

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 novembre 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/88539 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

G01N 33/533, 33/86, 15/10

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIO-
CYTEX [FR/FR]; 140, chemin de l'Armée d'Afrique,
F-13010 Marseille (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/01468

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CANTON,
Michel [FR/FR]; 92, rue Marius Aufan, F-92300 Leval-
lois-Perret (FR). BOTOSEZZY, Isabelle [FR/FR]; 130,
chemin de Chateau-Gombert, Le Hameau des Pins No.
105, F-13013 Marseille (FR).

(22) Date de dépôt international : 15 mai 2001 (15.05.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(30) Données relatives à la priorité :

00/06247

16 mai 2000 (16.05.2000)

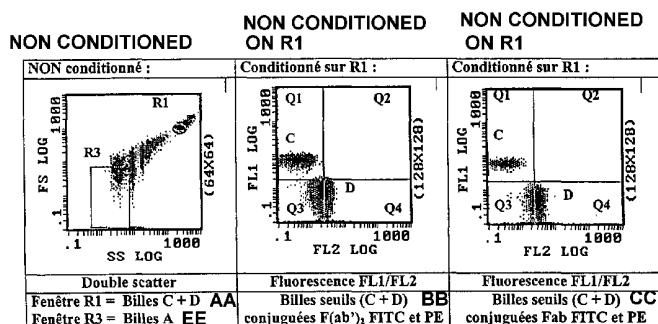
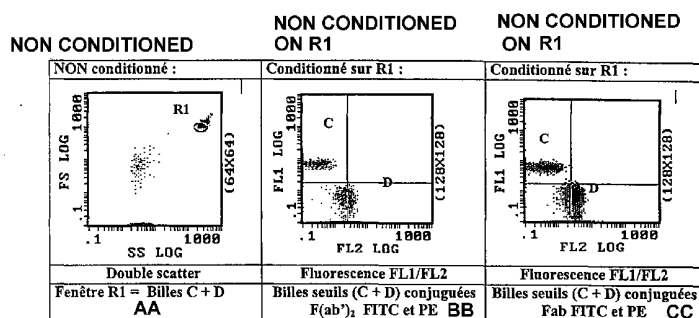
FR

(81) États désignés (national) : CA, JP, US.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MONOREAGENT FOR ASSAYING PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES

(54) Titre : MONOREACTIF POUR LE DOSAGE DES MICROPARTICULES PLAQUETTAIRES



AA ... WINDOWS R1 = BEADS C+D

BB ... CONJUGATED THRESHOLD BEADS F(ab')₂ FITC AND PE

CC ... CONJUGATED THRESHOLD BEADS Fab FITC AND PE

EE ... WINDOW R3 = BEADS A

(57) Abstract: The invention concerns a monoreagent and a diagnostic kit for detecting and quantifying platelet-derived microparticles (MPP). Said monoreagent, combining several populations of calibrated beads and a double labelling of MPP, enables both an optimal isolation of MPP based on a size criterion, their characterisation by specific labels, and their numbering with counting beads.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un monoréactif et à un kit de diagnostic le comprenant, pour la détection et la quantification des microparticules d'origine plaquettaire (MPP). Ce monoréactif, associant plusieurs populations de billes calibrées et un double marquage des MPP, permet à la fois un isolement optimal des MPP sur un critère de taille, leur caractérisation par des marquages spécifiques, et leur numération au moyen de billes de comptage.

WO 01/88539 A1



(84) **États désignés** (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

MONOREACTIF POUR LE DOSAGE DES MICROPARTICULES PLAQUETTAIRES

- 5 La présente invention concerne un monoréactif et un kit de diagnostic le comprenant, pour la détection et la quantification des microparticules d'origine plaquettaire (MPP) par marquage en double couleur.

10 Les plaquettes activées sont connues pour relarguer des vésicules appelées microparticules plaquettaires (MPP). Ces particules de faible diamètre (pouvant cependant aller de 0.1 à 0.8 μm) résultent d'une vésiculation de la membrane plasmique plaquettaire après certains stimuli (thrombine, collagène, C5b9...). De par leur activité prothrombotique et procoagulante, les MPP semblent jouer un rôle important in vivo.

