



HAL
open science

Les microvésicules cellulaires : biomarqueurs émergents en pathologie cardiovasculaire : intérêt dans le risque thrombotique de la COVID 19

Françoise Dignat-George, Amandine Bonifay, Romaric Lacroix

► To cite this version:

Françoise Dignat-George, Amandine Bonifay, Romaric Lacroix. Les microvésicules cellulaires : biomarqueurs émergents en pathologie cardiovasculaire : intérêt dans le risque thrombotique de la COVID 19. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2021, 205 (2), pp.166-179. 10.1016/j.banm.2020.04.016 . hal-03329150

HAL Id: hal-03329150

<https://hal.inrae.fr/hal-03329150>

Submitted on 13 Feb 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

1 **Les microvésicules cellulaires : biomarqueurs émergents en pathologie**
2 **cardiovasculaire : intérêt dans le risque thrombotique de la COVID 19***

3 *Cellular microvesicles: emerging biomarkers in cardiovascular disorders: application in*
4 *the thrombotic risk associated to COVID 19*

5 Françoise Dignat-George^{1,2, *}, Amandine Bonifay¹, et Romaric Lacroix^{1,2}

6
7 1. Aix-Marseille Université, C2VN-UMR-INSERM 1263, INRA 1260, faculté de Pharmacie,
8 27 Bd Jean Moulin, 13010, Marseille, France

9 2. Service d'hématologie et de biologie vasculaire, CHU La Conception, AP-HM, 147 Bd
10 Baille, 13005, Marseille, France

11
12 *Auteur correspondant : Françoise Dignat George ; C2VN-UMR-INSERM 1263, INRA
13 1260, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13010, Marseille, France.

14 francoise.dignatgeorge@univ-amu.fr

15 Tel: 0033(0)4 91 83 56 00; fax: 0033(0)4 91 83 56 02

16
17 * Séance du 3 novembre 2020

18
19 **Résumé**

20 Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité et de morbidité
21 dans le monde et la recherche de biomarqueurs permettant de stratifier le risque est un enjeu
22 majeur. Les microvésicules sont des fragments de membranes générés par toutes les cellules
23 de l'organisme. Elles sont reconnues aujourd'hui comme des vecteurs d'information
24 biologiques participant à la communication intercellulaire et des biomarqueurs dont la
25 pertinence clinique a été démontrée. En effet, l'élévation des taux plasmatiques des
26 microvésicules a été rapportée dans différents contextes cardiovasculaires incluant
27 l'athérosclérose, les syndromes coronariens aigus, les accidents vasculaires cérébraux, les
28 thromboses associées au cancer ou aux infections comme la COVID- 19. Dans ce contexte
29 infectieux émergeant, les microvésicules ont récemment été identifiées comme des
30 biomarqueurs prometteurs dans l'identification précoce des patients à risque et dans la
31 prédiction du risque thrombotique. Les progrès accomplis ces dernières années pour
32 développer des techniques ultrasensibles permettant d'énumérer ou de mesurer l'activité
33 fonctionnelle des microvésicules , associés aux efforts de standardisation impulsés par les
34 sociétés savantes, permettent aujourd'hui d'accélérer leur transfert vers la clinique, afin de
35 les positionner comme des candidats prometteurs pour une médecine personnalisée à visée
36 cardiovasculaire.

37

38 **Abstract**

39 Cardiovascular diseases are one of the leading causes of mortality and morbidity, and the
40 search for biomarkers for risk stratification is a challenge. Microvesicles are cell fragments
41 generated by all cells in the body. They are considered not only as vectors of biological
42 information involved in cell communication but also as emerging biomarkers with clinical
43 relevance .Indeed, elevated plasmatic levels of microvesicles have been reported in various
44 cardiovascular settings including atherosclerosis, acute coronary syndromes, ischemic strokes,
45 as well as in thrombosis associated with cancer or infection as COVID 19 , where
46 microvesicles were identified as promising biomarkers for early detection of patient with
47 severe forms of the disease and for prediction of thrombotic complications .

48 Despite the fact that the field has long been hampered by technical difficulties, the ongoing
49 progress in developing highly sensitive techniques and standardization efforts impulsed by
50 Scientific societies working in partnership with research teams are crucial for implementing
51 microvesicles analyses in the clinic. Large prospective studies are required to confirm which
52 microvesicle subpopulations are of prognostic relevance and can be used as a promising
53 biomarker to develop personalized cardiovascular medicine.

54

55 **Mots clés** : vésicules extracellulaires, microvésicules, biomarqueur, maladies
56 cardiovasculaires, COVID-19

57 **Key words:** extracellular vesicles, microvesicles, biomarkers, cardiovascular disorders,
58 COVID-19

59

60

61 Listes des abréviations :

62 ADP : Adénosine diphosphate

63 ALIX : Protéine d'interaction de mort cellulaire programmée 6

64 AnV : Annexine V

65 APC : protéine C activée

66 ARN : acide ribonucléique

67 CMF : cytométrie en flux

68 eNOS : NO synthase endothéliale

69 EPC : protéine C endothéliale

70 EPCR : récepteur endothélial à la protéine C

71 FDA : Food and Drugs Administration

72 FT : facteur tissulaire
73 FTPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
74 GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale
75 ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire1
76 ISAC : International Society for Advancement of Cytometry
77 ISEC : International Society on Extracellular Vesicles
78 ISTH : International Society of Thrombosis and Haemostasis
79 LAMP1 : Protéine membranaire associée aux lysosomes 1
80 LPS : lipopolysaccharide
81 miARN : micro-ARN
82 MMP : métalloprotéase
83 MV : microvésicules
84 NTA : nanoparticle tracking analysis
85 PAI-1 : Inhibiteur des activateurs du plasminogène
86 PECAM-1 : molécule d'adhésion entre les plaquettes et les cellules endothéliales 1
87 PFP : plasma déplété en plaquettes
88 PS : phosphatidylsérine
89 t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
90 TM : thrombomoduline
91 Tsg101 : Gène de sensibilité aux tumeurs 101
92 VEC : vésicules extracellulaires
93 VE-cadherine : endothélium vasculaire cadhérine
94 VCAM-1 : molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1

95

96 Décrites pour la première fois en 1967 comme des poussières de plaquettes par Peter Wolf
97 [1], les vésicules extracellulaires (VEC) sont des fragments de membranes générées par toutes
98 les cellules de l'organisme. Identifiées initialement comme des vecteurs d'information
99 biologiques participant à la régulation des réponses biologiques de l'organisme, elles ont
100 rapidement été considérées comme des biomarqueurs et des cibles pharmacologiques
101 pertinentes pour obtenir plus récemment le statut de thérapies cellulaires émergentes
102 dénommées « vésiculothérapies ». Cet intérêt grandissant se mesure par le nombre
103 exponentiel de publications dans le domaine dont le nombre est passé de 6 en 1980 à plus de
104 3000 en 2019. Il s'est également traduit par la création il y a 10 ans, de sociétés savantes
105 totalement dédiées aux VEC (ISEV : International Society on Extracellular Vesicles), ou

106 encore par l'émergence d'un intérêt spécifique sur des problématiques technologiques et
107 vasculaires par l'ISAC (International Society for Advancement of Cytometry), ou par l'ISTH
108 (International Society of Thrombosis and Haemostasis).

109 Cette démarche convergente de différentes sociétés savantes associée à l'intérêt grandissant
110 que les VEC ont suscité dans le cadre des biopsies liquides indiquent qu'il est devenu
111 pertinent pour la communauté scientifique de pouvoir transposer les VEC en clinique. Cette
112 transposition nécessite d'intégrer les progrès permanents des connaissances fondamentales sur
113 le rôle biologique des VEC et les performances évolutives des technologies permettant de les
114 mesurer. Ainsi, les 50 années passées depuis leur description initiale ont permis d'accumuler
115 suffisamment d'avancées technologiques et de recul en termes de standardisation pour
116 pouvoir envisager aujourd'hui le passage des VEC vers la clinique.

117

118 Après une introduction sur les notions importantes relatives à la diversité des VEC, en termes
119 de biogenèse, de taille et de phénotype, cette revue développera la pertinence de leur mesure
120 en clinique, notamment dans le domaine cardiovasculaire et le risque thrombotique émergent
121 associé à la COVID-19 , en s'appuyant sur les données de la littérature et sur des travaux
122 réalisés au sein de notre laboratoire. Enfin, elle fera une synthèse des principales méthodes
123 permettant de les mesurer en clinique, en développant les dernières innovations
124 technologiques et les avancées concernant la standardisation.

125

126 **1. Diversité des vésicules extracellulaires**

127 Les vésicules extracellulaires (VEC) constituent une population hétérogène de structures
128 membranaires submicroniques qui sont libérées dans l'espace extracellulaire par la presque
129 totalité des cellules eucaryotes [2]. Bien qu'il n'existe pas à ce jour de consensus en terme de
130 nomenclature, les VEC sont schématiquement classées en 3 catégories en fonction de leur
131 biogenèse, de leur taille et de leur expression antigénique [3] (Figure 1).

132

133 **1.1. Exosomes, microvésicules et corps apoptotiques**

134 Les **exosomes** sont formés par invagination de la membrane cellulaire, puis générés par
135 exocytose à partir des corps multi-vésiculaires. Ce sont les plus petites en taille, avec un
136 diamètre allant de 40 à 100 nm [4]. Les exosomes sont caractérisés par l'expression de
137 tétraspanines comme CD9, CD81 ou CD63 [5], et par l'expression de molécules en lien avec
138 leur mécanisme de formation comme Alix or Tsg101[6]. **Les microvésicules (MV)**, encore
139 dénommées microparticules ou ectosomes, ont un diamètre intermédiaire allant de 100 à 1000

140 nm. Leur formation se fait par bourgeonnement de la membrane cellulaire et remodelage des
141 phospholipides membranaires, suite à une activation ou à une apoptose cellulaire [7,8]. Elles
142 sont caractérisées classiquement par l'expression de phospholipides négatifs comme la
143 phosphatidylsérine (PS) et par l'expression d'antigènes représentatifs de leur cellule d'origine
144 comme les sélectines ou les intégrines [9]. Les vésicules de taille les plus importantes,
145 appelées **corps apoptotiques** ont un diamètre supérieur à 1000nm et sont formées au cours
146 des stades terminaux de l'apoptose [10]. Elles contiennent également de la PS et sont
147 enrichies en histones.

