40]. Par opposition aux MV, une centrifugation supérieure ou égale à 100.000g est nécessaire pour les isoler.

1.3. Microvésicules

Les MV sont des vésicules submicroniques libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique. Le bourgeonnement des MV est induit par la modification de l'asymétrie de la membrane et favorise la redistribution des phospholipides (PL), principalement de la PS, à la partie externe de la membrane plasmique. En effet, en réponse aux stimuli, le mouvement des PL peut dépendre de diverses enzymes telles que la flippase (vers l'intérieur), la floppase (vers l'extérieur) et scramblase (dans les 2 sens), associée à la signalisation calcique [41]. La formation de MV semble se produire sélectivement dans les microdomaines riches en lipides de la membrane, tels que les radeaux lipidiques. Le processus de bourgeonnement est complété par la contraction des structures du cytosquelette par des interactions actine-myosine [42]. Elles présentent des antigènes représentatifs de la cellule parentale, mais qui peuvent cependant varier en fonction du stimulus ayant provoqué leur formation. Dépourvues de noyau, elles vectorisent pourtant des acides nucléiques. La majorité des MV détectées dans le sang périphérique proviennent des plaquettes et des érythrocytes, mais aussi d'autres cellules comme les leucocytes, les cellules endothéliales ou encore des cellules non hématopoïétiques comme les syncytiotrophoblastes et les cellules tumorales [43,44].

Tableau 1 : Principales caractéristiques des vésicules extracellulaires

(Images extraites de Surman M et coll. Clin Exp Metastasis 2017)

	EXOSOMES	MICROVESICULES	CORPS APOPTOTIQUES
			
TAILLE	<100 nm	100-1000 nm	>1000 nm
ORIGINE	Exocytose de corps multivésiculaires	Vésiculation de la membrane plasmique	Mort cellulaire
COMPOSITION	Lipides, protéines, ARN, micro-ARN	Lipides, protéines, ARN, micro-ARN	Lipides, protéines, ARN, micro-ARN, ADN, organites cellulaires
METHODES DE DETECTION	Microscopie électronique	Cytométrie en flux Microscopie électronique	Cytométrie en flux Microscopie électronique
METHODES DE QUANTIFICATION	Détection à impulsions résistives accordables (TRPS) Suivi individuel de vésicules (NTA)	Cytométrie en flux Détection à impulsions résistives accordables (TRPS) Suivi individuel de vésicules (NTA)	Cytométrie en flux
METHODES DE PURIFICATION	Ultracentrifugation Centrifugation avec gradient de sucrose Séparation immunomagnétique Microfluidique	Ultracentrifugation Chromatographie par exclusion de taille Chromatographie échangeuse d'ion Séparation immunomagnétique	Centrifugation

Légende : ARN : Acide RiboNucléique, ADN : Acide DésoxyriboNucléique, TRPS : Tunable Resistive Pulse Sensing, NTA : Nanoparticle Tracking Analysis.

1.4. Fonctions des microvésicules

Contrairement à leur description initiale, il est aujourd'hui bien démontré que les MV ne sont pas des entités inertes. Dans le système cardiovasculaire, elles ont été décrites comme ayant de multiples fonctions notamment dans la modulation du tonus vasculaire, l'inflammation, l'angiogenèse et surtout l'hémostase qui sera développée de façon plus exhaustive dans le chapitre 2.

Les MV participent à la régulation du tonus vasculaire, notamment en diminuant la production de l'oxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales [5,45]. Cette diminution est provoquée par l'inhibition de la NO synthase ou une augmentation de la caveoline-1 qui va entraîner une augmentation du stress oxydatif local [46,47]. Une diminution du NO endothélial a pour conséquence de limiter les propriétés vasculoprotectrices et antiathérogènes de l'endothélium vasculaire [46,48–50].

De nombreux travaux ont démontré le rôle des MV dans la modulation de l'inflammation dans le compartiment vasculaire (Figure 1). L'effet proinflammatoire des MV implique par exemple les PL oxydés capables d'activer les récepteurs du facteur d'activation plaquettaire (PAF) présents sur les cellules endothéliales et les leucocytes [51]. Les MV constituent également une source importante de substrat aminophospholipidique pour la phospholipase A2 sécrétoire conduisant à la génération d'acide lysophosphatidique, un puissant médiateur proinflammatoire et agoniste plaquettaire. L'acide arachidonique transporté par les MV induit une augmentation de l'expression membranaire de la molécule d'adhésion intercellulaire de type 1 (ICAM-1) sur l'endothélium [52–54]. Ces MV induisent également la néosynthèse de contre-récepteurs (CD11a/CD18, CD11b/CD18) monocytaires favorisant les interactions leuco-endothéliales. Les MV plaquettaires (PMV) ou les MV leucocytaires induisent la libération de plusieurs cytokines endothéliales (IL-1b, IL-6, IL-8, la protéine chimiotactique monocyte-1 : MCP-1) ou monocytaires (IL-1b, TNFα, IL-8) renforçant ainsi la réponse inflammatoire [55–59]. Les PMV peuvent par ailleurs faciliter le recrutement de nombreuses cellules immunes (monocytes, lymphocytes T et B, cellules NK)[60–63]. Les plaquettes interagissent directement avec l'endothélium vasculaire activé en augmentant l'arrêt des leucocytes/monocytes après transfert par les MV de la chimiokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)[64]. Récemment, il a également été montré que les mitochondries libérées dans des MV issues de monocytes stimulés au LPS permettaient d'induire une activité proinflammatoire par la sécrétion d'interféron de type 1 et de TNFα au niveau des cellules endothéliales [65].

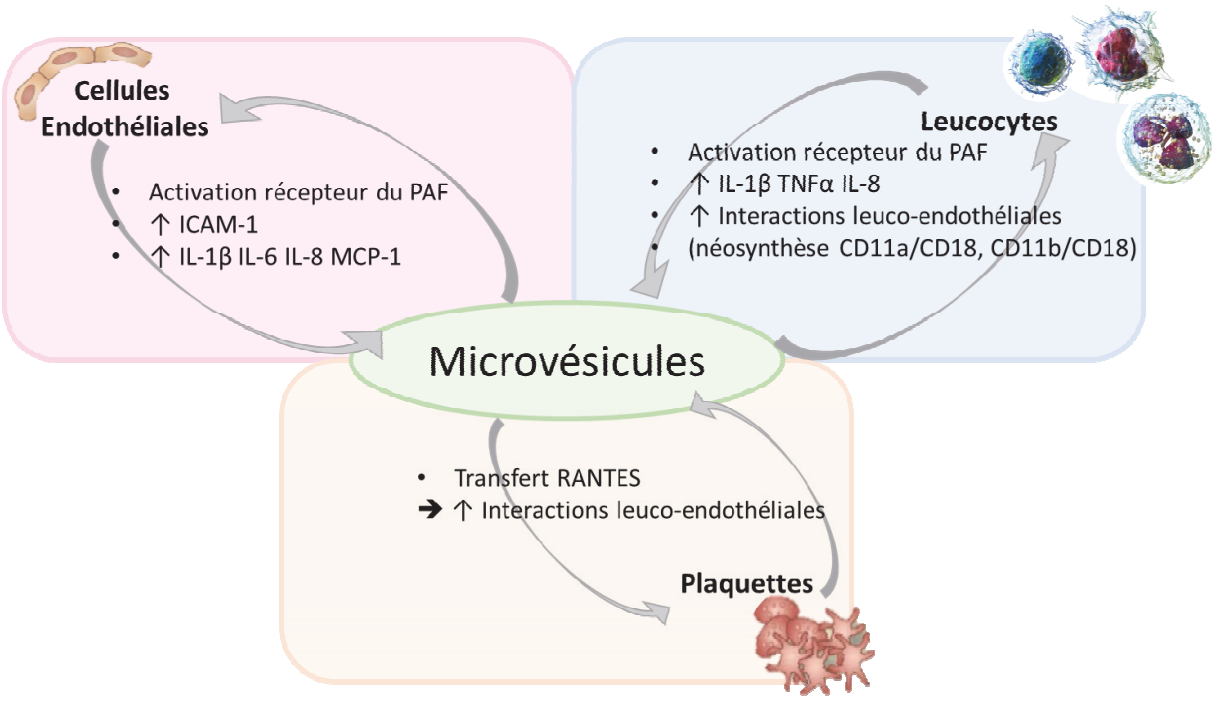


Figure 1 : Schéma des différentes fonctions attribuées aux microvésicules dans l'inflammation

(Inspiré de : Souza et coll., Kidney Int, 2016)

Une revue publiée récemment dans notre équipe montre le rôle des MV dans l'angiogenèse [66]. Comme illustré par la Figure 2, les MV interviendraient à 3 étapes de l'angiogenèse :

1) La protéolyse et la dégradation matricielle, grâce aux nombreuses protéases actives contenues par les MV [67].
2) Le recrutement et la différenciation de progéniteurs endothéliaux, par l'effet stimulant des MV endothéliales (EMV) sur la réparation du tissu musculaire en augmentant la différenciation des progéniteurs endothéliaux par un mécanisme impliquant les radicaux libres oxygénés [68].
3) La prolifération et la migration des cellules endothéliales objectivées *in vitro* et *in vivo* en utilisant des matrigels plugs [69].

Mais les MV transportent également des molécules proangiogénique telles que le vascular endothelial growth factor (VEGF), le β fibroblast growth factor (β-FGF), le platelet derived growth factor (PDGF)[70] ainsi que le FT [71]. Elles peuvent également transférer des miR proangiogéniques [66]. Ainsi, les nombreuses fonctions véhiculées par les MV en font un potentiel biomarqueur en pathologie humaine.

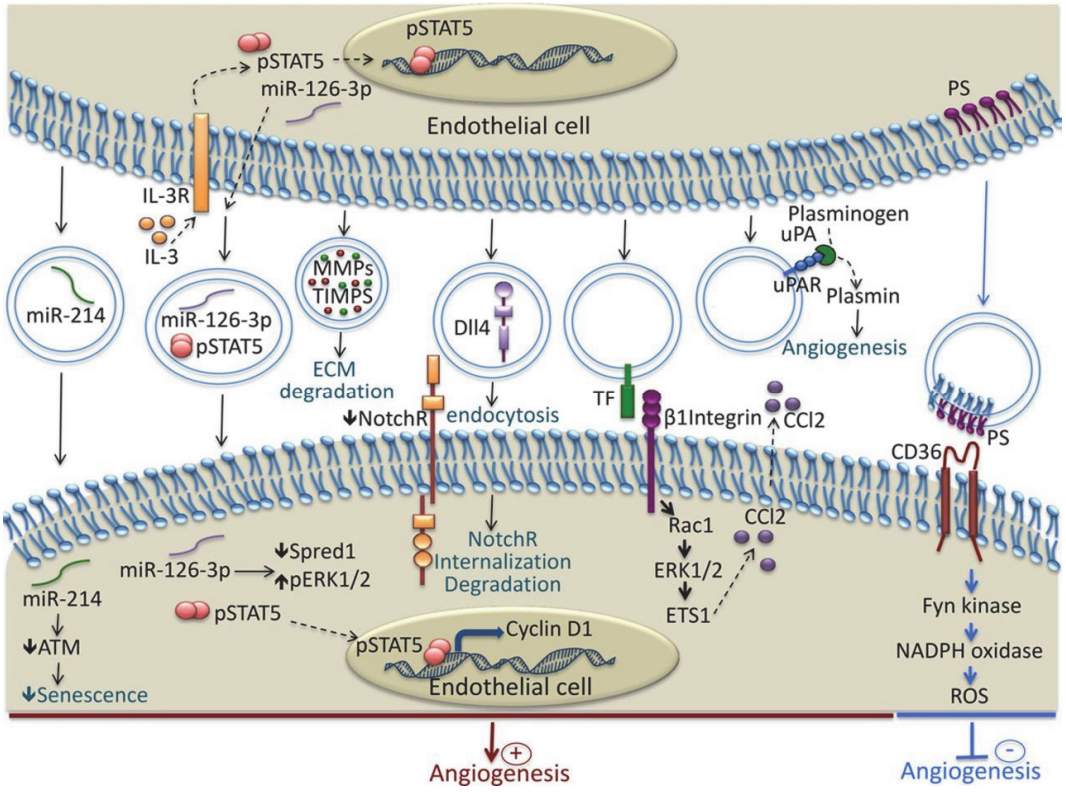


Figure 2 : Mécanismes impliqués dans la modulation de l'angiogenèse par les microvésicules

Légende : ATM : ataxia telangiectasia mutated ; CCl2 : chemokine c-c motif ligand 2 ; Dll4 : Delta-like 4 ; ECM : extracellular matrix ; ERK1/2 : extracellular signal-related kinase 1 and 2 ; ETS1 : avian erythroblastosis virus E26 homolog-1 ; IL-3R : interleukin-3 receptor ; MMPs : matrix metalloproteinases ; NotchR : Notch receptor ; PS : phosphatidylserine ; Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 ; ROS : reactive oxygen species ; FT : tissue factor ; TIMPS : tissue inhibitor of metalloproteinases ; uPA : urokinase plasminogen activator ; and uPAR : urokinase plasminogen activator receptor.

(Extrait de : Todorova et coll., Circ Res, 2017)

1.5. Microvésicules, biomarqueur en pathologie humaine et notion de biopsie liquide

Selon le NIH Biomarkers Definitions Working Group, un biomarqueur (abréviation de marqueur biologique) se définit comme une caractéristique mesurable objectivement et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux ou pathogènes ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Le biomarqueur peut ainsi permettre de diagnostiquer une maladie, lui permettre d'évaluer sa gravité, le risque de récidive ou encore prédire la réponse à un traitement et l'aider à en évaluer les doses. Depuis plusieurs années, les études cliniques ont montré que les MV circulantes reflètent le stress cellulaire ou une atteinte tissulaire lorsqu'elles sont libérées dans la circulation systémique. L'objectif de cette partie est de montrer de façon non exhaustive l'avancement des données dans l'intérêt des MV comme biomarqueur en pathologie humaine.

Dans certains contextes pathologiques, la libération des différentes sous-populations de MV peut être augmentée ou diminuée présentant ainsi une signature unique pouvant servir comme un biomarqueur potentiel pour de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, thrombotiques, auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses [72–74]. La notion de microparticulosome a même été proposée dans notre laboratoire pour caractériser cette signature [75–77]. Ainsi une modulation de la quantité de MV a été décrite dans différentes pathologies thrombotiques comme les syndromes coronariens aigus [78–81], l'ischémie myocardique [82], l'insuffisance coronarienne [50,83,84], les accidents vasculaires cérébraux [85–87] ou la thrombose veineuse profonde [86,88,89], mais aussi dans d'autres désordres vasculaires pouvant se compliquer de manifestations procoagulantes et/ou inflammatoires comme le syndrome métabolique [90], le purpura thrombotique thrombocytopénique [91], le syndrome des anti-phospholipides [92–94], les vascularites [95], l'insuffisance veineuse chronique [96], les phlébites [88], l'hémoglobinurie paroxystique nocturne [97] ou encore le sepsis [98,99]. La quantité de MV a également montré un intérêt pronostique. Par exemple, Nazaki et coll. ont montré que les taux plasmatiques de CD144-EMV étaient capables de prédire de manière indépendante les événements cardiovasculaires chez des patients à haut risque de maladie coronarienne avec une valeur incrémentale par rapport à d'autres marqueurs tels que la CRP ultrasensible et le peptide natriurétique de type B (BNP)[100].

Dans la plupart des liquides biologiques, les MV peuvent révéler une atteinte cellulaire initiale, accessible de façon simple par un dosage biologique, alors que les cellules dont elles

proviennent sont indétectables, car rapidement éliminées par phagocytose ou localisées/séquestrées dans des territoires de l'organisme inaccessibles. Ainsi, une valeur ajoutée des MV en termes de biomarqueur est de permettre de mesurer des processus d'activation/d'apoptose de tissus d'accès difficile comme l'endothélium, les tumeurs ou de cellules inaccessibles, car engagées dans un processus de mort cellulaire. Elles représentent, de ce fait, une alternative particulièrement intéressante en termes d'exploration non invasive de ces tissus, en donnant accès à ce que l'on peut appeler des « biopsies liquides », réalisables à partir du sang circulant ou d'autres liquides biologiques (Figure 3). Cette notion a été développée précédemment concernant les EMV dans les maladies cardiovasculaires [74] nous nous concentrerons sur les études réalisées sur les MV dans le diagnostic de tumeurs.

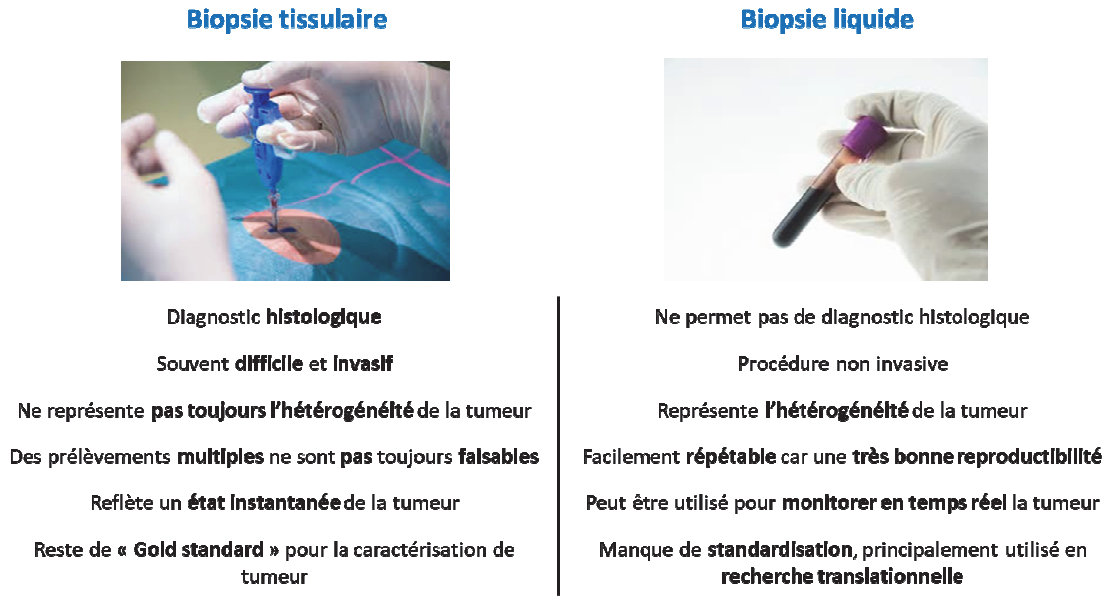


Figure 3 : Principales différences entre la biopsie tissulaire et la biopsie classique

La détection de MV d'origines cancéreuses dans le sang périphérique représente une perspective attractive dans le diagnostic précoce de cancer (Figure 4). Des taux élevés de MV ont également été rapportés au cours de cancers solides d'origines variées (côlon, pancréas, sein…). Des mutations spécifiques du cancer peuvent également être détectées dans les MV. En effet, Skog, et coll. ont découvert la présence d'ARNm d'EGFRvIII (un mutant du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)) dans des VE libérés *in vitro* par des cultures de cellules de glioblastome, ainsi que *in vivo* dans le plasma d'une grande proportion de patients atteints de glioblastomes, diagnostiqués avec des tumeurs positives à l'EGFRvIII. De manière intéressante, ce signal a été perdu du plasma du patient lors du retrait chirurgical de la lésion primaire, confirmant

que les cellules cancéreuses viables étaient la source des EV contenant le transcrit EGFRvIII [101]. Dans le cancer de la prostate, des analyses transcriptomiques ont mis en évidence la diminution de la cadhérine 3 (CDH3) exprimée par les MV [102]. Enfin, dans le cancer pancréatique, Melo et coll. ont identifié le protéoglycane de surface Glypican-1 (GPC-1) sur des EX permettant de discriminer les patients avec un adénocarcinome pancréatique des patients avec une pathologie pancréatique bénigne [103]. De façon intéressante, il a été montré par Hoshino et coll. que les intégrines exprimées par les EX permettaient d'identifier les sites de métastase de la tumeur [104]. Cette étude a démontré que les intégrines exosomales $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_6\beta_1$ étaient associées à une métastase pulmonaire, tandis que l'intégrine exosomale $\alpha_v\beta_5$ était liée à une métastase hépatique [104]. Ces données représentent une nouvelle stratégie pour prédire la présence de métastases grâce aux biopsies liquides. Avec le développement des technologies de génomique, de transcriptomique, de protéomique et de la métabolomique à haute résolution et à haute sensibilité, l'utilisation de biomarqueurs non invasifs, sans cellules, va devenir essentielle dans le diagnostic du cancer. Dans ce contexte, un premier test diagnostic a été commercialisé par EX Diagnostics : ExoDx Prostate IntelliScore® qui évalue l'expression génique dérivée d'EX à base d'urine contenant l'ARNm de l'antigène 3 du cancer de la prostate (PCA3). Ce test accroît la détection des patients présentant un cancer de la prostate tout en évitant au patient de subir une biopsie [105].

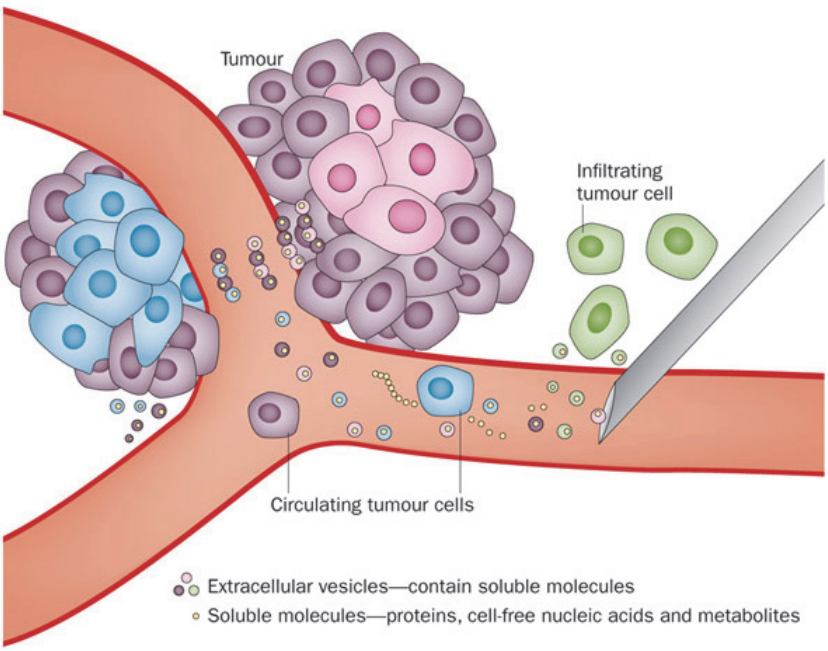


Figure 4 : Biomarqueurs circulants du cancer et concept de biopsie liquide

(Extrait de : Westphal et coll., Nat Rev Neurol, 2015)

À l'heure actuelle, la relevance des résultats des études cliniques menées sur les MV est encore limitée en raison du manque de connaissances sur la diversité des MV, en termes de taille,

structure, propriétés biologiques ou mécanismes de production. Une autre limite concerne le manque de sensibilité et de spécificité des techniques de caractérisation ainsi que leur manque de standardisation. Dans la suite de ce travail, nous développerons une des facettes des MV les plus décrites dans la littérature : leur rôle dans l'hémostase.

Chapitre 2. Rôle des microvésicules dans l'hémostase

Quelle que soit leur origine cellulaire, une caractéristique commune aux MV est leur implication dans l'hémostase. Dans cette partie, après un rappel succinct des étapes de l'hémostase, nous développerons les différentes fonctions des MV dans la thrombose.

2.1. Rappels d'hémostase

L'hémostase est un processus physiologique rapide, localisé, très régulé permettant de maintenir un flux sanguin normal. Ce processus fait intervenir les plaquettes (hémostase primaire), les facteurs de la coagulation (hémostase secondaire ou coagulation), ainsi que les composants du vaisseau (comme l'endothélium). Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent à la matrice sous-endothéliale, s'activent et libèrent des molécules permettant de recruter d'autres plaquettes afin de former le clou plaquettaire (= thrombus blanc). En parallèle, la cascade de la coagulation est activée et conduit au clivage du fibrinogène soluble en fibrine insoluble afin de former un réseau permettant de consolider le thrombus plaquettaire (= thrombus rouge). Des systèmes de rétrocontrôle négatif, tels que le système anticoagulant, garantissent un phénomène local et préviennent une perte excessive de sang en maintenant l'intégrité du vaisseau et le flux sanguin. Lors d'une blessure, le thrombus est dissous à l'aide du système fibrinolytique et permet de ré-établir un flux sanguin physiologique.

2.1.1. Hémostase primaire

En condition physiologique, l'endothélium produit en permanence des molécules protectrices telles que le NO, la prostacycline et la thrombomoduline qui préviennent l'activation plaquettaire en augmentant les niveaux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ou en captant la thrombine [106,107]. Lors d'une atteinte vasculaire (brèche ou activation de l'endothélium), ces molécules protectrices sont perdues et la matrice sous endothéliale est exposée au flux sanguin, l'hémostase primaire est initiée et se déroule en 3 phases distinctes : adhésion, activation et agrégation.

2.1.1.1. Adhésion

Lors d'une atteinte vasculaire, le facteur Willebrand (vWF) se fixe sur le sous-endothélium. Son immobilisation et le flux sanguin le font changer de conformation et lui donnent une forte affinité pour son récepteur, présent sur les plaquettes : la glycoprotéine (GP) Ib-V-IX [108]. Cette interaction induit le rolling des plaquettes qui vont ensuite se fixer au collagène par l'intermédiaire de la GPVI et GPIa/IIa (intégrine $\alpha_2\beta_1$) et va entraîner leur activation [109,110].

2.1.1.2. Activation

La fixation entre le vWF et la GPIb-V-IX et collagène/GPVI va entraîner une cascade de signalisation, activant la plaquette qui va changer de forme, libérer ses granules α et ses granules denses, et activer ses intégrines [109,111,112]. Cette activation va être maintenue de façon efficace par la sécrétion d'ADP, des granules denses plaquettaires, qui va se fixer sur son récepteur P2Y12 et par le TXA2 synthétisé au niveau de la membrane plaquettaire [113]. La plaquette va exposer à sa surface des PL négatifs qui vont permettre l'assemblage du complexe prothrombinique. La thrombine ainsi générée va agir comme un agoniste plaquettaire *via* le clivage protéolytique de ses récepteurs PAR-1 et PAR-4 (Protease-activated receptors de type 1 et 4). L'activation plaquettaire va provoquer l'activation par un processus appelé « Inside-out signalling » de sa plus abondante intégrine : la GPIIbIIIa. Celle-ci va alors pouvoir se fixer à des protéines contenant un motif RGD tel que la vitronectine, la fibronectine et le fibrinogène. Le fibrinogène, présent dans le sang circulant, va alors se fixer sur la GPIIbIIIa et provoquer un « Outside-in signalling » afin de propager l'activation et l'étalement plaquettaire et provoquer leur dégranulation [114].

2.1.1.3. Agrégation

Les interactions entre les plaquettes vont se faire suivant 2 mécanismes, tout d'abord par interaction du PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) à la P-selectine renforcée par l'intermédiaire du fibrinogène : formation du thrombus blanc. L'activation en parallèle de la cascade de la coagulation va permettre de transformer le fibrinogène soluble en fibrine insoluble et ainsi former un thrombus plus solide = formation du thrombus rouge. Le thrombus va provoquer une

occlusion partielle ou totale du vaisseau et restreindre le flux sanguin. Il va s'en suivre une rétraction de caillot médié par le cytosquelette d'actine et de myosine [114] des plaquettes ce qui va permettre de maintenir la perméabilité vasculaire et initier la résorption du caillot.

2.1.2. Coagulation

Dans les années 1960, les chercheurs Mc Farlane, Davie et Ratnoff ont décrit le phénomène de coagulation sous la forme d'une cascade, avec notamment 2 voies : extrinsèque et intrinsèque. Ce modèle est encore utilisé aujourd'hui pour étudier la coagulation plasmatique *in vitro* (Figure 5). Des études plus récentes réalisées notamment par microscopie intravitale, ont montré une nouvelle vision de la coagulation pouvant se produire *in vivo* [115]. Contrairement au modèle en cascade, le modèle plus récent implique la surface cellulaire et particulièrement le FT membranaire ainsi que les plaquettes. Il décrit ainsi la coagulation associée à l'hémostase primaire en 3 étapes : initiation, amplification et propagation (Figure 6).