- 15 Expriment plusieurs récepteurs plaquettaires (GpIb, GpIIb/IIIa...), les MPP sont capables de fixer plusieurs types de ligands plaquettaires (fibrinogène, fibronectine, collagène, vWF, vitronectine...) et d'adhérer à la matrice sub-endothéliale, au niveau d'une brèche vasculaire. Des taux élevés de MPP circulantes ont été observés dans de nombreuses pathologies telles que : angor instable, infarctus du myocarde, angiographie coronarienne, diabète sucré, dérivation cardiopulmonaire, hémoglobinurie paroxystique nocturne, anémie aplasique, HIT (thrombopénies induites par l'héparine), purpura thrombopénique idiopathique ... Inversement, certaines pathologies comme le syndrome de Scott peuvent être associées à une déficience dans le taux de MPP circulantes.

- 20
25 Ainsi, la détection et la numération de ces MPP semble être un critère important dans la détection, et l'évaluation de la sévérité d'un état prothrombotique au cours de différentes pathologies.

30 Les phénomènes liés à la formation des microparticules d'origine plaquettaire et l'intérêt de leur détection pour le diagnostic ont été largement décrits dans la littérature (1-5).

Différentes approches basées sur des techniques telles que par exemple la filtration (6), l'ELISA (7), ou plus particulièrement la cytométrie de flux (8-11) ont ainsi été proposées pour leur isolement et/ou leur quantification.

5 Le principe de la cytométrie de flux et ses avantages pour discriminer et quantifier des sous-populations de cellules et particules cellulaires sont aujourd'hui bien connus de l'homme du métier.

Cette méthode a déjà été utilisée pour la détection des plaquettes activées dans des échantillons sanguins et la détermination de microparticules d'origine plaquettaire
10 procoagulantes par des tests fonctionnels (12).

Toutefois, les études réalisées utilisent pour la plupart un marquage fluorescent en une seule couleur, et/ou mettent en oeuvre des billes de comptage dont les performances en terme de calibration sont insuffisantes pour concevoir une méthode industrialisable permettant de réaliser des tests de détection et quantification des MPP d'une manière
15 totalement standardisée.

La présente invention apporte un perfectionnement aux méthodes préexistantes en proposant une nouvelle solution qui permet en un temps, et de manière standardisée, de détecter et de compter spécifiquement des microparticules d'origine plaquettaire dans
20 un échantillon sanguin, sans traitement préalable.

A cet effet, un monoréactif particulier, associant plusieurs populations de billes calibrées et un double marquage des MPP, a été mis a point. Ainsi, un tel réactif permet à la fois 1) un isolement optimal des MPP sur un critère de taille, 2) leur caractérisation par des marquages spécifiques, et 3) leur numération au moyen de billes
25 de comptage. Il offre donc un moyen de détecter spécifiquement et de compter, de façon très fiable, le nombre de MPP dans un échantillon, même lorsque celles-ci sont présentes en très faible quantité.

La présente invention a ainsi pour objet un monoréactif pour la détection et la
30 quantification des microparticules plaquettaires (MPP) dans un échantillon sanguin par cytométrie de flux, comprenant :

a) un réactif 1 pour un double marquage des MPP comprenant :

- soit de l'Annexine V ou tout autre marqueur spécifique des phospholipides membranaires couplé à un fluorochrome 1,
- 5 - soit une population 1 d'anticorps monoclonaux (ACM) dirigés contre des structures membranaires plaquettaires marqués avec un fluorochrome 1, (**réactif 1a**), et,

une population 2 d'ACM dirigés contre des structures membranaires plaquettaires marqués avec un fluorochrome 2 (**réactif 1b**), ledit fluorochrome 2 étant différent du
10 fluorochrome 1 et,

b) **un réactif 2** constitué par un mélange de microsphères comprenant :