148 Une caractéristique commune à toutes les VEC est leur contenu en lipides, protéines et acides
149 nucléiques qu'elles sont susceptibles d'échanger avec les cellules voisines par endocytose,
150 fusion ou phagocytose [11–13]. Ceci leur confère un rôle clé dans la communication
151 intercellulaire et les identifie potentiellement comme des biomarqueurs d'intérêt des cellules
152 dont elles sont issues.

153

154 **1.2. Notion de biopsies liquides**

155 Une autre caractéristique commune aux VEC est qu'elles sont libérées dans les milieux
156 extracellulaires et peuvent de ce fait être détectées dans une grande variété de liquides
157 biologiques en contact avec les cellules qui les produisent. En effet, initialement décrites dans
158 le plasma [14,15], les VEC ont été ensuite retrouvées dans d'autres liquides ou extraits
159 biologiques tels que la salive [16], la bile [17], les ascites [18], la vitrée [19], la plaque
160 d'athérome [20], l'urine [21] le liquide séminal [22] ou les liquides articulaire [23]. Ainsi, par
161 leur présence dans des liquides facilement accessibles et leur teneur en éléments lipidiques,
162 protéiques ou nucléiques représentatifs des cellules d'origine, les VEC sont devenues des
163 cibles d'intérêt pour les biopsies liquides. Une biopsie liquide désigne le prélèvement et
164 l'analyse d'un tissu biologique à l'état « non solide », le plus souvent représenté par le sang,
165 utilisés pour obtenir des informations indispensables pour la prise en charge des patients [24].
166 À ce jour, leur utilisation a été validée essentiellement en oncologie, où la FDA a approuvé
167 l'utilisation de la mesure des cellules tumorales circulantes pour faire le pronostic de
168 différents types de tumeurs [25]. Comme les biopsies traditionnelles, elles sont utilisées
169 essentiellement pour faire le diagnostic et le suivi de maladies avec comme valeur ajoutée
170 d'être non invasives, moins coûteuses et surtout de permettre un suivi longitudinal ou
171 d'évaluer l'efficacité d'un traitement grâce à des examens répétés au cours de la maladie.
172 Même s'il existe encore à ce jour des verrous méthodologiques et de standardisation qui
173 limitent leur utilisation, la détermination des VEC dans les biopsies liquides devrait prendre

174 une place de plus en plus importante dans l'arsenal des explorations biologiques des maladies
175 chroniques.

176

177 **1.3. Diversité structurale et fonctionnelle des microvésicules**

178 Nous avons choisi d'axer la suite de cette revue sur les microvésicules, sur lesquelles notre
179 laboratoire a centré ses travaux depuis de longues années, avec un intérêt particulier pour les
180 microvésicules endothéliales s'inscrivant totalement dans le concept émergeant de « biopsie
181 liquide de l'endothélium ».

182 Ainsi, les travaux de notre groupe sur les MV formées par les cellules endothéliales (MVE)
183 ont fait émerger un nouveau concept selon lequel l'endothélium vasculaire n'est pas
184 seulement un tissu passif hémocompatible recouvrant l'ensemble du système vasculaire. Il
185 représente au contraire un tissu d'une grande plasticité, capable de s'engager dans des
186 remodelages cellulaires dynamiques conduisant à la production de MV lui permettant de
187 communiquer avec son environnement [26].

188 Les MV sont des fragments de cellules qui se détachent de la membrane plasmique en
189 embarquant avec elle divers composants de la cellule mère, d'où le nom de « cargo »
190 cellulaire qui leur est donné. Comme illustré dans la figure 3, divers contextes
191 physiopathologiques ou inducteurs de stress peuvent induire leur formation. De ce fait, les
192 MV présentent une diversité de structure et de composition en terme d'antigènes, de lipides et
193 d'acides nucléiques leur conférant un large répertoire de fonctions biologiques liées à leur
194 implication dans des réponses physiopathologiques [27,28]. Dans les années 2000, notre
195 groupe a été le premier à décrire les MVE [15] et à montrer leur rôle dans l'activation des
196 voies procoagulantes, et proinflammatoires de l'endothélium [29,30].

197 Comme illustré dans la figure 4, à côté de leur rôle dans la coagulation, relié à l'expression de
198 phospholipides négatifs et de facteur tissulaire, l'activateur majeur de la voie intrinsèque de la
199 coagulation, elles expriment aussi des métalloprotéases et des activateurs du plasminogène,
200 leur donnant la capacité de participer à la fibrinolyse, aux remodelages vasculaires, à
201 l'angiogenèse ou à l'invasion tumorale [31]. Elles expriment aussi un répertoire de molécules
202 d'adhésion, permettant des interactions cellulaires ciblées. Elles transportent du matériel
203 génétique, notamment des microARN qu'elles sont capables de vectoriser sur de longues
204 distances et de délivrer à des cellules cibles, contribuant ainsi à leur rôle dans la
205 communication intercellulaire. Une revue récente a fait la synthèse de l'ensemble des
206 microARN régulant l'angiogenèse, la cicatrisation et la réparation vasculaire identifiés dans

207 les MVE, compatibles avec leur utilisation à des fins thérapeutiques dans un contexte de
208 médecine régénérative [32].

209

210 **2. Microvésicules et pathologies cardiovasculaires**

211 **2.1 Pertinence de la mesure des microvésicules en clinique**

212 Les principales raisons pour lesquelles la mesure MV est pertinente en clinique se résument
213 ainsi : 1/ elles apportent des informations biologiques indispensables sur des tissus d'accès
214 difficiles tels que le vaisseau, le placenta, les tissus articulaires ou les tumeurs 2/ leur
215 accessibilité dans les liquides biologiques en contact avec ces tissus, et leur détermination
216 réalisable par des méthodes fonctionnelles et quantitatives standardisées en font des cibles
217 d'intérêt pour les biopsies liquides.3/ elles permettent de caractériser un patient, et donc de le
218 stratifier en fonction de l'étiologie de sa pathologie, sa progression et sa réponse à un
219 traitement 4/ elles ont une valeur pronostique pour identifier des patients à risque, ou suivre
220 l'efficacité d'un traitement 5/ elles sont utilisables comme contrôle de qualité pour les
221 produits transfusionnels.

222

223 **2.2 Intérêt des microvésicules dans le domaine cardiovasculaire**

224 Les maladies cardiovasculaires restent une des premières causes de mortalité et de morbidité
225 dans le monde. Leur prévention est basée essentiellement sur la prise en charge des facteurs
226 de risque traditionnels comme l'hypertension, le diabète, l'obésité ou le tabagisme qui ont
227 permis d'améliorer leur progression. Mais les risques de récurrence des complications
228 cardiovasculaires restent élevés [33]. Il est donc essentiel de disposer de biomarqueurs
229 permettant de stratifier les patients afin d'identifier les patients asymptomatiques qui ont un
230 profil à risque et ceux avec maladies cardiovasculaires avérées, à haut risque de récurrence.

231

232 Une élévation significative des taux circulants de MV d'origine plaquettaire, érythrocytaire,
233 leucocytaire ou endothéliale a été rapportée dans différents contextes cardiovasculaires
234 incluant l'athérosclérose, les syndromes coronariens aigus, les accidents vasculaires
235 cérébraux, le diabète, l'insuffisance rénale , l'insuffisance cardiaque, les fibrillations
236 ventriculaires ou encore les thromboses associées au cancer [27,34–37]. De manière
237 intéressante, il ressort de ces études que les taux élevés de MVE sont associés à différents
238 facteurs de risques tels que l'obésité, le diabète, l'hypertension et le tabagisme et sont
239 positivement associées à la dysfonction endothélium-dépendante. Nous avons compilé dans
240 les tableaux 1 et 2 les principales études prospectives montrant un rôle prédictif des MV dans

241 ces situations à risque thrombotique, en différenciant les thromboses artérielles et les
242 thromboses veineuses.

243 *Dans les thromboses artérielles*, une première étude a montré que les MV positives pour les
244 marqueurs CD31 et annexine V, contenant les MVE, prédisent de façon indépendante les
245 complications cardio-vasculaires chez les patients coronariens stables [38]. Une autre étude
246 sur un effectif élevé de patients avec des risques CV a montré que les MVE sont un facteur
247 prédictif indépendant de futurs évènements CV dans les populations à haut risque et que
248 l'ajout des MVE au score de Framingham améliorent la stratification du risque
249 cardiovasculaire par celui-ci [39]. Chez des patients avec insuffisance rénale sévère, les MVE
250 définies par le marquage CD31+/CD41- sont des facteurs prédictifs indépendants des
251 complications cardio-vasculaires et de la mortalité [40]. Chez des patients asymptomatiques à
252 haut risque de sténose carotidienne une élévation des MV leucocytaires est un marqueur
253 prédictif indépendant des plaques instables, illustrant l'intérêt, du concept de biopsie liquide
254 donnant accès par la mesure des MV leucocytaires, au caractère stable ou instable de la
255 plaque d'athérome et pouvant de ce fait orienter le choix thérapeutique chez ces patients
256 asymptomatiques [41]. Chez les patients avec insuffisance cardiaque chronique le nombre de
257 MVE circulantes est prédictif de la mortalité associée à et la ré-hospitalisation liée à
258 l'insuffisance cardiaque chronique [42]. Enfin, deux études réalisées chez des patients à haut
259 risque cardiovasculaire ont montré que l'élévation des MVE et leucocytaires exprimant le
260 facteur tissulaire étaient prédictives des accidents cardio-vasculaires et de la mortalité [43,44].
261 En synthèse, ces études montrent que parmi les sous-populations de MV, les MV d'origine
262 endothéliale et leucocytaire, qui sont présentes en plus faible concentration dans la
263 circulation, apparaissent pourtant comme les plus prometteuses pour identifier les groupes de
264 patients avec manifestations subcliniques de thrombose ou les patients à haut risque de
265 récurrence.