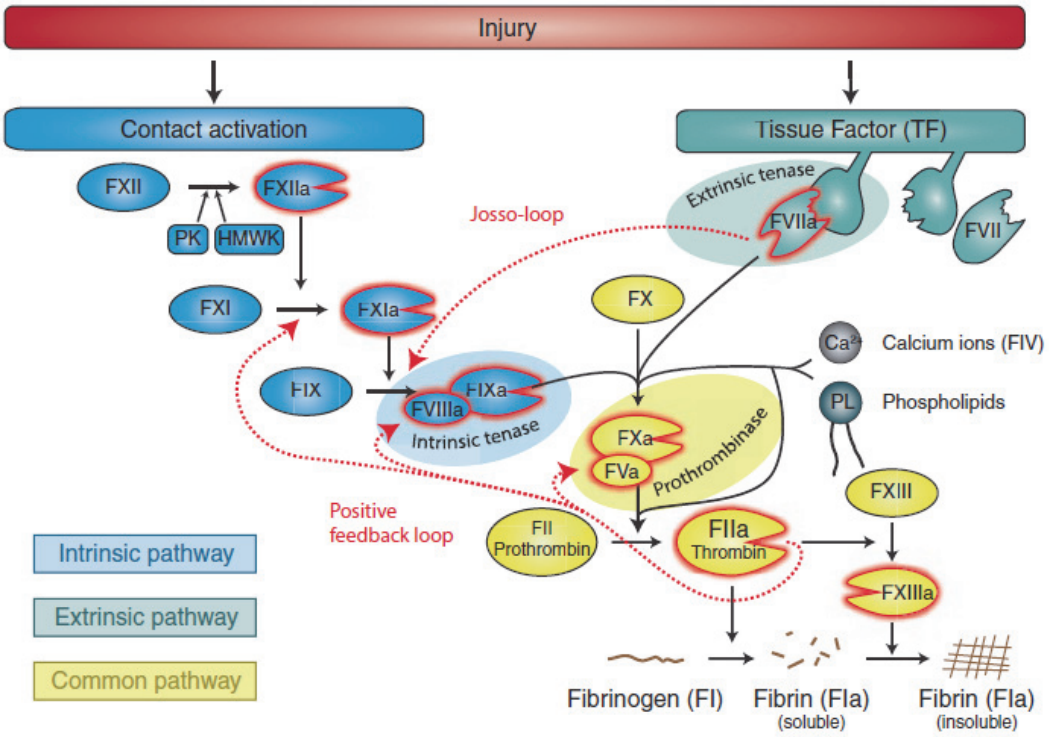


Figure 5 : Schéma du modèle de la coagulation en cascade

(Extrait de : Mussbacher et coll., Fundamentals of Vascular Biology, 2016)

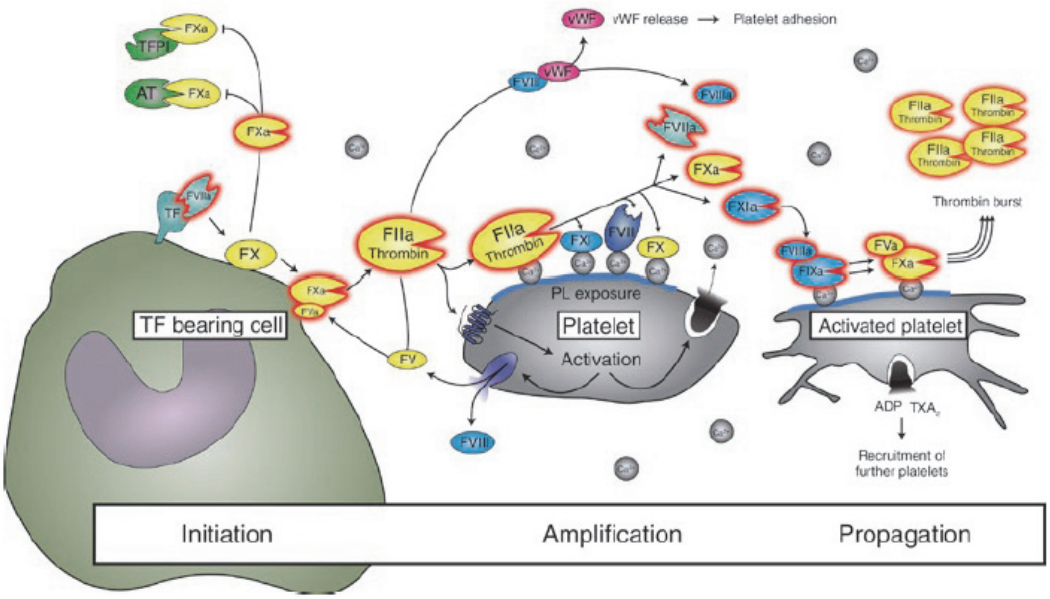


Figure 6 : Schéma du modèle cellulaire de la coagulation

(Extrait de : Mussbacher et coll., Fundamentals of Vascular Biology, 2016)

2.1.2.1. Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire (FT) joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la coagulation, il est notamment porté, dans la circulation sanguine, par les cellules et les MV. Je vais donc brièvement présenter cette molécule.

Le FT, également appelé facteur III de la coagulation, thromboplastine tissulaire ou encore CD142 [116] est le principal activateur de la coagulation. C'est une protéine transmembranaire glycosylée de classe 2 de la superfamille des récepteurs de cytokines [117]. La protéine mature est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 263 acides aminés composée 1) d'un domaine extracellulaire N-terminal de 219 acides aminés contenant 2 domaines fibronectines nécessaires à la fixation du facteur VII (FVII) activé (FVIIa) 2) d'un peptide d'ancrage de 23 acides aminés et 3) d'un domaine intracellulaire C-terminal de 21 acides aminés, qui, malgré sa courte taille, contient 2 sites de phosphorylation qui peuvent être palmitoylés [118] ou ubiquitinylés [119]. En situation pathologique (notamment le cancer), il a été montré que la phosphorylation sur la sérine 253 du domaine intracellulaire par la protéine kinase C [118,120] ou sur la sérine 258 par p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK)[121] pouvaient induire un changement de conformation du FT, affectant la liaison du ligand, mais également de manière intéressante pouvait modifier l'incorporation du FT sur les MV [121–123]. La fonction principale du FT va être de fixer le FVII à la surface cellulaire et ainsi initier la coagulation. Par ailleurs, d'autres fonctions du FT ont été décrites et notamment dans

l'activation de voies intracellulaires. En effet, le complexe FT/FVIIa/FX peut-être cliver et ainsi activer les récepteurs PAR-2 et PAR-1 impliqués dans la métastase tumorale et l'angiogenèse [124]. Ce complexe permet également l'activation directe d'une voie intracellulaire décrite pour jouer un rôle dans la métastase tumorale, l'angiogenèse, le remodelage vasculaire, le recrutement des leucocytes et la réponse immunitaire [124]. Le FT a initialement été décrit comme étant uniquement exprimé, de manière constitutive, dans l'épithélium et les barrières périvasculaires du cerveau, de la peau, des poumons, de l'intestin et du placenta afin de former une enveloppe hémostatique protectrice [125]. Mais récemment, la vision initiale a évolué, car le FT a été décrit sur les cellules en contact avec le sang circulant telles que l'endothélium [126], les monocytes [127], les macrophages [128], et les granulocytes [129]. Mais il est également exposé sur les MV et présent dans une forme soluble [130,131]. Ces observations suggèrent que la cascade de la coagulation pourrait ne pas être nécessairement déclenchée par une lésion du vaisseau et que d'autres évènements intravasculaires encore partiellement inconnus pourraient être impliqués [132]. En revanche, il est souvent décrit que le FT en contact avec le sang serait sous forme inactive appelée «forme encryptée» ou forme réduite, cette forme peut être nitrosylée au niveau des cystéines 186 ou 209 ou convertit en disulfide mixte entre la cystéine 209 du FT et la thioredoxine ou le glutathion [133]. La dé-encryption par des agents oxydants tels que les ROS [134] ou l'action de la protéine disulfide isomérase (PDI)[135] serait nécessaire afin de former la liaison entre les cystéines 186 et 209 (forme oxydée) qui permet une affinité augmentée pour le VIIa et pour la reconnaissance du Xa [136].

Le principal inhibiteur du FT est le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor). C'est un inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz qui inhibe le complexe entre le FT/FVIIa/FXa en présence de calcium, mais également le complexe prothrombinase (constitué du FXa et du FVa de la coagulation). Il existe 2 formes de TFPI issues d'un épissage alternatif : le TFPIα et le TFPIβ. Le TFPIα, sécrété par les cellules endothéliales et par les mégacaryocytes, possède une région N-terminale suivie de 3 domaines Kunitz : le domaine K1 se fixant sur le FVIIa, le domaine K2 sur le FXa, et le K3 ne se fixe pas sur une protéase, mais est décrit pour se lier à la protéine S, ainsi qu'un domaine C terminal. Le TFPIα peut ainsi inhiber à la fois le complexe FT/FVIIa/FXa et le complexe prothrombinase. Le TFPIβ ne possède pas de domaine K3 et la région C terminale est remplacée par un ancrage GPI lui permettant de se fixer à la surface de la membrane des cellules endothéliales. Cependant l'absence de région C terminale l'empêche d'inhiber le complexe prothrombinase. Ainsi le TFPI va réguler l'initiation de la coagulation par le FT.

2.1.2.2. Initiation

Lors d'une blessure au niveau du vaisseau, les composants du sang sont exposés au FT cellulaire (fibroblastes, cellules musculaires lisses). Le FT va rapidement lier le FVIIa (seul facteur circulant dans sa forme active, environ 1% du FVII total) [137]. Le complexe FT/VIIa va activer du FVII circulant en FVIIa créant ainsi une boucle d'amplification, mais il va également activer le facteur X (FX) et le facteur IX (FIX). Le facteur X activé (FXa) et IX activé (FIXa) vont pouvoir générer une petite quantité de thrombine (appelé «thrombin spark») [138,139]. Le FX libéré va pouvoir se fixer à la membrane cellulaire et activer le facteur V (FV) pour former le complexe prothrombinase qui va générer de nouveau une petite quantité de thrombine. Le FX en circulation va pouvoir être inhibé par l'antithrombine (AT) ou l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI) alors que le IX sera faiblement inhibé par l'AT [140]. L'AT est considérée comme l'inhibiteur principal de la coagulation. Comme son nom l'indique, l'AT va bloquer la thrombine, mais aussi les FXa, FIXa et FVIIa. En situation physiologique, l'activité anticoagulante de l'AT s'exerce à la surface de l'endothélium où elle se lie à des glycosaminoglycanes. Elle va également pouvoir jouer un rôle anti-inflammatoire et cytoprotecteur en se fixant au glycocalyx [141].

2.1.2.3. Amplification

La petite quantité de thrombine générée va activer les plaquettes par l'intermédiaire des récepteurs activés par des protéases (PAR) appelées PAR-1 et PAR-4 [142]. Les plaquettes vont libérer le FV, le facteur VIII (FVIII) et le fibrinogène contenu dans leurs granules et vont exprimer des PL négatifs tels que la PS et la PE. Ces PL vont permettre la fixation des résidus d'acide γ-carboxyglutamique, chargés négativement, par l'intermédiaire d'un pont calcium, des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant (FVII, FIX, FX, prothrombine (FII))[143]. La thrombine va également libérer du FVIII à partir du vWF [144].

2.1.2.4. Propagation

Alors que l'agrégation plaquettaire commence à s'accélérer, le FIX et le FVIII se fixent à la surface des plaquettes pour former le complexe tenase. Ce complexe est capable de générer

rapidement une grande quantité de FXa. Le FXa forme ensuite le complexe prothrombinase avec le FVa et génère une grande quantité de thrombine : cette étape est également appelée « thrombin burst ». La thrombine va ensuite cliver le fibrinopeptide A du fibrinogène qui va permettre de débuter la polymérisation du fibrinogène. Le clivage du fibrinopeptide B va permettre la génération d'une matrice de fibrine insoluble [145]. La thrombine va également renforcer la solidité du thrombus en activant, dans un premier temps, le facteur XIII qui va rendre le caillot insoluble, et ensuite en activant l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) qui va prévenir la fixation du plasminogène sur la fibrine. La thrombine va également activer la protéine C qui, associée à son cofacteur la protéine S, va se fixer aux PL négatifs *via* le calcium et inactiver le FVa et le FVIIIa et ainsi inhiber la propagation du thrombus.

2.2. Rôle des microvésicules dans la coagulation

Les MV ont généralement été décrites comme ayant des propriétés procoagulantes. Il a été démontré que le FT véhiculé par ces MV joue un rôle clé dans les différents modèles animaux de thrombose associée au cancer (CAT) expérimental. Mais, d'autres mécanismes moléculaires impliquant des PolyPs ou de la phosphatidyléthanolamine (PE) pourraient également être impliqués. En pratique clinique, une association entre une augmentation du nombre de MV-FT ou de l'activité procoagulante de ces MV et la survenue de CAT a été démontrée dans les cancers pancréatiques et biliaires, suggérant qu'elles pourraient se comporter comme un biomarqueur prédictif de la CAT. Cependant, à ce jour, cette association n'a pas été confirmée dans d'autres types de cancers. **L'essentiel des connaissances autour de cette problématique a été développé dans la revue écrite au cours de ma thèse en annexe**. Dans cette revue, nous avons développé le rôle des MV dans la coagulation et la thrombose associée au cancer ainsi que les causes potentielles expliquant cette association limitée entre MV et CAT comprenant : (1) la diversité des mécanismes associant les MV et les différents types de cancers ; (2) un rôle plus complexe des MV dans l'hémostase intégrant leur activité anticoagulante et fibrinolytique; et (3) le manque de sensibilité, de reproductibilité et de normalisation des méthodologies actuelles permettant la mesure des MV.
Les points principaux ont été résumés dans les sous-parties ci-dessous.

2.2.1. Bases moléculaires des activités procoagulantes

Quelle que soit leur origine cellulaire, les MV ont généralement une activité procoagulante. Ce potentiel procoagulant repose essentiellement sur l'expression de PL anioniques, notamment la PS et de celle du FT, l'effecteur principal de l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation (Figure 7).

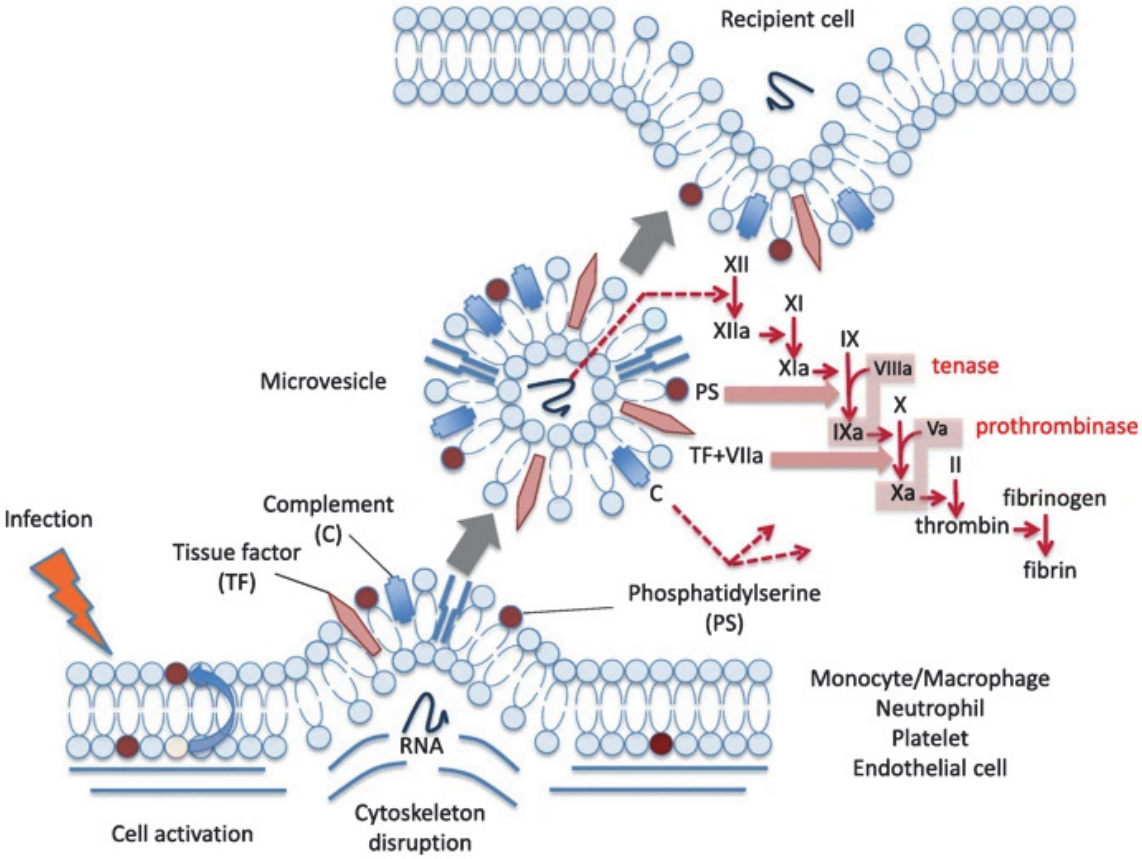


Figure 7 : Bases moléculaires de l'activité procoagulante décrites chez les microvésicules

(Extrait de : Iba et coll., J Int Care, 2018)

2.2.1.1. Activité dépendante des phospholipides

Comme décrit précédemment, la perte de l'asymétrie membranaire au cours de la formation des MV, permet l'externalisation de la PS sur le feuillet externe de la membrane cellulaire [146]. Les charges négatives à la surface cellulaire sont ainsi accessibles aux facteurs de la coagulation et favorisent la formation du complexe prothrombinase et la formation de thrombine à la surface des MV [147]. Le blocage de ces zones riches en PL a entraîné une inhibition de 200 à 1000 fois de l'activité catalytique des complexes tenase et prothrombinase. Les surfaces riches en PS sont donc

essentielles dans la promotion des activités catalytiques et ont également montré leur importance dans l'activité procoagulante médiée par le FT [148]. Par ailleurs, il a été observé par microscopie électronique l'existence de PMV ne possédant pas de PS à leur surface [149] remettant ainsi en cause leur mécanisme de sécrétion, mais également l'activité procoagulante de cette sous-population.

2.2.1.2 Activité du facteur tissulaire

Les MV exprimant à la fois la PS et le FT (Figure 12) ont une capacité procoagulante le plus élevée [150]. En effet, tout comme sur les cellules, le FT sur les MV est capable d'activer le FVII en VIIa qui à son tour catalyse l'activation des facteurs FX et FIX et permet l'initiation de la coagulation sanguine. De nombreux modèles animaux de thrombose, notamment chez la souris, ont montré le rôle du FT vectorisé par les MV dans la formation du thrombus [151,152]. Ceci a suscité l'intérêt de pouvoir mesurer ces MV procoagulantes en clinique humaine [153]. Des approches antigéniques telles que la cytométrie de flux, permettant de dénombrer les MV en fonction de leur origine cellulaire, et des tests fonctionnels évaluant leur l'activité procoagulante ont été développés [154]. L'activité procoagulante des MV est hétérogène en fonction de l'expression à leur surface de PS et de FT, selon le type cellulaire et l'inducteur de la vésiculation [155–157]. En revanche, les MV détectées physiologiquement expriment de la PS, mais n'expriment pas ou très peu de FT à l'état physiologique. Cependant, des niveaux élevés de FT et de PS sur les MV ont été rapportés dans différentes situations pathologiques telles que les syndromes coronaires aigus, le diabète, le sepsis, les anémies drépanocytaires ou le cancer [150]. Dans ces contextes pathologiques, le FT est majoritairement porté par les MV leucocytaires, endothéliales ainsi que tumorales.

2.2.1.3. Fonctions anticoagulantes et fibrinolytiques des microvésicules

Plus récemment, le concept de MV exclusivement procoagulantes a été challengé par l'identification de MV portant des fonctions anticoagulantes pouvant potentiellement contrebalancer leurs fonctions procoagulantes. En effet, des molécules régulatrices telles que le TFPI [158], le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) [159] et la thrombomoduline [160] ont été rapportées non seulement sur des MV générées *in vitro* et aussi sur les MV circulantes chez des patients avec infarctus du myocarde ou dans le diabète [161,162]. Des données ont par la suite décrit une activité fibrinolytique pouvait également contrebalancer l'activité procoagulante des MV. Également, des données récentes générées principalement par notre laboratoire, ont montré que les MV d'origines leucocytaires,

endothéliales et tumorales expriment un panel complet de molécules leur permettant de générer efficacement de la plasmine [163]. Cette capacité de génération de plasmine (MV-CGP) implique la liaison du plasminogène et de ces activateurs tels que l'urokinase (uPA) ou le tissue-type plasminogen activator (tPA) sur des récepteurs spécifiques à la surface des MV [164]. De manière intéressante, nous avons également retrouvé cette activité de MV-CGP sur des MV circulantes de patients souffrant de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), d'athérosclérose ou d'un syndrome des antiphospholipides [165]. Les MV de patients en choc septiques montrent également MV-CGP avec un niveau d'activité hétérogène en fonction des patients. De manière intéressante, cette activité mesurée à la prise en charge des patients est significativement plus élevée chez les patients qui survivent en comparaison des patients qui décèdent dans les 30 jours. Par opposition, un niveau bas de MV-CGP est associé à une coagulopathie, une hypoxie et un score de défaillances d'organes plus élevé. Ces données préliminaires sont à l'origine d'un PHRC interrégional (PHRC MISS, APHM) pour évaluer la valeur pronostique de la MV-CGP dans le choc septique. L'hypothèse est que le maintien d'une activité fibrinolytique élevée des MV pourrait limiter le risque microthrombotique de ces patients.

2.3. Microvésicules associées au risque de thrombose en clinique

Au cours des dix dernières années, différentes études ont mesuré les taux MV circulantes dans un large panel de pathologies thrombotiques artérielles ou veineuses. Ces études ont été discutées dans diverses revues [150,163,166–174]. Les principales études prospectives sont répertoriées dans le Tableau 2.

Un lien a été trouvé entre le FT et la TEV dans cinq études rétrospectives [8,9,175–177]. Elles ont mis en évidence des taux accrus de MV portant le FT en circulation (mesurés par cytométrie en flux et essais fonctionnels) chez les sujets atteints de cancer avec TEV par rapport à des sujets sans TEV. Les taux les plus élevés sont retrouvés chez les patients atteints de cancer pancréatiques. Le premier article qui soutient l'hypothèse selon laquelle, des niveaux élevés d'activité des MV-FT sont associés à la TEV dans le cancer du pancréas, a été publié par Khorana et coll. [178]. Depuis ce travail initial, plusieurs autres études prospectives ont mesuré les MV-FT pour évaluer la relation entre les MV-FT et le développement de la TEV. Une association positive a été trouvée dans les études utilisant la cytométrie en flux et les tests d'activité [9,10,179,180], y compris les études les plus récentes, [11,12,181], alors qu'elle n'a pas été trouvée dans d'autres grandes études [182–184]. Une méta-analyse récente sur la

relation entre les MV-FT et les patients cancéreux atteints de TEV a conclu que la présence accrue de MV-FT représentait un risque accru de TEV avec un odds ratio (OR) global de 1,76 [13].

Ainsi, l'association la plus forte a été retrouvée dans les cancers pancréatobiliaires et les glioblastomes. Ces résultats positifs ont été le support d'une étude de phase II de prévention primaire de la thrombose veineuse par enoxaparine dans laquelle les MV-FT sont utilisées pour guider une décision de thromboprophylaxie chez des patients avec un cancer avancé [185]. Les patients avec un niveau élevé de MV-FT ont été randomisés avec de l'enoxaparine (n=23) ou une simple observation (n=11). Une réduction de 80% des thromboses a été observée dans le bras enoxaparine comparé au groupe contrôle (5.6% vs 27.3%). Basé sur ces résultats, un large essai de phase III est en cours.

En dehors d'un contexte tumoral, les MV ont également été évaluées à distance de l'évènement thromboembolique veineux. Trois études montrent une augmentation des MV exprimant de la PS ou du FT par cytométrie en flux chez les patients ayant eu une thrombose [186–188]. Trois autres études réalisées par Campello et coll. incluant 398 patients porteurs d'une thrombophilie héréditaire (facteur V Leiden, mutation G20210A de la prothrombine, déficits en antithrombine, protéine C ou protéine S) ont montré des niveaux significativement plus élevés de MV exprimant la PS chez les patients présentant un antécédent de thrombose veineuse en comparaison des patients n'ayant jamais eu de thrombose, malgré au minimum 3 mois de thérapie anticoagulante [189–191]. D'autre part, en mesurant l'activité procoagulante des MV dépendante du FT, Thaler et coll. n'ont pas montré de modification de l'activité des MV dépendante du FT sur des prélèvements répétés pendant la durée du traitement anticoagulant [192]. L'activité procoagulante des MV dépendante de la PS reste également inchangée chez ces patients après l'arrêt de l'anticoagulation [193,194]. Deux autres études rétrospectives n'ont pas retrouvé d'association entre l'activité procoagulante des MV et la survenue de thromboses récurrentes [193,195].

Pris ensemble, ces résultats montrent l'existence d'une association entre une élévation du taux ou de l'activité MV-FT et le risque de thrombose veineuse. Cependant, cette association n’est retrouvée que dans des cancers avec un très haut risque de thrombose tels que le cancer pancréatobiliaire. Comme illustré dans la revue en annexe, les causes potentielles expliquant cette association limitée entre les MV et la CAT comprenent les différents mécanisme de la CAT, un rôle plus complexe des MV dans l'hémostase intégrant leur activité anticoagulante et fibrinolytique; et le manque de sensibilité, de reproductibilité et de normalisation des méthodologies actuelles permettant la mesure des MV. Celles-ci vont être décrites dans le chapitre suivant.

Tableau 2 :Rôle des MV en tant que biomarqueurs pronostiques de la TEV chez les patients cancéreux

(Extrait de Lacroix et coll., Semin. Thromb. Hemost, 2019)

Patients	Total/With VTE	Follow-up	MV phenotype	Method	Reference (author, year)
Locally advanced or metastatic pancreatic cancer	11/02	Every 4 weeks for 20 weeks	TF +	Functional assay	Khorana et al, 2008[46]
Solid cancer	60/5	1 y	TF +	Impedance FCM	Zwicker et al, 2009[43]
Solid and hematological cancer	728/53	2 y	PS +	Functional assay	Thaler et al, 2011[53]
Solid and hematological cancer	299 (48 pancreatic)/ 49 (12 pancreatic)	2 y	TF +	Functional assay (chromogenic end point and kinetic)	Thaler et al, 2012[54]
Solid cancer	43/5	6 mo	Annexin V +	FCM	Van Doormaal et al, 2012[47]
Pancreatic Cancer	252/40	10 mo	TF +	FCM	Hernández et al, 2013[55]
Solid cancer	43/5	6 mo	TF +	Functional assay	Van Doormaal et al 2012[47]
Glioblastoma multiforme	61/11	7 mo	TF +	FCM	Sartori et al, 2013[48]
Pancreatobilary cancer	117/52	Not specified	TF +	Functional assay	Bharthuar et al, 2013[49]
Pancreatic cancer	65/11	6 mo–1 y	TF +	Functional assay	Woei-A-Jin et al, 2016[50]
Solid cancer	608 (90 pancreatic)/ 40 (10 pancreatic)	180 d	TF +	Functional assay (fibrin generation and FXa generation	Van Es et al, 2018[51]
Pancreatic cancer	41/9	1 y	TF +	Functional assay	Faille et al, 2018[52]

Légende: FCM : cytométrie en flux ; FXa: facteur X activé ; MV: microvésicule ; PS : phosphatidylsérine ; TF, facteur tissulaire ; VTE : thromboembolie veineuse.

Chapitre 3. Méthodes de mesure des activités procoagulantes des microvésicules

L'implication des MV dans l'hémostase et la thrombose en fait un biomarqueur potentiel dans la prédiction des événements thrombotiques. Le développement de tests permettant de mesurer l'activité procoagulante est donc nécessaire à la caractérisation de ce biomarqueur. Ce chapitre va développer l'importance de la maîtrise du préanalytique, des méthodes de purification et de caractérisation des MV afin de développer des tests sensibles et spécifiques. Les tests existants permettant de mesurer l'activité procoagulante seront ensuite décrits ainsi que leurs limites et la nécessité d'une standardisation de ces méthodes sera discutée.

3.1. Variables préanalytiques impactant sur la mesure des microvésicules

La mesure des MV comme potentiel biomarqueur a déjà montré des résultats prometteurs dans de nombreuses pathologies. L'objectif est d'intégrer les tests sur les MV comme tests de diagnostic *in vitro* (DM-IVD) en pratique clinique [196]. Il faut pour cela maîtriser les variables du préanalytique. Les enjeux du préanalytique sont d'améliorer la qualité et la fiabilité des résultats d'analyse des MV. Dans les cas d'échantillons plasmatiques, il est nécessaire 1) d'éliminer les cellules résiduelles telles que les plaquettes et les globules rouges tout en conservant les MV, 2) d'éviter la génération artéfactuelle de MV *ex vivo*, et enfin 3) de préserver les MV du prélèvement. La phase préanalytique possède une importance majeure dans la qualité et la fiabilité des résultats. En effet, de nombreux facteurs sont potentiellement source de variabilité (Figure 8 et Tableau 3). Ainsi, il a été montré dans différentes études que le choix de l'anticoagulant, la nature du tube de prélèvement, le mode de prélèvement, la taille de l'aiguille utilisée, le transport, le délai entre le prélèvement et la première centrifugation, le nombre, les vitesses et les durées de centrifugation, la congélation et sa température et sa durée et le mode de décongélation influencent la mesure des MV dans le plasma [197]. Ceci a rendu nécessaire la standardisation des étapes préanalytiques. Des indications concernant la standardisation de la collecte, la manipulation des échantillons ainsi que l'influence du mode de stockage ont été proposées [197–200]. Les sociétés savantes telles que l'ISTH [201,202] et l'ISEV [203] ont récemment émis des recommandations mises à jour dans lors du congrès de l'ISEV 2018 [204].

Les recommandations (résumées dans le Tableau 3) sont d'effectuer le prélèvement veineux avec une aiguille assez large (gauge 21 minimum) et de rejeter les premiers millilitres de sang prélevés afin de s'affranchir de l'impact de la lésion vasculaire induite par la ponction veineuse. L'utilisation de tubes en plastique semble moins activer les plaquettes que les tubes en verre. L'anticoagulant à utiliser, pour minimiser l'activation cellulaire, est toujours sujet à débat. Plusieurs études favorisent les tubes citrate [197,205], notamment pour leur utilisation dans les tests de coagulation, alors que d'autres montrent que les tubes EDTA peuvent fournir une meilleure stabilité de l'échantillon pour la mesure des MV plaquettaires et érythrocytaires [199,206]. Une étude menée par György *et coll.* a recommandé l'utilisation d'acide-citrate-dextrose (ACD) pour l'étude des MV, car l'ACD bloque le processus de vésiculation *in vitro* et n'interfère pas avec les analyses de protéines ou d'ARN [207].

Les prélèvements doivent être transportés avec précaution, de préférence en position verticale afin de limiter toute agitation des tubes et d'effectuer en laboratoire deux centrifugations pour éliminer les plaquettes. Le délai entre le prélèvement et la première centrifugation ne devrait pas excéder 2 heures puisque, au-delà, le taux de MV augmente, notamment la sous-population plaquettaire et elles peuvent également s'agréger à la surface des granulocytes et des monocytes au bout de 3h notamment avec les tubes citrates et ACD [206]. Les centrifugations ont ainsi pour but de séparer le plasma des cellules et d'éliminer les plaquettes résiduelles, ces dernières pouvant être à l'origine d'une génération artéfactuelle de MV. Dans ce but, il est recommandé de pratiquer deux centrifugations successives à 2.500g pendant 15 minutes à température ambiante, afin d'obtenir un « platelet-free plasma » (PFP) contenant les MV. Dans certains cas, il semble possible de congeler les échantillons de plasma à -80°C pendant des années, mais il est recommandé d'éviter plusieurs cycles de congélation-décongélation. Bien sûr, les facteurs influençant la phase préanalytique n'ont pas la même importance en fonction du paramètre ce que l'on souhaite mesurer : il est essentiel de retirer soigneusement les plaquettes si on souhaite mesurer les PMV ou l'activité procoagulante des MV, mais ceci est sans doute moins important si on recherche l'ARN des MV tumorales. Les conditions peuvent également varier en fonction du fluide corporel étudié : les conditions de centrifugation ne seront pas les mêmes entre le plasma, les fluides pleuraux et les urines. L'influence des variables préanalytiques sur le résultat de certaines techniques caractérisant les MV a particulièrement été documentée pour la cytométrie en flux [198,206,208,209], les analyses de protéomique [210], l'analyse par microarray [211], et également des tests procoagulants [199,200,205]. Le préanalytique est une préoccupation majeure dans un domaine émergeant comme les MV où la standardisation n'est pas encore suffisamment généralisée. Il est essentiel de souligner que bien que les MV soient présentes dans tous les fluides biologiques, la plupart des recommandations n'ont été vérifiées que pour du sang

humain. De plus, ces recommandations n'ont été acceptées que pour certaines méthodes d'analyse (cytométrie en flux, test de génération de thrombine, STA-procoag-PPL), et uniquement pour les MV. Ainsi, il est nécessaire de développer ces analyses de préanalytique sur les MV afin d'optimiser le développement de tests spécifiques, sensibles et standardisés.