- une population de microsphères A marquée par l'un des deux fluorochromes 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux, servant à définir la région
15 d'analyse des MPP en terme de taille (paramètres de diffusion lumineuse) et permettant leur différenciation (billes de positionnement),
- une population de microsphères B non marquée ou marquée par l'un des deux fluorochromes 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux, dont la concentration est connue, servant d'étalon interne au comptage des microparticules
20 (billes de comptage),
- une population de microsphères C marquée uniquement par le fluorochrome 1, servant à définir sur le paramètre de fluorescence du fluorochrome 1 le seuil d'intensité minimum qui délimite la région d'analyse des microparticules sur lesquelles sont fixés les ACM 1 ou l'annexine V ou tout autre marqueur spécifique des phospholipides
25 membranaires marqués au fluorochrome 1 (billes seuils),
- et une population de microsphères D, de diamètre identique à C, et marquée uniquement par le fluorochrome 2, servant à définir sur le paramètre de fluorescence du fluorochrome 2 le seuil d'intensité minimum qui délimite la région d'analyse des microparticules sur lesquelles sont fixés les ACM 2 marqués au fluorochrome 2 (billes
30 seuils).

Le monoréactif selon l'invention possède donc plusieurs fonctions, qui sont :

- marquage des microparticules en double couleur, permettant une différenciation optimale des microparticules plaquettaires des équivalents d'origine autre,
- standardisation des seuils de discrimination des microparticules d'intérêt des autres
- 5 particules et débris responsables d'un bruit de fond éventuel,
- standardisation du comptage des microparticules plaquettaires marquées et discriminées par le comptage de référence de la bille étalon interne.

Avantageusement, chaque population C et D de billes seuils est composée de deux

10 sous-populations de billes de 2 niveaux de fluorescence 1 ou 2 pour optimiser la standardisation de l'analyse par un positionnement des seuils et un réglage des compensations.

Les différentes populations de billes peuvent être obtenues à partir de divers matériaux

15 classiquement utilisés pour la fabrication de ce type de particules. Ce sont par exemple les polymères organiques, tels que les polysaccharides, les polymères de styrène, les polyacrylates, la polyacrylamide, l'hydroxyéthyl polyméthacrylate, les polyvinyliques, les polystyrènes et les polymères contenant des groupes aromatiques. Un matériau préférentiellement utilisé est le polystyrène. Le matériau peut toutefois être différent

20 entre les différentes populations de billes utilisées.

Plusieurs fluorochromes sont disponibles dans le commerce. On utilise

avantageusement la phycoerythrine (PE) ou la fluoresceine, comme par exemple

l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC).

25

Les billes de comptage, dont le rôle est de numérer les MPP, ont avantageusement un diamètre supérieur ou égal à 5 μm , pour qu'en cytométrie le nuage de billes de comptage soit bien distinct des cellules et des billes d'une autre population (billes seuils). Préférentiellement, leur diamètre est compris entre 5 et 10 μm .

30

Ces billes de comptage peuvent être non marquées ou marquées, dans la masse ou en surface. Elles sont préférentiellement marquées dans la masse par l'un des fluorochromes 1 ou 2 utilisés pour le marquage des billes seuils, ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un d'eux.

5

Les billes de positionnement permettent de positionner la fenêtre d'analyse des MPP selon la taille. Leur diamètre est avantageusement compris entre 1 et 0.5 μm . Elles sont marquées par l'un des deux fluorochromes 1 et 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux dans la masse, ou en surface.

10

Les billes seuils ont pour rôle de standardiser l'analyse en positionnant la fenêtre d'analyse des MPP et permettre le réglage des compensations. Leur diamètre est compris entre 1 et 5 μm et est préférentiellement de 3 μm .

15 Les deux populations C et D de billes seuils consistent en deux populations marquées par l'un des fluorochromes 1 ou 2 et sont avantageusement constituées toutes deux de deux catégories de billes de même nature mais présentant des niveaux de fluorescence différents.