266

267 *Dans le domaine des thromboses veineuses*, les travaux les plus pertinents montrant la valeur
268 des MV dans la prédiction des complications thrombotiques ont été réalisés chez des patients
269 cancéreux [45]. Dans le tableau 2, ont été résumées les principales études qui ont analysé le
270 lien entre patients cancéreux (cancers solides ou hématopoïétiques) ayant développé une
271 thrombose et niveaux plasmatiques des MV procoagulantes exprimant le facteur tissulaire,
272 mesurées par des tests fonctionnels ou utilisant la cytométrie en flux. La première étude
273 démontrant la valeur prédictive des MV procoagulantes pour le risque de thrombose veineuse
274 a été publiée [46] chez des patients avec cancer du pancréas. Cette valeur prédictive a ensuite

275 été confirmée, dans d'autres études portant sur des cancer solides [35,47–52]. Il est intéressant
276 de noter que sur les 8 études rapportées, 4 ciblent des patients avec cancer des voies
277 pancréato-biliaires. Par ailleurs, 6 sont basées sur des tests fonctionnels, qui ont mesuré
278 l'activité procoagulante portée par la totalité des microparticules exprimant le facteur
279 tissulaire, sans analyser l'origine cellulaire de ces MV, sauf l'étude sur le glioblastome
280 réalisée en cytométrie de flux qui a montré que cette activité est portée par des MV exprimant
281 une protéine gliale. De façon intéressante, une méta analyse récente a confirmé que
282 l'élévation des MV ayant une activité procoagulante dépendante du facteur tissulaire était
283 prédictive du risque thrombotiques chez des patients cancéreux en notant que les résultats de
284 cette méta-analyse sont dominés par les cancers pancréato-biliaires [53]. Cependant, 3 études
285 ne retrouvent pas cette association, dont deux concernent les cancers oncohématologiques
286 [54–56].

287

288 *Dans le domaine des complications thrombotiques associées au COVID-19.*

289 Différent arguments viennent à l'appui de la recherche de MV procoagulantes dans cette
290 maladie infectieuse émergente 1/ les formes sévères de la COVID-19 sont associées à des
291 anomalies de l'hémostase, à un contexte inflammatoire et à une incidence accrue de
292 complications thromboemboliques, malgré une thrombophylaxie à dose préventive [57]. Par
293 ailleurs, l'inflammation vasculaire généralisée et les lésions endothéliales conduisent à
294 l'expression du facteur tissulaire et à la génération de thrombine [58–60]. Dans une étude
295 portant sur 111 patients COVID-19 hospitalisés dans des services de réanimation, de
296 médecine interne et de Néphrologie, le nombre et l'activité procoagulante des MV dépendants
297 du facteur tissulaire ont été mesurés chez des patients stratifiés selon la sévérité de leur
298 atteinte (modérée ou sévère). Alors que les numérations de sous populations de MV, quelle
299 qu'en soit l'origine cellulaire, ne diffèrent pas entre ces 2 sous-groupes de patients, l'activité
300 procoagulante des MVest 10 fois plus élevée dans les formes sévères de la maladie par
301 rapport aux formes modérées, et environ 20 fois plus élevée chez les patients qui présentent
302 une complication thrombo-embolique par rapport à ceux qui n'en font pas. [61]. Cette activité
303 procoagulante des MV est également associée aux paramètres de l'inflammation, notamment
304 le fibrinogène, la PCR et IL6. De façon intéressante, une valeur seuil de l'activité
305 procoagulante de ces MV, établie à 78fM, est prédictive des complications thrombotiques, de
306 façon indépendante de l'âge, de l'indice de masse corporelle, des leucocytes, des LDH et des
307 valeurs de IL6 [61].

308 Cette coagulopathie récemment décrite pour la COVID 19 a été comparée à celle du choc
309 septique . Cette comparaison montre que ces 2 types de situations thrombotiques associées à
310 un contexte infectieux sont caractérisés par un profil de coagulopathie distinct [62–64]. Les
311 patients COVID-19 présentant des taux circulants de MV procoagulantes 10 fois plus élevés
312 que les patients en choc septique. Cette décharge massive d’activité procoagulante
313 disséminée par les MV n’est pas associée à la diminution de l’activité fibrinolytique
314 caractéristique du choc septique [61].

315 En conclusion, ces résultats apportent un nouvel éclairage à la physiopathologie de la COVID
316 -19. Ils montrent pour la première fois que des MV vectorisant du facteur tissulaire
317 disséminent des niveaux extrêmement élevés d’activité procoagulante dans la circulation, que
318 l’on pourrait qualifier d’orage procoagulant, faisant le lien entre inflammation et thrombose.

319 En complément des biomarqueurs conventionnels de la coagulopathie, comme les D-
320 dimères ou les plaquettes [65,66], les MV pourraient représenter des Biomarqueurs
321 émergents pour identifier de façon précoce les patients à risque thrombotique. Ces avancées
322 viennent à l’appui des recommandations internationales sur l’instauration précoce d’un
323 traitement anti coagulant pour la prévention et le traitement des thromboses , avec
324 intensification potentielle en cas de COVID-19 sévère . Les MV facteur tissulaire favorisant
325 la génération de thrombine, plusieurs médicaments antithrombotiques ciblant la formation de
326 thrombine comme les héparines ont été proposés dans des protocoles prophylactiques et / ou
327 curatifs, pour la prise en charge des thromboses associées à la COVID-19 [67]. Cette réponse
328 procoagulante étant elle-même déclenchée par la réponse inflammatoire, les thérapies ciblant
329 cette réponse inflammatoire de façon générale comme les corticoïdes, ou plus sélectivement
330 comme les immunothérapies ciblant les cytokines inflammatoires et le complément
331 pourraient, de façon indirecte, améliorer les effets délétères de cette réponse immuno-
332 thrombotique.

333

334 Au total, les études publiées à ce jour aussi bien dans les thromboses artérielles et veineuses
335 sont encourageantes, car elles montrent que les MV ont un réel potentiel pour prédire le risque
336 thrombotique, et doivent prendre en considération aussi bien l’origine cellulaire des MV que
337 leur activité fonctionnelle. Mais ces études reposent sur des effectifs restreints pour la
338 majorité d’entre elles et sont limitées par un manque de standardisation des méthodes reposant
339 sur des tests fonctionnels. Par ailleurs, les tests fonctionnels sont globaux et ne permettent pas
340 de dire si l’activité procoagulante provient des cellules hématopoïétiques ou des cellules
341 tumorales. Le chapitre suivant s’attachera à montrer pourquoi le développement de stratégies

342 technologiques sensibles, reproductibles et standardisées est indispensable pour préciser
343 l'intérêt des MV dans les pathologies cardiovasculaires.

344

345 **3. Méthodes de mesure des microvésicules et stratégies de standardisation**

346 La translation des MV à la clinique implique de prendre en considération tous les facteurs qui
347 peuvent potentiellement biaiser leur détermination. Parmi eux, l'étape pré-analytique est la
348 source de variabilité la plus importante. Les principaux paramètres pré analytiques influençant
349 les dosages des microvésicules plasmatiques sont la nature de l'anticoagulant, le diamètre de
350 l'aiguille, le délai d'acheminement, les conditions de transport et le stockage (Tableau 3) [68].
351 Ce rôle critique a été démontré par une étude multicentrique incluant plus de 40 laboratoires
352 [69] conduisant à proposer des recommandations pré analytiques pour la mesure des MV dans
353 le plasma, très proches de celles préconisées en hémostase spécialisée pour la mesure des
354 anticoagulants de type lupiques [69,70]. Ces recommandations ont été élargies à d'autres
355 types de milieux biologiques et à d'autres types de vésicules par un panel d'experts
356 internationaux, sous l'égide de l'ISEV et de l'ISTH [70,71].

357 Concernant la mesure des MV dans les échantillons biologiques, les différentes méthodes
358 disponibles peuvent être regroupées en 2 grandes catégories : *les méthodes qui apportent des*
359 *informations à l'échelle d'une MV* incluant la cytométrie en flux, la détection par impédance
360 (RPS : Resistive Pulse Sensing), la détection grâce à la microscopie électronique et la
361 microscopie de force atomique, ainsi que la détection des mouvements browniens (NTA :
362 Nanoparticle Tracking Analysis) et *les méthodes qui donnent des informations globales, à*
363 *l'échelle d'une population de MV*, comme les immuno-assays, les tests fonctionnels et les
364 tests hybrides qui combinent les deux. Toutes ces méthodes ont leurs propres avantages et
365 leurs limites pour la mesure des VEC [70–73]. Dans cette revue, nous nous focaliserons sur la
366 cytométrie en flux et les tests fonctionnels qui ont été largement utilisés pour mesurer les MV
367 dans des contextes cliniques. (Tableau 4)

368

369 **3.1 La Cytométrie en flux (CMF)**

370 Elle repose sur la combinaison des propriétés de diffraction de la lumière des MV et
371 l'expression d'antigènes spécifiques détectés par marquage fluorescent. Les avantages sont de
372 combiner une analyse multiparamétrique permettant de détecter des sous-populations de MV
373 avec un bon niveau de spécificité en fonction de l'origine cellulaire. Les principaux
374 marqueurs immunologiques utilisés à ce jour ont été résumés dans le tableau 5. La CMF

375 donne accès à une analyse quantitative des MV grâce à des billes de comptage et à une
376 stratégie de standardisation possible grâce à des calibrants en taille et en fluorescence. De
377 plus, c'est une technologie accessible dans de nombreux laboratoires hospitaliers et de
378 recherche. Cependant, la CMF a ses propres limites, en lien avec la taille submicronique et la
379 faible expression antigénique des MV.