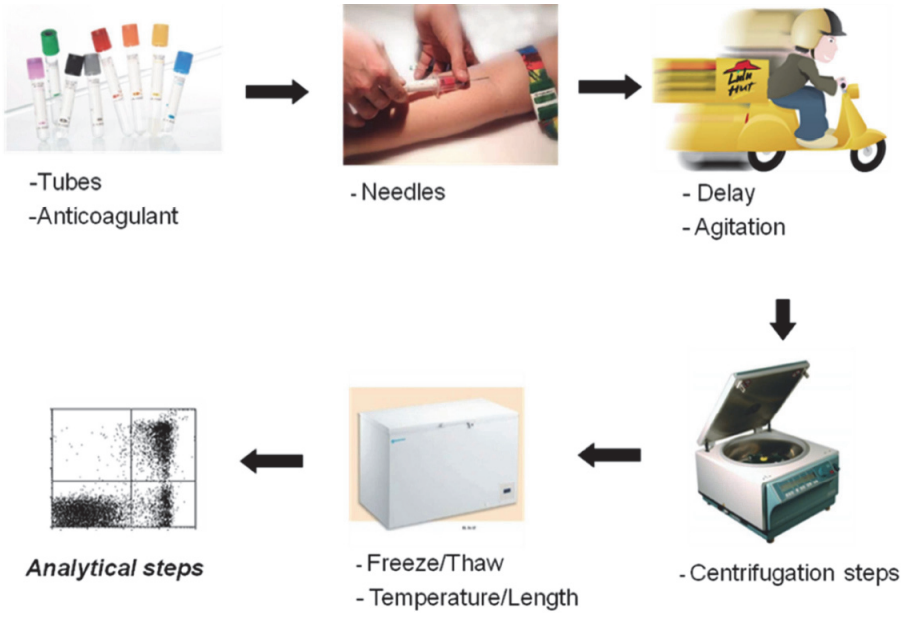


Figure 8 : Étapes du processus préanalytique pouvant influer sur le dosage des microvésicules

(Adapté de Lacroix et coll., J Thromb Haemost, 2012)

Tableau 3 : Protocole préanalytique recommandé pour l'analyse des microvésicules circulantes

(Adapté de Lacroix et coll., J Thromb Haemost, 2012)

Paramètres pré-analytiques	Recommandations
Nature du tube	Tubes citratés
Prélèvement sanguin	Aiguille assez large (21 G minimum) Rejeter les premiers millilitres de sang
Délai avant la première centrifugation	≤ 2 heures
Transport des tubes	Dispositif maintenant les tubes verticaux
Protocole de centrifugation	Deux centrifugations successives : 2500g 15min à température ambiante
Conservation du PFP	-80°C et décongélation rapide au bain-marie

Légende : PRP = platelet-free plasma

3.2. Techniques de purification des microvésicules

Dans la plupart des cas, l'analyse des MV peut être effectuée directement sur le PFP, mais pour diverses applications, notamment les dosages fonctionnels ou la recherche plus fondamentale, l'isolement des MV des fluides corporels est nécessaire. De nombreuses revues détaillent différentes techniques pour purifier les MV [212–215] (Tableau 4). Actuellement, les techniques de centrifugation restent encore les plus largement utilisées pour la purification des MV [212]. Ces méthodes sont utilisées depuis de nombreuses années. Cependant, cette méthode présente de nombreuses limites : la formation d'agrégats entrave le dénombrement correct des MV et a un impact sur la qualité de l'imagerie en microscopie. La coprécipitation de protéines solubles ou d'ARN fausse les résultats d'essais fonctionnels, western blot, PCR ou des techniques « omiques ». D'autre part, les résultats, obtenus avec le même échantillon, la même force, mais utilisant un rotor différent, sont significativement différents, ce qui entrave la comparaison interlaboratoire [216]. De plus, la viscosité élevée du plasma influence le rendement de purification par centrifugation [217]. Ainsi, bien que très pratique, la centrifugation n'est pas une bonne méthode pour purifier les MV.

Des méthodes alternatives, résumées dans le Tableau 4, sont disponibles. Parmi elles, les techniques de nanofiltration et de précipitation sont également très rapides, mais entraînent généralement une faible pureté. La flottation utilisant une ultracentrifugation de bas en haut dans un gradient de sucrose [218,219] ou d'iodixanol permet une bonne pureté, mais prend beaucoup de temps. Le tri de MV, utilisant la cytométrie par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), est possible pour

les larges MV, mais est encore à ses débuts. Les immunocaptures sur billes magnétiques sont très intéressantes pour la purification de sous-ensembles de MV, cette méthode sera illustrée plus tard dans la partie décrivant la caractérisation fonctionnelle des MV. Enfin, la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) semble une technique intéressante étant donné les avantages qu'elle présente [215]. Avec cette méthode les MV peuvent être facilement séparées des protéines et des HDL, car le principe de séparation est basé sur la différence de taille. Les travaux réalisés dans l'équipe de Nieuwland en 2014 utilisent des billes de sépharose dans une colonne de SEC avec des pores de diamètre d'environ 75 nm. Ainsi une petite vésicule, avec un diamètre inférieur aux pores, entre dans la matrice et son trajet est retardé par rapport aux vésicules et lipoprotéines de plus de 75 nm qui ne peuvent pas entrer dans les billes. Les plus petites vésicules présentent dans la fraction vésiculaire ont un diamètre de 70 nm ou plus [220]. Ainsi la SEC va permettre permet une bonne séparation entre les MV et les protéines libres [221]. De plus cette technique permet de conserver l'activité fonctionnelle des MV [220]. En pratique, la SEC peut être combinée avec une autre technique pour concentrer l'échantillon. Des expériences combinant l'ultrafiltration tangentielle et la SEC ont permis d'obtenir des rendements compris entre 20 et 40% correspondant à ceux obtenus avec l'ultracentrifugation [222,223,224].

Tableau 4 : Comparaison des différentes techniques de purification des microvésicules

Méthodes de purification	Avantages	Limites
Nanofiltrations	Rapide	Faible pureté
Précipitations	Rapide	Faible pureté
Flotation (exosomes)	Bonne pureté	Temps
Tri par FACS (MV)	Bonne pureté, sous-populations	Faible rendement, MV pré-marquées, Prix
Immunocaptures	Bonne pureté, sous-populations	Faible rendement, Prix
Chromatographie par Exclusion de taille	Pureté intermédiaire, Rendement, Prix, temps	

Légende : FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting : méthode de dénombrement, de tri et d'isolement de MV

3.3. Méthodes de caractérisation des microvésicules

Différentes méthodologies sont disponibles pour mesurer les MV dans des échantillons biologiques. Elles peuvent être sous-regroupées en deux catégories principales (Tableau 5). Certaines d'entre elles, telles que la cytométrie en flux, la détection à impulsions résistives accordables (ou Tunable Resistive Pulse Sensing : TRPS), la microscopie électronique (ME), ou la microscopie à force atomique (AFM), fournissent des informations sur une seule particule. L'autre groupe fournit une information globale d'un ensemble de MV, comprend les tests immunologiques, les tests fonctionnels et les tests hybrides associant la capture et le test fonctionnel. Elles ont toutes des avantages et des limites pour mesurer les MV. Dans cette présentation, je me concentrerai sur la cytométrie en flux et les tests fonctionnels utilisés pour l'étude des propriétés procoagulantes des MV.

Tableau 5 : Méthodes utilisées pour caractériser les microvésicules

(Adapté de Cointe et coll., PMPs Springer, 2017)

	Méthode	Quantification	Phenotype	Taille	Limites
EV individuelle	Cytométrie en flux	+	+	Limited	Agrégats, diamètre > 200nm
	Suivi individuel de vésicules (NTA)	+	±	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)
	Détection à impulsions résistives accordables (TRPS)	+	-	+	Artefacts (débris cellulaires, protéines et lipides)
	Microscopie électronique	Limited	Limited	+	Arfefacts pendant la préparation de l'échantillon
	Microscopie à force atomique (AFM)	Limited	Limited	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)
Culot de EV	Tests immunologiques (ELISA)	+	+	-	Accessibilité de la PS ou de molécules activées portées par les MV
	Tests fonctionnels	+	+	-	Accessibilité de la PS ou de molécules activées portées par les MV
	Spectrométrie de masse	-	+ (extraction de protéines)	-	Echantillon> 10µg

3.4. Caractérisation des activités procoagulantes

Les différents tests procoagulants ont été développés dans une revue en annexe et résumés dans le tableau n°5. Ces tests comprennent des tests antigéniques, fonctionnels ou

combinant ces 2 stratégies. Ils visent à mesurer le FT sur les MV ou la présence de PL procoagulants.

Tableau 6 : Tests procoagulants dépendants des microvésicules.

(Inspiré de Lacroix et coll., Semin Thromb Haemost, 2019)

	Test	Cible	Méthode	Pré-analytique	Kit commercial	Références
Antigénique	Cytométrie en flux	PS, FT, FT/TFPI	Immunofluorescence	PFP	Non	Poncelet et al, Trasci, 2015, Nolan et al, Platelets, 2017
	Cytométrie en flux	Fibrin	Immunofluorescence	PFP	Non	Mege et al, Oncotarget, 2017
	Microscopie confocale à balayage	FT	Immunofluorescence	PFP / Centrifugation	Non	Hisada et al, Thromb Res, 2017
Fonctionnel	Test de génération de thrombine (CAT)	PS or FT	Génération de thrombine	PFP	Oui	Hemker et al, Pathophysiol. Haemost. Thromb., 2002
	STA-Procoag PPL	PS	Temps de coagulation	PFP	Oui	Exner et al, Blodd Coagul. Fribinolysis, 2003
	Test de génération de Facteur Xa	FT	Génération de FXa	Centrifugation	Non	Khorana et al, JTH, 2008 ; Woei-A-Jin, B J Cancer, 2016 ; Vallier et al, Thromb haemost , 2019
	Test de génération de fibrine	PS + FT	Génération de fibrine	Centrifugation	Non	Berckmans et al, Blood, 2011
Combiné	Zymuphen-MP ELISA Kit	PS	Génération de thrombine	Immunocapture (PS) on PFP	Oui	Laroche et al, Platelets, 2017
	Zymuphen-MP TF	FT	Génération de FXa	Immunocapture (PS) on PFP	Oui	Laroche et al, Platelets, 2017

Légende : ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ; PFP : Platelet-Free Plasma ; FT : Facteur Tissulaire ; TFPI : Inhibiteur de la voie du Facteur Tissulaire.

3.5. Tests viscoélastométriques

Alternativement, des tests plus globaux ont été proposés pour suivre la formation du caillot de fibrine ainsi que sa lyse après incubation de MV purifiées. Les premiers tests viscoélastiques, connus sous le nom de thrombo-élastographie, ont été rapportés en 1948 par Hartert [225]. La thrombo-élastographie utilise la rotation mécanique pour détecter la dynamique globale de la formation, de la stabilisation et de la dissolution de caillots, supposée refléter une hémostase *in vivo* [226]. La thrombo-élastographie (TEG®, Haemonetics®, États-Unis) et la thromboélastométrie rotationnelle (ROTEM®, Haemoview Diagnostics, Australie) sont les deux instruments de contrôle viscoélastiques les plus courants (Figure 9). Le TEG®5000 évalue la formation de caillots de sang total par une tige suspendue dans une cupule oscillante, chauffée à 37°C. Au fur et à mesure que le caillot se forme, les brins de fibrine augmentent la résistance à la rotation de la tige, puis à mesure que la fibrinolyse évolue, ces brins se décomposent, réduisant cette résistance. Ces changements de résistance sont ensuite transmis par un détecteur qui évalue les paramètres quantitatifs de l'échantillon pour produire une représentation graphique. Dans le cas du ROTEM®, c'est la tige en plastique plutôt que la cupule qui bouge. Contreras-Garcia et coll. ont montré que le TEG est sensible à l'ajout et à la déplétion en MV [227]. Mitchell et coll. ont montré que chez des patients présentant un hémothorax, l'augmentation de la quantité des MV dans le plasma était accompagnée d'un profil procoagulant au ROTEM [228]. Chan et coll. ont montré que la déplétion des leucocytes dans le sang diminuait la quantité de MV circulantes et diminuait ainsi le potentiel hémostatique du plasma dans le ROTEM [229]. Chez des patients en choc septique, la concentration en LPS dans le sang est corrélée avec l'activité FT sur les MV et également au profil procoagulant sur le ROTEM. Enfin chez des patients traumatiques, Fröhlich et coll. ont montré une corrélation inverse entre la quantité de EMV et certains paramètres du ROTEM concluant non seulement à une augmentation de l'activité procoagulante, mais également de l'activité fibrinolytique apportée par ces vésicules [230].

Pris ensemble, ces données montrent que les tests viscoélastométriques sont adaptés à la mesure de la BCL des MV en situations pathologiques. Cependant, la limite principale de ces tests est l'obligation de rajouter des inducteurs de coagulation et de la fibrinolyse pour réaliser ces tests dans des temps courts. La forte concentration de ces agents (souvent FT et tPA) a tendance à totalement masquer l'effet des MV. Ces tests sont plus adaptés pour étudier le potentiel d'inhibition de la coagulation et de la fibrinolyse.

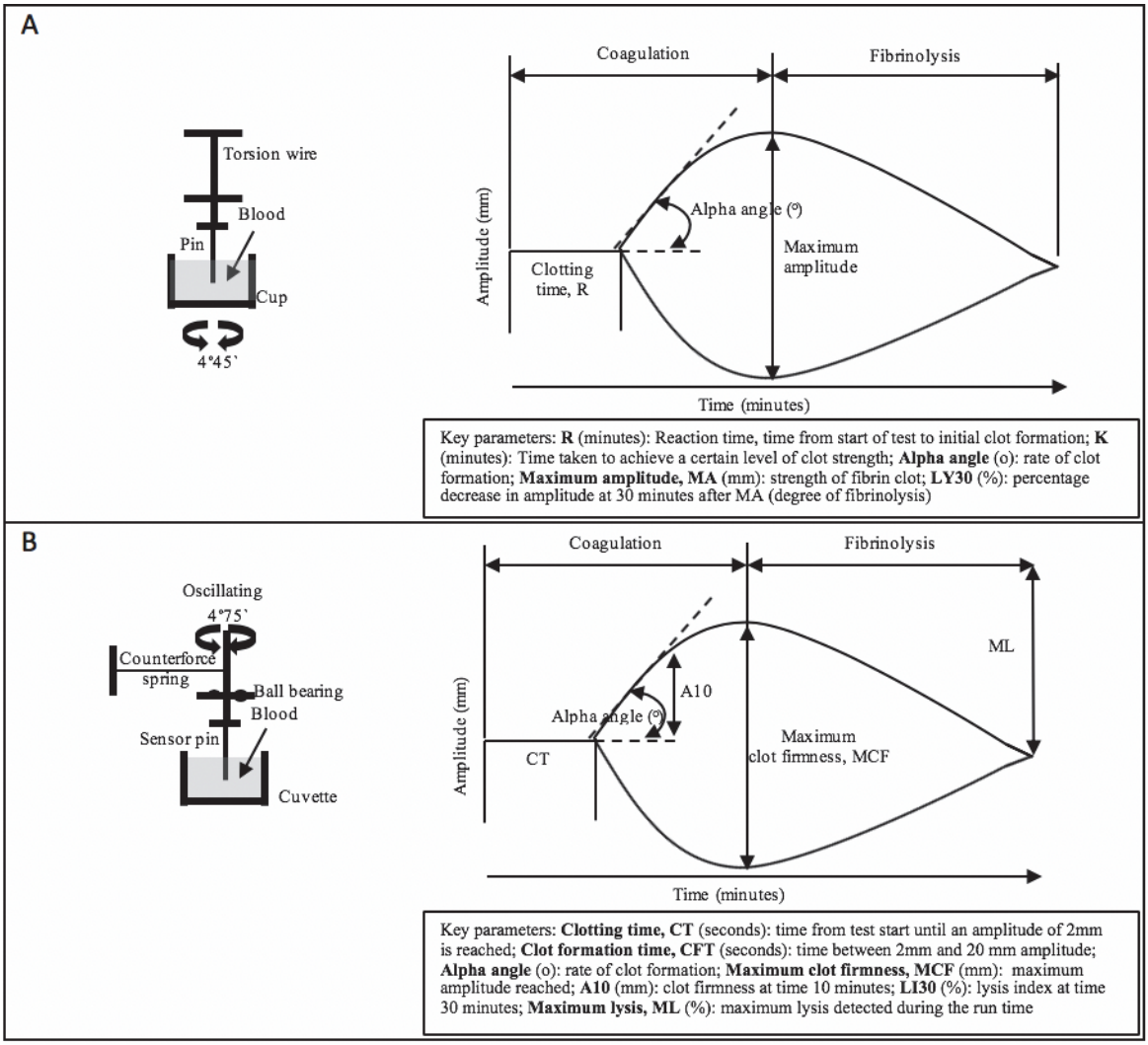


Figure 9 : Principe des tests (A) TEG® et (B) ROTEM®

(Extrait de : Lim et coll., Thromb Res, 2019)

3.6. Limites des tests procoagulants

Les tests procoagulants mesurant le FT possèdent, encore aujourd'hui, des limites par méconnaissance des variables préanalytiques influençant sa mesure, un nombre réduit de techniques de purification des MV, et enfin un manque de spécificité et de sensibilité des tests de mesure de l'activité du FT.

Les étapes critiques de préanalytiques de mesure telles que décrites par Nigel Key sont 1) la contamination du sang par le sous-endothélium vasculaire riche en FT lors du prélèvement sanguin, 2) l'utilisation d'un anticoagulant pouvant influencer la fixation du TFPI sur le FT et 3) les cycles de congélation et décongélation du plasma favorisent l'exposition des PL négatifs à la surface des MV augmentant ainsi l'activité du FT [154].

Dans la plupart des tests fonctionnels, les MV doivent être purifiées à partir des fluides corporels avant d'effectuer le test. L'ultracentrifugation a été utilisée depuis de nombreuses années. Cependant, l'étape de centrifugation diminue considérablement la reproductibilité des tests et peut entraver les comparaisons interlaboratoires. L'immunocapture sur des billes magnétiques peut représenter une alternative utile [231,232].

Le manque de sensibilité des tests procoagulants est illustré, par le fait, que l'activité MV-FT est mesurée uniquement dans le cas de cancers extrêmement procoagulants, comme le cancer pancréatique. En effet, une activité MV-FT a été mesuré uniquement chez les patients à fort risque de thrombose. L'amélioration de la sensibilité pourrait permettre de détecter les patients à risque plus modéré de thrombose. De plus, l'augmentation de la sensibilité augmenterait la plage de mesure de l'activité MV-FT permettant d'observer des diminutions de cette activité. Dans l'optimisation de nouveaux tests mesurant l'activité procoagulante dépendante du FT, les variables à prendre en compte incluent non seulement la sensibilité, mais également la spécificité du test FT. La spécificité est définie ici comme l'activation du FX dépendante du FT. Dans les tests fonctionnels, elle est généralement obtenue par la soustraction de l'activité totale (condition isotype contrôle) par l'activité non-spécifique (condition anticorps bloquant spécifique du FT). Ainsi, Nigel Key montre dans sa revue qu'en utilisant le test de capture de l'activité MV-FT [231], environ deux tiers de l'activation du FX dépendant de VIIa était inhibée par un anticorps bloquant anti-FT, alors que plus de 95% de la génération Xa était dépendante de FT dans les MV obtenues à partir du plasma après une exposition au lipopolysaccharide. À l'inverse, dans les tests antigéniques tels que la cytométrie en flux, on ne peut pas discerner à l'heure actuelle, le FT étant capable d'activer le FX en FXa (FT décrypté) du FT inactif (ou encrypté). La cytométrie en flux permet de mesurer l'expression de la PS grâce à la fixation de l'annexine V fluorescente ou avec la lactadhérine et le FT en utilisant des anticorps spécifiques. Cependant, malgré un rôle prometteur dans la détection des sous-populations de MV, elle est limitée par un manque de sensibilité, n'étant pas capable de détecter des éléments avec une taille inférieure à 300 nm.

Le préanalytique, les techniques de purification des MV et la sensibilité et la spécificité des tests restent encore à améliorer et fournissent une potentielle explication à la performance limitée de la mesure des MV-FT en tant que biomarqueur permettant de prédire avec précision le risque de thrombose.

3.7. Comparaison et standardisation des essais mesurant l'activité procoagulante

Parmi les tests mesurant les MV-FT, seule la cytométrie en flux bénéficie jusqu'à présent d'un effort de normalisation permettant de réduire la variabilité interlaboratoire [233,234,201,197,235]. Ce travail fait actuellement l'objet d'un atelier collaboratif sur la normalisation des VE qui réunit les experts de trois sociétés internationales : la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV), la Société internationale pour l'avancement de la cytométrie (ISAC) et la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH). Toutefois, il reste encore à élaborer des normes internationales pour comparer les résultats issus de différents laboratoires [236]. À ce jour, seulement 3 études ont comparé la mesure des MV-FT [205,237,181]. En 2012, Lee et coll. ont montré que le test de génération de FXa était généralement plus sensible que les tests antigéniques tels que la cytométrie en flux et les tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). En 2016, Tatsumi et coll. ont montré que ce test était également plus sensible que le test fonctionnel commercial mesurant l'activité MV-FT (Zymuphen-MPTF®). Enfin, van Es et coll. a récemment montré une faible corrélation entre le test de génération de Xa et le test de génération de fibrine. Cependant, à ce jour, il n'y a pas eu de comparaison globale de toutes les techniques mesurant les MV-FT. Un nouvel atelier comparant la sensibilité et la spécificité des tests, permettant de mesurer les MV-FT dans des échantillons de plasma commencera cette année. Les résultats de cette étude fournira certainement des informations importantes pour progresser vers les méthodes optimales de mesure des MV et des outils de normalisation obligatoires pour construire des études multicentriques robustes dans le domaine de la thrombose.

3.8. Conclusion/Perspectives

Actuellement, il manque des données robustes comparant les différentes méthodes fonctionnelles mesurant le potentiel procoagulant des MV. Certaines recommandations ont été émises [202,236]. Il est par exemple recommandé que les nouveaux tests procoagulants soient validés en utilisant le modèle de sang stimulé au LPS. Ce modèle, connu pour augmenter l'activité coagulante dépendante du FT, permettrait de s'assurer de la spécificité de la mesure. Les utilisateurs doivent également savoir que les variables préanalytiques ont un impact important sur le test fonctionnel mesurant l'activité procoagulante des MV. La purification des MV par centrifugation à grande vitesse contribue à la faible reproductibilité des tests fonctionnels en cours. Le développement de méthodes alternatives pour extraire les MV du plasma tout en maintenant une bonne sensibilité et spécificité des tests est nécessaire.

III-TRAVAIL PERSONNEL

Article : Augmenter la sensibilité de mesure de l'activité du facteur tissulaire portée par les microvésicules

Les MV ont initialement été décrites pour leurs propriétés procoagulantes étant donné leur structure principalement composée de PL permettant l'assemblage des facteurs de la coagulation, mais également par l'expression du FT, principal activateur de la coagulation dans des pathologies telles que le choc septique ou le cancer. Le FT forme un complexe avec le FVII permettant dans un premier temps l'activation du FVII en FVIIa et dans un second temps la génération de FXa étape essentielle dans la génération de thrombine. Des niveaux élevés d'activité procoagulante dépendante des MV-FT sont détectables chez les patients présentant un risque accru de thrombose. Plusieurs méthodes ont été décrites pour mesurer l'activité du FT, mais elles sont caractérisées par une sensibilité et une spécificité limitée.

Le but de ce travail a été d'améliorer les performances du test d'activité MV-FT et d'évaluer ses performances en le comparant à un autre test couramment utilisé (Chapel Hill assay)

Pour réaliser cet objectif, nous avons tout d'abord démontré :

1) **La spécificité du test pour le FT**, confirmée en utilisant une lignée cellulaire knock-out pour le gène du FT dans laquelle l'activité mesurée n'a pas été inhibée en comparaison des MV de la lignée parentale et optimisée en montrant l'avantage de l'anticorps inhibiteur de l'activité MV-FT SBTF-1 possédant une activité inhibitrice plus forte qu'un autre clone très utilisé le HTF-1.
2) **La sensibilité du test** a été optimisée en choisissant les meilleures conditions de vitesse et de temps de centrifugation pour concentrer les MV et les concentrations en réactif permettant d'obtenir les plus fortes activités et notamment l'utilisation de FVII par rapport au FVIIa ou encore l'utilisation d'un substrat fluorogène.
3) **Le test a été validé** en réalisant des expériences utilisant du sang provenant d'individus sains, stimulés ou non par le LPS, ou de plasma enrichi avec 3 niveaux différents de MV.

4) **Le test a été comparé au test réalisé au laboratoire de Chapel Hill.** Les résultats ont montré que le nouveau test était plus sensible et que cela permettait de détecter l'activité de MV-FT dans des échantillons de PFP provenant d'individus sains contrairement au test de Chapel Hill.
5) **Les limites du test :** limité par une variabilité intertest, principalement due à l'étape de centrifugation.

En conclusion, nous avons amélioré la sensibilité du test d'activité de FT sans perdre de spécificité. Ce nouveau test pourrait être utilisé pour évaluer les niveaux de MV-FT en tant que biomarqueur potentiel du risque thrombotique chez les patients.

Thrombosis Research 182 (2019) 64–74

Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Full Length Article

Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay

Loris Vallier[a], Tarik Bouriche[b], Amandine Bonifay[a], Coralie Judicone[b,c], Jeremy Bez[b], Corentin Franco[a,b], Christophe Guervilly[d], Yohei Hisada[e], Nigel Mackman[e], Reaves Houston[e], Philippe Poncelet[b], Françoise Dignat-George[a,c,*], Romaric Lacroix[a,c]

[a] Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France
[b] Research and Technology Department, BioCytex, Marseille, France
[c] Department of Hematology and Vascular Biology, CHU La Conception, APHM, Marseille, France
[d] Medical Intensive Care Unit, North Hospital, APHM, Marseille, France
[e] Division of Hematology and Oncology, Thrombosis and Hemostasis Program, Department of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, United States of America

ARTICLE INFO

Keywords:
Microvesicles
Extracellular vesicles
Tissue factor
Procoagulant test

ABSTRACT

Introduction: The TF-FVIIa complex is the primary activator of coagulation. Elevated levels of microvesicle (MV) bearing tissue factor (TF)-dependent procoagulant activity are detectable in patients with an increased risk of thrombosis. Several methods have been described to measure MV TF activity but they are hampered by limited sensitivity and specificity. The aim of this work was to increase the sensitivity of the MV TF activity assay (called Chapel Hill assay).

Material and methods: Improvements of the MV TF activity assay included i/ speed and time of centrifugation, ii/ use of a more potent inhibitory anti-TF antibody iii/ use of FVII and a fluorogenic substrate to increase specificity.

Results: The specificity of the MV TF activity assay was demonstrated by the absence of activity on MV derived from a knock-out-TF cell line using an anti-human TF monoclonal antibody called SBTF-1, which shows a higher TF inhibitory effect than the anti-human TF monoclonal antibody called HTF-1. Experiments using blood from healthy individuals, stimulated or not by LPS, or plasma spiked with 3 different levels of MV, demonstrated that the new assay was more sensitive and this allowed detection of MV TF activity in platelet free plasma (PFP) samples from healthy individuals. However, the assay was limited by an inter-assay variability, mainly due to the centrifugation step.

Conclusions: We have improved the sensitivity of the MV TF activity assay without losing specificity. This new assay could be used to evaluate levels of TF-positive MV as a potential biomarker of thrombotic risk in patients.

1. Introduction

Microvesicles (MV) are extracellular vesicles released from the cellular membrane which have been described as procoagulant entities since their first report by Peter Wolf, 50 years ago [1]. This procoagulant phenotype relies on the exposure of anionic phospholipids, especially the phosphatidylserine (PS), on the external leaflet of the membrane, allowing the binding of coagulation factors at the MV surface by their carboxylglutamic acid-rich (GLA)-domains [2]. In addition, the presence of the coagulation initiator tissue factor (TF) on subsets of MV also significantly contributes to their procoagulant activity. Different studies that infused MV into mouse models of venous or arterial thrombosis demonstrate the procoagulant activity of MV *in vivo* [3–5]. Special attention has been given to cancer-associated thrombosis and the underlying mechanisms linking MV and venous thromboembolism (VTE) [6,7]. Data from animal models show that tumor-derived TF-positive MV are key players of thrombus formation by activating both the coagulation system and platelets [8–12].

These mechanistical data in murine models unequivocally demonstrate the contribution of MV TF in thrombus formation. Indeed, in humans, elevated plasma levels of MV TF have been associated with an increased risk of developing VTE in cancer patients. [13–18]. However,

* Corresponding author at: C2VN, UMR-1263, INRA-1260, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13010 Marseille, France.
E-mail address: francoise.dignat-george@univ-amu.fr (F. Dignat-George).

https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.011
Received 8 February 2019; Received in revised form 10 June 2019; Accepted 14 July 2019
Available online 19 July 2019
0049-3848/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

the association between levels of MV TF activity and VTE has been shown in patients with pancreatic cancer but no other types of cancer. This may be due to different pathophysiological mechanisms involved in the VTE formation in cancer [12] but also limited sensitivity of the MV TF activity.

Several methods have been described to measure MV TF in clinical samples using either activity or antigen-based assays [6,19]. However, the specificity and sensitivity of these assays is a concern. Among these assays, antigenic detection of TF on circulating MV provides the advantage to detect both cryptic and decrypted TF but the measurement of TF by flow cytometry remains very challenging because of the low levels of TF and concerns about some anti-TF antibodies [20]. Currently, there are two non-commercial methods that have been reported for MV TF activity that use either a kinetic monitoring of the specific substrate digestion (Leiden assay) or an end point reading (Chapel Hill assay) to measure factor Xa (FXa) generation [6,21,22]. These assays use an antibody which inhibits TF activity. A good correlation was found between these two versions of the FXa generation assay in 54 pancreatic cancer patients [23] and they proved to be more sensitive than commercial assays [24]. A recent paper described the Chapel Hill assay in details [25].

The aim of this work was to improve the MV TF-dependent FXa generation assay (MV TF activity assay) and evaluate its analytical performances in comparison with a currently used test (Chapel Hill assay).

2. Materials and methods

2.1. Blood sample processing

Blood samples from healthy donors, who signed an informed consent form, were collected and processed according to the current International Society on Thrombosis and Hemostasis guidelines [19,26]. Briefly, after a light tourniquet was applied, samples were drawn from the antecubital vein using a butterfly device with a 21-gauge needle. Blood was collected into 5 mL Vacutainer tubes containing 0.129 mol/L sodium citrate (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, US), and the first few milliliters were discarded. The samples were subjected to two successive centrifugations (2500*g* for 15 min at room temperature (RT)) to prepare platelet-free plasma (PFP). The PFP was homogenized before being aliquoted and stored at −80 °C until use.

