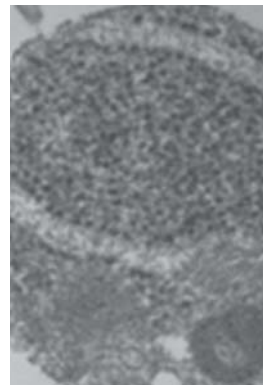


> Des microparticules cellulaires dont la taille varie entre 0,1 et 1 μm sont émises par des cellules activées ou en apoptose. Elles portent, associées à leur membrane, des protéines indiquant leur origine cellulaire et de la phosphatidylsérine qui transforme le feuillet membranaire externe en surface d'assemblage des facteurs de la coagulation. Cette propriété procoagulante est accentuée par la présence de facteur tissulaire (FT) sur certaines microparticules. Une nouvelle fonction pro-fibrinolytique et protéolytique est maintenant décrite pour des microparticules d'origine tumorale ou endothéliale portant des métalloprotéinases matricielles et/ou des composants du système d'activation du plasminogène. Ces microparticules concentrent le plasminogène à leur surface où il est transformé en plasmine par l'urokinase (uPA, *urokinase plasminogen activator*) liée à son récepteur uPAR. La fibrinolyse, la migration cellulaire, l'angiogenèse, la dissémination tumorale, ainsi que l'apoptose induite par le détachement cellulaire pourraient ainsi être modifiées par la présence de ces microparticules chargées en plasmine. <

Des microparticules cellulaires dévoilent leur fonction fibrinolytique et protéolytique

Loïc Dœuvre, Eduardo Angles-Cano



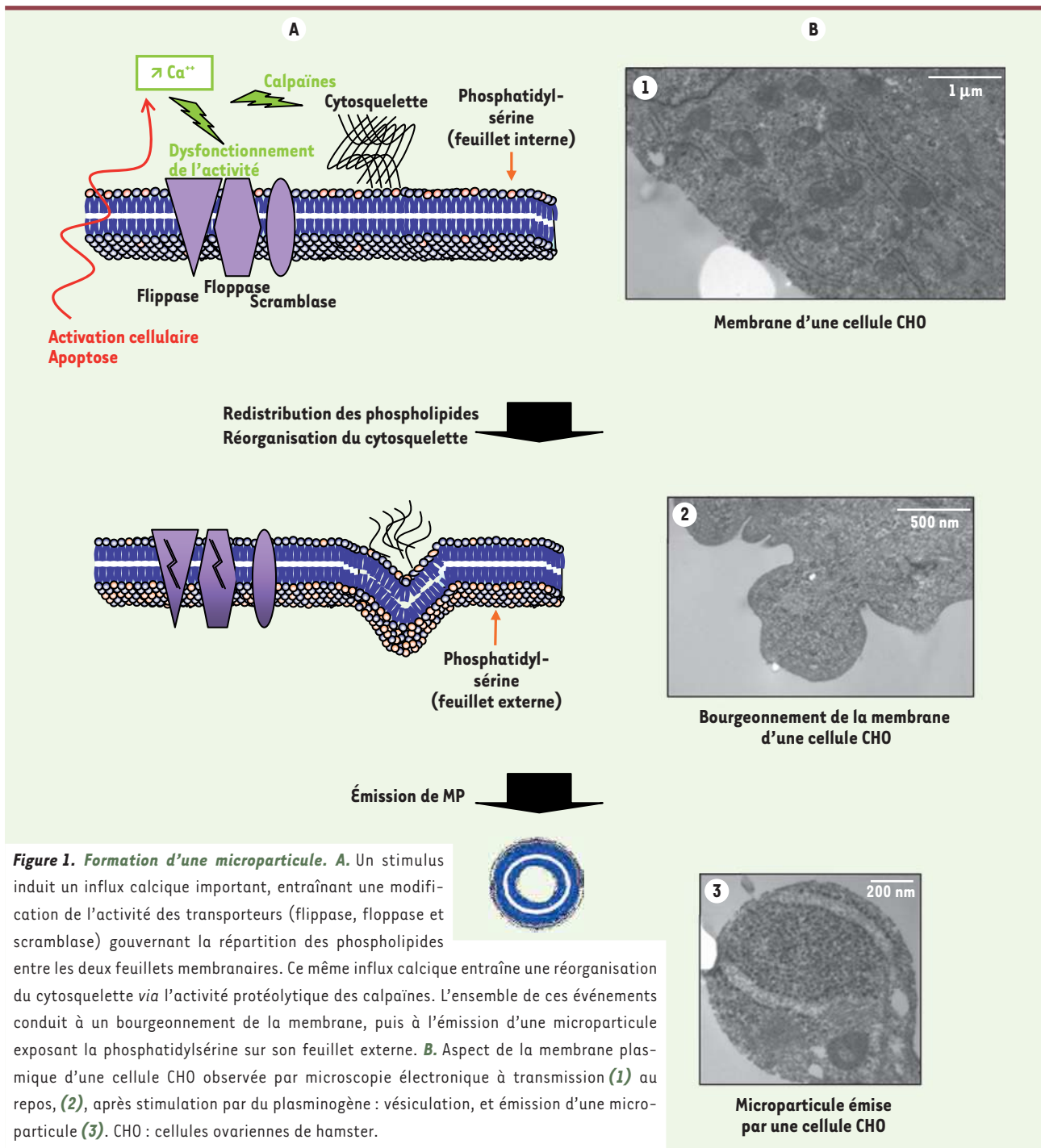
Inserm U919, Sérine Protéases et Physiopathologie de l'Unité neurovasculaire, CiNaps, UMR CNRS 6232, GIP Cyceron, boulevard Henri Becquerel, 14074 Caen Cedex, France. Eduardo.Angles-Cano@inserm.fr