380 Durant ces 10 dernières années, la CMF a bénéficié de progrès technologiques considérables
381 impulsés par la demande des sociétés savantes d'améliorer les capacités de résolution en taille
382 et en fluorescences des cytomètres. Depuis 2018, ces évolutions ont abouti au développement
383 par différents fabricants, d'instruments de dernière génération ultrasensibles en taille et en
384 fluorescences, avec en conséquence, une performance accrue pour mesurer les MV présentes
385 en très faible quantité dans la circulation comme les MV d'origine endothéliale, leucocytaire
386 ou tumorale [74]. À côté de ces évolutions technologiques, la CMF est aussi la méthode de
387 mesure qui a le plus bénéficié d'avancées en termes de standardisation [75]. En effet durant
388 ces 10 dernières années, plusieurs études internationales de standardisation, impliquant près
389 de 40 laboratoires de pays différents, ont été coordonnées par notre groupe et le groupe de
390 Rienk Niewland à Amsterdam dans le cadre des Sous-comités de standardisation de l'ISTH,
391 en interface avec l'ISAC et l'ISEV. Ces travaux multicentriques ont permis de définir des
392 protocoles standardisés et des outils de calibration aujourd'hui à disposition de la
393 communauté scientifique, avec comme valeur ajoutée, de disposer de stratégies communes
394 pour quantifier les sous-populations de MV tout en réduisant les variabilités inter-laboratoires.

395

396 **3.2 Mesure de l'activité fonctionnelle des MV**

397 L'activité procoagulante des MV repose sur l'expression conjointe des phospholipides
398 anioniques qui permettent la liaison et l'activation des facteurs de la coagulation à la surface
399 des MV mais aussi du facteur tissulaire (FT), exprimé de façon sélective par certaines sous-
400 populations de MV. Concernant les tests disponibles, différentes stratégies sont possibles, qui
401 diffèrent en fonction de la cible procoagulante mesurée, du principe de la méthode et des
402 conditions pré analytiques (Tableau 6). Une première stratégie est basée sur une détermination
403 antigénique des phospholipides anioniques, du FT ou de la fibrine mesurés sur des MV
404 directement sur l'échantillon biologique [76–79]. Une deuxième stratégie est basée sur la
405 détermination d'une activité fonctionnelle, mesurée en utilisant soit un temps de coagulation,
406 un temps de génération de thrombine, de fibrine, ou de facteur X activé, à la surface de MV
407 purifiées par centrifugation ou par immuno-capture [16,46,50,80,81]. La dernière stratégie
408 combine une purification des MV par immuno-capture sur des plaques ELISA et un test

409 fonctionnel basé sur un test de génération de thrombine ou de génération de facteur X activé
410 [82].

411 Les enjeux actuels pour optimiser les performances analytiques des tests fonctionnels
412 appliqués à la mesure de l'activité procoagulante des MV dépendante du FT sont de
413 développer des tests plus sensibles, spécifiques et reproductibles. Quelle que soit la stratégie,
414 les recommandations sont d'utiliser un anticorps bloquant le FT pour attester de la spécificité
415 de la mesure et un étalon FT permettant de calibrer cette activité. C'est en intégrant ces
416 recommandations que nous avons récemment développé, , un nouveau test procoagulant
417 permettant de mesurer le FT avec une plus grande sensibilité comparée aux autres tests
418 développés à ce jour [83].

419 La vision initiale des MV comme des surfaces enzymatiques capables d'activer des réactions
420 procoagulantes délétères a été revisitée plus récemment en montrant qu'elles pouvaient
421 également être le support d'activités fibrinolytiques protectrices [84]. Ces activités dépendent
422 de l'expression d'urokinase et de t-PA, exprimées respectivement par les MV d'origine
423 leucocytaire et endothéliale, qui ont de ce fait la capacité de générer de la plasmine et de
424 participer à des réponses de protéolyse intra et extravasculaire. Nous avons développé une
425 approche originale combinant la capture des MV leucocytaires en sang total et la mesure de
426 leur activité de génération de plasmine [85]. Contrairement à l'activité pro coagulante,
427 associée au risque de thrombose, cette l'activité fibrinolytique apparait comme protectrice
428 dans certains contextes. En effet, elle est élevée chez les sujets normaux et chez les patients en
429 choc septique qui survivent par rapport à ceux qui décèdent. Ainsi, le fait que les MV puissent
430 être de façon concomitante le support d'activités procoagulantes et fibrinolytiques nous a
431 conduits à proposer le concept de « balance coagulolytique des MV », mesurable par la
432 résultante de ces 2 activités à la surface des MV.

433 Même s'il reste encore des verrous technologiques à lever concernant les approches
434 préanalytiques et analytiques appliquées à la mesure des MV, des progrès importants ont été
435 accomplis ces dernières années pour permettre d'envisager aujourd'hui des études
436 multicentriques.

437

438 **Conclusion**

439 Ainsi, les progrès technologiques accomplis ces dernières années dans le domaine de la
440 mesure des MV, et les efforts de standardisation impulsés par 3 sociétés savantes (ISEV,
441 ISTH, ISAC) travaillant en synergie avec les équipes de recherche sont encourageants pour
442 accélérer leur transfert vers la clinique. Les données cliniques obtenues ont permis d'intégrer

443 en 2016 le dosage des MV dans la liste des actes innovants (RIHN) de la nomenclature des
444 actes de biologie médicale en France. D'autre part, en 2019, les outils et stratégies de
445 calibration et de contrôles développés par la communauté scientifique, ont également permis
446 de satisfaire pour la première fois aux exigences de l'accréditation de la mesure des sous
447 populations de MV par CMF par le COFRAC (Comité FRançais d'ACcréditation).
448 Néanmoins, différents challenges restent encore à atteindre pour donner tout leur potentiel aux
449 MV pour se positionner comme des bio marqueurs prédictifs.

450 **Le premier** est de poursuivre les efforts de standardisation, notamment 1/ de standardiser les
451 tests fonctionnels pour disposer d'approche sensibles, spécifiques et reproductibles, objectif
452 priorisé dans une étude multicentrique internationale que nous coordonnons actuellement au
453 sein de l'ISTH avec un groupe hollandais et américain 2/ de définir les meilleurs marqueurs
454 pour les MV les moins fréquentes mais les plus pertinentes d'un point de vue clinique comme
455 celles d'origine endothéliale, leucocytaire et tumorale 3/ d'établir les variations
456 physiopathologiques des MV en fonction de l'âge ou du sexe.

457 **Un autre challenge est de valider la pertinence clinique des MV**, grâce à des études
458 multicentriques à large échelle et à des scores combinant les MV aux données biologiques et
459 cliniques. Les résultats de ces études, associés aux recommandations des sociétés savantes
460 nationales et internationales et à l'implémentation des MV dans les éléments normatifs des
461 analyses de biologie médicale, permettront dans l'avenir de positionner les MV comme de
462 futurs candidats pour développer une médecine personnalisée appliquée aux maladies
463 cardiovasculaires

464 Ce que nous avons appris du risque thrombotique associé à la COVID 19, illustre le potentiel
465 des MV, pour stratifier les patients à risque vasculaire et proposer une adaptation des doses
466 d'anticoagulation, avec comme objectif une personnalisation des traitements anti-coagulants
467 dans les formes sévères de cette maladie infectieuse émergente.

468

469

470 **Légendes figures et tableaux**

471

472 **Figure 1 : Caractéristiques des vésicules extracellulaires**

473 Représentation schématique des différents types de vésicules extracellulaires de la formation
474 des vésicules extracellulaires et classification en fonction de leur biogénèse, leur taille et leur
475 contenu.

476 Légende : ALIX : Protéine d'interaction de mort cellulaire programmée 6 ; LAMP1 : Protéine
477 membranaire associée aux lysosomes 1 ; Tsg101 : Gène de sensibilité aux tumeurs 101

478

479 **Figure 2 : Vésicules extracellulaires dans les fluides biologiques et notion de biopsie** 480 **liquide**

481 Les vésicules extracellulaires sont présentes dans les milieux extracellulaires en contact avec
482 les cellules et les tissus qui les produisent. Elles sont, de ce fait, détectables dans une grande
483 variété de liquides biologiques (plasma, urine, liquide cébrospinal, liquides articulaires,
484 salive, ascite, liquide séminal, lait maternel...). Elles sont reconnues comme des
485 biomarqueurs prometteurs dans les biopsies liquides de ces tissus.

486

487 **Figure 3 : Diversité structurale et fonctionnelle des microvésicules**

488 Représentation schématique des différents agonistes capables d'augmenter la libération des
489 microvésicules à partir de différents types de cellules. Impact sur la diversité de leur
490 composition protéique, lipidique et nucléiques et conséquences sur la diversité fonctionnelle
491 qui en résulte.

492 Légende : ADP : Adénosine diphosphate ; LPS : lipopolysaccharide ; MV : microvésicules ;
493 PAI-1 : Inhibiteur des activateurs du plasminogène

494

495 **Figure 4 : Multiples facettes des microvésicules endothéliales**

496 Représentation schématique du panel des molécules portées par les microparticules
497 endothéliales et des effets biologiques associés à ces molécules (d'après Françoise Dignat-G
498 et al, ATVB, 2011).