For specific experiments, whole blood was incubated with bacterial lipopolysaccharide (LPS) (10 μg/mL, *Escherichia coli* O111: B4; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 h at 37 °C. Then PFP were prepared with two successive centrifugations (2500*g*, 15 min, RT with a Multifuge X3R centrifuge, rotor TX-1000, k-factor: 9470, Thermofisher, Courtaboeuf, France).

2.2. MV preparation

Human myeloid leukemia HL60 cells (Sigma Aldrich, Lyon, France) and human pancreatic BxPC3 cells (Sigma Aldrich, Lyon, France), regularly tested for mycoplasmas with Mycoalert (Lonza Biosciences, Basel, Switzerland) and DAPI (Sigma Aldrich, Lyon, France) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 1% of penicillin and 1% of streptomycin (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), in humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO_2. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion. Haploid human cell line (HAP1) cells and its derivative KO-TF-HAP1 made by CRISPR/Cas9 (Thermofisher, Courtaboeuf, France) were grown at 37 °C and 5% CO_2 in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% of FBS, 1% of penicillin and 1% of streptomycin. TF protein and TF gene expression were tested by flow cytometry and qPCR respectively All mediums were filtrated at 0.22 μm (Corning, New York, USA).

MV purified from culture supernatants: HL60-MV, BxPC3-MV and HAP1-MV were purified from conditioned medium after cells and debris by two successive centrifugations at 300*g*, 5 min and an additional 2500*g* centrifugation, 10 min.

MV purified from clinical samples: Platelet-derived MV (PMV) were generated from PRPs as already described [27]. Erythrocyte-derived MV (Ery-MV) were purified generated from purified red blood cells either by aging (48 h) or sonication by VIBRA Cell 75186 sonicator ; Pulse S9 (60%) 3 times for 60s. All MV subsets were pelleted at 70,000*g*, 90 min, 4 °C (JA-30.50 Ti fixed-angle rotor, k-factor: 280, Beckman Coulter, Villepinte, France) and washed twice in PBS buffer (2 × 70,000*g*, 90 min). Isolated MV were enumerated by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter, Villepinte, France) standardized by Megamix strategy [28] by reference to counting beads (MP-Count beads, BioCytex, Marseille, France) [29]. Finally, MV were spiked in MV-free plasma (removing MV by high-speed centrifugation 3 × 70,000*g*, 90 min) before performing TF-dependent procoagulant testings.

2.3. Optimized MV TF dependent FXa generation assay design

An optimized TF-dependent FXa generation assay (MV TF activity assay) was adapted from the Chapel Hill TF-dependent FXa generation assay [21,30] as described [31]. Briefly, MV were pelleted by centrifugation at 24,000*g* for 60 min at RT from 500 μL of plasma 1:2 diluted in HEPES buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES and 0.1% NaN_3, pH 7.4, 0.22 μm filtrated), washed in HEPES buffer and resuspended in 140 μL of HEPES buffer. Aliquots (70 μL) were pre-incubated for 30 min at 37 °C with either an inhibitory anti-TF monoclonal antibody (10 μg/mL final, clone SBTF-1, BioCytex, Marseille, France) or a control antibody (10 μg/mL, clone a-DNP 2H11–2H12, BioCytex, Marseille, France) (Fig. 1A). Then, 7 μL HEPES-Ca^{2+} buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES and 0.1% NaN_3, 50 mM $CaCl_2$, pH 7.4, 0.22 μm filtrated) containing purified human FVII and FX (Stago BNL, JV Leiden, Netherland) was added to each 70 μL sample, to produce final concentrations of 10 nM, 190 nM and 5 mM $CaCl_2$ respectively and incubated for another 2 h at 37 °C (Fig. 1B). FXa generation was halted by the addition of 8 μL of EDTA buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES and 0.1% NaN_3, 200 mM EDTA, pH 7.4, 0.22 μm filtrated) and a FXa fluorogenic substrate (1 mM final, BioCytex, Marseille, France) was added (Fig. 1C). Finally, the fluorescence at 390 nm (excitation) and 460 nm (emission) was monitored for 15 min at 37 °C on a microplate fluorescence reader (Fluoroskan, CAT instrument, Stago, Asnières-sur-Seine, France) (Fig. 1D). Maximum reaction velocity (Vmax) was calculated with the associated software (Ascent Software, Luqa, Malta). Vmax were corrected by subtracting those generated in the presence of SBTF-1 from those generated in the presence of the control antibody. Data from plasma-purified MV were expressed as fmole/L (fM) by comparison to a calibration curve generated using recombinant TF (Fig. 1E).

For comparison experiments, different centrifuge rotors were tested (FA45-24-11, k-factor: 321; F15-6x100y, k-factor: 1536, Thermofisher, Courtaboeuf, France; JA-30.50, k-factor: 280; Beckman Coulter, Villepinte, France). SBTF-1 anti-TF inhibitory antibody was compared to HTF-1 (BD Biosciences, San Jose, CA) at various concentration (0.3–20 μg/mL) and incubation time (5–10 min). Purified human FVII was compared to purified human FVIIa (Stago BNL, JV Leiden, Netherland).

2.4. Chapel Hill assay

This assay has already been described in details in Khorana et al. 2008 [21,25,30]. Briefly, the measurement of MV TF activity in plasma is based on an end point FXa generation chromogenic assay, the use of a monoclonal antibody to inhibit TF activity (clone HTF-1, BD Biosciences, San Jose, CA) and the use of FVIIa as TF cofactor.

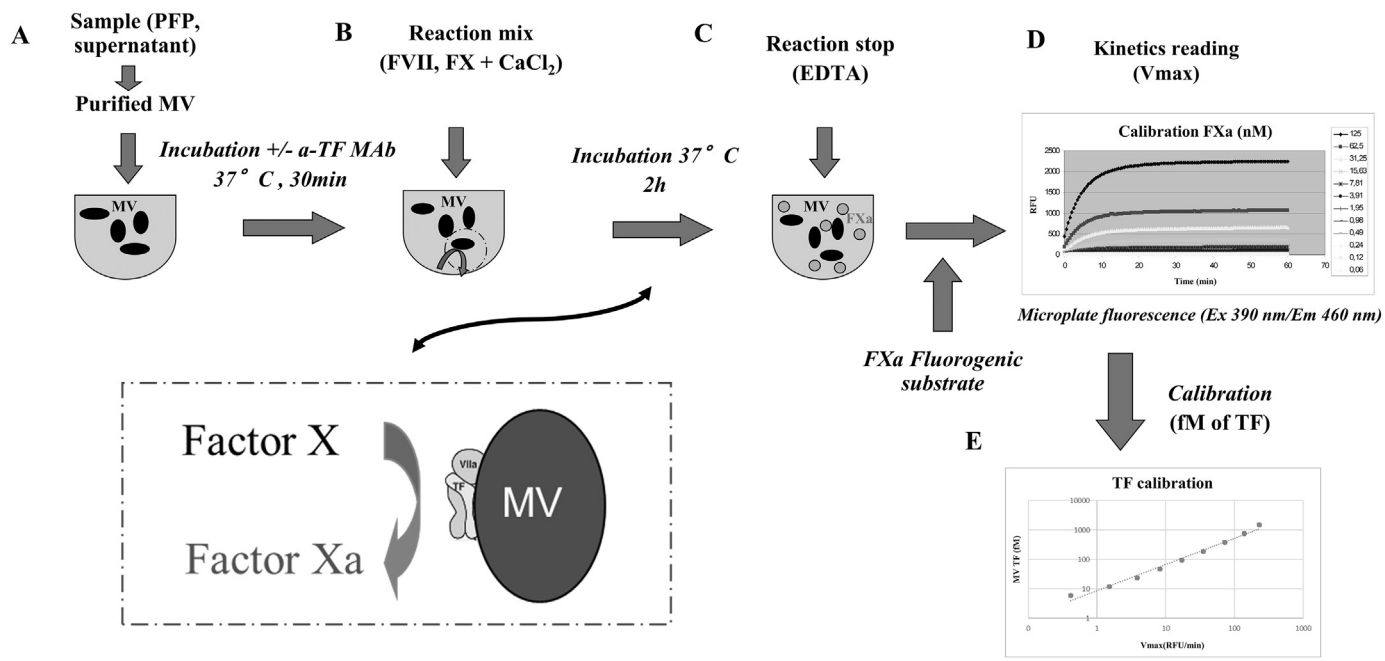


Fig. 1. Schematic sketch of the MV TF activity assay. A. Microvesicles (MV) were extracted from platelet-free plasma (PFP) using ultracentrifugation. Blocking anti-TF (or sham) antibody was reacted with MV for specificity evaluation. B. Reaction mix containing factor VII (FVII), factor X (FX) and calcium ($CaCl_2$) was added, FX cleavage into activated factor X (FXa) was induced by tissue factor (TF)/ activated FVII (FVIIa) complex during incubation at 37 °C. C. The reaction was stopped by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) that captures the calcium. D. The generated FXa was quantified by fluorometry using a specific fluorogenic substrate, and the fluorescence (excitation 390 nm/emission 460 nm) was monitored in RFU/min. E. Calibration range of liposome associated recombinant TF allows us to convert the values in femtomolar of TF.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US). Significant differences were determined using a non-parametric Mann-Whitney test or a paired *t*-test. Analysis of variances (ANOVA) was used to compare rotors. A p-value < .05 was considered statistically significant. Spearman's rank correlation was used as a measure of the correlations between assays.

3. Results

3.1. Specificity of the MV TF activity assay

A major modification of the new MV TF activity assay relies on using a novel inhibitory anti-TF antibody (SBTF-1) which ensures the assay specificity. The SBTF-1 clone was compared to the HTF-1 clone used in the Chapel Hill assay at different concentrations and incubation times with all other parameters being the same. As demonstrated on Fig. 2A, compared to HTF-1, SBTF-1 showed a significantly more potent inhibition of the TF-dependent FXa generation (95 ± 1% *vs* 92 ± 0.4%, at 20 μg/mL, 5 min, $p = .04$). The superiority of SBTF-1 over HTF-1 was confirmed at lower concentrations. Twenty-two percent of inhibition were lost at 2.5 μg/mL compared with 20 μg/mL with HTF-1 while the inhibitory effect of SBTF-1 was unchanged. At 10 μg/mL with both antibodies, we show a significant increase in the inhibition % levels with SBTF-1 compared to HTF-1 (95 ± 0.7% *vs* 90 ± 0.5%, $p < .001$). This difference is amplified at 5 μg/mL (94 ± 1% *vs* 86 ± 1%, p < .001) (Fig. 2A). Moreover, the inhibitory effect of SBTF-1 was maintained over a broad range of spiking doses of HL60 MV (0.6–5 × 10^5) with a saturating concentration above 1,3 μg/mL that decreases significantly and in a concentration dependent manner at 0.63 μg/mL ($p = .03$), 0.32 μg/mL (p = .03) and 0.16 μg/mL (p = .03) (Fig. 2B) and dramatically decreases at 0.02 μg/mL (p = .03) and at 0.002 μg/mL (p = .03) (Fig. 2B). Thus, these data demonstrated that the SBTF-1 clone has a more potent inhibitory activity than HTF-1 clone, whatever the concentration used. For further experiments, a concentration of 10 μg/mL of SBTF-1 was chosen.

The TF-dependent FXa generation of the MV TF activity assay was then calculated by the difference between the total FXa activity and the residual FXa activity which is not inhibited by the SBTF-1 antibody (non-specific activity). As illustrated on a range of spiked TF-positive HAP1-MV (Fig. 2C), a significant difference of TF activity was noted between, total and non-specific activity. Interestingly, when the assay was performed in presence of the same amount of parental MV which have been knocked-out for TF (KO-TF-MV), no TF specific activity was measured, in contrast to parental MV (Fig. 2D). This result demonstrates the TF specificity of the SBTF-1 antibody and therefore the specificity of the MV TF activity assay for TF.

The impact of MV surface phospholipids (PLs) was also tested. As illustrated in Fig. 2E, the addition of a range of KO-TF-MV to MV of the same PLs nature (parental HAP1-MV) results in a slight increase in the FXa activity (+17 ± 17% with 0.25 × 10^6 KO-TF-MV). This increase of FXa activity was only due to an increase in the non-specific activity (+11 ± 7% with 0.25 × 10^6 KO-TF-MV) while the TF specific activity remained unchanged (Fig. 2E). In contrast, a significant increase of the specific activity generated by HL60-MV was observed after spiking of sonicated Ery-MV, old Ery-MV, KO-TF-MV and PMV. As shown on Fig. 2F, the extent of the increase varies according to the PL origins ranging from 100 ± 20% with 1 × 10^6 sonicated Ery-MV ($p < .001$), 50 ± 20% with 0.5 × 10^6 old Ery-MV ($p = .01$), 40 ± 20% with 0.5 × 10^6 KO-TF-MV ($p = .02$) to no significant impact with PMV. These results demonstrate that MV TF specific activity can be impacted according to the origin of MV surface phospholipids.

3.2. Optimizing sensitivity of the MV TF activity assay

The MV TF activity assay was optimized in order to improve its sensitivity. First, the impact of the centrifugation protocol was evaluated by comparing MV TF activity in MV-free plasma spiked by three

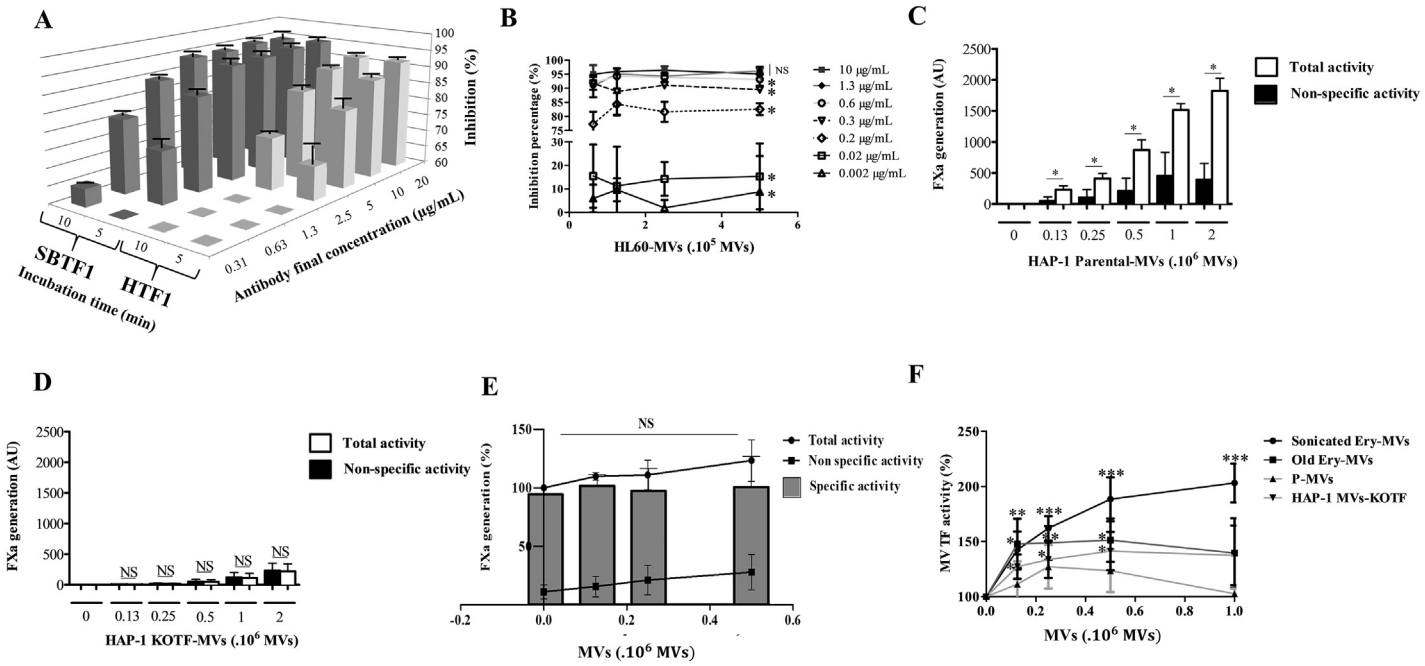


Fig. 2. Specificity of the MV TF activity assay. A. Comparison of blocking effect between SBTF-1 and HTF-1 blocking antibodies on HL60-derived MV as a function of antibody concentration with two times of incubation. The results are expressed in inhibition percentage ($n = 3$). B. Comparison of different antibody concentrations (0,002–10 µg/mL) on a range of HL60-MV (0,6–5.10^5 MV) . The results are expressed in inhibition percentage ($n = 3$). C. FXa generation measured on a range of parental HAP1-MV. White histograms represent total activity and black histograms represent non-specific activity. Results are expressed in arbitrary unit (AU) (n = 3). D. FXa generation measured on a range of KO-TF-HAP1 derivative MV (KO-TF-MV). White histograms represent total activity and black histograms represent non-specific activity. Results are expressed in AU (n = 3). E. FXa generation measured on 10^5 parental HAP1-MV added to a range of KO-TF-MV. Curve with circles represents the total activity, curve with squares represents non-specific activity and column bar represents the specific activity. Results are expressed in percentage ($n = 4$). F. MV TF activity measured on 10^5 HL60-MV added to a range of erythrocyte-derived MV (Ery-MV) obtain either by sonication or blood aging and platelet-derived MV (PMV). Results are expressed in percentage compared with HL60-MV alone (n = 4).

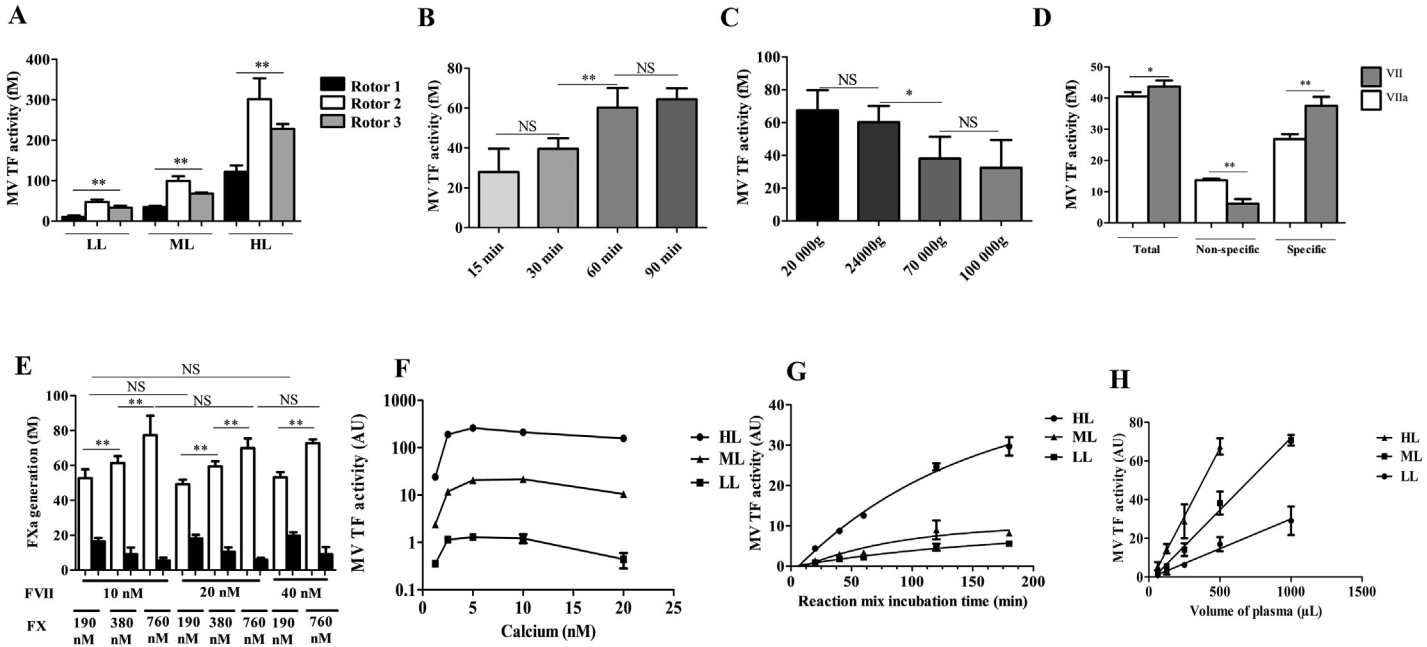


Fig. 3. Increasing sensitivity of the MV TF activity assay. A. Comparison of MV TF activity in plasma spiked with BxPC3-MV between three different rotors (n = 6 with rotor 1 and 2, n = 3 with rotor 3). Results are expressed in fM of TF. B. Comparison of MV TF activity on PFP between four centrifugation times at 24.000*g* (15 min, 30 min, 60 min, 90 min) (n = 6). Results are expressed in fM of TF. C. Comparison of MV TF activity on PFP between four centrifugation speeds during 60 min (20.000*g*, 24.000*g*, 70.000*g*, 100.000*g*) (n = 6). Results are expressed in fM of TF. D. Comparison between FVII and FVIIa in the reaction mix on HL60-MV (n = 3). Results are expressed in AU. E. Comparison between different reaction mixes with different concentrations of FVII and FX on HL60-MV. White histograms represent total activity and black histograms represent non-specific activity. Results are expressed in AU. F. MV TF activity measured on HL60-MV with a reaction mix that contain a range of calcium concentrations. Results are expressed in AU. G. MV TF activity measured on HL60-MV with different incubation times in the reaction mix. H. Evaluation of linearity by measuring MV TF on a range of volumes of the same plasma. Samples of MV-free plasma spiked by three various levels of HL60-MV are used: high level (HL), medium level (ML) and low level (LL) (HL = 7500 MV/µL, ML = 2500/µL, LL = 750 MV/µL). Results are expressed in AU (n = 3).

different levels of BxPC3-MV. As illustrated in Fig. 3A, the experiment was performed at the same centrifuge force (24,000*g*) but with different rotors. We observed a significantly different activities in all levels (LL: 11 ± 3; 47 ± 6 and 33 ± 5 fM for rotor 1, 2 and 3 respectively, $p = .003$; ML: 35 ± 3; 100 ± 10; 70 ± 2 fM, $p = .002$; HL: 120 ± 16; 300 ± 50; 230 ± 13 fM, p = .002). Because of this variation, all further comparison was performed with the same rotor. (rotor 2). Regarding the centrifugation time, a significantly increased activity was observed with 60 min compared to 30 or 15 min as performed on the Chapel Hill assay (28 ± 10 fM *vs* 60 ± 10 fM, $p = .009$, at 15 and 60 min, respectively) while no further increase was observed with 90 min (64 ± 6 fM) (Fig. 3B). Regarding the centrifugation speed, no significant difference was observed between the speed used in the Chapel Hill assay protocol 20,000*g* and 24,000*g*. Surprisingly, further increase in the centrifugation speed results in a significant decrease in the activity (60 ± 10; 38 ± 13; 32 ± 17 fM at 24.000*g*, 70,000*g* and 100,000*g*, respectively, $p = .02$) (Fig. 3C). Therefore, centrifugation of PFP at 24,000*g* for 60 min at RT, using the same rotor was delineated as optimized preanalytical conditions to measure TF activity with reduced variability.

The Chapel Hill assay includes as reaction mix FX, $CaCl_2$ and FVIIa to generate FXa. First, we compared FVII with FVIIa. As a result, FVII generated significantly increased MV TF activity compared to FVIIa (38 ± 3 fM *vs* 27 ± 2 fM, $p = .02$) with significantly less non-specific activity (6 ± 2 fM *vs* 14 ± 1 fM, $p = .004$) (Fig. 3D). Secondly, we determined the optimal concentrations of the FX or FVII to be used in the reaction mix without increasing the non-specific activity. We compared different concentration of FX and FVII. As shown in Fig. 3E, a concentration of FVII above 10 nM does not improve the sensitivity. In contrast, increasing the FX concentration results in a significant gain in the MV TF activity without increasing the non-specific activity (36 ± 6, 52 ± 4, and 72 ± 10 fM, at 190, 380 and 760 nM (10 nM FVII), respectively, $p = .002$). Finally, a concentration of FX of 190 nM was chosen for cost reasons. Regarding calcium concentration, an activity plateau was reached at 5 mM regardless of the levels of MV TF activity (Fig. 3F) showing that this concentration is sufficient for the FXa generation assay. Thirdly, we determined the optimal incubation time with the reaction mix. As observed in Fig. 3G, MV TF activity increased with incubation time. A 2 h of incubation was chosen for further experiments as a good compromise between sensitivity and assay duration (Fig. 3G). Therefore, the incubation time was the same as the Chapel Hill assay.

Taken together, these results established the optimal experimental conditions to improve sensitivity of the MV TF activity assay without losing specificity: centrifugation at 24,000*g* for 60 min; 10 nM FVII, 190 nM FX and 5 mM $CaCl_2$ incubated for 2 h in the new version instead of centrifugation at 20,000*g* for 15 min; 10 nM FVIIa, 300 nM FX and 10 mM $CaCl_2$ incubated for 2 h in the Chapel Hill assay.

3.3. Linearity and reproducibility of the MV TF activity assay

The impact of the MV TF activity assay optimizations was evaluated, on linearity and reproducibility. First, to demonstrate the linearity of the assay, a dose-effect relationship of the MV TF activity was measured on different volumes of plasma spiked with HL60-MV. A significant linear relationship between the initial plasma volume centrifugate and the measured MV TF activity was observed (HL, $r^2 = 0.97$, $p < .001$; ML, $r^2 = 0.98$, $p < .001$; LL, $r^2 = 0.91$, $p < .001$) (Fig. 3H).

The variability of the MV TF activity assay was evaluated either after MV purification or on PFP with the aim to include the impact of the centrifugation procedure. As shown in Table 1, the intra-assay (repeatability) and the inter-assay variation (reproducibility over a 12 month-period) of three levels of purified MV was low (4% and 4–13% respectively) while the intra-assay (repeatability) and the inter-assay variation (reproducibility over time) of the assay in PFP was higher with CV above 20% (20%, 22–26%, respectively) due to the centrifugation step. Because the quality of the recovery of the MV pellet may vary between operators, the inter-operator reproducibility ($n = 4$) was evaluated using samples containing three different levels of MV TF activity. As a result, the inter-operator variability was inversely related to the level of TF activity, (LL, CV = 38%, ML, CV = 17%, HL, CV = 3%, Table 1). While the direct comparison was not made, no difference in variability is expected between the MV TF activity assay and the Chapel Hill assay because both assays share a centrifugation step which is the main cause of variability within the assays.

Table 1
Reproducibility of the MV TF activity assay. Different types of assay reproducibility measured with the coefficient of variation. Type of sample, number of experiment and number of operators are indicated. MV-free plasma spiked by three distinct levels of BxPC3-MV: HL = high level, ML = medium level, LL = low level.

Type of reproducibility	Sample nature	Number of samples	Number of operators	Coefficient of variation	
Repeatability	Purified MV	4	4	4%	
Reproducibility over time	Purified MV	52	1	LL	13%
				ML	9%
				HL	4%
Repeatability	PFP	4	1	20%	
Reproducibility over time	PFP	25	1	LL	26%
				ML	22%
				HL	25%
Inter-operator reproducibility	PFP	4	3	LL	38%
				ML	17%
				HL	3%

3.4. Evaluation of the MV TF activity assay sensitivity

The sensitivity of the MV TF activity assay was first compared to the Chapel Hill assay evaluating the detection limit of the method which was defined as the linearity breakpoint in a serial dilution of recombinant source of TF. As shown in the Fig. 4A, a lower detection limit was found for the new assay compared to the Chapel Hill assay (3 ± 1 *vs* 12 ± 3 fM, $p = .03$). This low detection limit permitted the detection of MV TF activity in plasma samples from healthy individuals (26 ± 15 fM) which was specifically inhibited by the anti-TF antibody SBTF-1 (Fig. 4B). After adjusting for the enrichment factor of 3.6 between the sample of 500 μL and the pellet recovered in 140 μL of buffer, this value represents a concentration of 7 ± 4 fM TF in the donor plasma sample. This result was obtained after discarding the first milliliters of blood because of a potential release of subendothelial TF during the venipuncture [32]. Indeed, as shown in Fig. 4C, when measured on 6 successive 5 mL tubes from the same donor, the activity was significantly higher in the first tube compared to the following (−20 ± 10%, $p = .05$). This result suggests that the first tube was contaminated by subendothelial TF and therefore should be discarded from the analysis. Next, the ability of MV TF activity assay to discriminate MV TF activity from unstimulated blood compared to the same blood stimulated with LPS was measured. As illustrated in Fig. 4D, the activity was significantly increased in LPS-stimulated compared to unstimulated conditions (190 ± 120 fM *vs* 26 ± 15 fM, $p = .002$).