Origine et formation des microparticules

Les microparticules cellulaires (MP) sont des vésicules membranaires de petite taille (entre 0,1 et 1 μm) émises par des cellules activées ou en apoptose. Leur formation puis leur expulsion ont lieu à la suite d'un stimulus entraînant un influx calcique important [1, 2]. Cet influx calcique modifie l'activité des transporteurs transmembranaires des phospholipides (flippase, floppase et scramblase) qui, dans la cellule au repos, assurent le maintien de la phosphatidylsérine (PS) dans le feuillet cytoplasmique de la membrane [3]. La modification de l'activité de ces protéines conduit à l'exposition de la PS sur le feuillet membranaire externe, ce qui constitue une manifestation précoce de l'activation cellulaire et de l'apoptose [4]. L'augmentation de Ca^{2+}

intracellulaire favorise également l'activation des calpaïnes intervenant dans la dissociation de structures membranaires du cytosquelette et favorisant le bourgeonnement de la membrane plasmique. L'ensemble de ces phénomènes conduit à la formation et à l'émission de MP portant à leur surface la PS (Figure 1), véritable stigmate reconnu par l'annexine V. Cette interaction entre la PS et l'annexine V est utilisée pour détecter et mesurer, principalement par cytométrie en flux, le nombre et la taille des MP présentes dans le sang circulant [5, 6]. Il est important de noter que la cytométrie en flux ne permet pas de détecter les MP dont la taille est inférieure à 300 nm, le nombre de MP obtenu par cette méthode reste donc sous-évalué.

La plupart des MP circulantes sont d'origine plaquettaire, mais le sang contient également des MP issues de leucocytes, de globules rouges et de cellules endothéliales [7-9]. Toute cellule vivante étant susceptible de produire des MP, la présence dans les fluides biologiques (sang, larmes, liquide céphalo-rachidien...) de MP d'origines cellulaires diverses serait la signature détectable d'un processus d'activation ou d'apoptose de cellules qui, séquestrées dans les tissus, sont inaccessibles à la détection par des moyens non invasifs.



L'exposition de la PS, le bourgeonnement membranaire et l'émission de MP précèdent généralement la fragmentation de l'ADN. Les MP émises après activation cellulaire se distinguent donc des corps apoptotiques qui sont en général de plus grande taille (> 1,5 μm) et englobent des fragments d'ADN. Les MP doivent également être distinguées des exosomes [10-12]. Ces petites vésicules d'origine endosomique, de taille (< 100 nm) inférieure à celle des MP, ont une composition protéique différente et sont sécrétées dans le milieu

extracellulaire après fusion d'endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique. En raison de leur petite taille et de leur surface lipidique, les exosomes sont isolés par des centrifugations séquentielles suivies d'une centrifugation à très haute vitesse (100 000 g). La purification des MP suit également un protocole très précis comportant une succession de différentes centrifugations. Un consensus sur