499 Légende : APC : protéine C activée ; ARN : acide ribonucléique ; eNOS : NO synthase
500 endothéliale ; EPC : protéine C endothéliale ; EPCR : récepteur endothélial à la protéine C ;
501 FT : facteur tissulaire ; ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; miARN : micro-
502 ARN ; MMP : métalloprotéase ; PAI-1 : inhibiteur des activateurs du plasminogène ; PECAM-
503 1 : molécule d'adhésion entre les plaquettes et les cellules endothéliales 1 ; PS :
504 phosphatidylsérine ; t-PA : activateur tissulaire du plasminogène ; TM : thrombomoduline ;
505 VE-cadherine : endothélium vasculaire cadherine ; VCAM-1 : molécule d'adhésion aux
506 cellules vasculaires 1

507

508 **Tableau 1 : Les microvésicules comme biomarqueur du risque de thrombose artérielle**

509 Ce tableau regroupe les principales études prospectives montrant un rôle prédictif des
510 microvésicules dans les thromboses artérielles.

511 Légende :

512 AnV : Annexine V ; CMF : cytométrie en flux ; FT : facteur tissulaire ; MV : microvésicules

513

514 **Tableau 2 : Les microvésicules procoagulantes comme biomarqueur du risque de** 515 **thrombose veineuse**

516 Ce tableau regroupe les principales études prospectives impliquant les microvésicules portant
517 le facteur tissulaire comme prédictives ou pas du risque de thrombose veineuse. Les études
518 sur fond blanc montrent une association entre les FT+MV et la survenue de thromboses
519 veineuse. Cette association n'a pas été retrouvée dans les études sur fond gris.

520 Légende : FT : facteur tissulaire ; MV : microvésicules

521

522 **Tableau 3 : Recommandations pré analytiques pour la mesure des microvésicules** 523 **plasmatiques**

524 Ce tableau regroupe les principaux paramètres pré analytiques influençant les dosages des
525 microvésicules plasmatiques.

526

527 **Tableau 4 : Méthodes de caractérisation des microvésicules**

528 Les méthodes permettant la caractérisation des microvésicules sont séparées en deux
529 catégories. Des méthodes permettant l'analyse une à une des microvésicules comme la
530 cytométrie en flux et les méthodes analysant de façon globale un mélange de microvésicules
531 telles que les techniques ELISA ou les tests fonctionnels.

532

533 **Tableau 5 : Marqueurs de surface des différentes sous-populations de microvésicules**

534 Différentes sous population de microvésicules détectées par cytométrie en flux en utilisant des
535 marqueurs spécifiques des cellules.

536 Légende : ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; VCAM-1 : Molécule d'adhésion
537 aux cellules vasculaire 1

538

539 **Tableau 6 : Méthodes de caractérisation des MV procoagulantes**

540 La mesure de l'activité procoagulante des microvésicules peut être obtenue grâce à différentes
541 stratégies : les méthodes antigéniques (Antig.), fonctionnelles (Fonct.) et hybrides (Hyb.).

542 Légende : PS : phosphatidylsérine, FT : facteur tissulaire ; FTPI : inhibiteur de la voie du
543 facteur tissulaire ; PFP : plasma déplété en plaquettes.

544

545 **Références**

546

- 547 [1] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*
548 1967;13:269–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>.
- 549 [2] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell*
550 *Biol* 2013;200:373–83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- 551 [3] Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological
552 properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*
553 2015;4:27066.
- 554 [4] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers
555 budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008;319:1244–7.
556 <https://doi.org/10.1126/science.1153124>.
- 557 [5] Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F,
558 et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function
559 as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 2013;288:11649–61.
560 <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>.
- 561 [6] Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, et al. Syntenin-ALIX
562 exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2.
563 *Nat Commun* 2014;5:3477. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>.
- 564 [7] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular
565 vesicles. *Trends Cell Biol* 2015;25:364–72. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- 566 [8] Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next
567 Small Big Thing. *Int J Mol Sci* 2016;17:170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>.
- 568 [9] Boulanger CM, Dignat-George F. Microparticles: an introduction. *Arterioscler Thromb Vasc*
569 *Biol* 2011;31:2–3. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.220095>.
- 570 [10] Poon IKH, Parkes MAF, Jiang L, Atkin-Smith GK, Tixeira R, Gregory CD, et al. Moving
571 beyond size and phosphatidylserine exposure: evidence for a diversity of apoptotic cell-derived
572 extracellular vesicles in vitro. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1608786.
573 <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1608786>.
- 574 [11] Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep*
575 2011;3:15. <https://doi.org/10.3410/B3-15>.
- 576 [12] Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We
577 Need to Go. *Cell* 2016;164:1226–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.
- 578 [13] Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in
579 Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* 2016;30:836–48.
580 <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>.
- 581 [14] Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, et al. The significance of shed
582 membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J*
583 *Clin Invest* 1997;99:1546–54. <https://doi.org/10.1172/JCI119317>.
- 584 [15] Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of
585 endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus
586 anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104:93–102. <https://doi.org/10.1172/JCI4985>.
- 587 [16] Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles
588 exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* 2011;117:3172–80.
589 <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290460>.
- 590 [17] Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn W-K, et al. Liver cell-derived
591 microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells.
592 *Gastroenterology* 2009;136:320–330.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.066>.

- 593 [18] Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ, Pennil C, Garcia R, Goff BA, et al. Microparticles from ovarian
594 carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22:546–
595 52. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318241d9b9>.
- 596 [19] Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, et al. Increased
597 vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial
598 proliferation. *Diabetes* 2010;59:694–701. <https://doi.org/10.2337/db08-1524>.
- 599 [20] Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and
600 thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll*
601 *Cardiol* 2007;49:772–7. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.10.053>.
- 602 [21] Rood IM, Deegens JKJ, Merchant ML, Tamboer WPM, Wilkey DW, Wetzels JFM, et al.
603 Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of
604 nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2010;78:810–6. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.262>.
- 605 [22] Franz C, Böing AN, Hau CM, Montag M, Strowitzki T, Nieuwland R, et al. Procoagulant tissue
606 factor-exposing vesicles in human seminal fluid. *J Reprod Immunol* 2013;98:45–51.
607 <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.02.002>.
- 608 [23] Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets
609 amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*
610 2010;327:580–3. <https://doi.org/10.1126/science.1181928>.
- 611 [24] Watts G. Liquid biopsy: still early days for early detection. *Lancet* 2018;391:2593–4.
612 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31476-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31476-4).
- 613 [25] Moon DH, Lindsay DP, Hong S, Wang AZ. Clinical indications for, and the future of,
614 circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;125:143–50.
615 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.002>.
- 616 [26] Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells,
617 microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell*
618 *Mol Med* 2009;13:454–71. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x>.
- 619 [27] Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat
620 M-L, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European
621 Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb*
622 *Haemost* 2017;117:1296–316. <https://doi.org/10.1160/TH16-12-0943>.
- 623 [28] van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and
624 clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012;64:676–705.
625 <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>.
- 626 [29] Simoncini S, Njock M-S, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harlé J-R, et al. TRAIL/Apo2L
627 mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a
628 potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res* 2009;104:943–51.
629 <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183285>.
- 630 [30] Sapet C, Simoncini S, Loriol B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, et al. Thrombin-induced
631 endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II
632 activation by caspase-2. *Blood* 2006;108:1868–76. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-014175>.
- 633 [31] Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler*
634 *Thromb Vasc Biol* 2011;31:27–33. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.218123>.
- 635 [32] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in
636 Angiogenesis. *Circ Res* 2017;120:1658–73. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309681>.
- 637 [33] Cooney MT, Cooney HC, Dudina A, Graham IM. Assessment of cardiovascular risk. *Curr*
638 *Hypertens Rep* 2010;12:384–93. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0143-1>.
- 639 [34] Thulin Å, Christersson C, Alfredsson J, Siegbahn A. Circulating cell-derived microparticles as
640 biomarkers in cardiovascular disease. *Biomarkers in Medicine* 2016;10:1009–22.
641 <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0035>.
- 642 [35] Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived
643 tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in
644 malignancy. *Clin Cancer Res* 2009;15:6830–40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0371>.
- 645
646

- 647 [36] Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of
648 circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart
649 Study. *Eur Heart J* 2014;35:2972–9. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu153>.
- 650 [37] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, et al. Elevated levels
651 of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and
652 coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1622–30.
653 <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.047>.
- 654 [38] Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating
655 CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*
656 2011;32:2034–41. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq478>.
- 657 [39] Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a
658 multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for
659 cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*
660 2009;54:601–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.022>.
- 661 [40] Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating
662 endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study.
663 *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1873–80. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr573>.
- 664 [41] Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, et al.
665 Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in
666 asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1436–41.
667 <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.078>.
- 668 [42] Berezin AE, Kremzer AA, Samura TA, Martovitskaya YV. Circulating endothelial-derived
669 apoptotic microparticles in the patients with ischemic symptomatic chronic heart failure:
670 relevance of pro-inflammatory activation and outcomes. *Int Cardiovasc Res J* 2014;8:116–23.
- 671 [43] Chiva-Blanch G, Crespo J, Suades R, Arderiu G, Padro T, Vilahur G, et al. CD142+/CD61+,
672 CD146+ and CD45+ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following
673 a Mediterranean diet supplemented with nuts. *Thromb Haemost* 2016;116:103–14.
674 <https://doi.org/10.1160/TH16-02-0130>.
- 675 [44] Chiva-Blanch G, Laake K, Myhre P, Bratseth V, Arnesen H, Solheim S, et al. Platelet-,
676 monocyte-derived and tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute
677 myocardial infarction severity. *PLoS ONE* 2017;12:e0172558.
678 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172558>.
- 679 [45] Lacroix R, Vallier L, Bonifay A, Simoncini S, Mege D, Aubert M, et al. Microvesicles and
680 Cancer Associated Thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2019;45:593–603.
681 <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693476>.
- 682 [46] Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang J-G, Hyrien O, Hathcock J, et al. Plasma tissue
683 factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost*
684 2008;6:1983–5. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x>.
- 685 [47] van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans RJ, Mackman N, Manly D, Kamphuisen PW, et al.
686 Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An
687 exploratory prospective study. *Thromb Haemost* 2012;108:160–5. <https://doi.org/10.1160/TH12-02-0099>.
- 688 [48] Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, Campello E, Radu CM, Saggiorato G, et al. Circulating
689 microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential
690 prothrombotic role. *Thromb Haemost* 2013;110:378–85. <https://doi.org/10.1160/TH12-12-0957>.
- 691 [49] Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, Wang J-G, Key NS, Mackman N, et al. Circulating
692 microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. *Thromb*
693 *Res* 2013;132:180–4. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.06.026>.
- 694 [50] Woei-A-Jin FJSH, Tesselar MET, Garcia Rodriguez P, Romijn FPHTM, Bertina RM, Osanto S.
695 Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated
696 thrombosis? *Br J Cancer* 2016;115:332–8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.170>.
- 697 [51] van Es N, Hisada Y, Di Nisio M, Cesarman G, Kleinjan A, Mahé I, et al. Extracellular vesicles
698 exposing tissue factor for the prediction of venous thromboembolism in patients with cancer: A
699 prospective cohort study. *Thromb Res* 2018;166:54–9.
700 <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.04.009>.
- 701