Finally, the sensitivity of the MV TF activity assay was directly compared to the Chapel Hill assay. In healthy plasma the FXa generation specifically inhibited by the anti-TF antibodies was significantly detected with the MV TF activity assay (26 ± 15 fM) while it remained undetectable with the Chapel Hill assay (Fig. 5A). In LPS-stimulated plasma, a significant increase of 30 ± 40% with the MV TF activity assay was measured ($p = .04$) (Fig. 5A) with a good correlation between assays ($r^2 = 0.952$; $p < .0001$, Fig. 5B). Both assays were performed with a different plasma volume (500 μL *vs* 200 μL). After normalization of this volume (200 μL or 500 μL) the MV TF activity

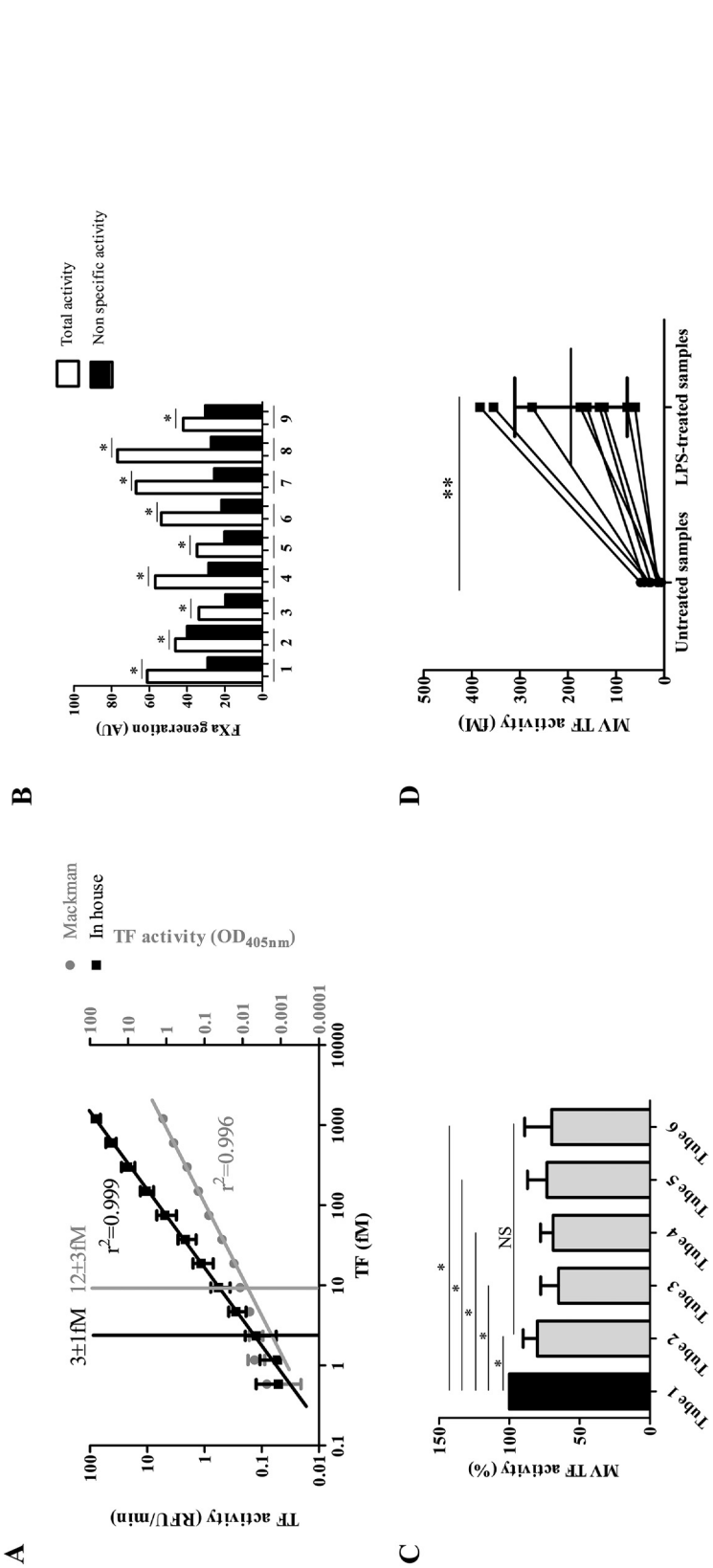


Fig. 4. Validation of MV TF assay sensitivity. A. Limit of linearity determined by a range of successive two-fold dilutions of TF calibrator. Results are expressed in relative fluorescence unit per minute (RFU/min) with the MV TF assay and in optical density at 405 nm (OD_{405nm}) with the Chapel Hill assay. B. MV TF activity measured on healthy individuals. White histograms represent total activity and black histograms represent non-specific activity. Results are expressed in AU ($n = 9$). C. Measurement of MV TF activity on 6 successive blood collection tubes. Results are expressed in percentage compared to the first tube ($n = 5$). D. MV TF activity compared between PFP extracted from untreated blood and LPS-treated blood. Results are expressed in fM TF ($n = 9$).

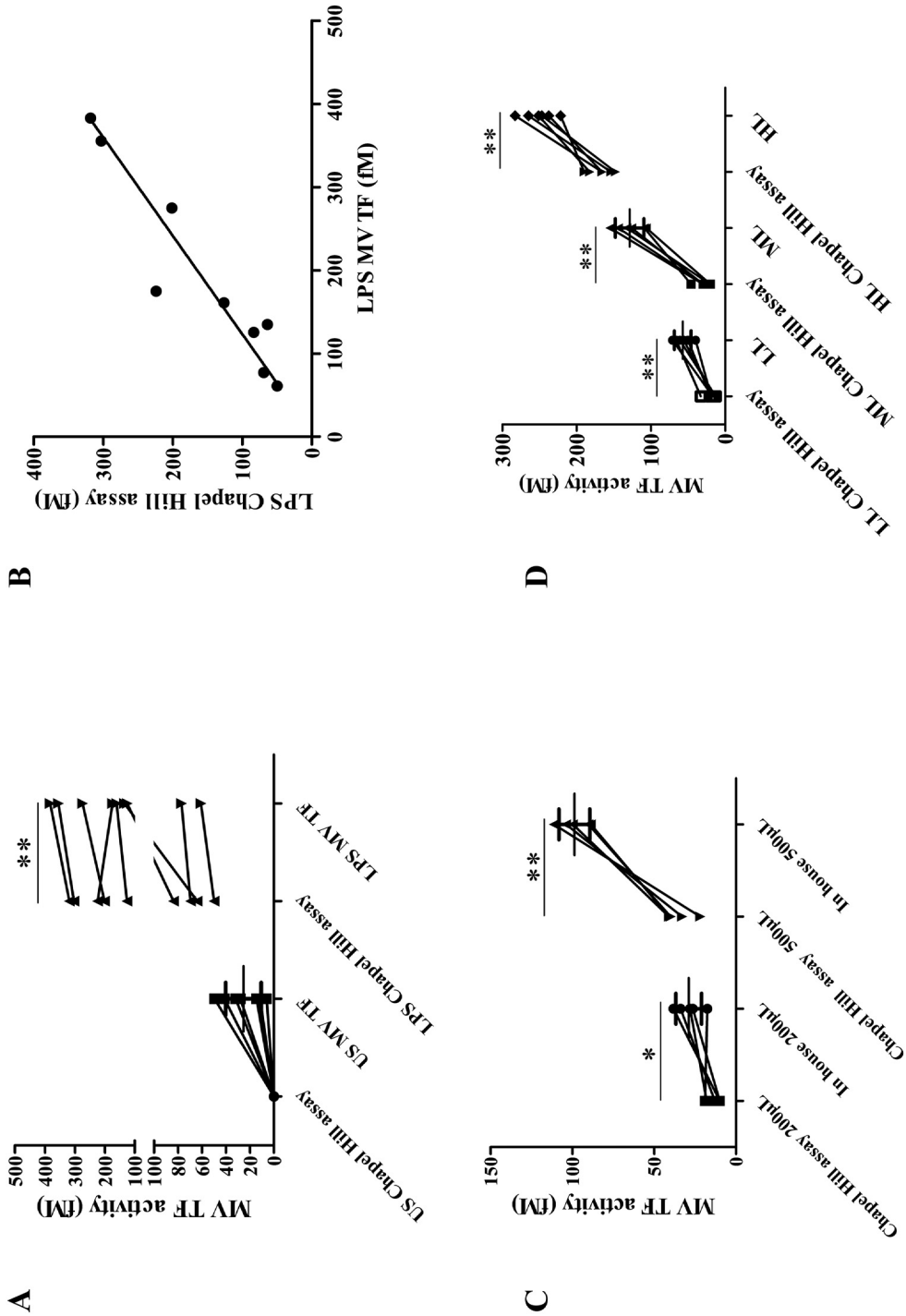


Fig. 5. Comparison of the in-house MV TF activity method and pre-existing assays. A. MV TF activity measured with the MV TF activity assay (In-house) and the Chapel Hill assay were compared on the PFP of 9 healthy individuals from untreated and LPS-treated blood. B. Correlation between in-house method and Chapel Hill assay for LPS-treated samples, r2 = 0952, $p < .0001$, significant. C. MV TF activity measured with the MV TF activity assay (In-house) and the Chapel Hill assay were compared on spiked MV TF in plasma featuring three levels of activity (HL = 7500 MV/µL, ML = 2500/µL, LL = 750 MV/µL). D. MV TF activity measured with the new assay and the Chapel Hill assay with the same PFP volumes of 200 µL and 500 µL. Results are expressed in fM.

remains significantly higher with the MV TF activity assay than the Chapel Hill assay (29 ± 8 *vs* 14 ± 4 fM; $p = .03$; 99 ± 9 *vs* 35 ± 8 fM; $p = .008$ for 200 and 500 μL, respectively, Fig. 5C). These results were confirmed in plasma spiked with three different levels of TF + MV (BxPC3). As shown in Fig. 5D, a significantly higher activity was found in the MV TF activity assay compared to the Chapel Hill assay (57 ± 11 *vs* 20 ± 7 fM; $p = .003$, 129 ± 19 *vs* 30 ± 9 fM; p = .002 and 251 ± 21 *vs* 168 ± 16 fM; p = .002; for LL, ML and HL, respectively). Altogether these results demonstrate that the MV TF activity assay is more sensitive than the Chapel Hill assay and that the difference of initial plasma volume was not the key factor explaining this difference.

4. Discussion

Although many studies have suggested that MV TF activity may be a useful biomarker to identify patients with an increased risk of thrombosis, the most convincing results were published in patients with cancer [14,15,22,24,33,34]. In contrast, significant increases in MV TF activities were not observed in cardiovascular disorders [6]. It is thought that the major part of TF-positive MV are derived from tumor cells in cancer in particular for pancreatic cancer displaying the highest MV TF activity [12,18], whereas they are derived from hematopoietic cells in non-tumoral disease. But one can also hypothesize that the current tests are hampered by a lack of sensitivity. In the present study, we showed that the sensitivity of MV TF activity can be significantly improved by 1/ increasing the plasma volume, the speed and time of centrifugation, the FX concentration, 2/ using an anti-TF antibody (Clone SBTF-1) with a more potent inhibition capacity to better delineate the TF-specific reaction and, 3/ using a fluorogenic substrate and continuously monitoring its degradation to measure the amount of generate FXa and 4/ using FVII instead of FVIIa to reduce TF-independent FXa generation.

We demonstrated that this new assay was able to measure MV TF activity with a high specificity and an improved sensitivity, especially in the low range of values. Indeed, we were able to detect MV TF activity in normal PFP samples. However, the assay was still limited by an inter-assay variability, mainly due to the centrifugation step.

The MV TF activity assay developed in the present study combines an enzymatic assay of generated FXa, with initial plasmatic MV purification by centrifugation. A first step was to improve some parameters that influence the preanalytical step, one of the most important issue, as extensively discussed in previous reviews [35,36]. High-speed centrifugation is frequently used to pellet MV because it can be performed easily. However, as illustrated in our study, isolation of the MV introduces some variability, as shown by the CV of MV TF activity. We found significantly less variability when measuring suspensions of previously purified MV. Consistent with previous studies showing that the recovery of the pellet depends on the rotor type, the centrifugation speed (g-force) and the centrifugation time [37], we demonstrated that MV TF activity is significantly affected by 1) type of rotor 2) speed of centrifugation and 3) centrifugation time. According to our results, centrifugation of PFP at 24,000*g* for 60 min at RT, using the same rotor was retained as appropriate preanalytical conditions to measure MV TF activity in a controlled range.

Another disadvantage of centrifugation is to cause the aggregation of MV and/or their contaminations by unwanted elements, such as protein/lipid aggregates [38]. Accordingly, in the future, an option to overcome the disadvantages of centrifugation would be to use antibody coated magnetic beads to easily capture MV from larger volumes of plasma, thus reducing the time to isolate MV and opening the way to future automation and extraction of specific subsets enriched in MV TF. We recently used such a strategy in a new assay measuring CD15+ MV associated plasmin activity [29], with an improvements in time, sensitivity, specificity and reproducibility.

We also focused on improving the analytical settings of the FXa generation assay and showed that the sensitivity of the MV TF activity was optimized by 1) using factor VII instead of VIIa, 2) an optimized calcium concentration, and 3) tuning the incubation time that allows a better recovery of activated FX and a better cleavage of the fluorescent substrate.

An important modification was provided by introducing a new inhibitory anti-TF antibody with a high inhibitory potential (SBTF-1). The use of KO-TF-MV was key to confirm that SBTF-1 confers a high specificity to the novel assay. Indeed, when MV generated from the cell line HAP1 that has been KO for TF were compared to MV MV TF issued from their parental cells, no TF specific activity was generated from KO-TF-MV, indicating that SBTF-1 confers a high specificity to the novel assay. In comparison with the commercially available anti-TF antibody HTF-1 (the most widely used antibody in the previous studies [25,30,39]), the SBTF-1 exhibited an increased inhibitory effect, as attested by its higher inhibition of FXa generation seen at different times and concentrations. Moreover, the SBTF-1 inhibitory effect remained maximal over a broader range of MV TF concentrations.

Non TF elements that can modify TF activity in blood are widely described in previous studies, such as notably negatively charged PLs [40–42]. Indeed, we showed that TF activity can be influenced by erythrocyte-derived MV (Ery-MV) probably by increasing the rate of FXa to FX exchange from the TF-FVIIa-FX(a) enzymatic complex. We have shown that hemolysis increases the non-specific FXa generation in plasma samples from dogs with immune-mediated hemolytic anemia [43]. This emphasizes the importance of the pre-analytical treatment of samples and the interpretation of data from hemolysed samples.

Having optimized the analytical settings of MV TF activity assay, we challenged its sensitivity and specificity. We illustrate here the sensitivity by showing 1/ a lower detection limit, 2/ the existence of a basal level of MV TF activity in blood plasma from healthy donors and, 3/ a significant increase of activity for MV from LPS stimulated blood.

Finally, we demonstrated that MV TF activity assay presented a higher sensitivity than the end point Xa generation assay compared with the Chapel Hill assay. Differences between the assays are summarized in Table 2. Significantly more TF activity was always measured by the optimized FXa generation assay 1/ using plasma from healthy controls, both untreated and LPS-activated 2/ using plasma enriched with various known concentrations of MV from the pancreatic cancer cell line BxPC3, with a better correlation between assays observed for samples with higher TF activity than for those with low TF activity.

In conclusion, the MV TF activity assay presented here shows a higher sensitivity without reducing specificity. Therefore, this modified assay could provide a significant improvement to measure TF-positive MV as a potential biomarker of thrombotic risk in patients.

Sources of funding

This work was partly funded by INSERM and Aix-Marseille University (France). Financial support was also received from the Stago Company. This work was supported by funds from the John C. Parker Endowed Professorship and the National Institute of Health

Table 2
Differences between the MV TF activity assay and the Chapel Hill assay.

	MV TF activity assay	Mackman assay
Sample	500 μL plasma	200 μL plasma
Isolation of MV	1 h, 24.000*g* centrifugation with one wash	15 min, 20.000*g* centrifugation with two washes
Blocking antibody	SBTF1 (10 μg/mL)	HTF1 (4 μg/mL)
Reaction MIX	10 nM FVII, 190 nM FX and 5 mM $CaCL_2$	10 nM FVIIa, 300 nM FX and 10 mM $CaCL_2$
Substrate monitoring	Kinetic	End-point
Substrate	Fluorogenic	Chromogenic

(T32HL007149).

Declaration of Competing Interest

We disclose as a conflict of interest that a patent on this topic has been licensed by the Stago Company, and P. Poncelet, T. Bouriche, and C. Judicone are full-time employees of Biocytex.

References

[1] P. Wolf, The nature and significance of platelet products in human plasma, Br. J. Haematol. 13 (1967) 269–288.
[2] V.C. Ridger, C.M. Boulanger, A. Angelillo-Scherrer, L. Badimon, O. Blanc-Brude, M.-L. Bochaton-Piallat, E. Boilard, E.I. Buzas, A. Caporali, F. Dignat-George, P.C. Evans, R. Lacroix, E. Lutgens, D.F.J. Ketelhuth, R. Nieuwland, F. Toti, J. Tunon, C. Weber, I.E. Hoefer, 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 (2017) 1296–1316 (doi:10.1160/TH16-12-0943).
[3] E. Biró, K.N. Sturk-Maquelin, G.M.T. Vogel, D.G. Meuleman, M.J. Smit, C.E. Hack, A. Sturk, R. Nieuwland, Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner, J. Thromb. Haemost. 1 (2003) 2561–2568.
[4] J. Chou, N. Mackman, G. Merrill-Skoloff, B. Pedersen, B.C. Furie, B. Furie, Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation, Blood. 104 (2004) 3190–3197 (doi:10.1182/blood-2004-03-0935).
[5] E. Ramacciotti, A.E. Hawley, D.M. Farris, N.E. Ballard, S.K. Wrobleski, D.D. Myers, P.K. Henke, T.W. Wakefield, Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis, Thromb. Haemost. 101 (2009) 748–754.
[6] Y. Hisada, W. Alexander, R. Kasthuri, P. Voorhees, F. Mobarrez, A. Taylor, C. McNamara, H. Wallen, M. Witkowski, N.S. Key, U. Rauch, N. Mackman, Measurement of microparticle tissue factor activity in clinical samples: a summary of two tissue factor-dependent FXa generation assays, Thromb. Res. 139 (2016) 90–97, https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.01.011.
[7] D. Mege, S. Mezouar, F. Dignat-George, L. Panicot-Dubois, C. Dubois, Microparticles and cancer thrombosis in animal models, Thromb. Res. 140 (2016) 21–26 (doi:10.1016/S0049-3848(16)30094-9).
[8] G.M. Thomas, L. Panicot-Dubois, R. Lacroix, F. Dignat-George, D. Lombardo, C. Dubois, Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo, J. Exp. Med. 206 (2009) 1913–1927, https://doi.org/10.1084/jem.20082297.
[9] J.-G. Wang, J.E. Geddings, M.M. Aleman, J.C. Cardenas, P. Chantrathammachart, J.C. Williams, D. Kirchhofer, V.Y. Bogdanov, R.R. Bach, J. Rak, F.C. Church, A.S. Wolberg, R. Pawlinski, N.S. Key, J.J. Yeh, N. Mackman, Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer, Blood. 119 (2012) 5543–5552, https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402156.
[10] G.M. Thomas, A. Brill, S. Mezouar, L. Crescence, M. Gallant, C. Dubois, D.D. Wagner, Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice, J. Thromb. Haemost. 13 (2015) 1310–1319, https://doi.org/10.1111/jth.13002.
[11] J.E. Geddings, Y. Hisada, Y. Boulaftali, T.M. Getz, M. Whelihan, R. Fuentes, R. Dee, B.C. Cooley, N.S. Key, A.S. Wolberg, W. Bergmeier, N. Mackman, Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice, J. Thromb. Haemost. 14 (2016) 153–166, https://doi.org/10.1111/jth.13181.
[12] Y. Hisada, N. Mackman, Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis, Blood. 130 (2017) 1499–1506, https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-743211.
[13] M.E.T. Tesselaar, F.P.H.T.M. Romijn, I.K. Van Der Linden, F.A. Prins, R.M. Bertina, S. Osanto, Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? J. Thromb. Haemost. JTH. 5 (2007) 520–527, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x.
[14] J.I. Zwicker, H.A. Liebman, D. Neuberg, R. Lacroix, K.A. Bauer, B.C. Furie, B. Furie, Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 15 (2009) 6830–6840, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0371.
[15] A. Bharthuar, A.A. Khorana, A. Hutson, J.-G. Wang, N.S. Key, N. Mackman, R.V. Iyer, Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers, Thromb. Res. 132 (2013) 180–184, https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.06.026.
[16] F.J.S.H. Woei-A-Jin, M.E.T. Tesselaar, P. Garcia Rodriguez, F.P.H.T.M. Romijn, R.M. Bertina, S. Osanto, Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated thrombosis? Br. J. Cancer. 115 (2016) 332–338, https://doi.org/10.1038/bjc.2016.170.
[17] D. Faille, M.-C. Bourrienne, E. de Raucourt, L. de Chaisemartin, V. Granger, R. Lacroix, L. Panicot-Dubois, P. Hammel, P. Lévy, P. Ruszniewski, N. Ajzenberg, V. Rebours, Biomarkers for the risk of thrombosis in pancreatic adenocarcinoma are related to cancer process, Oncotarget. 9 (2018) 26453–26465 (doi:10.18632/oncotarget.25458).
[18] C.-J. Cui, G.-J. Wang, S. Yang, S.-K. Huang, R. Qiao, W. Cui, Tissue Factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients: a meta-analysis, Sci. Rep. 8 (2018) 1675, https://doi.org/10.1038/s41598-018-19889-8.
[19] F.A.W. Coumans, A.R. Brisson, E.I. Buzas, F. Dignat-George, E.E.E. Drees, S. El-Andaloussi, C. Emanueli, A. Gasecka, A. Hendrix, A.F. Hill, R. Lacroix, Y. Lee, T.G. van Leeuwen, N. Mackman, I. Mäger, J.P. Nolan, E. van der Pol, D.M. Pegtel, S. Sahoo, P.R.M. Siljander, G. Sturk, O. de Wever, R. Nieuwland, Methodological guidelines to study extracellular vesicles, Circ. Res. 120 (2017) 1632–1648, https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.
[20] P. Poncelet, S. Robert, N. Bailly, F. Garnache-Ottou, T. Bouriche, B. Devalet, J.H. Segatchian, P. Saas, F. Mullier, 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 (2015) 110–126, https://doi.org/10.1016/j.transci.2015.10.008.
[21] A.A. Khorana, C.W. Francis, K.E. Menzies, J.-G. Wang, O. Hyrien, J. Hathcock, N. Mackman, M.B. Taubman, Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer, J. Thromb. Haemost. 6 (2008) 1983–1985, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x.
[22] M.E.T. Tesselaar, F.P.H.T.M. Romijn, Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis, J. Thromb. Haemost 7 (2009) 1421–1423, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03504.x.
[23] J. Thaler, C. Ay, N. Mackman, R.M. Bertina, A. Kaider, C. Marosi, N.S. Key, D.A. Barcel, W. Scheithauer, G. Kornek, C. Zielinski, I. Pabinger, Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients, J. Thromb. Haemost. 10 (2012) 1363–1370, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04754.x.
[24] K. Tatsumi, S. Antoniak, D.M. Monroe, A.A. Khorana, N. Mackman, Subcommittee on hemostasis and malignancy of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and hemostasis, evaluation of a new commercial assay to measure microparticle tissue factor activity in plasma: communication from the SSC of the ISTH, J. Thromb. Haemost. 12 (2014) 1932–1934, https://doi.org/10.1111/jth.12718.
[25] Y. Hisada, N. Mackman, Measurement of tissue factor activity in extracellular vesicles from human plasma samples, Res Pr. Thromb Haemost. 0 (2018), https://doi.org/10.1002/rth2.12165.
[26] R. Lacroix, F. Dignat-George, Microparticles: new protagonists in pericellular and intravascular proteolysis, Semin. Thromb. Hemost. 39 (2013) 33–39 (doi:10.1055/s-0032-1333310).
[27] R. Lacroix, L. Plawinski, S. Robert, L. Doeuvre, F. Sabatier, S. Martinez de Lizarrondo, A. Mezzapesa, F. Anfosso, A.S. Leroyer, P. Poullin, N. Jourde, M.-S. Njock, C.M. Boulanger, E. Anglés-Cano, F. Dignat-George, Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis, Haematologica. 97 (2012) 1864–1872, https://doi.org/10.3324/haematol.2012.066167.
[28] S. Robert, R. Lacroix, P. Poncelet, K. Harhouri, T. Bouriche, C. Judicone, J. Wischhusen, L. Arnaud, F. Dignat-George, High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles—brief report, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32 (2012) 1054–1058, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244616.
[29] S. Cointe, K. Harti Souab, T. Bouriche, L. Vallier, A. Bonifay, C. Judicone, S. Robert, R. Armand, P. Poncelet, J. Albanese, F. Dignat-George, R. Lacroix, A new assay to evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis imbalance, J. Extracell. Vesicles. 7 (2018) 1494482, , https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1494482.
[30] R.D. Lee, D.A. Barcel, J.C. Williams, J.G. Wang, J.C. Boles, D.A. Manly, N.S. Key, N. Mackman, Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity, Thromb. Res. 129 (2012) 80–85, https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.06.004.
[31] I. Agouti, S. Cointe, S. Robert, C. Judicone, A. Loundou, F. Driss, A. Brisson, D. Steschenko, C. Rose, C. Pondarré, E. Bernit, C. Badens, F. Dignat-George, R. Lacroix, I. Thuret, Platelet and not erythrocyte microparticles are procoagulant in transfused thalassaemia major patients, Br. J. Haematol. 171 (2015) 615–624, https://doi.org/10.1111/bjh.13609.
[32] N. Tekkeşin, O.B. Esen, C. Kilinç, O. Eviyaoğlu, Discard first tube for coagulation testing, Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb. 23 (2012) 299–303, https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e328351ebbf.
[33] F. van Doormaal, A. Kleinjan, R.J. Berckmans, N. Mackman, D. Manly, P.W. Kamphuisen, D.J. Richel, H.R. Büller, A. Sturk, R. Nieuwland, Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients, An exploratory prospective study, Thromb. Haemost. 108 (2012) 160–165 (doi:10.1160/TH12-02-0099).
[34] M.T. Sartori, A. Della Puppa, A. Ballin, E. Campello, C.M. Radu, G. Saggiorato, D. d'Avella, R. Scienza, G. Cella, P. Simioni, Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role, Thromb. Haemost. 110 (2013) 378–385, https://doi.org/10.1160/TH12-12-0957.
[35] N.S. Key, N. Mackman, Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles, Semin. Thromb. Hemost. 36 (2010) 865–875, https://doi.org/10.1055/s-0030-1267040.
[36] R. Lacroix, S. Robert, P. Poncelet, R.S. Kasthuri, N.S. Key, F. Dignat-George, ISTH SSC Workshop, Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop, J. Thromb. Haemost. 8 (2010) 2571–2574, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04047.x.
[37] A. Cvjetkovic, J. Lötvall, C. Lässer, The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles, J. Extracell. Vesicles. 3 (2014) 23111, , https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111.
[38] R. Linares, S. Tan, C. Gounou, N. Arraud, A.R. Brisson, High-speed centrifugation

induces aggregation of extracellular vesicles, J. Extracell. Vesicles. 4 (2015) 29509, , https://doi.org/10.3402/jev.v4.29509.
[39] T. Nielsen, A.F. Kristensen, S. Pedersen, G. Christiansen, S.R. Kristensen, Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation, J. Extracell. Vesicles. 7 (2018) 1454777, , https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1454777.
[40] Y. Fu, J. Zhou, H. Li, F. Cao, Y. Su, S. Fan, Y. Li, S. Wang, L. Li, G.E. Gilbert, J. Shi, Daunorubicin induces procoagulant activity of cultured endothelial cells through phosphatidylserine exposure and microparticles release, Thromb. Haemost. 104 (2010) 1235–1241, https://doi.org/10.1160/TH10-02-0102.
[41] H. Kothari, R.C. Nayak, L.V.M. Rao, U.R. Pendurthi, Cystine 186-cystine 209 disulfide bond is not essential for the procoagulant activity of tissue factor or for its de-encryption, Blood. 115 (2010) 4273–4283, https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241356.
[42] J. Zhou, J. Shi, J. Hou, F. Cao, Y. Zhang, J.T. Rasmussen, C.W. Heegaard, G.E. Gilbert, Phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in acute promyelocytic leukemia, J. Thromb. Haemost. 8 (2010) 773–782, https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03763.x.
[43] L. Kidd, N. Mackman, Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia, J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex 2001 (23) (2013) 3–13, https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2012.00824.x.

IV-DISCUSSION

Les MV sont de petits éléments plasmatiques pouvant être modulés dans la plupart des situations pathologiques. Du fait de leur production par un panel très large de cellules, elles sont reconnues aujourd'hui comme un élément d'intérêt important dans de nombreux domaines de la biologie. Leur surface antigénique ainsi que leur contenu composé de molécules cytosoliques et d'acides nucléiques les identifient comme des structures uniques caractérisables et dotées d'activités fonctionnelles et leur confèrent un réel potentiel de biomarqueur en pathologie humaine.

Les MV ont été décrites initialement comme des surfaces phospholipidiques permettant l'assemblage des facteurs de la coagulation du fait de l'expression de PL négatifs à leur surface tels que la PS et la PE, mais aussi du FT, principal activateur de la coagulation. Les MV issues de cellules cancéreuses représentent une sous-population de MV procoagulantes. Des lignées de cellules tumorales humaines d'origines différentes expriment des niveaux variables de FT et libèrent des MV cancéreuses avec divers potentiels procoagulants [175,238]. Selon la lignée cellulaire, les mécanismes impliquent des voies indépendantes du FT qui favorisent l'activation et l'agrégation plaquettaires et/ou la génération de thrombine dépendante du FT [239]. La preuve du rôle des MV dans la formation de thrombus *in vivo* est corroborée par différentes études utilisant des modèles murins de thrombose formés de manière endogène ou exogène, ou injectés de manière exogène. Les travaux pionniers réalisés par le groupe Furies en 2003 ont montré que les MV monocytaires s'accumulaient rapidement sur le site de la lésion dans un modèle de lésion au laser des artérioles crémaster [151,240]. Ce résultat a été reproduit dans divers modèles de thrombose artérielle et veineuse avec différentes sources de MV [76,150,153,171,241]. Les patients cancéreux ont un risque accru de thrombose, en particulier de TEV, qui diffère selon le type de cancer [175,242]. Bien que le cancer soit connu comme étant un état d'hypercoagulabilité, la pathogenèse n'est pas totalement élucidée. Les MV porteuses de FT ont été évaluées comme facteur de risque de TEV liée au cancer dans plusieurs études. Jusqu'à présent, plusieurs hypothèses expliquent pourquoi les MV ne sont pas systématiquement associées à la CAT. Parmi eux, la diversité des mécanismes associant les MV et la CAT, le rôle complexe des MV dans l'hémostase intégrant leur activité anticoagulante et fibrinolytique ainsi que la sensibilité limitée, la reproductibilité, et la normalisation des méthodologies actuelles permettant de mesurer les MV.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a été d'optimiser un test permettant de mesurer l'activité procoagulante des MV de façon sensible et spécifique.

Plusieurs méthodes ont été décrites pour mesurer les MV-FT dans des échantillons cliniques en utilisant des dosages antigéniques ou la capture par des anticorps [154,237]. Cependant, toutes ces méthodes ont montré des limites en matière de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité. Les tests antigéniques permettent de détecter à la fois le FT crypté (inactif) et décrypté (actif), mais la mesure du FT par cytométrie en flux reste très difficile en raison des faibles niveaux de FT et des préoccupations relatives à certains anticorps anti-FT [243]. Un test fonctionnel est disponible dans le commerce (Zymuphen-MPTF, Hyphen Biomed). Brièvement, les MV sont capturées en utilisant un anticorps anti-FT qui n'interfère pas avec l'activité du FT. Malheureusement, aucun anticorps inhibiteur anti-FT n'est incorporé lors de la mesure du FXa généré. Il a été constaté que cette analyse avait une spécificité et une sensibilité réduites par rapport à une analyse fonctionnelle isolant les MV par centrifugation [237]. Nous avons démontré que ce nouveau test était capable de mesurer l'activité de MV-FT avec une spécificité élevée. Pour cela, une modification importante a été apportée en introduisant un nouvel anticorps anti-FT avec un potentiel inhibiteur élevé (SBTF-1). L'utilisation de MV issue d'une lignée knock-out (KO) pour le FT était essentielle pour confirmer que SBTF-1 conférait une haute spécificité au nouvel essai. En effet, lorsque les MV générées à partir de la lignée cellulaire HAP1 KO FT a été comparé aux MV issues des cellules parentales, aucune activité spécifique du FT n'a été générée à partir de KOFT-MV, ce qui indique que SBTF-1 confère une haute spécificité au nouvel essai. En comparaison avec l'anticorps anti-FT le plus utilisé dans la littérature, HTF-1 [205,234,244], le SBTF-1 présentait un effet inhibiteur accru, comme en témoigne son inhibition plus élevée de la génération de FXa observée à différents temps d'incubation et à concentrations différentes. La purification des MV par centrifugation n'interfère pas avec l'utilisation de cet anticorps, la question peut se poser dans un test qui fonctionnerait sur le même principe que le Zymuphen où les MV seraient capturées par des billes magnétiques. Les éléments non-FT susceptibles de modifier l'activité du FT dans le sang sont largement décrits dans des études antérieures, tels que les PL particulièrement ceux chargés négativement [245,246]. En effet, nous avons montré que l'activité du FT peut être influencée par les MV érythrocytaires, probablement en augmentant le taux d'échange entre le FXa et le FX du complexe enzymatique FT-FVIIa-FX(a). Il a été montré que l'hémolyse augmentait la génération de FXa non spécifique dans les échantillons de plasma provenant de patient avec anémie hémolytique à médiation immunitaire [247]. Cela souligne l'importance du traitement préanalytique des échantillons sur la spécificité de mesure.