Source	Type cellulaire	Stimulus	Méthode de purification	Référence
Surnageant de culture				
	Cellules CABA 1 (cancéreuses)		600 g/15 min 1 500 g/15 min 100 000 g / 1 h	[27]*
	U937 et cellules Jurkatt	LPS 10 µg/mL, TNFα 1 nM	1 500 g/5 min 100 000 g / 20 min	[44]*
	HMEC-1	TNFα 100 ng/mL	4 300 g/5 min 20 000 g / 2 h	[25]
Liquide d'ascite				
	Carcinome ovarien		600 g/15 min 1 500 g/ 15 min 100 000 g / 1 h	[27]*
	Carcinome ovarien		500 g/15 min 800 g / 10 min 100 000 g / 1 h	[29]*
Plasma				
	Cellules circulantes sanguines		1 900 g/20 min 31 000 g/150 min	[13]
	Cellules circulantes sanguines		600 g/15 min 1 500 g/ 15 min 100 000 g / 1 h	[27]*
	Cellules circulantes sanguines		2 000 g/ 15 min 2 000 g / 15 min 24 000 g / 1 h	[25]

Tableau 1. Différentes méthodes d'isolement des microparticules. CABA 1 : cellules issues de carcinome ovarien. U937 : lignées cellulaires issues de lymphomes monocytaires. HMEC-1 : cellules endothéliales microvasculaires. *Les MP obtenues par cette procédure contiendraient également des exosomes. LPS : lipopolysaccharide. TNF : *tumor necrosis factor*.

une méthode d'isolement n'a pas encore été obtenue (Tableau 1), mais il paraît clair que la force gravitationnelle relative nécessaire pour sédimenter les MP (20 000 g, 45 à 90 min) est très différente de celle utilisée pour isoler les exosomes.

Molécules bioactives exprimées par les microparticules

Activité procoagulante des microparticules

Deux observations clés ont conduit à la découverte de MP procoagulantes dans le plasma frais dépourvu de plaquettes. Premièrement, l'identification par Chargaff (1946) d'une activité procoagulante dans le précipité obtenu par centrifugation de ce plasma à haute vitesse (30 000 g, 120 min) [13]. Puis, la confirmation

par Wolf (1967) de ce phénomène et l'identification dans ces précipités, par microscopie électronique, de très petites particules d'origine plaquettaire [14]. Cette activité procoagulante des MP est associée à la présence de la PS dans le feuillet externe de la membrane et de facteur tissulaire (FT), une protéine transmembranaire synthétisée par les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales. La PS joue un rôle pivot dans l'assemblage membranaire de facteurs de la coagulation et le FT est le principal initiateur de la séquence d'activation aboutissant à la formation de thrombine et, *in fine*, au caillot fibrino-plaquettaire. La description d'un défaut dans la translocation de phospholipides membranaires et dans la libération de MP plaquettaires, érythrocytaires et lymphocytaires chez des patients ayant un syndrome hémorragique (syndrome de Scott) a confirmé le rôle physiologique de ces MP dans la réponse hémostatique [15].

Ces caractéristiques, présence de PS et/ou de FT, ont orienté les travaux sur les MP dérivées de plaquettes ou de leucocytes vers l'étude de leur rôle dans la coagulation [7, 8]. Ainsi, leur activité procoagulante est actuellement considérée comme un déterminant du risque de thrombose au cours de plusieurs situations pathologiques [16, 17].

Reconnaître l'identité cellulaire des microparticules

L'activation cellulaire provoquée par différents types de stimulus (inflammatoires, physiques, chimiques, infectieux) se manifeste par l'expression de médiateurs cellulaires et de facteurs protéolytiques. Les MP émises expriment également ces molécules (Tableau II) et reflètent directement l'état d'activation cellulaire.

La présence de glycoprotéines membranaires spécifiques de la cellule parentale [16, 17] a permis d'identifier l'origine des MP (plaquettaire, endothéliale, leucocytaire et érythrocytaire), mais aussi de considérer leur présence dans la circulation comme un indicateur soit de lésion endothéliale [18-20] soit d'activation plaquettaire [7]. Hormis ces glycoprotéines identitaires et les composants procoagulants, des études *in vitro* montrent que les MP transportent également d'autres composants bioactifs dérivés de la cellule parentale (récepteurs membranaires, cytokines, facteurs de transcription, ARNm) [21, 22] (Tableau II). Récemment, une analyse