- 702 [52] Faille D, Bourrienne M-C, de Raucourt E, de Chaisemartin L, Granger V, Lacroix R, et al.
703 Biomarkers for the risk of thrombosis in pancreatic adenocarcinoma are related to cancer
704 process. *Oncotarget* 2018;9:26453–65. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25458>.
- 705 [53] Cui C-J, Wang G-J, Yang S, Huang S-K, Qiao R, Cui W. Tissue Factor-bearing MPs and the risk
706 of venous thrombosis in cancer patients: A meta-analysis. *Sci Rep* 2018;8:1675.
707 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19889-8>.
- 708 [54] Thaler J, Ay C, Weinstabl H, Dunkler D, Simanek R, Vormittag R, et al. Circulating
709 procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann Hematol* 2011;90:447–53.
710 <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1111-1>.
- 711 [55] Thaler J, Ay C, Mackman N, Bertina RM, Kaider A, Marosi C, et al. Microparticle-associated
712 tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal
713 and brain cancer patients. *J Thromb Haemost* 2012;10:1363–70. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04754.x>.
- 715 [56] Hernández C, Orbe J, Roncal C, Alvarez-Hernandez M, Martinez de Lizarrondo S, Alves MT, et
716 al. Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis
717 in cancer patients. *Thromb Haemost* 2013;110:598–608. <https://doi.org/10.1160/TH13-02-0122>.
- 718 [57] Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E, Duburcq T, Lassalle F, et al. Pulmonary Embolism
719 in Patients With COVID-19: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation* 2020;142:184–
720 6. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047430>.
- 721 [58] McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The Emerging Threat of (Micro)Thrombosis in COVID-19
722 and Its Therapeutic Implications. *Circ Res* 2020;127:571–87.
723 <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317447>.
- 724 [59] Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of
725 severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020;130:2620–9.
726 <https://doi.org/10.1172/JCI137244>.
- 727 [60] Guervilly C, Burtey S, Sabatier F, Cauchois R, Lano G, Abdili E, et al. Circulating Endothelial
728 Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID -19. *J Infect Dis* 2020;222:1789–93.
729 <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa528>.
- 730 [61] Guervilly C, Bonifay A, Burtey S, Sabatier F, Cauchois R, Abdili E, et al. Dissemination of
731 extreme levels of extracellular vesicle - tissue factor activity in severe COVID-19 patients.
732 *Blood Advances* [in press]
- 733 [62] Iba T, Levy JH, Connors JM, Warkentin TE, Thachil J, Levi M. The unique characteristics of
734 COVID-19 coagulopathy. *Crit Care* 2020;24:360. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03077-0>.
- 735 [63] Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced
736 coagulopathy. *J Intensive Care* 2018;6:68. <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0340-6>.
- 737 [64] Marchandot B, Sattler L, Jesel L, Matsushita K, Schini-Kerth V, Grunebaum L, et al. COVID-19
738 Related Coagulopathy: A Distinct Entity? *J Clin Med* 2020;9.
739 <https://doi.org/10.3390/jcm9061651>.
- 740 [65] Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor
741 prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844–7.
742 <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.
- 743 [66] Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer is Associated with Severity of Coronavirus Disease 2019: A
744 Pooled Analysis. *Thromb Haemost* 2020;120:876–8. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709650>.
- 745 [67] Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation.
746 *Blood* 2020;135:2033–40. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006000>.
- 747 [68] Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical
748 parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of
749 protocol. *J Thromb Haemost* 2012;10:437–46. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x>.
- 751 [69] Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles
752 in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1:24–35.
753 <https://doi.org/10.1111/jth.12268>.
- 754 [70] Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andalousi S, et al.
755 Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res* 2017;120:1632–48.
756 <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>.

- 757 [71] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal
758 information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the
759 International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J*
760 *Extracell Vesicles* 2018;7:1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- 761 [72] Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of
762 Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci* 2017;18.
763 <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>.
- 764 [73] Xu R, Greening DW, Zhu H-J, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and
765 characterization: toward clinical application. *J Clin Invest* 2016;126:1152–62.
766 <https://doi.org/10.1172/JCI81129>.
- 767 [74] Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, et al. High-sensitivity
768 flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief
769 report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1054–8.
770 <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244616>.
- 771 [75] Welsh JA, Van Der Pol E, Arkesteijn GJA, Bremer M, Brisson A, Coumans F, et al.
772 MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry
773 experiments. *J Extracell Vesicles* 2020;9:1713526.
774 <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1713526>.
- 775 [76] Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks
776 for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci*
777 2015;53:110–26. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2015.10.008>.
- 778 [77] Nolan JP, Jones JC. Detection of platelet vesicles by flow cytometry. *Platelets* 2017;28:256–62.
779 <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1280602>.
- 780 [78] Mege D, Crescence L, Ouaiissi M, Sielezneff I, Guieu R, Dignat-George F, et al. Fibrin-bearing
781 microparticles: marker of thrombo-embolic events in pancreatic and colorectal cancers.
782 *Oncotarget* 2017;8:97394–406. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22128>.
- 783 [79] Hisada Y, Ay C, Auriemma AC, Cooley BC, Mackman N. Human pancreatic tumors grown in
784 mice release tissue factor-positive microvesicles that increase venous clot size. *J Thromb*
785 *Haemost* 2017;15:2208–17. <https://doi.org/10.1111/jth.13809>.
- 786 [80] Hemker HC, Giesen P, AIDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, et al. The calibrated
787 automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability.
788 *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249–53. <https://doi.org/10.1159/000073575>.
- 789 [81] Exner T, Joseph J, Low J, Connor D, Ma D. A new activated factor X-based clotting method
790 with improved specificity for procoagulant phospholipid. *Blood Coagul Fibrinolysis*
791 2003;14:773–9. <https://doi.org/10.1097/00001721-200312000-00015>.
- 792 [82] Laroche M, Dunois C, Vissac AM, Amiral J. Update on functional and genetic laboratory assays
793 for the detection of platelet microvesicles. *Platelets* 2017;28:235–41.
794 <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265925>.
- 795 [83] Vallier L, Bouriche T, Bonifay A, Judicone C, Bez J, Franco C, et al. Increasing the sensitivity
796 of the human microvesicle tissue factor activity assay. *Thromb Res* 2019;182:64–74.
797 <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.011>.
- 798 [84] Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of
799 plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that
800 modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110:2432–9.
801 <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069997>.
- 802 [85] Cointe S, Harti Souab K, Bouriche T, Vallier L, Bonifay A, Judicone C, et al. A new assay to
803 evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis
804 imbalance. *J Extracell Vesicles* 2018;7:1494482.
805 <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1494482>.
- 806