Après s'être assurées d'une spécificité optimale, les performances en matière de sensibilité ont été évaluées en montrant 1 / une limite de détection plus basse, 2 / l'existence d'un niveau basal d'activité de MV-FT dans le plasma sanguin de donneurs sains et 3 / une augmentation significative de l'activité des MV du sang stimulé par le LPS. L'activité FT mesurée dans le plasma de sujet est

un résultat controversé dans la littérature. Dans une étude publiée en 2005, Butenas et coll. [248] ont démontré que l'ajout de 16 à 20 fM de FT dans le sang réduisait le temps de coagulation. Ils ont conclu de leurs expériences qu'aucun FT fonctionnel n'était présent dans le sang d'individus en bonne santé. Ces tests réalisés dans le sang total ne sont que très peu comparables aux résultats obtenus dans notre test. En effet, l'activité MV-FT mesurée ici est obtenue après prélèvement sanguin utilisant un anticoagulant bloquant le calcium et pouvant de ce fait diminuer la fixation du TFPI. Le TFPI ainsi que d'autres composés solubles ou des petites vésicules sont éliminés après centrifugation. Tout ceci peut contribuer à révéler une activité MV-FT sur les MV plasmatique. De plus, des expériences complémentaires réalisées au laboratoire ont montré que l'addition de l'anticorps inhibiteur SBTF-1 augmentait considérablement le temps de coagulation d'un plasma recalcifié. Ce test de coagulation a permis de révéler l'impact du FT dans le plasma de 13 individus sains, ce qui indique que du FT fonctionnel est présent dans le plasma d'une majorité d'individus sains. Ce résultat est cohérent avec le résultat trouvé avec le test de FXa optimisé et montre une probable importance de la préparation des échantillons et notamment du blocage du calcium. De plus, la mesure d'une augmentation de l'activité après traitement du sang au LPS montre la mesure d'un élément inductible et pas d'un artefact obtenu lors des étapes de préanalytique.

Enfin, nous avons démontré que le test d'activité MV-FT présentait une sensibilité plus élevée que le test de génération Xa en point final par rapport au test de Chapel Hill. Une activité significativement plus importante du FT a toujours été mesurée par le test optimisé de génération de FXa 1 / en utilisant du plasma, de témoins sains, non traité et activé par LPS 2 / en utilisant un plasma enrichi à diverses concentrations connues de MV de la lignée cellulaire de cancer du pancréas BxPC3. Une meilleure corrélation entre les tests a été observée pour les échantillons présentant une activité MV-FT plus élevée par rapport à ceux ayant une faible activité MV-FT. Ces étapes valident le processus d'optimisation que nous avons suivi, permettant de détecter des valeurs indétectables en utilisant une autre méthode que celle utilisée dans la littérature.

Ce test sensible va pouvoir être comparé avec tous les autres tests utilisés actuellement pour mesurer le FT sur les MV dans le cadre d'un atelier visant à comparer leur sensibilité et spécificité. Cet atelier est organisé dans le cadre du sous-comité de standardisation en biologie vasculaire de l'ISTH.

La première étape de ce programme consistera à l'organisation d'un nouveau workshop international visant à comparer la sensibilité et la spécificité des tests actuels de mesures des MV procoagulantes portant le FT dans les échantillons plasmatiques (Workshop MV n°5). Le principe de cet atelier a été validé par le sous-comité à l'ISTH de Dublin (2018). Une première étape consistera à l'inscription des laboratoires participants en remplissant un questionnaire détaillé sur les méthodologies utilisées et à préparer les échantillons tests (2019) et la deuxième étape consistera à

envoyer les échantillons à tester pour qu'ils soient dosés dans les différents laboratoires participants. Les résultats seront recueillis et analysés par notre laboratoire (2020). Les résultats des performances analytiques des tests seront exprimés selon la stratégie de score établie par Tripodi [249,250]. Ce workshop est organisé en étroite collaboration avec des experts internationaux du domaine : Rienk Nieuwland (Amsterdam University), Nigel Mackman (University of North Carolina), Johannes Thaler (Vienna University) et Elaine Gray (National Institute for Biological Standards and Control, London) qui fournira l'unique standard FT stable au monde. À ce jour, 19 équipes se sont inscrites représentant une quarantaine de méthodes.

En définitive, nous avons démontré que ce nouveau test était capable de mesurer l'activité de MV-FT avec une spécificité élevée et une sensibilité améliorée. Cependant, le test est toujours limité par une variabilité intertest, principalement due à l'étape de centrifugation. Le test d'activité des MV-FT développé dans notre travail combine un dosage enzymatique de FXa généré, avec une purification plasmatique initiale de MV par centrifugation. Une première étape consistait à améliorer certains paramètres influençant l'étape préanalytique, l'un des problèmes les plus importants, comme il a été discuté en détail dans les études précédentes [235,251]. La centrifugation à grande vitesse est fréquemment utilisée pour concentrer les MV, car elle peut être facilement effectuée. Cependant, notre étude a montré que la centrifugation introduit une variabilité intertest, comme le montre le CV de la mesure obtenue autour de 20%. Nous avons trouvé beaucoup moins de variabilité lors de la mesure sur des MV préalablement purifiées. Conformément aux études précédentes montrant que la récupération du culot dépend du type de rotor, de la vitesse de centrifugation (force g) et de la durée de centrifugation [252], nous avons montré que l'activité du FT est significativement affectée par 1/ le type de rotor 2/ la vitesse de centrifugation et 3/ temps de centrifugation. Selon nos résultats, la centrifugation du PFP à 24 000 g pendant 60 min à température ambiante, en utilisant le même rotor, a été retenue comme condition de préanalyse appropriée pour mesurer l'activité du FT. Un autre inconvénient de la centrifugation est de provoquer l'agrégation de MV ou leur contamination par des éléments indésirables, tels que des agrégats de protéines/lipides [221]. Une version destinée à la recherche de ce test devrait être commercialisée en 2020 (Stago). Cependant, l'extraction de MV du plasma est encore effectuée manuellement par centrifugation à grande vitesse, ce qui limite la reproductibilité du test et n'est pas compatible avec son automatisation. Par conséquent, notre objectif est de développer une nouvelle version de ce test procoagulant consistant à réaliser un bioassay, combinant un test procoagulant et une stratégie de purification des MV à partir de PFP par séparation immunomagnétique (IMS) en alternative de la centrifugation. Nous avons déjà utilisé l'IMS pour développer un test mesurant l'activité de génération de plasmine des MV, qui est un bio-

essai de capture hybride combinant IMS pour purifier les MV du plasma et mesurer leur capacité de production de plasmine [232].

V-CONCLUSION/PERSPECTIVES

Mes travaux se sont intéressés à l'optimisation d'un test d'activité procoagulante dépendante du FT des MV. Dans notre laboratoire, la mesure de cette activité est aujourd'hui associée à la mesure de l'activité fibrinolytique. La présence simultanée de ces 2 activités sur les MV permet d'introduire la notion de balance coagulolytique (BCL) des MV. La mesure de cette balance pourrait s'avérer être un biomarqueur plus performant que la mesure isolée de ces 2 activités dans les contextes cliniques tels que le choc septique. Pour cela, la BCL sera exprimée sous la forme d'un ratio entre l'activité procoagulante dépendante du FT portée par les MV et leur activité de génération de plasmine. Dans un premier temps, un PHRC (PHRC MISS) a été déposé et l'objectif a été d'étudier l'intérêt de la mesure de la balance coagulolytique dépendante des MV circulantes dans le pronostic de mortalité mesurée dans une population de sujets présentant un choc septique. Dans un second temps, le projet MicroREVE a pour objectif de déterminer la valeur prédictive de la BCL des MV dans la récurrence des évènements thrombo-emboliques. Enfin, ce travail s'intègre également dans le projet RHU INNOVCKD impliquant le développement de méthodes automatisées pour mesurer la BCL des MV par IMS. En effet, en utilisant la stratégie IMS pour nos tests fonctionnels, nous avons démontré un gain significatif de la sensibilité et de la reproductibilité par rapport à la méthode de centrifugation à haute vitesse. L'extraction de MV par IMS est une étape importante vers l'automatisation et sur la base de cet essai, le prototype d'une version automatisée d'essais sur les MV est en cours de développement par la société Biocytex. Dans le cadre du programme du RHU INNOV-CKD, afin d'adapter ces tests à la sous-population MVE, nous avons prévu d'effectuer un vaste screening d'anticorps sur les MV afin d'identifier les meilleures spécificités pour la détection de MVE, en utilisant des cellules endothéliales primaires de lits micro et macro vasculaires distincts (poumon, aorte, reins, artère coronaire). Mon projet professionnel post doctorat s'intègre dans le cadre de ce RHU en tant que futur employé de la société partenaire STAGO. Ma mission sera de participer à l'automatisation du test fonctionnel / hybride (procoagulant et profibrinolytique) dérivé de MV spécifiques de l'endothélium. Les performances de ce test seront évaluées dans la cadre de la prédiction du risque de saignement et de thrombose dû à la dysfonction endothéliale chez des patients présentant un syndrome coronarien aigu associé à une insuffisance rénale.

ANNEXE

Annexe :

Microvesicles and Cancer Associated Thrombosis.

Lacroix R, **Vallier L**, Bonifay A, Simoncini S, Mege D, Aubert M, Panicot-Dubois L, Dubois C, Dignat-George F. Semin Thromb Hemost. 2019 Sep;45(6):593-603.

Microvesicles and Cancer Associated Thrombosis

Romaric Lacroix, PharmD, PhD[1,2] Loris Vallier, PharmD[1] Amandine Bonifay, PharmD[1]
Stephanie Simoncini, PhD[1] Diane Mege, MD, PhD[1] Mathilde Aubert, MD[1]
Laurence Panicot-Dubois, PhD[1] Christophe Dubois, PhD[1] Françoise Dignat-George, PharmD, PhD[1,2]

[1] Aix-Marseille University, INSERM, INRA, C2VN UMR_S1263, UFR de Pharmacie, Marseille, France
[2] Department of Hematology and Vascular Biology, CHU La Conception, APHM, Marseille, France

Address for correspondence Francoise Dignat-George, PharmD, PhD, C2VN, UMR_S1263, UFR de Pharmacie, Aix-Marseille Université, INSERM, Marseille, France (e-mail: francoise.dignat-george@univ-amu.fr).

Semin Thromb Hemost

Abstract

Microvesicles (MVs) are small membrane enclosed structures released into the extracellular space by virtually all cell types. Their composition varies according to the cell origin and the stimulus which caused their formation. They harbor functional molecules and participate in intercellular communication. Endothelium, inflammatory cells, and cancer cells produce procoagulant MVs which contribute to cancer-associated thrombosis (CAT) in animal models. The tissue factor (TF) conveyed by these MVs was shown to play a key role in different animal models of experimental CAT. Alternatively, other molecular mechanisms involving polyphosphates or phosphatidylethanolamine could also be involved. In clinical practice, an association between an increase in the number of TF-positive or the procoagulant activity of these MVs and the occurrence of CAT has indeed been demonstrated in pancreatic-biliary cancers, suggesting that they could behave as a biomarker predictive for CAT. However, to date, this association was not confirmed in other types of cancer. Potential causes explaining this limited associated between MVs and CAT are (1) the diversity of mechanisms associating MVs and different types of cancer; (2) a more complex role of MVs in hemostasis integrating their anticoagulant and fibrinolytic activity; and (3) the lack of sensitivity, reproducibility, and standardization of current methodologies permitting measurement of MVs. Each of these hypotheses constitutes an interesting exploration path for a future reassessment of the clinical interest of the MVs in CAT.

Keywords
- extracellular vesicles
- microvesicles
- cancer-associated thrombosis

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

Extracellular vesicles (EVs) constitute a heterogeneous population of small membrane enclosed structures released into the extracellular space by virtually all cell types. They can be divided in subpopulations based on specific characteristics like, biogenesis, size, content and biological function. EVs have been divided into three main categories according to their biogenesis. Exosomes are generated by fusion of the multivesicular bodies with the membrane. Ectosomes originate from the budding of cell membranes and are more often referred to as microparticles or microvesicles (MVs), whereas apoptotic bodies result from the late stages of apoptosis.[1,2] In this review, we will refer mainly to MVs, small membrane vesicles with a size between 100 and 1,000 nm released from activated or apoptotic cells.[3] Once released by the cells, MVs circulate in a variety of body fluids and vectorize information to multiple target cells in the body.[3] MVs are extremely diverse depending on the inducer triggering their biogenesis and their parent cell. They are considered both as molecular signature of the cells from which they originate and as a depository of important biological information that can be exchanged with neighboring cells.[4] Diversity of MVs origin is responsible for a diversity of structures and composition in lipids, proteins and nucleic acid such as mRNA and miRNA resulting in a diversity of functions. Because of the panel of selected molecules they bear, MVs have been involved in different pathophysiological processes such as coagulation, inflammation, angiogenesis or

Issue Theme Emergent Paradigms of Thrombosis and Cancer—Part II; Guest Editors: Hau C. Kwaan, MD, PhD, and Paul F. Lindholm, MD

Copyright © by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel: +1(212) 584-4662.

DOI https://doi.org/10.1055/s-0039-1693476.
ISSN 0094-6176.

endothelial dysfunction.[5,6] This coagulo-inflammatory profile has logically led over the past decades to the question about their involvement in thrombosis. To address the question of the role of MVs in cancer associated thrombosis (CAT), MVs have to be integrated in their complex vascular environment with all partners contributing to thrombus formation including innate immune cells, such as polymorphonuclear cells (PMNs) and monocytes, endothelial cells, platelets, and also tumor cells. Additional partners resulting from cellular activation also include neutrophil extracellular traps (NETs) and polyphosphates (PolyPs).[7] Moreover, MVs, originating from normal and tumoral cells, contribute to CAT explaining that both common and cancer specific mechanisms are involved. After a rapid overview of MVs involvement in coagulation and CAT and their association with the development of clinical thrombosis, we will address the current causes potentially explaining why MVs were not always found associated to CAT including: (1) the diversity of CAT mechanisms; (2) the more complex role of MVs in hemostasis integrating their anticoagulant and fibrinolytic activity; and (3) the lack of sensitivity, reproducibility, and standardization of current methodologies allowing to measure MVs in clinical situations.

Microvesicle Involvement in Coagulation and CAT

Microvesicles are procoagulant because they provide a catalytic surface for the assembly of different clotting factor complexes. Their procoagulant properties mainly rely on the exposure of anionic phospholipids, especially the phosphatidylserine (PS) on the external leaflet of the membrane after a calcium-dependent cellular activation.[6] PS allows the binding of coagulation factors at the MVs surface by their carboxylglutamic acid-rich (GLA)-domains. A critical transporter with scramblase activity responsible for the PS exposure was identified as an anoctamin, the calcium-dependent channel transmembrane member 16F (TMEM16F).[8] Accordingly, mutated form of TMEM16F lead to a defective PS membrane exposure and MVs shedding which is associated with a bleeding disorder in rare Scott's syndrome patients.[9]

Besides PS, the presence of the coagulation initiator tissue factor (TF) on subsets of MVs also significantly contributes to their procoagulant activity. TF was initially identified on MVs, after the observation that tumor cells release procoagulant vesicles.[10,11] PS and TF are not independent each other, indeed TF needs anionic phospholipids to be fully activated. It is the concentration of the same restricted surface of both molecules which lead to highly procoagulant MVs. Incorporation of TF in PS + MVs is tightly regulated.[12–16]

Once release in the circulation, TF positive MVs (TF + MVs) participate in a transfer of information between cells at the crossroad between inflammation and thrombosis. Indeed, it was demonstrated that MVs released by activated endothelial cells induce TF-dependent pathways on monocytes,[17] whereas activation of monocytes generate TF + MVs which induce a switch of the endothelium phenotype towards a proinflammatory profile. This profile is associated with the release of inflammatory cytokines, TF expression, and release of new TF + MVs which can in turn transferred TF to platelets or activate monocytes and increase their TF expression.[18] Consequently, TF expression on cells or MVs which initially do not express TF, is enabled by different mechanisms of membrane fusion[19] or endocytosis recycling.[20]

The procoagulant potential of MVs depends on their cellular origin and the stimuli which triggered their formation. Platelet MVs (PMVs), the main subset of MVs, present in the blood circulation[21,22] are natively lacking TF-dependent procoagulant activity.[23] When observed, the TF activity on PMVs may result from the fusion of endothelial or monocyte-derived TF + MVs with activated platelets as described above. Moreover, the PS-rich environment generated by PMVs may amplify the TF + MVs activity from MVs from another source. It was also showed that PMVs represent an appropriate surface to activate the contact phase pathway.[24] Similarly, erythrocyte-derived MVs (EryMVs) trigger the coagulation independently of TF but in a contact phase-dependent manner.[25]

Among leucocytes, monocyte-derived MVs (MoMVs) represent a major component of the TF + MVs circulating pool.[26] As recently reviewed by Halim et al,[27] TF on MoMVs can be upregulated by several factors including LPS (lipopolysaccharide) and proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)α and interleukin (IL)-1β. Interestingly, it was recently shown that the different human monocyte subsets generated MVs with different procoagulant potential after stimulation by IL-33.[28] In contrast to MoMVs, granulocyte-derived MVs (Gran-MVs) generated only a low level of TF activity, if any, while this property may be observed in pathological situations,[29] although MoMVs transfer to granulocytes cannot be excluded.[30]

Endothelial-derived MVs (EMVs) harbor PS and TF-dependent procoagulant activity in response to a variety of stimuli including cytokines, complement, and LPS and, therefore, contribute to the circulating pool of TF + MVs in clinical situation where the endothelium is activated.[5] Cancer MVs represent another set of procoagulant MVs. Cultured human tumor cell lines of different origins express variable levels of TF and release cancer MVs with various procoagulant potentials in their supernatant.[31,32] As illustrated for breast cancer, according to the cell line, mechanisms involve TF-independent pathways which promote platelet activation and aggregation and/or TF-dependent thrombin generation.[33]

Evidence of MVs involvement in thrombus formation in vivo is supported by different studies using endogeneously formed or exogeneously injected MVs and mice mouse models of thrombosis. The pioneering work by Furies's group in 2003 showed that MoMVs rapidly accumulate at the site of injury in a laser injury model of small cremaster muscle arteries.[34,35] This result was reproduced in various murine model of arterial and venous thrombosis with different sources of MVs.[36–40]

Microvesicles Association with the Development of Clinical Thrombosis

Cancer patients have an increased risk of thrombosis, especially venous thromboembolism (VTE), which differs according to

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

the type of cancer.[31,41] Although cancer is known as a hypercoagulable state, the pathogenesis is not totally elucidated. TF bearing MVs has been assessed as a risk factor for cancer related VTE in several studies. The five main retrospective studies[31,42–45] that analyzed the link between TF + MVs and VTE demonstrated increased levels of circulating TF + MVs (measured by flow cytometry and functional assays) in cancer patients with VTE compared with cancer patient without VTE, with the highest values found in patients with pancreatic cancer.

The main prospective studies are listed in ►**Table 1**. The first one supporting the hypothesis that high levels of TF + MVs activity predicts VTE in pancreatic cancer was performed by Khorana et al.[46] Since this initial work, several other prospective studies, measured TF + MVs to evaluate the relationship between TF + MVs and future development of VTE. A positive association was found in studies using reported methodologies[43,47–49] including the most recent studies,[50–52] whereas it was not found in other large studies.[53–55] A recent meta-analysis on the relationship between TF + MVs and cancer patients with VTE concluded that the increased presence of TF + MVs represents an increased risk for cancer patients VTE with an overall odds ratio (OR) of 1.76.[56] However, due to the heterogeneity of study design, methods to measure TF + MVs, cancer origins, and causes of death, more well-designed studies and more comprehensive adjustments for confounders are needed to confirm this association. Indeed, it is most likely that the results of the aforementioned studies are primarily driven by pancreaticobiliary cancer.

From these clinical studies, it seems that MVs have a real potential to predict CAT. However, most of these studies have limitations including a low number of patients, and the fact that few of them rely on multicenter prospective designs. More importantly these studies display a broad methodological heterogeneity and lack of standardization. We will now address the potential causes explaining that MVs are not always associated to CAT including: (1) the diversity of CAT mechanisms; (2) the more complex role of MVs in hemostasis integrating their anticoagulant and fibrinolytic activity; and (3) the lack of sensitivity, reproducibility, and standardization of current methodologies allowing to measure MVs in clinical situations.

Microvesicles and the Diversity of Cancer Associated Thrombosis Mechanisms

Over the past years, a special attention has been given to CAT and the underlying mechanisms linking MVs and the thrombus formation (►**Fig. 1**). Several mouse models of cancer-associated thrombosis have been used with different mouse strains, tumors, tumor sites, and thrombosis models.[40] As a result, it seems that the importance of MVs and the mechanisms involved may vary according to the cancer origin.[57] Consequently, the relevance of measuring MVs as a biomarker of CAT may similarly vary according to the cancer origin. Moreover, the

Table 1 Role of MVs as prognostic biomarkers of VTE in cancer patients

Patients	Total/With VTE	Follow-up	MV phenotype	Method	Reference (author, year)
Locally advanced or metastatic pancreatic cancer	11/02	Every 4 weeks for 20 weeks	TF +	Functional assay	Khorana et al, 2008[46]
Solid cancer	60/5	1 y	TF +	Impedance FCM	Zwicker et al, 2009[43]
Solid and hematological cancer	728/53	2 y	PS +	Functional assay	Thaler et al, 2011[53]
Solid and hematological cancer	299 (48 pancreatic)/ 49 (12 pancreatic)	2 y	TF +	Functional assay (chromogenic end point and kinetic)	Thaler et al, 2012[54]
Solid cancer	43/5	6 mo	Annexin V +	FCM	Van Doormaal et al, 2012[47]
Pancreatic Cancer	252/40	10 mo	TF +	FCM	Hernández et al, 2013[55]
Solid cancer	43/5	6 mo	TF +	Functional assay	Van Doormaal et al 2012[47]
Glioblastoma multiforme	61/11	7 mo	TF +	FCM	Sartori et al, 2013[48]
Pancreatobilary cancer	117/52	Not specified	TF +	Functional assay	Bharthuar et al, 2013[49]
Pancreatic cancer	65/11	6 mo–1 y	TF +	Functional assay	Woei-A-Jin et al, 2016[50]
Solid cancer	608 (90 pancreatic)/ 40 (10 pancreatic)	180 d	TF +	Functional assay (fibrin generation and FXa generation	Van Es et al, 2018[51]
Pancreatic cancer	41/9	1 y	TF +	Functional assay	Faille et al, 2018[52]

Abbreviations: FCM, flow-cytometry; FXa: activated factor X; MV, microvesicle; PS, phosphatidylserine; TF, tissue factor; VTE, venous thromboembolism.

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

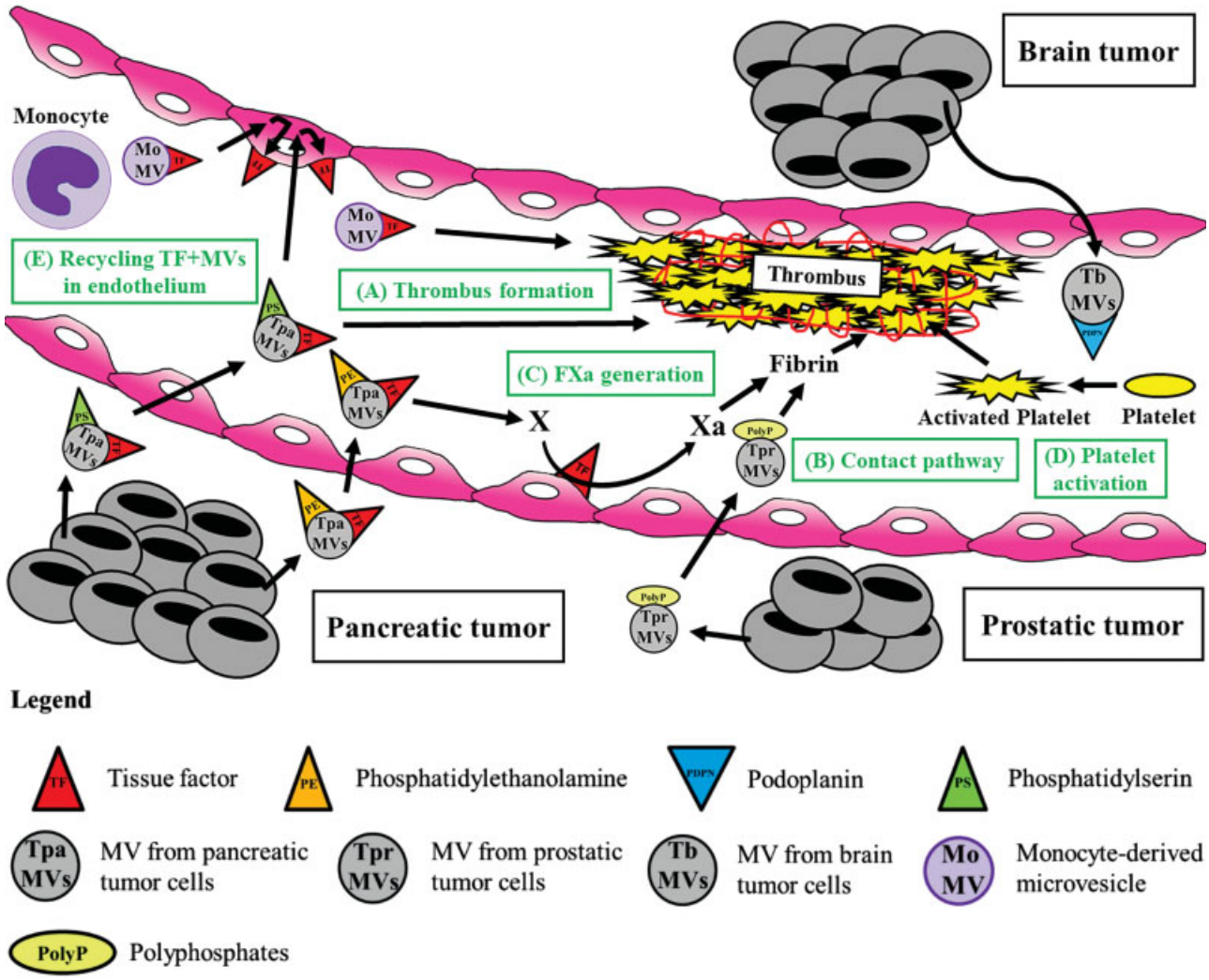


Fig. 1 (**A**) Diversity of mechanisms involving MVs in cancer associated thrombosis. MoMVs and MVs originating from the tumor cell itself rapidly accumulate at the site injury, increase fibrin formation and activating platelets. (**B**) Prostatic tumor cells-MV (Tpr MVs) also exhibit polyphosphates that may activate the contact pathway. (**C**) Pancreatic tumor cells-MVs (Tpa MVs) support robust generation of Xa provided by phosphatidylethanolamine externalization. (**D**) Brain tumor cells-MV (Tb MVs) may release Podoplanin (PDPN)-MVs that activate circulating platelets. (**E**) High levels of TF which accumulate in ECs and is recycled to the ECs surfaces. EC, endothelial cells; FXa: activated factor X; MoMV, monocyte-derived microvesicles; PolyP, polyphosphates; PS, phosphatidylserine; TF, tissue factor; t-PA, tissue-type plasminogen activator.

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

exact nature of what should be measured on these MVs may also not be restricted to TF.

Pancreatic cancer was the most studied, due to its high rate of CAT.[58] The role of pancreatic cancer-derived MVs in thrombosis has been first studied with the model of Panc02 pancreatic tumor cell lines. Using the ferric chloride mesentery vessel model and an ectopic pancreatic cancer mice model, a first study demonstrated that MVs released by Panc02 cell are detectable in mice peripheral circulation and accumulated in developing thrombus. Thrombus formation was reduced by inhibition of P-selectin suggesting a P-selectin/PSGL-1 interaction may be involved.[59] In this model, thrombus growth induced by both exogeneously infused tumor-MVs and endogenous MVs, was prevented by inhibition of platelet activation by clopidrogrel and by blocking αvβ1/β3 integrins, suggesting that tumor-MVs bind to the thrombus on activated platelets in an integrin-dependent manner.[60] Injection of the Panc02 derived MVs in the inferior vena cava (IVC) stenosis models significantly increased the number of mice developing a thrombus but also the thrombus size.[61] Interestingly, when MVs with low TF were injected, significantly less mice developed a thrombus, showing that TF from tumoral MVs is essential to their thrombus promoting activity. It was also recently shown that infusion of tumor-MVs resulted in the activation of platelets both in vitro and in vivo as suggested by the accumulation of platelets in the lung.[62] Thus TF + MVs enhance VTE both by increasing fibrin formation but also by activating platelets. The direct demonstration of the role of TF on MVs originating from the tumor cell itself has recently been confirmed in a recent study performed with human pancreatic BxPc-3 grown orthotopically in nude mice (►**Fig. 1A**). In the IVC stenosis model, inhibition of human TF reduced the clot size in tumor-bearing mice but did not affect clot size in control mice. These results demonstrate that TF + MVs released from pancreatic tumors

are responsible for increased clot size in tumor bearing mice.[63] Interestingly, inflammation is a further putative pathway that could provide the trigger driving the procoagulant response with a particular relevance for the development of VTE in pancreatic cancer. In this model, high levels of TF + MVs are present and increased leukocyte infiltration contributes to promote TF pathway and proinflammatory effects. Anticoagulant mechanisms are overwhelmed by the high levels of TF which accumulate in endothelial cells (ECs).TF is then recycled to the EV surfaces with PS, resulting in apoptosis, junctional weakening, and subsequent endothelial denudation, resulting in activation of the extrinsic pathway via Xa activation TF + MVs in the context of acute inflammation.[64] Beside TF pathway, another alternative novel pathway was also recently reported, using an IVC flow restricted model and strains of genetically engineered mice lacking GP1b or expressing reduced levels of TF.[65] The mechanisms are independent of platelets and myeloid cells and involve the synergistic activation of coagulation by pancreatic MVs and host TF. A major contribution of the procoagulant activity of pancreatic MVs was provided by phosphatidylethanolamine (PE) externalization which supported robust generation of Xa (►**Fig. 1C**). Disrupting PE dependent activation of factor X suppressed pancreatic MVs induced DVT without causing changes in hemostasis.[65] In terms of therapy, this study confirms the observation that low molecular weight heparins are effective for prevention and treatment of CAT[66,67] but also suggests that oral actor Xa inhibitors may also be even more effective and tolerated.[68]

In other cancers, TF is not necessary the major pathway by which MVs can promote VTE. For example, in prostate cancer, a recent work using mice knock-out for FXII, FXI, and kininogen showed that these mice were protected against pulmonary embolism by the infusion of prostate cancer-derived MVs.[69] These tumor-MVs also exhibit polyphosphates which suggests that tumor generated polyphosphate-rich MVs may activate the contact pathway (►**Fig. 1B**), favoring the thrombus formation.[70] In brain cancers, platelet aggregation is a mechanism by which brain tumors may release podoplanin (PDPN) positive MVs in the circulation that could activate circulating platelets (►**Fig. 1D**), resulting in increased VTE in patients with brain cancer.[71–73] Additionally, mammary carcinoma derived EVs that induce the formation of NETs which may represent another mechanism linking MVs and thrombosis.[74] Thus according to the type of cancer, TF-independent mechanisms associated with MVs can also be involved in CAT and, thus, represent a potential cause explaining why an association between the biomarker TF + MVs and CAT was not always found.