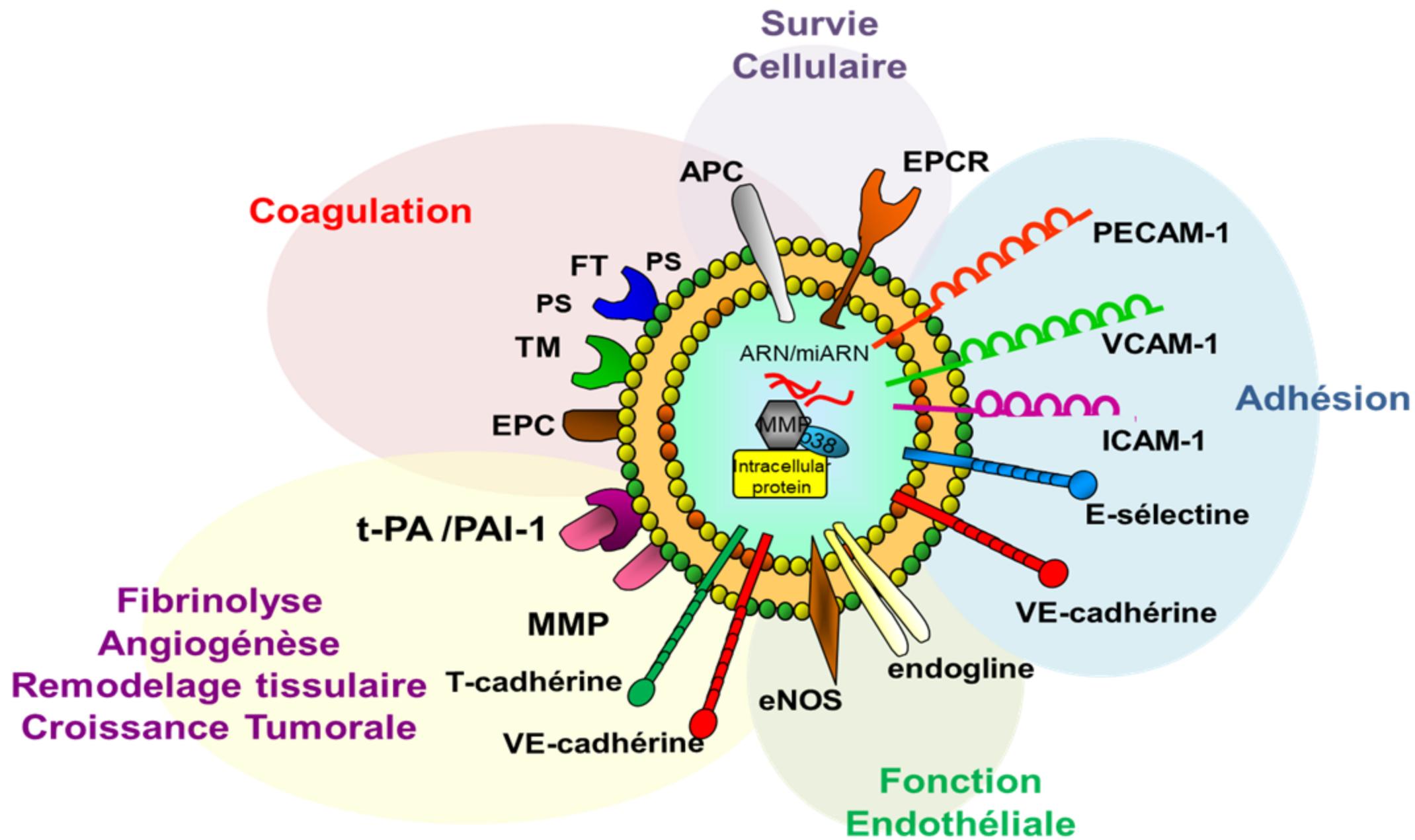


Figure 3

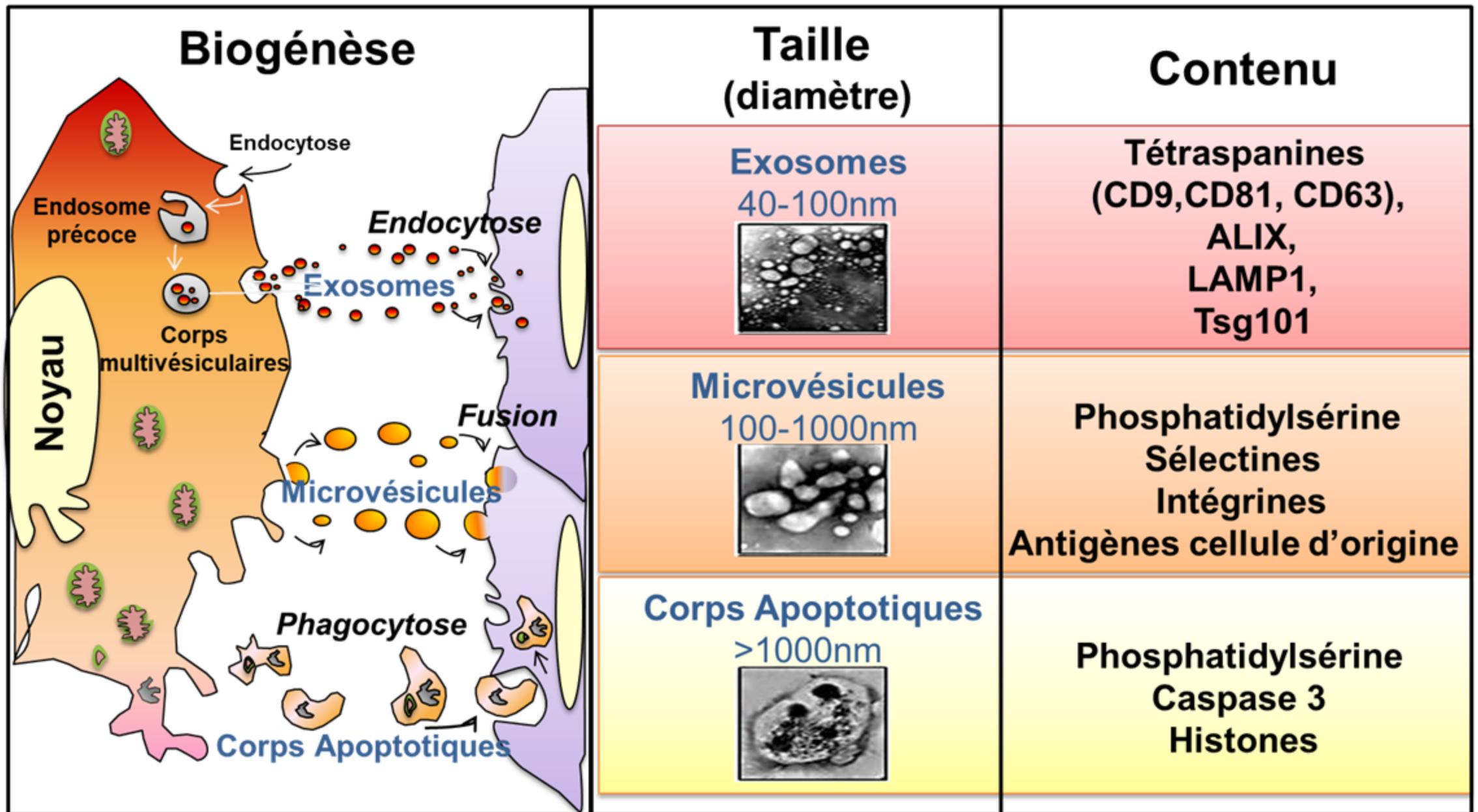


Figure 1

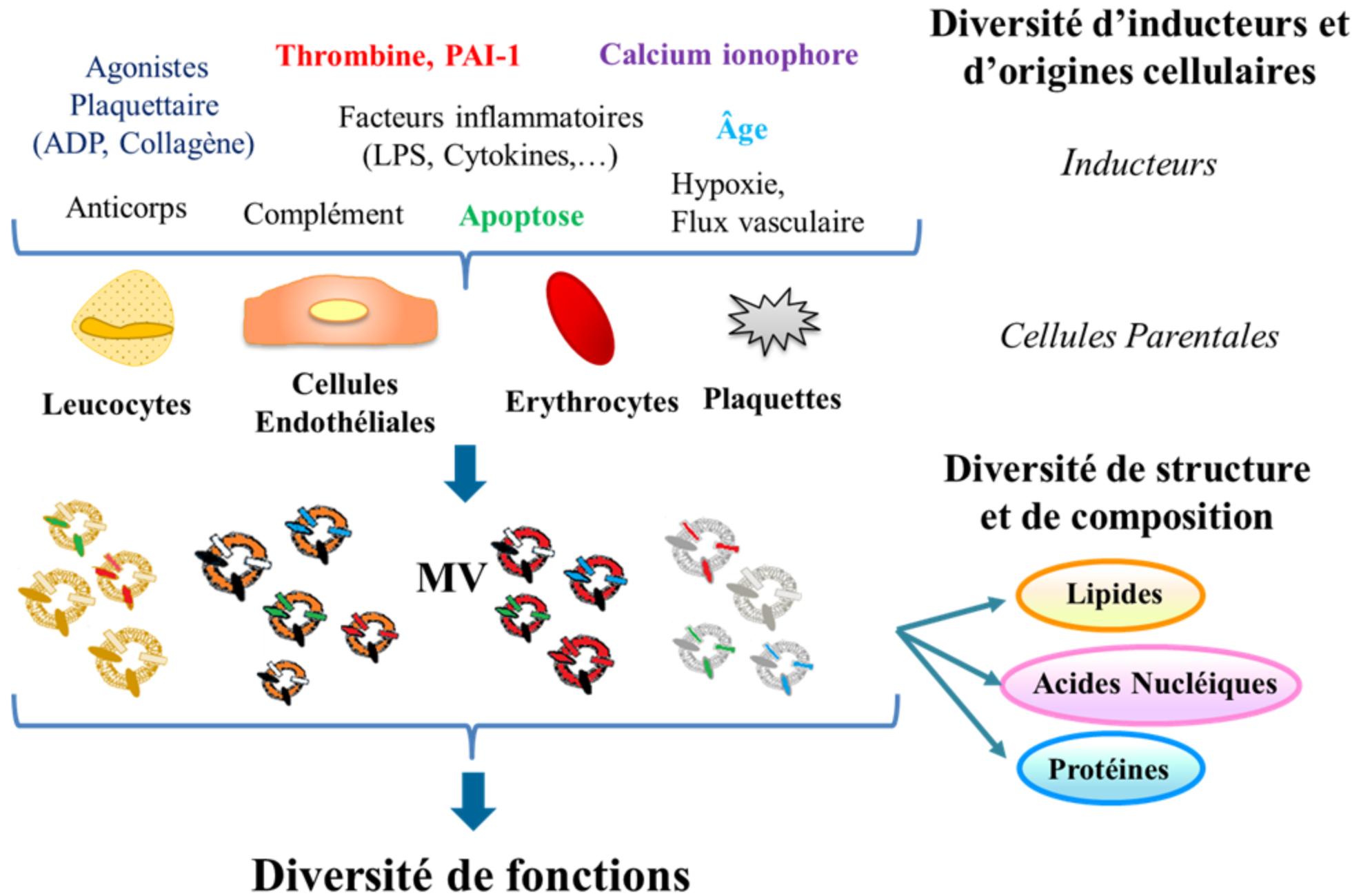


Figure 2

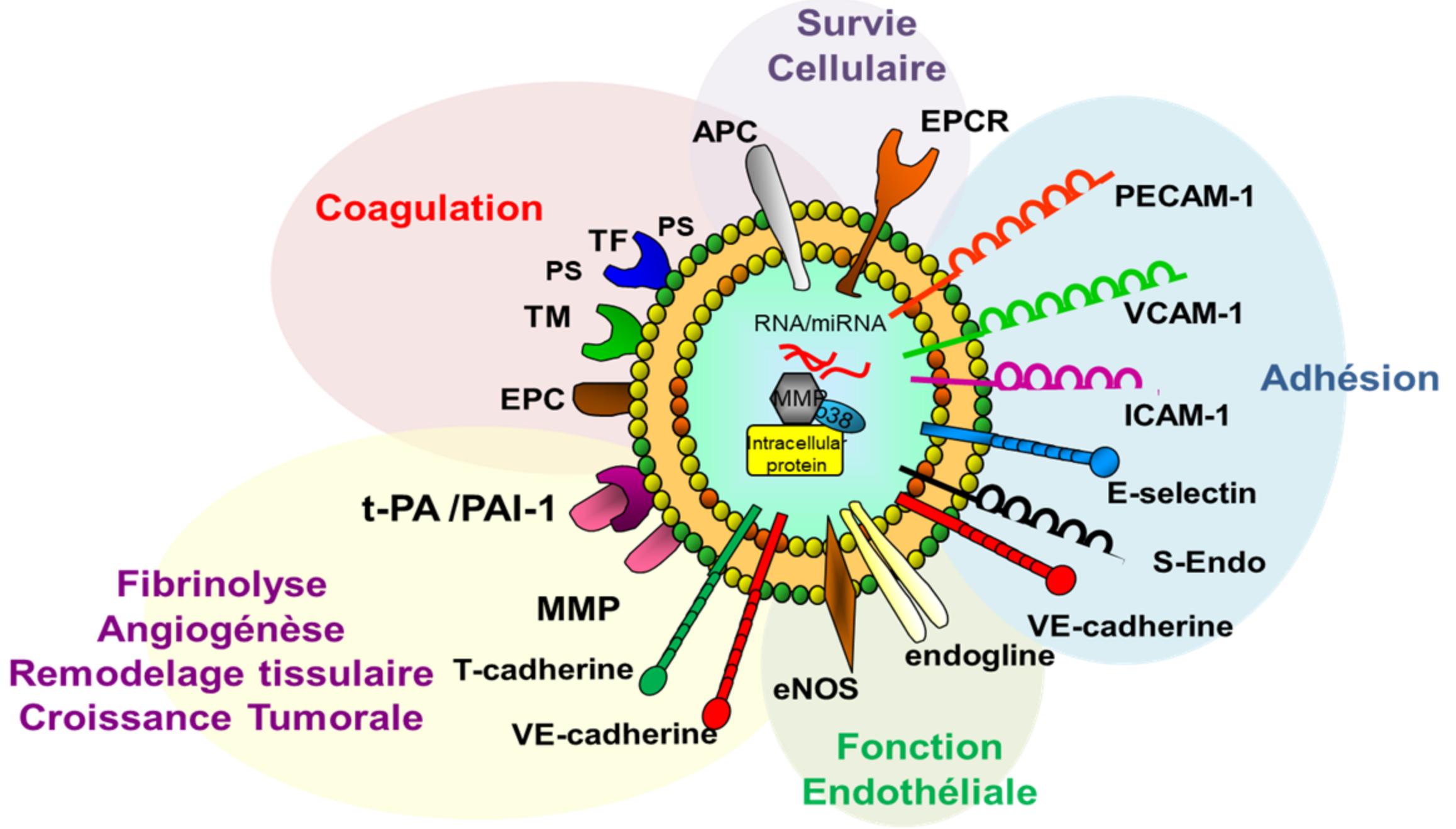


Figure 4

Tableau 1 : Les microvésicules comme biomarqueur du risque de thrombose artérielle

Pathologie	Effectif	Origine des MV	Méthode	Interêt prédictif (*) Indépendant	Réf
Maladie coronnaire	n=200	Endothéliale (CD31+/ AnV+)	CMF	Evénements cardiovasculaires (*)	[38]
Maladie coronnaire	n= 378	Endothéliale (CD144+)	CMF	Evénements cardiovasculaires et mortalité (*)	[39]
Insuffisance rénale	n=81	Endothéliale (CD31+/CD41-)	CMF	Evénements cardiovasculaires sévéres et mortalité (*)	[40]
Sténose carotidienne	n= 42	Leucocytaire CD11b/CD66b	CMF	Instabilité de la plaque (*)	[41]
Insuffisance cardiaque chronique	n=154	Endothélaile (CD31+/ AnV+)	CMF	Mortalité et ré-hospitalisation liée à l'insuffisance cardiaque chronique (*)	[42]
Patients âgés Avec minimum 3 facteurs de risque cardiovasculaire	n=25	Endothéliale (CD146+) Leucocytaire (CD45+) MV FT+ (CD142+)	CMF	Evénements cardiovasculaires chez des patients à haut risque avec régime alimentaire chargé en oléagineux	[43]
Infarctus du myocarde	n=200	Monocytaire (CD14+) Plaquettaire (CD61+) MV FT+ (CD142+)	CMF	Mortalité cardiovasculaire (suivi sur 4 ans)	[44]

Tableau 2 : Les microvésicules procoagulantes comme biomarqueur du risque de thrombose veineuse

Pathologie	Total/Thrombose veineuse +	Durée du suivi	Origine MV	Méthode	Réf
Cancer Pancréatique	11/02	20 semaines	MV totale	Test fonctionnel	[46]
Cancer solide	60/5	1 an	MV totale	Impédance	[35]
Cancer solide	43/5	6 mois	MV totale	Test fonctionnel	[47]
Glioblastome	61/11	7 mois	GFAP + FT + MV	CMF	[48]
Cancer pancréatique	117/52	Non précisé	MV totale	Test fonctionnel	[49]
Cancer pancréatique	65/11	6 mois – 1 an	MV totale	Test fonctionnel	[50]
Cancer solide	608/40	180 jours	MV totale	Test fonctionnel	[51]
Cancer pancréatique	41/12	1 an	MV totale	Test fonctionnel	[52]
Cancer solide et oncohématologique	728/53	2 ans	MV totale	Test fonctionnel	[54]
Cancer solide et oncohématologique	299/49	2 ans	MV totale	Test fonctionnel	[55]
Cancer pancréatique	252/40	10 mois	MV totale	CMF	[56]

Tableau 3 : Recommandations pré-analytiques pour la mesure des microvésicules plasmatiques

Paramètres pré analytiques	Recommandations
Type de tube	Tube citrate de sodium (C=0,109mol/L)
Prélèvement	Aiguille large (21G minimum) Eliminer les 2 premiers millilitres de sang