A More Complex Role of Microvesicles in Hemostasis

Beside their well-documented procoagulant activity, MVs vectorize anticoagulant and fibrinolytic molecules which may balance the resulting effect of MVs in the hemostasis equilibrium (►**Fig. 2**).

Anticoagulant molecules have been described at the surface of MVs originating of cells which may be activated in the tumoral environment, such as platelets, leukocytes, and endothelial cells. Anticoagulant proteins S and C, as others vitamin K-dependent molecules, can bind to the MVs surface on anionic PS residues and directly inhibit the procoagulant activity of platelet MVs.[75–77] The endothelial protein C-receptor (EPCR)[78] and

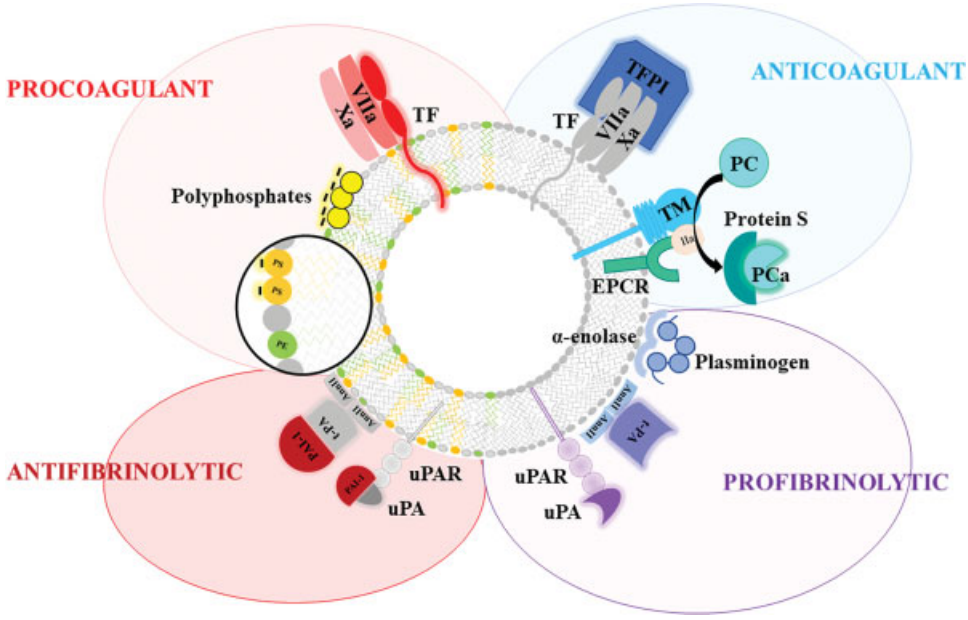


Fig. 2 Prothrombotic and antithrombotic molecular pattern of MVs. MVs are initially described to bear procoagulant molecules like phospholipids such as phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE), tissue factor (TF) and polyphosphates. Anticoagulant molecules have been more recently described at the surface of MVs like TFPI, thrombomodulin (TM) that activate protein C, its cofactor protein S, and the receptor EPCR. The role of MVs in hemostasis was complicated by the presence of proteins of the fibrinolytic system: the tissue-type plasminogen activator (t-PA) and urokinase (uPA) and its receptor urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and their principal inhibitor (PAI-1). MVs can also carry directly plasminogen on its receptors such as α-enolase. EPCR, endothelial protein C-receptor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

thrombomodulin[79] have been reported not only on endothelial-derived MVs generated in vitro but also among circulating MVs in patients.[80,81] Regulatory molecules, such as TFPI (TF pathway inhibitor), were detected on leukocytes and endothelial MVs.[82] Thus, the thrombogenicity of MVs depends on a balance between the pro- and anticoagulant molecules which may vary among various disease conditions. For instance, the TF/TFPI balance of MVs has been evaluated in 26 patients with cancer from various origins compared to 92 healthy control volunteers. As a result, the ratio of TF/TFPI MVs was significantly increased in the cancer patients due to a significant decrease of the percentage of TFPI + MVs.[83] The same team also recently showed that this balance is modified by chemotherapy drugs. Indeed, a significant increase in the circulating MVs TF/TFPI ratio was found after the first 24 hours of doxorubicin treatment.[84] Consistently, tumoral MVs derived from MDA-MB-231 cells stimulated with high-dose doxorubicin display a strong decrease in the TFPI levels resulting in a six-fold increase in their procoagulant activity.[82] Interestingly, in these studies, the critical variable was the level of the anticoagulant molecule on the MVs surface. These results emphasize the importance of taking into account both the procoagulant and the anticoagulant molecules on the MVs surface to better reflect their global effect. In practice, the presence of these anticoagulant molecules, such as TPFI, may impact in the resulting MVs procoagulant activity measured by functional assays. Indeed, the inhibition of TFPI increases their sensitivity to procoagulant MVs.[85,86] However, how the balance of TF/TFPI on circulating MVs is modified by the preanalytical and analytical protocols remains to be clarified.

The role of MVs in hemostasis is further complicated by the presence of fibrinolytic activity. Initially, proteolytic molecules, such as metalloproteinases and the urokinase (uPA)/uPA receptor, have been reported on MVs from tumoral cell lines in vitro[87–89] and from ascites from patients with ovarian cancers.[90–92] Tissue-type plasminogen activator (t-PA) was also identified on MVs derived from a prostate cancer cell line.[93] This tumoral MV proteolytic activity was first associated with an increased cellular invasiveness and metastasis.[94–96] It was shown that hsp90alpha is secreted in small EV and interacts with t-PA and its receptor annexin II in invasive cancer cells and contributes to their invasive nature by enhancing the conversion of plasminogen to active plasmin.[97] Finally, the complete panel of molecules allowing MVs to efficiently generate plasmin and to vectorize a fibrinolytic activity was found to be present at their surface. This was first demonstrated on MVs from endothelial origin in vitro[98,99] and extended to leucocyte MVs.[100] The plasmin generation capacity involves the binding of plasminogen on a specific receptor, such as alpha-enolase, and its activators, such as uPA or t-PA, on receptors specific to surface of the MVs.[101] Interestingly, this MV-dependent activity was found on circulating MVs of patients including cancer patients with acute promyelocytic leukemia.[100,102] The fibrinolytic potential varies according to the cellular origin and the vesicular subsets. Comparison of the thrombotic and fibrinolytic activity of exosomes and MVs from several tumor cell lines showed that exosomes and/or MVs from most cell lines (MCF7, NB4, MDA-MB-231) with the exception of the A549 cell line, displayed fibrinolytic activity toward a pure fibrin clot, while only exosomes from MDA-MB-231 cells could degrade a fibrin clot formed in plasma.[103] Interestingly, this fibrinolytic potential could be transferred from cell to cell by exosomes. Indeed, the incubation of MDA-MB-231 cell-derived exosomes with A549 cells increased plasmin generation by these cells.[103]

Plasmin generation is a highly regulated process controlled by a balance between activators and inhibitors. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) has been detected on tumoral MVs surface. MVs derived from leukemic mast cells inhibit the process of fibrinolysis by increasing the expression and secretion of PAI-1.[104] It has been also recently shown that the active oncogene EGFRvIII increased the concentration of TF and PAI-1 in prostate cancer derived MVs increasing their procoagulant activity.[105]

Presence of both procoagulant and profibrinolytic activity at the surface of MVs lead us to propose that the resulting effect on bleeding or thrombotic events will be oriented as a function of the balance between the MV-dependent procoagulant and fibrinolytic activities.[106,107] This concept of the coagulofibrinolytic balance of MVs was recently evaluated in the context of the fibrinolytic imbalance associated with septic shock. In a preliminary study, we showed that the MVs fibrinolytic activity was significantly higher in septic shock patients who survived compared to those who died and that this MV-dependent activity was inversely correlated with multiorgan failure scores and ischemic markers.[108] However, to what extent the fibrinolytic side may counterbalance the procoagulant side and play a significant role in the cancer-associated thrombosis pathophysiology is still largely unknown. Similarly, whether the coagulofibrinolytic balance of MVs is a better predictor of the occurrence of thrombosis in cancer patients rather their procoagulant activity alone, remains to be evaluated with suitable methodologies.

Methodological Considerations

The reported limited performance of MVs as biomarker to accurately predict the risk of thrombosis in cancer patients, may also originate from methodological issues.

Preanalytics remains an important source of artifacts. Recommendations have been made but they are not always easy to apply in clinical studies.[109,110] Moreover, several functional assays require MV isolation from the body fluids before performing the test. For many years, ultracentrifugation has been used. However, the centrifugation step significantly decreases the reproducibility of the assays and may impede interlaboratory comparisons. Immunocapture on magnetic beads may represent a useful alternative.[108]

The two main approaches which have been applied to evaluate the potential of MVs biomarker of cancer associated thrombosis are: (1) the antigenic detection of procoagulant molecules at the surface of MVs[111] or (2) the functional capacity of MVs to generate factor Xa, thrombin, or a clot. Combined strategies have also been developed[112] (►**Table 2**).

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

Table 2 Procoagulant assay

Assay	Strategy	Target	Method	Preanalytics	EV commercial kit	Reference (author, year)
Flow cytometry	Antigenic	PS, TF, TF/TFPI	Immunofluorimetry	PFP	No	Poncelet et al, 2015,[113] Nolan, 2017[114]
Flow cytometry	Antigenic	Fibrin	Immunofluorimetry	PFP	No	Mege et al, 2017[39]
Scanning confocal microscopy	Antigenic	TF	Immunofluorimetry	PFP/ Centrifugation	No	Hisada et al, 2017[115]
Calibrated automated thrombogram	Functional	PS or TF	Thrombin generation	PFP	Yes	Hemker et al, 2002[118]
STA-Procoag PPL	Functional	PS	Coagulation time	PFP	Yes	Exner et al, 2003[116]
Zymuphen-MP ELISA Kit	Combined	PS	Thrombin generation	Immunocapture (PS) on PFP	Yes	Laroche et al, 2017[112]
Zymuphen-MP TF	Combined	TF	FXa generation	Immunocapture (PS) on PFP	Yes	Laroche et al, [112]
Factor Xa generation assays	Functional	TF	FXa generation	Centrifugation	No	Khorana et al, 2008,[46] Woei-A-Jin et al, 2016[50]
Fibrin generation assay	Functional	PS + TF	Fibrin generation	Centrifugation	No	Berckmans et al, 2011[125]

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PFP, platelet free plasma; PS, phosphatidylserin; TF, tissue factor; TFPI, TF pathway inhibitor.
Note: Different strategies were used: antigenic assay using flow cytometry, functional assay using coagulation time, factor Xa (FXa) generation assay, thrombin generation assay or fibrin generation assay.

Among antigenic assays, flow cytometry (FCM) was used for the detection of procoagulant molecules such as PS with annexin V or lactadherin and TF with specific antibodies. Over the past few years, significant improvements have been made regarding the sensitivity of FCM to detect single vesicles with a diameter of < 300 nm which have further established this methodology as the most promising tool for routine enumeration of EV subsets.[113,114] However, the lack of sensitivity of the current flow cytometers to characterize small MVs and to detect small amount of molecules at the MVs surface still impede this evaluation. Moreover, most FCM studies did not take into account the presence of other active PLs, such as PE or the presence of physiological inhibitors, regulating the procoagulant activity, such as TFPI. As an interesting alternative, we measured fibrin + (positive) MVs by FCM in pancreatic and colorectal cancers. The hypothesis is that as fibrin is the final product of the coagulation cascade, the level of fibrin + MVs may directly reflect the activation state of the blood coagulation cascade. As a result, fibrin + MVs were significantly increased in patients with thrombosis.[39] Other antigenic methods have been recently proposed, such as the detection of TF + MVs by scanning confocal microscopy.[115]

Regarding functional tests, a first group of methods focuses on the PS-dependent procoagulant activity of MV:

1. PS contribution can be evaluated measuring a PL-dependent coagulation time after dilution in a PL-depleted plasma and activation with factor Xa (FXa) and calcium. Thus, the only PLs present in the reaction mixture are provided by the patient sample. This test, initially described by Exner et al,[116] is commercially available (XaCT test, Haematex; STA-Procoag-PPL, Stago) and can be fully automated on routine hemostasis instruments.
2. Other assays combine solid-phase capture of MVs on annexin V and thrombin generation (Zymuphen-MP ELISA kit, Hyphen Biomed).[117] The generation of thrombin after adding prothrombin, FXa, FVa, and calcium, is measured via cleavage of a chromogenic thrombin substrate producing absorbance at 405 nm. A standard curve of known MVs concentration is used to convert the absorbance into nM PS. This test may be adapted to quantify different subsets of MVs substituting annexin V by various capture antibodies. However, the sensitivity of these methods is limited by a heterogeneous and passive sedimentation of MVs and a limited contact surface.
3. The Calibrated Automated Thrombogram assay was originally developed by Hemker et al for measuring thrombin generation in platelet-rich or platelet-poor plasma in a variety of clinical settings (Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope BV and Stago).[118] To evaluate the PS contribution of MVs, thrombin generation is initiated by the addition of a reagent containing tissue factor and a minimal amount of PLs (platelet poor plasma reagent). Thrombin generation is monitored with a thrombin fluorogenic substrate. The use of a thrombin calibrator for each individual plasma corrects for donor-to-donor differences in color of plasma, inner filter effects, and substrate consumption. This assay is sensitive to the contact phase activation. Alternatively, plasmatic MVs can be pelleted, washed and resuspended in MV-free plasma. The reproducibility of the measurement will decrease, but the measurement of thrombin generation will not be affected by soluble factors, the presence of anticoagulants, or a coagulopathy.

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

A second group of assays focuses on the measurement of TF-dependent procoagulant activity of MVs:

1. The calibrated automated thrombogram assay can be modified to be more sensitive to TF. Thrombin generation in platelet free plasma or purified MVs spiked in MV-free plasma is initiated in presence of a "MP reagent" which contents only PLs and no TF. This assay is sensitive to the contact phase activation. Even if this test is more sensitive than the Zymuphen-TF (described below) in a Neisseria meningitidis-stimulated whole blood model,[119] high concentrations of TF + MVs are necessary to be detectable probably because of a masking effect due to the high concentration of PLs added in the test.
2. Most of the studies evaluating the potential interest of MVs as a biomarker of the cancer-associated thrombosis have measured procoagulant MVs with FXa generation assays as a read-out of TF-FVIIa activity.[120] These assays have been performed using either antibody-mediated MVs captured on coated plate or isolation of the MVs by high-speed centrifugation. In the commercially available assay (Zymuphen-TF, Hyphen Biomed), MVs are captured using an anti-TF antibody which does not interfere with TF activity. Unfortunately, no anti-TF inhibitor antibody is incorporated during the measurement of FXa. It was found that this assay has reduced specificity and sensitivity compared with an "in-house" assay that isolates MVs using centrifugation.[121] Two slightly different "in house" assays have been reported for the measurement of TF + MVs activity after isolation of MVs by high-speed centrifugation. MVs are washed then resuspended in buffer before measuring FXa. Both assays use commercially available Dade thromboplastin reagent Innovin as a standard. FVII is added with synthetic PLs in the "kinetic assays,"[42] whereas FVIIa is used without adding PLs in the endpoint assay.[46] A moderate correlation was found ($r = 0.61$, $p < 0.001$) between the two assays in 54 pancreatic cancer patients.[54] Several ongoing developments are improving the sensitivity of these assays.[122,123]

Alternatively, a more global assay has been proposed monitoring the fibrin generation (FGT; fibrin generation test) after incubating purified MVs by high-speed centrifugation in a plasma in presence of anti-TF or anti-FXII blocking antibodies.[124,125] Clotting is initiated by addition of calcium and fibrin formation is monitored by kinetic measurement of the optical density at 405 nm.

Data, comparing all these methods, to measure the procoagulant potential of MVs are lacking. Moreover, FCM is the only method which benefits from a standardization effort so far which lead to different tools to reduce the interlaboratory variability.[123,124] This work is currently ongoing in a collaborative workshop on the standardization of EVs combining the experts from three international societies: International Society on Extracellular Vesicles (ISEV), International Society on Advancement of Cytometry (ISAC), and the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). However, development of international standards is still needed to compare the results in the field. In a timely manner, a new ISTH workshop, comparing the sensitivity and the specificity of assays to measure TF + MV in plasma samples will start this year. Results of these studies will certainly provide important information to progress toward the optimal methods to measure MVs and standardization tools mandatory for robust multicenter studies in the cancer associated thrombosis field.

Conclusion

Up to now, several issues explain why MVs are not systemically found associated with CAT, including the diversity of mechanisms associating MVs and different types of cancer, the complex role of MVs in hemostasis integrating their anticoagulant and fibrinolytic activity and the limited sensitivity, reproducibility, and standardization of current methodologies allowing to measure MVs. Continuation of the technical development for measuring MVs, standardization of methods in combination with efforts to define the most interesting antigenic or functional target to be measured on MVs in different clinical settings are issues that need to be addressed during the coming years. In addition, modulating MVs with treatment and the benefits of regulating MVs in the prevention of future cardiovascular events are to be tested in prospective large randomized trials. Altogether, the rapidly growing knowledge on the biology of EV combined with the many technological advances set high expectations for future clinical applications of MVs as a predictive biomarker for CAT.

Conflicts of Interest

R.L. reports grants from Stago/BioCytex, during the conduct of the study; in addition, R.L. has a patent Microvesicle Plasmin generation licensed to Stago. The other authors have no conflict of interest to disclose.

References

1 van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacol Rev 2012;64(03):676–705
2 Boulanger CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. Nat Rev Cardiol 2017;14(05): 259–272
3 György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci 2011;68(16):2667–2688
4 Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, et al. Focus on extracellular vesicles: new frontiers of cell-to-cell communication in cancer. Int J Mol Sci 2016;17(02):175
5 Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31(01): 27–33
6 Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) working group on atherosclerosis and vascular biology. Thromb Haemost 2017; 117:1296–1316
7 Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol 2013;13(01):34–45
8 Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. Nature 2010;468 (7325):834–838

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

9 Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. J Thromb Haemost 2011;9(10):1883–1891
10 Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, et al. Tumor shedding and coagulation. Science 1981;212(4497):923–924
11 Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, et al. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. Cancer Res 1983;43(09):4434–4442
12 Collier MEW, Ettelaie C. Regulation of the incorporation of tissue factor into microparticles by serine phosphorylation of the cytoplasmic domain of tissue factor. J Biol Chem 2011;286 (14):11977–11984
13 Collier MEW, Maraveyas A, Ettelaie C. Filamin-A is required for the incorporation of tissue factor into cell-derived microvesicles. Thromb Haemost 2014;111(04):647–655
14 Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, et al. Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. J Clin Invest 2015;125(04):1471–1484
15 Ettelaie C, Collier MEW, Featherby S, Greenman J, Maraveyas A. Oligoubiquitination of tissue factor on Lys255 promotes Ser253-dephosphorylation and terminates TF release. Biochim Biophys Acta 2016;1863(11):2846–2857
16 Rothmeier AS, Marchese P, Langer F, et al. Tissue factor prothrombotic activity is regulated by integrin-arf6 trafficking. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37(07):1323–1331
17 Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. Blood 2002;99(11):3962–3970
18 Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles–a new player in sepsis? Crit Care 2010;14(05):236
19 Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood 2005; 106(05):1604–1611
20 Collier MEW, Mah P-M, Xiao Y, Maraveyas A, Ettelaie C. Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity. Thromb Haemost 2013;110(05):966–976
21 Cointe S, Lacroix R, Dignat-George F. Platelet-derived microparticles. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorder. Cham, Switzerland: Springer; 2017:379–392
22 Mazurov A, Antonova O, Golubeva N. Procoagulant properties of microparticles produced by monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells. Res Pr Thromb Haemost Berlin 2017; 1:443–444
23 Tripisciano C, Weiss R, Eichhorn T, et al. Different potential of extracellular vesicles to support thrombin generation: contributions of phosphatidylserine, tissue factor, and cellular origin. Sci Rep 2017;7(01):6522
24 Van Der Meijden PEJ, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, ten Cate H, Spronk HM. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. J Thromb Haemost 2012;10(07):1355–1362
25 Rubin O, Delobel J, Prudent M, et al. Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation. Transfusion 2013;53(08):1744–1754
26 Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. Circ Res 2012;110(02):356–369
27 Halim ATA, Ariffin NAFM, Azlan M. Review: the multiple roles of monocytic microparticles. Inflammation 2016;39(04):1277–1284
28 Stojkovic S, Thulin Å, Hell L, et al. IL-33 stimulates the release of procoagulant microvesicles from human monocytes and differentially increases tissue factor in human monocyte subsets. Thromb Haemost 2017;117(07):1379–1390
29 Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. Ann Rheum Dis 2014;73(10):1854–1863
30 Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Østerud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. Blood 2008;111(03):1208–1216
31 Geddings JE, Mackman N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. Blood 2013;122(11):1873–1880
32 Ettelaie C, Collier ME, Featherby S, Benelhaj NE, Greenman J, Maraveyas A. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: correlation with tissue factor and PAR2 expression. Thromb J 2016;14:2
33 Gomes FG, Sandim V, Almeida VH, et al. Breast-cancer extracellular vesicles induce platelet activation and aggregation by tissue factor-independent and -dependent mechanisms. Thromb Res 2017;159:24–32
34 Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. J Exp Med 2003;197(11):1585–1598
35 Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. Blood 2004;104(10):3190–3197
36 Owens AP III, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. Circ Res 2011;108(10):1284–1297
37 Zwicker JI, Trenor CC III, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31(04):728–733
38 Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012;32(03):563–568
39 Mege D, Crescence L, Ouaissi M, et al. Fibrin-bearing microparticles: marker of thrombo-embolic events in pancreatic and colorectal cancers. Oncotarget 2017;8(57):97394–97406
40 Hisada Y, Mackman N. Mouse models of cancer-associated thrombosis. Thromb Res 2018;164(Suppl 1):S48–S53
41 Sørensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. N Engl J Med 2000;343(25):1846–1850
42 Tesselaar MET, Romijn FPHTM, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? J Thromb Haemost 2007;5(03): 520–527
43 Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009;15(22): 6830–6840
44 Manly DA, Wang J, Glover SL, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with venous thromboembolism. Thromb Res 2010;125(06):511–512
45 Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. Thromb Res 2011;127(05): 473–477
46 Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. J Thromb Haemost 2008;6(11):1983–1985
47 van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans RJ, et al. Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. Thromb Haemost 2012;108(01):160–165
48 Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, et al. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

glioma: a potential prothrombotic role. Thromb Haemost 2013; 110(02):378–385
49 Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, et al. Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. Thromb Res 2013;132(02):180–184
50 Woei-A-Jin FJSH, Tesselaar MET, Garcia Rodriguez P, Romijn FP, Bertina RM, Osanto S. Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated thrombosis? Br J Cancer 2016;115(03):332–338
51 van Es N, Hisada Y, Di Nisio M, et al. Extracellular vesicles exposing tissue factor for the prediction of venous thromboembolism in patients with cancer: A prospective cohort study. Thromb Res 2018;166:54–59
52 Faille D, Bourrienne M-C, de Raucourt E, et al. Biomarkers for the risk of thrombosis in pancreatic adenocarcinoma are related to cancer process. Oncotarget 2018;9(41):26453–26465
53 Thaler J, Ay C, Weinstabl H, et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. Ann Hematol 2011;90(04):447–453
54 Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. J Thromb Haemost 2012;10(07):1363–1370
55 Hernández C, Orbe J, Roncal C, et al. Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients. Thromb Haemost 2013;110(03):598–608
56 Cui C-J, Wang G-J, Yang S, Huang SK, Qiao R, Cui W. Tissue factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients: a meta-analysis. Sci Rep 2018;8(01):1675
57 Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. Blood 2017;130(13):1499–1506
58 Mege D, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Microparticles and cancer thrombosis in animal models. Thromb Res 2016;140(Suppl 1):S21–S26
59 Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. J Exp Med 2009;206(09):1913–1927
60 Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. Int J Cancer 2015;136(02):462–475
61 Thomas GM, Brill A, Mezouar S, et al. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. J Thromb Haemost 2015;13(07):1310–1319
62 Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, et al. Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. J Thromb Haemost 2016;14(01):153–166
63 Hisada Y, Ay C, Auriemma AC, Cooley BC, Mackman N. Human pancreatic tumors grown in mice release tissue factor-positive microvesicles that increase venous clot size. J Thromb Haemost 2017;15(11):2208–2217
64 Date K, Ettelaie C, Maraveyas A. Tissue factor-bearing microparticles and inflammation: a potential mechanism for the development of venous thromboembolism in cancer. J Thromb Haemost 2017;15(12):2289–2299
65 Stark K, Schubert I, Joshi U, et al. Distinct pathogenesis of pancreatic cancer microvesicle-associated venous thrombosis identifies new antithrombotic targets in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2018;38(04):772–786
66 Lee AYY, Levine MN, Baker RI, et al; Randomized Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin versus Oral Anticoagulant Therapy for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer (CLOT) Investigators. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. N Engl J Med 2003;349(02):146–153
67 Lee AYY, Kamphuisen PW, Meyer G, et al; CATCH Investigators. Tinzaparin vs warfarin for treatment of acute venous thromboembolism in patients with active cancer: a randomized clinical trial. JAMA 2015;314(07):677–686
68 Streiff MB, Milentijevic D, McCrae K, et al. Effectiveness and safety of anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism in patients with cancer. Am J Hematol 2018;93(05): 664–671
69 Nickel KF, Ronquist G, Langer F, et al. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. Blood 2015;126(11):1379–1389
70 Nickel KF, Labberton L, Long AT, et al. The polyphosphate/factor XII pathway in cancer-associated thrombosis: novel perspectives for safe anticoagulation in patients with malignancies. Thromb Res 2016;141(Suppl 2):S4–S7
71 Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. J Biol Chem 2007;282(36):25993–26001
72 Thaler J, Koder S, Kornek G, Pabinger I, Ay C. Microparticle-associated tissue factor activity in patients with metastatic pancreatic cancer and its effect on fibrin clot formation. Transl Res 2014;163(02):145–150
73 Riedl J, Preusser M, Nazari PMS, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. Blood 2017;129(13): 1831–1839
74 Leal AC, Mizurini DM, Gomes T, et al. Tumor-derived exosomes induce the formation of neutrophil extracellular traps: implications for the establishment of cancer-associated thrombosis. Sci Rep 2017;7(01):6438
75 Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. Blood 1991;77(12):2641–2648
76 Dahlbäck B, Wiedmer T, Sims PJ. Binding of anticoagulant vitamin K-dependent protein S to platelet-derived microparticles. Biochemistry 1992;31(51):12769–12777
77 Stavenuiter F, Davis NF, Duan E, Gale AJ, Heeb MJ. Platelet protein S directly inhibits procoagulant activity on platelets and microparticles. Thromb Haemost 2013;109(02):229–237
78 Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. Blood 2005;105(04):1515–1522
79 Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. Br J Haematol 1997;96(03): 534–542
80 Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. Thromb Haemost 2005;93(01): 35–39
81 Tsimerman G, Roguin A, Bachar A, Melamed E, Brenner B, Aharon A. Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. Thromb Haemost 2011;106(02):310–321
82 Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. Thromb Haemost 2008;100(05):878–885
83 Aharon A, Katzenell S, Tamari T, Brenner B. Microparticles bearing tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in gestational vascular complications. J Thromb Haemost 2009;7 (06):1047–1050
84 Aharon A, Sabbah A, Ben-Shaul S, et al. Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function. Oncotarget 2017;8(38):63265–63280
85 Gheldof D, Mullier F, Chatelain B, Dogné JM, Chatelain C. Inhibition of tissue factor pathway inhibitor increases the sensitivity of thrombin generation assay to procoagulant microvesicles. Blood Coagul Fibrinolysis 2013;24(05):567–572

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

86 Hellum M, Franco-Lie I, Øvstebø R, Hauge T, Henriksson CE. The effect of corn trypsin inhibitor, anti-tissue factor pathway inhibitor antibodies and phospholipids on microvesicle-associated thrombin generation in patients with pancreatic cancer and healthy controls. PLoS One 2017;12(09):e0184579
87 Dolo V, Ginestra A, Ghersi G, Nagase H, Vittorelli ML. Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities. J Submicrosc Cytol Pathol 1994;26(02):173–180
88 Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, et al. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. J Biol Chem 1997;272 (27):17216–17222
89 Dolo V, Ginestra A, Cassarà D, et al. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. Cancer Res 1998;58(19): 4468–4474
90 Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, et al. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. Clin Exp Metastasis 1999;17(02):131–140
91 Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. Anticancer Res 1999;19(4C):3439–3445
92 Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. Cancer Res 2004;64(19):7045–7049
93 Millimaggi D, Festuccia C, Angelucci A, et al. Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells. Int J Oncol 2006;28(04):909–914
94 Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassarà D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. Anticancer Res 1998;18(5A):3433–3437
95 Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. Clin Exp Metastasis 2000;18(02):163–170
96 Jung T, Castellana D, Klingbeil P, et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. Neoplasia 2009; 11(10):1093–1105
97 McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. BMC Cancer 2010;10:294
98 Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. Blood 2007;110(07):2432–2439
99 Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, et al. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. Blood 2010;115(10): 2048–2056
100 Lacroix R, Plawinski L, Robert S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. Haematologica 2012;97(12):1864–1872
101 Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles: new protagonists in pericellular and intravascular proteolysis. Semin Thromb Hemost 2013;39(01):33–39
102 Kwaan HC, Rego EM. Role of microparticles in the hemostatic dysfunction in acute promyelocytic leukemia. Semin Thromb Hemost 2010;36(08):917–924
103 Durrieu L, Bharadwaj A, Waisman DM. Analysis of the thrombotic and fibrinolytic activities of tumor cell-derived extracellular vesicles. Blood Adv 2018;2(10):1054–1065
104 Al-Nedawi K, Szemraj J, Cierniewski CS. Mast cell-derived exosomes activate endothelial cells to secrete plasminogen activator inhibitor type 1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25(08): 1744–1749
105 Al Saleh HA, Haas-Neill S, Al-Hashimi A, et al. Thrombotic characteristics of extracellular vesicles derived from prostate cancer cells. Prostate 2018;78(13):953–961
106 Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. J Thromb Haemost 2013;11(Suppl 1):24–35
107 Vallier L, Cointe S, Lacroix R, et al. Microparticles and Fibrinolysis. Semin Thromb Hemost 2017;43(02):129–134
108 Cointe S, Harti Souab K, Bouriche T, et al. A new assay to evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis imbalance. J Extracell Vesicles 2018;7(01):1494482
109 Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. J Thromb Haemost 2012;10 (03):437–446
110 Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. Circ Res 2017;120(10):1632–1648
111 Shpacovitch V, Hergenröder R. Optical and surface plasmonic approaches to characterize extracellular vesicles. A review. Anal Chim Acta 2018;1005:1–15
112 Laroche M, Dunois C, Vissac AM, Amiral J. Update on functional and genetic laboratory assays for the detection of platelet microvesicles. Platelets 2017;28(03):235–241
113 Poncelet P, Robert S, Bailly N, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. Transfus Apheresis Sci 2015;53(02):110–126
114 Nolan JP, Jones JC. Detection of platelet vesicles by flow cytometry. Platelets 2017;28(03):256–262
115 Hisada Y, Auriemma AC, Alexander W, Ay C, Mackman N. Detection of tissue factor-positive extracellular vesicles by laser scanning confocal microscopy. Thromb Res 2017;150:65–72
116 Exner T, Joseph J, Low J, Connor D, Ma D. A new activated factor X-based clotting method with improved specificity for procoagulant phospholipid. Blood Coagul Fibrinolysis 2003;14(08):773–779
117 Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. J Thromb Haemost 2004;2(10):1842–1851
118 Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiol Haemost Thromb 2002;32(5-6):249–253
119 Hellum M, Øvstebø R, Trøseid A-MS, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. Blood Coagul Fibrinolysis 2012;23(06):520–526
120 Hisada Y, Alexander W, Kasthuri R, et al. Measurement of microparticle tissue factor activity in clinical samples: A summary of two tissue factor-dependent FXa generation assays. Thromb Res 2016;139:90–97
121 Tatsumi K, Antoniak S, Monroe DM III, Khorana AA, Mackman N; Subcommittee on Hemostasis and Malignancy of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Evaluation of a new commercial assay to measure microparticle tissue factor activity in plasma: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost 2014;12(11): 1932–1934
122 Vallier L, Bouriche T, Bonifay A, et al. New specific and highly sensitive procoagulant test to measure tissue factor activity on microparticles. Res Pract Thromb Haemost Berlin 2017;1:1087
123 Hisada Y, Mackman N. Measurement of tissue factor activity in extracellular vesicles from human plasma samples. Res Pr Thromb Haemost 2018;3:44–48
124 Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. J Thromb Haemost 2003;1(12):2561–2568
125 Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MC, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. Blood 2011;117(11):3172–3180

Downloaded by: Georgetown University Medical Center. Copyrighted material.

BIBLIOGRAPHIE

1. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* 2012;64(3):676–705.
2. Boulanger CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2017;14(5):259–272.
3. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 2011;68(16):2667–2688.
4. Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, et al. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(2):175.
5. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(1):27–33.
6. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb. Haemost.* 2017;117(7):1296–1316.
7. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(1):34–45.
8. Tesselaar MET, Romijn FPHTM, Van Der Linden IK, et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J. Thromb. Haemost.* 2007;5(3):520–527.
9. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009;15(22):6830–6840.
10. Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, et al. Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. *Thromb. Res.* 2013;132(2):180–184.
11. Woei-A-Jin FJSH, Tesselaar MET, Garcia Rodriguez P, et al. Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated thrombosis? *Br. J. Cancer*. 2016;115(3):332–338.
12. Faille D, Bourrienne M-C, de Raucourt E, et al. Biomarkers for the risk of thrombosis in pancreatic adenocarcinoma are related to cancer process. *Oncotarget*. 2018;9(41):26453–26465.
13. Cui C-J, Wang G-J, Yang S, et al. Tissue Factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients: A meta-analysis. *Sci. Rep.* 2018;8(1):1675.
14. Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood*. 2017;130(13):1499–1506.
15. Poon IKH, Parkes MAF, Jiang L, et al. Moving beyond size and phosphatidylserine exposure: evidence for a diversity of apoptotic cell-derived extracellular vesicles in vitro. *J. Extracell. Vesicles*. 2019;8(1):1608786.
16. Atkin-Smith GK, Poon IKH. Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends Cell Biol.* 2017;27(2):151–162.

17. Tixeira R, Caruso S, Paone S, et al. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*. 2017;22(3):475–477.

18. Poon IKH, Chiu Y-H, Armstrong AJ, et al. Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. *Nature*. 2014;507(7492):329–334.

19. Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat. Commun.* 2015;6:7439.

20. Moss DK, Betin VM, Malesinski SD, Lane JD. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J. Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2362–2374.

21. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972;26(4):239–257.

22. Orlando KA, Stone NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 2006;312(1):5–15.

23. Witasp E, Uthaisang W, Elenström-Magnusson C, et al. Bridge over troubled water: milk fat globule epidermal growth factor 8 promotes human monocyte-derived macrophage clearance of non-blebbing phosphatidylserine-positive target cells. *Cell Death Differ.* 2007;14(5):1063–1065.

24. Xu X, Lai Y, Hua Z-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.* 2019;39(1):.

25. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(8):581–593.

26. Théry C, Boussac M, Véron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2001;166(12):7309–7318.

27. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* 2015;6:203.

28. Möbius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, et al. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 2002;50(1):43–55.

29. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2014;29:116–125.

30. Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5553–5565.

31. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 2012;14(7):677–685.

32. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244–1247.

33. Strauss K, Goebel C, Runz H, et al. Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 2010;285(34):26279–26288.

34. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* 2014;5:3477.

35. van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell*. 2011;21(4):708–721.

36. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 2013;288(17):11649–11661.

37. Lea J, Sharma R, Yang F, et al. Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study. *Oncotarget*. 2017;8(9):14395–14407.

38. Sharma R, Huang X, Brekken RA, Schroit AJ. Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies. *Br. J. Cancer*. 2017;117(4):545–552.

39. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *J. Pharm. Sci.* 2017;106(1):168–175.

40. Grant R, Ansa-Addo E, Stratton D, et al. A filtration-based protocol to isolate human plasma membrane-derived vesicles and exosomes from blood plasma. *J. Immunol. Methods*. 2011;371(1–2):143–151.

41. Yang Y, Lee M, Fairn GD. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.* 2018;293(17):6230–6240.

42. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 2013;113(1):1–11.

43. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21(3):157–171.

44. Zwicker JI. Tissue factor-bearing microparticles and cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008;34(2):195–198.

45. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertens. Dallas Tex 1979*. 2006;48(2):180–186.

46. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock Augusta Ga*. 2006;26(5):464–471.

47. Liu M-L, Williams KJ. Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2012;19(2):121–127.

48. Boulanger Chantal M., Scoazec Alexandra, Ebrahimian Talin, et al. Circulating Microparticles From Patients With Myocardial Infarction Cause Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2001;104(22):2649–2652.

49. Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 2005;16(11):3381–3388.

50. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;45(10):1622–1630.

51. Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, et al. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* 2001;104(1):1–6.

52. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 1997;99(9):2118–2127.

53. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 1998;102(1):136–144.

54. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, et al. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001;15(5):825–835.

55. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1998;161(8):4382–4387.

56. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999;274(33):23111–23118.

57. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, et al. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):277–287.

58. Distler JHW, Pisetsky DS, Huber LC, et al. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3337–3348.

59. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, Mekori YA. T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2010;185(7):4206–4212.

60. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000;95(4):1317–1323.

61. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, et al. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J. Trauma*. 2001;50(5):801–809.

62. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 2002;30(5):450–459.

63. Rautou P-E, Leroyer AS, Ramkhelawon B, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ. Res.* 2011;108(3):335–343.

64. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2005;105(3):924–930.

65. Puhm F, Afonyushkin T, Resch U, et al. Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells. *Circ. Res.* 2019;125(1):43–52.

66. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ. Res.* 2017;120(10):1658–1673.

67. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, et al. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am. J. Pathol.* 2007;171(5):1713–1723.

68. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009;119(21):2808–2817.

69. Leroyer AS, Rautou P-E, Silvestre J-S, et al. CD40 Ligand+ Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Stimulate Endothelial Proliferation and Angiogenesis: A Potential Mechanism for Intraplaque Neovascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;52(16):1302–1311.

70. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 2011;118(5):1359–1369.

71. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat. Med.* 2004;10(5):502–509.

72. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J-M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.* 2004;11(3):156–164.

73. Freyssinet J-M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(7):1655–1662.

74. Bank IEM, Timmers L, Gijsberts CM, et al. The diagnostic and prognostic potential of plasma extracellular vesicles for cardiovascular disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2015;15(12):1577–1588.

75. Mege D, Panicot-Dubois L, Ouaissi M, et al. The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int. J. Cancer*. 2016;138(4):939–948.

76. Mege D, Crescence L, Ouaissi M, et al. Fibrin-bearing microparticles: marker of thrombo-embolic events in pancreatic and colorectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(57):97394–97406.

77. Mege D, Panicot-Dubois L, Dubois C. Tumor-Derived Microparticles to Monitor Colorectal Cancer Evolution. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. 2018;1765:271–277.

78. Skeppholm M, Mobarrez F, Malmqvist K, Wallén H. Platelet-derived microparticles during and after acute coronary syndrome. *Thromb. Haemost.* 2012;107(6):1122–1129.

79. Montoro-García S, Shantsila E, Tapp LD, et al. Small-size circulating microparticles in acute coronary syndromes: relevance to fibrinolytic status, reparative markers and outcomes. *Atherosclerosis*. 2013;227(2):313–322.

80. Giannopoulos G, Oudatzis G, Paterakis G, et al. Red blood cell and platelet microparticles in myocardial infarction patients treated with primary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* 2014;176(1):145–150.

81. van der Zee PM, Biró E, Ko Y, et al. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin. Chem.* 2006;52(4):657–664.

82. Augustine D, Ayers LV, Lima E, et al. Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress. *Circ. Res.* 2014;114(1):109–113.

83. Hu S-S, Zhang H-G, Zhang Q-J, Xiu R-J. Small-size circulating endothelial microparticles in coronary artery disease. *PloS One*. 2014;9(8):e104528.

84. Jayachandran M, Litwiller RD, Owen WG, et al. Characterization of blood borne microparticles as markers of premature coronary calcification in newly menopausal women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008;295(3):H931–H938.

85. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb. Res.* 1993;72(4):295–304.

86. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2006;4(6):1296–1302.

87. Williams JB, Jauch EC, Lindsell CJ, Campos B. Endothelial microparticle levels are similar in acute ischemic stroke and stroke mimics due to activation and not apoptosis/necrosis. *Acad. Emerg. Med. Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med.* 2007;14(8):685–690.

88. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;45(9):1467–1471.

89. Jung K-H, Chu K, Lee S-T, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann. Neurol.* 2009;66(2):191–199.

90. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am. J. Pathol.* 2008;173(4):1210–1219.

91. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br. J. Haematol.* 2003;123(5):896–902.

92. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 1999;104(1):93–102.

93. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 2004;91(4):667–673.

94. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus*. 2009;18(8):671–675.

95. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2008;47(12):1820–1825.

96. Georgescu A, Alexandru N, Popov D, et al. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2009;7(9):1566–1575.

97. Helley D, de Latour RP, Porcher R, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica*. 2010;95(4):574–581.

98. Woth G, Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, et al. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (Candida albicans) sepsis. *Ann. Clin. Biochem.* 2012;49(Pt 6):554–560.

99. Paues Göranson S, Thålin C, Lundström A, et al. Circulating H3Cit is elevated in a human model of endotoxemia and can be detected bound to microvesicles. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12641.

100. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, et al. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2010;12(11):1223–1228.

101. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(12):1470–1476.

102. Royo F, Zuñiga-Garcia P, Torrano V, et al. Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(6):6835–6846.

103. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177–182.

104. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329–335.

105. Carneiro A, Priante Kayano P, Gomes Barbosa ÁR, et al. Are localized prostate cancer biomarkers useful in the clinical practice? *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 2018;40(9):1010428318799255.

106. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu. Rev. Med.* 1996;47:315–331.

107. Geraldo RB, Sathler PC, Lourenço AL, et al. Platelets: still a therapeutical target for haemostatic disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(10):17901–17919.

108. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* 2011;17(11):1423–1436.

109. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb. Haemost.* 2009;102(2):248–257.

110. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 2013;6(3):299–309.

111. Randriamboavonjy V. Mechanisms Involved in Diabetes-Associated Platelet Hyperactivation. *Non-Thromb. Role Platelets Health Dis.* 2015;

112. Watson SP, Auger JM, McCarty OJT, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2005;3(8):1752–1762.

113. Schrottmaier WC, Kral JB, Badrnya S, Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.* 2015;114(3):478–489.

114. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004;104(6):1606–1615.

115. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(9):938–949.

116. Cimmino G, Ciccarelli G, Golino P. Role of Tissue Factor in the Coagulation Network. *Semin. Thromb. Hemost.* 2015;41(7):708–717.

117. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990;87(18):6934–6938.

118. Dorfleutner A, Ruf W. Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood*. 2003;102(12):3998–4005.

119. Ettelaie C, Collier MEW, Featherby S, Greenman J, Maraveyas A. Oligoubiquitination of tissue factor on Lys255 promotes Ser253-dephosphorylation and terminates TF release. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016;1863(11):2846–2857.

120. Ahamed J, Ruf W. Protease-activated Receptor 2-dependent Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Domain. *J. Biol. Chem.* 2004;279(22):23038–23044.

121. Ettelaie C, Elkeeb AM, Maraveyas A, Collier MEW. p38α phosphorylates serine 258 within the cytoplasmic domain of tissue factor and prevents its incorporation into cell-derived microparticles. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1833(3):613–621.

122. Sen M, Herzik M, Craft JW, et al. Spectroscopic Characterization of Successive Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Region. *Open Spectrosc. J.* 2009;3:58–64.

123. Kurakula K, Koenis DS, Herzik MA, et al. Structural and cellular mechanisms of peptidyl-prolyl isomerase Pin1-mediated enhancement of Tissue Factor gene expression, protein half-life, and pro-coagulant activity. *Haematologica*. 2018;103(6):1073–1082.

124. Hoffman M. The Tissue Factor Pathway and Wound Healing. *Semin. Thromb. Hemost.* 2018;44(2):142–150.

125. Zelaya H, Rothmeier AS, Ruf W. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2018;16(10):1941–1952.

126. Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, et al. Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. *Blood*. 2018;131(19):2161–2172.

127. Shantsila E, Lip GYH. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb. Haemost.* 2009;102(5):916–924.

128. Wang J, Pendurthi UR, Rao LVM. Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding. *Blood Adv.* 2017;1(13):849–862.

129. Maugeri N, Manfredi AA. Tissue Factor Expressed by Neutrophils: Another Piece in the Vascular Inflammation Puzzle. *Semin. Thromb. Hemost.* 2015;41(7):728–736.

130. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss H-P, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ. Res.* 2005;96(12):1233–1239.

131. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.* 2003;9(4):458–462.

132. Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson Y. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood*. 2002;100(8):2787–2792.

133. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(38):13932–13937.

134. Ansari SA, Pendurthi UR, Rao LVM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal induces tissue factor decryption via ROS generation and the thioredoxin system. *Blood Adv.* 2017;1(25):2399–2413.

135. Popescu NI, Lupu C, Lupu F. Role of PDI in regulating tissue factor: FVIIa activity. *Thromb. Res.* 2010;125 Suppl 1:S38-41.

136. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb. Haemost.* 2014;111(4):590–597.

137. Morrissey JH. Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance. *Haemostasis*. 1996;26 Suppl 1:66–71.

138. Mussbacher M, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrottmaier WC, Assinger A. Mechanisms of Hemostasis: Contributions of Platelets, Coagulation Factors, and the Vessel Wall. *Fundam. Vasc. Biol.* 2019;145–169.

139. Smith KM, Rendahl A, Sun Y, Todd JM. Retrospective evaluation of the route and timing of nutrition in dogs with septic peritonitis: 68 cases (2007-2016). *J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex 2001*. 2019;29(3):288–295.

140. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32–38.

141. Chappell D, Brettner F, Doerfler N, et al. Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2014;31(9):474–481.

142. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258–264.

143. Tie J-K, Carneiro JDA, Jin D-Y, et al. Characterization of vitamin K-dependent carboxylase mutations that cause bleeding and nonbleeding disorders. *Blood*. 2016;127(15):1847–1855.

144. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex 2001*. 2009;19(1):3–10.

145. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2005;3(8):1894–1904.

146. Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet J-M. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *Semin. Thromb. Hemost.* 2010;36(8):833–844.

147. Morel Olivier, Jesel Laurence, Freyssinet Jean-Marie, Toti Florence. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(1):15–26.

148. Robinson RA, Worfolk L, Tracy PB. Endotoxin enhances the expression of monocyte prothrombinase activity. *Blood*. 1992;79(2):406–416.

149. Brisson AR, Tan S, Linares R, Gounou C, Arraud N. Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. *Platelets*. 2017;28(3):263–271.

150. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 2011;108(10):1284–1297.

151. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J. Exp. Med.* 2003;197(11):1585–1598.

152. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, et al. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J. Exp. Med.* 2009;206(9):1913–1927.

153. Zwicker JI, Trenor CC, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(4):728–733.

154. Key K. Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb. Res.* 2010;125 Suppl 1:S42-45.

155. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Østerud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood*. 2008;111(3):1208–1216.

156. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29(12):1989–1996.

157. Osteikoetxea X, Balogh A, Szabó-Taylor K, et al. Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PloS One*. 2015;10(3):e0121184.

158. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 2008;100(5):878–885.

159. Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005;105(4):1515–1522.

160. Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br. J. Haematol.* 1997;96(3):534–542.

161. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, et al. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 2005;93(1):35–39.

162. Tsimerman G, Roguin A, Bachar A, et al. Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. *Thromb. Haemost.* 2011;106(2):310–321.

163. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2013;11 Suppl 1:24–35.

164. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007;110(7):2432–2439.

165. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*. 2012;97(12):1864–1872.

166. Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2016;89(2):111–122.

167. Rautou P-E, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev. Hematol.* 2013;6(1):91–101.

168. Amabile N, Rautou P-E, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010;36(8):907–916.

169. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(1):4–9.

170. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* 2004;34(6):392–401.

171. Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(3):563–568.

172. Viera AJ, Mooberry M, Key NS. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH*. 2012;6(4):243–252.

173. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Simioni P. Microparticles as biomarkers of venous thromboembolic events. *Biomark. Med.* 2016;10(7):743–755.

174. Zhou L, Qi X, Xu M, et al. Microparticles: new light shed on the understanding of venous thromboembolism. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014;35(9):1103–1110.

175. Geddings JE, Mackman N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*. 2013;122(11):1873–1880.

176. Manly DA, Wang J, Glover SL, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb. Res.* 2010;125(6):511–512.

177. Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 2011;127(5):473–477.

178. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(11):1983–1985.

179. van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans RJ, et al. Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. *Thromb. Haemost.* 2012;108(1):160–165.

180. Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, et al. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb. Haemost.* 2013;110(2):378–385.

181. van Es N, Hisada Y, Di Nisio M, et al. Extracellular vesicles exposing tissue factor for the prediction of venous thromboembolism in patients with cancer: A prospective cohort study. *Thromb. Res.* 2018;166:54–59.

182. Thaler J, Ay C, Weinstabl H, et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann. Hematol.* 2011;90(4):447–453.

183. Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(7):1363–1370.

184. Hernández C, Orbe J, Roncal C, et al. Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients. *Thromb. Haemost.* 2013;110(3):598–608.

185. Zwicker JI, Liebman HA, Bauer KA, et al. Prediction and prevention of thromboembolic events with enoxaparin in cancer patients with elevated tissue factor-bearing microparticles: a randomized-controlled phase II trial (the Microtec study). *Br. J. Haematol.* 2013;160(4):530–537.

186. Flores-Nascimento MC, Beltrame MP, De Paula EV, et al. Microparticles in deep venous thrombosis, antiphospholipid syndrome and Factor V Leiden. *Platelets*. 2009;20(6):367–375.

187. Ye R, Ye C, Huang Y, Liu L, Wang S. Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis. *Thromb. Res.* 2012;130(2):253–258.

188. Bucciarelli P, Martinelli I, Artoni A, et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 2012;129(5):591–597.

189. Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Circulating microparticles in carriers of factor V Leiden with and without a history of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2012;108(4):633–639.

190. Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Circulating microparticles in carriers of prothrombin G20210A mutation. *Thromb. Haemost.* 2014;112(3):432–437.

191. Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Circulating microparticles and the risk of thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb. Haemost.* 2016;115(1):81–88.

192. Thaler J, Koppensteiner R, Pabinger I, Ay C, Gremmel T. Microparticle-associated tissue factor activity in patients with acute unprovoked deep vein thrombosis and during the course of one year. *Thromb. Res.* 2014;134(5):1093–1096.

193. Ay C, Freyssinet J-M, Sailer T, Vormittag R, Pabinger I. Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 2009;123(5):724–726.

194. Otero R, Elias T, Montes-Worboys A, et al. Effects of long-term anticoagulant therapy on levels of circulating microparticles in patients with deep venous thrombosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 2011;22(7):628–629.

195. Kooiman J, den Exter PL, Kilicsoy I, et al. Association between micro particle-tissue factor activity, factor VIII activity and recurrent VTE in patients with acute pulmonary embolism. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2015;40(3):323–330.

196. Ayers L, Pink R, Carter DRF, Nieuwland R. Clinical requirements for extracellular vesicle assays. *J. Extracell. Vesicles*. 2019;8(1):1593755.

197. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2012;10(3):437–446.

198. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemost.* 2011;105(3):396–408.

199. Wisgrill L, Lamm C, Hartmann J, et al. Peripheral blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature, and anticoagulants. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2016;89(7):663–672.

200. Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, et al. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(11):1759–1767.

201. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, et al. 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*. 2013;

202. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* 2017;120(10):1632–1648.

203. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles*. 2013;2:.

204. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*. 2018;7(1):1535750.

205. Lee RD, Barcel DA, Williams JC, et al. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thromb. Res.* 2012;129(1):80–85.

206. Fendl B, Weiss R, Fischer MB, Spittler A, Weber V. Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;478(1):168–173.

207. György B, Pálóczi K, Kovács A, et al. Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb. Res.* 2014;133(2):285–292.

208. Ayers L, Harrison P, Kohler M, Ferry B. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity. *J. Extracell. Vesicles*. 2014;3:.

209. van der Pol E, Coumans F a. W, Grootemaat AE, et al. 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*. 2014;12(7):1182–1192.

210. Sparrow RL, Chan KS-K. Microparticle content of plasma for transfusion is influenced by the whole blood hold conditions: pre-analytical considerations for proteomic investigations. *J. Proteomics*. 2012;76 Spec No.:211–219.

211. Bæk R, Søndergaard EKL, Varming K, Jørgensen MM. The impact of various preanalytical treatments on the phenotype of small extracellular vesicles in blood analyzed by protein microarray. *J. Immunol. Methods*. 2016;438:11–20.

212. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Res. Int.* 2018;2018:8545347.

213. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front. Immunol.* 2018;9:738.

214. Freitas D, Balmaña M, Poças J, et al. Different isolation approaches lead to diverse glycosylated extracellular vesicle populations. *J. Extracell. Vesicles*. 2019;8(1):1621131.

215. Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 2019;76(12):2369–2382.

216. Vallier L, Bouriche T, Bonifay A, et al. Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay. *Thromb. Res.* 2019;182:64–74.

217. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Front. Physiol.* 2012;3:162.

218. Onódi Z, Pelyhe C, Terézia Nagy C, et al. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma. *Front. Physiol.* 2018;9:1479.

219. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(8):E968-977.

220. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles*. 2014;3:.

221. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 2015;4:29509.

222. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J. Immunol. Methods*. 2012;375(1–2):207–214.

223. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 2015;11(4):879–883.

224. Guerreiro EM, Vestad B, Steffensen LA, et al. Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PloS One*. 2018;13(9):e0204276.

225. Hartert H. [Not Available]. *Klin. Wochenschr.* 1948;26(37–38):577–583.

226. Shaydakov ME, Blebea J. Thromboelastography (TEG). *StatPearls*. 2019;

227. Contreras-García A, D'Elía NL, Desgagné M, et al. Synthetic anionic surfaces can replace microparticles in stimulating burst coagulation of blood plasma. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2019;175:596–605.

228. Mitchell TA, Herzig MC, Fedyk CG, et al. Traumatic Hemothorax Blood Contains Elevated Levels of Microparticles that are Prothrombotic but Inhibit Platelet Aggregation. *Shock Augusta Ga*. 2017;47(6):680–687.

229. Chan KS-K, Sparrow RL. Microparticle profile and procoagulant activity of fresh-frozen plasma is affected by whole blood leukoreduction rather than 24-hour room temperature hold. *Transfusion (Paris)*. 2014;54(8):1935–1944.

230. Fröhlich M, Schäfer N, Caspers M, et al. Temporal phenotyping of circulating microparticles after trauma: a prospective cohort study. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 2018;26(1):33.

231. Aras O, Shet A, Bach RR, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*. 2004;103(12):4545–4553.

232. Cointe S, Harti Souab K, Bouriche T, et al. A new assay to evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis imbalance. *J. Extracell. Vesicles*. 2018;7(1):1494482.

233. Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(12):2561–2568.

234. Hisada Y, Mackman N. Measurement of tissue factor activity in extracellular vesicles from human plasma samples. *Res Pr. Thromb Haemost*. 2018;0(0):

235. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(11):2571–2574.

236. Nieuwland R, Gardiner C, Dignat-George F, et al. Toward standardization of assays measuring extracellular vesicle-associated tissue factor activity. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2019;17(8):1261–1264.

237. Tatsumi K, Antoniak S, Monroe DM, et al. Evaluation of a new commercial assay to measure microparticle tissue factor activity in plasma: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(11):1932–1934.

238. Ettelaie C, Collier ME, Featherby S, et al. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: correlation with tissue factor and PAR2 expression. *Thromb. J.* 2016;14:2.

239. Gomes FG, Sandim V, Almeida VH, et al. Breast-cancer extracellular vesicles induce platelet activation and aggregation by tissue factor-independent and -dependent mechanisms. *Thromb. Res.* 2017;159:24–32.

240. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, et al. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*. 2004;104(10):3190–3197.

241. Hisada Y, Mackman N. Mouse models of cancer-associated thrombosis. *Thromb. Res.* 2018;164 Suppl 1:S48–S53.

242. Sørensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(25):1846–1850.

243. Poncelet P, Robert S, Bailly N, et al. 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*. 2015;53(2):110–126.

244. Nielsen T, Kristensen AF, Pedersen S, Christiansen G, Kristensen SR. Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles*. 2018;7(1):1454777.

245. Fu Y, Zhou J, Li H, et al. Daunorubicin induces procoagulant activity of cultured endothelial cells through phosphatidylserine exposure and microparticles release. *Thromb. Haemost.* 2010;104(6):1235–1241.

246. Kothari H, Nayak RC, Rao LVM, Pendurthi UR. Cystine 186-cystine 209 disulfide bond is not essential for the procoagulant activity of tissue factor or for its de-encryption. *Blood*. 2010;115(21):4273–4283.

247. Kidd L, Mackman N. Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J. Vet. Emerg. Crit. Care San Antonio Tex 2001*. 2013;23(1):3–13.

248. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood*. 2005;105(7):2764–2770.

249. Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm M, et al. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2004;2(9):1601–1609.

250. Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, et al. Second international collaborative study evaluating performance characteristics of methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2008;6(9):1534–1541.

251. Key NS, Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010;36(8):865–875.

252. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 2014;3:23111.

SERMENT DE GALIEN

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

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

RESUME

Le complexe formé entre le facteur tissulaire (FT) et le facteur VII est le principal activateur de la coagulation. Des niveaux élevés d'activité procoagulante dépendante du FT portée par les microvésicules (MV) sont détectables chez les patients présentant un risque accru de thrombose. Cependant, l'association entre l'activité du FT sur les MV (activité MV-FT) et la thrombose est limitée par de multiples mécanismes de thrombose liée aux cancers, un rôle plus complexe des MV dans la thrombose et enfin des limites technologiques dans le test mesurant l'activité MV FT. Plusieurs méthodes ont été décrites pour mesurer l'activité MV-FT, mais elles sont gênées par une sensibilité et une spécificité limitées. L'objectif est d'augmenter la sensibilité de l'analyse de l'activité de MV-FT en comparaison à un test préexistant (appelé test de Chapel Hill). L'amélioration du dosage de l'activité du FT a été réalisée en optimisant i/la vitesse et le temps de centrifugation, ii/l'utilisation d'un puissant anticorps anti-FT inhibiteur iii/l'utilisation de FVII et d'un substrat fluorogène pour augmenter la spécificité. La spécificité de mesure de l'activité MV-FT a été démontrée par l'absence d'activité sur une lignée de cellules qui expriment le FT en utilisant un anticorps monoclonal anti-FT appelé SBTF-1, qui présente un effet inhibiteur de FT supérieur à celui de l'anticorps monoclonal anti-FT humain, le plus utilisé dans la littérature, appelé HTF-1. Des expériences utilisant du sang provenant d'individus en bonne santé, stimulés ou non par le LPS, ou de plasma enrichi avec 3 niveaux différents de MV ont montré que le nouveau dosage était plus sensible et détecte de l'activité du FT dans les échantillons de plasma sans plaquettes (PFP) provenant d'individus sains. Cependant, le test a été limité par une variabilité intertest, principalement due à l'étape de centrifugation. Ainsi, nous avons amélioré la sensibilité de l'activité MV-FT sans perdre de spécificité. Ce nouveau test pourrait être utilisé pour évaluer les niveaux de MV-FT en tant que biomarqueur potentiel du risque thrombotique chez les patients.