Délai avant la première centrifugation	Inférieur à 2 heures
Transport des tubes	Maintenir les tubes à la verticale
Centrifugation	2 centrifugations successives de 2500g, 15 minutes à température ambiante
Stockage des plasma déplétés en plaquette	Congélation -80°C
Utilisation des plasma déplétés en plaquette après congélation	Décongélation rapide au bain marie 37°C Conservation à 4°C avant dosage

Tableau 4 : Méthodes de caractérisation des microvésicules

	Méthodes	Quantification	Phénotypage	Taille	Limites
Analyse individuelle MV	Cytométrie en flux	+	+	Limité	Agrégats, diamètre < 200nm
	Mouvements browniens	+	-	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)
	Impédance	+	-	+	Artefacts (débris cellulaires, lipides et protéines)
	Microscopie électronique	Limité	Limité	+	Artefacts pendant la préparation de l'échantillon
	Microscopie de force atomique	Limité	Limité	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)
Population de MV	ELISA	+	+	-	Accessibilité des molécules portées par les MV
	Tests fonctionnels	+	+	-	Accessibilité des molécules portées par les MV
	Spectrométrie de masse	-	+(extraction protéique)	-	Echantillon > 10µg

Tableau 5 : Marqueurs de surface des différentes sous-populations de microvésicules

Origine cellulaire	Marqueurs de surface
Plaquettaire	CD41, P-sélectine, CD42b, CD31
Leucocytaire	CD14, CD11b, CD15, CD66b, ICAM-1, CD45
Endothéliale	CD31, VCAM-1, ICAM-1, CD62E, CD105, CD146, CD144
Erythrocytaire	CD235a

Tableau 6 : Méthodes de caractérisation des microvésicules procoagulantes

Tests	Stratégie	Cible	Méthode	Préanalytique	Test commercial	Réf
Cytométrie en Flux	<i>Antig.</i>	PS, FT, FT/ TFPI	Immuno fluorimétrie	PFP Centrifugation	Non	[75,76]
Cytométrie en Flux	<i>Antig.</i>	Fibrine	Immuno fluorimétrie	PFP Centrifugation	Non	[77]
Microscopie confocale	<i>Antig.</i>	FT	Immuno fluorimétrie	PFP Centrifugation	Non	[78]
Calibrated Automated Thrombogram	<i>Fonct.</i>	PS ou FT	Génération de Thrombine	PFP Centrifugation	Oui	[79]
STA-Procoag PPL	<i>Fonct.</i>	PS	Temps de Coagulation	PFP Centrifugation	Oui	[80]
Test de génération de facteur X activé	<i>Fonct.</i>	FT	Génération de facteur X activé	Centrifugation	Non	[46,50]
Test de génération de fibrine	<i>Fonct.</i>	PS + FT	Génération de fibrine	Centrifugation	Non	[16]
Zymuphen-MP ELISA	<i>Hyb.</i>	PS	Génération de Thrombine	Immunocapture (PS) sur PFP	Oui	[81]
Zymuphen-MP TF	<i>Hyb</i>	FT	Génération de facteur X activé	Immunocapture (PS) sur PFP	Non	[81]