Ces calibrants sont avantageusement étalonnés en MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome - 13) grâce à un étalon (Quantum 24 fluorescein - Code : RF 824 ; Quantum PE R-Phycoerythrin - Code RF 827, FCSC Europe).

20

L'intensité des billes seuils est ainsi réglée pour être à la limite entre l'intensité minimale des MPP et l'intensité maximale des microparticules d'origine autre et des contaminants de taille similaire (poussières, débris cellulaires ...).

25

La valeur des seuils fluorochrome 1 et fluorochrome 2, préférentiellement FITC et PE, est déterminée sur une cohorte d'individus normaux et pathologiques grâce aux calibrants étalons commerciaux, pour une discrimination optimale des MPP par rapport aux autres contaminants.

30

La valeur des seuils ainsi définis donne la valeur des billes seuils associés (C, D) du monoréactif.

Les anticorps monoclonaux (ACM) des populations 1 et 2 sont avantageusement dirigés contre des structures membranaires plaquettaires choisies parmi les spécificités suivantes : CD61, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD49b, CD29, CD62P, CD63, protéine S et prothrombine.

Ces populations 1 et 2 peuvent être représentées par un seul ACM, par plusieurs ACM de même spécificité mais dirigés contre des épitopes différents, ou par plusieurs ACM de spécificité plaquettaire différente.

10 Selon une variante préférée, le réactif 1 du monoréactif de l'invention est constitué d'annexine V ou autre marqueur spécifique des phospholipides membranaires marqué par un fluorochrome 1 (réactif 1a), et d'une population 2 d'ACM marqués par un fluorochrome 2 (réactif 1b).

On utilise de préférence une population 2 d'ACM comprenant plusieurs ACM de spécificités différentes, et plus préférentiellement des ACM anti-CD61, et des ACM anti-CD42b. Un exemple de réactif préféré est constitué par des ACM anti-CD61 et anti-CD42b marqués à la PE, et par de l'Annexine V marquée au FITC.

20 Selon une variante avantageuse, les anticorps anti-CD61 sont produits par les hybridomes P18 et 4F8, déposés auprès de la BCCM/LMBP Collection (Belgium Coordinated Collections of Microorganisms) selon le Traité de Budapest respectivement les 26.06.97 et 02.06.98 sous les N° LMBP162CB (P18) et LMBP1667CB (4F8).

L'association de ces deux ACM est particulièrement avantageuse car il n'y a pas de gène stérique entre eux, et leur fixation sur les MPP n'est pas altérée par la présence éventuelle d'agents anti-agrégants anti-GPIIb/IIIa commerciaux tels que le Réopro (Abciximab, Centocor), l'Integrilin (Ceptifibatide, Shering-Plough), l'Agrastat (Tirofiban, Merck).

30 Les ACM anti-CD42b sont par exemple représentés par l'anticorps SZ2. Celui-ci peut être obtenu auprès de la société Beckman Coulter/Immunotech (Réf. IM0409).

L'Annexine V est disponible commercialement. Elle peut par exemple provenir de chez Bender (Réf. BMS306 FI).

5 D'autres composés utilisables comme marqueurs spécifiques des phospholipides membranaires sont par exemple des anticorps anti-phosphatidylserine, tels les anticorps BA3B5C4 et 3SB9b décrits dans la littérature (14) ou les anticorps Ab-1 distribués par France Biochem (Réf. AM31, Oncogene Research Product).

Avantageusement, l'échantillon est constitué par du sang total prélevé sur CTAD (citrate théophilline adenosine dipyridamole), citrate de sodium ou EDTA. Il peut aussi
10 être constitué par du plasma, bien que ce type d'échantillon, du fait de l'étape de préparation préalable qu'il nécessite, ne soit pas utilisé préférentiellement.

Selon un deuxième aspect, l'invention a trait à un kit de diagnostic comprenant un monoréactif tel que mentionné ci-dessus, destiné à la détection et à la quantification
15 des MPP dans un échantillon sanguin.

Un tel kit de diagnostic comprend ainsi avantageusement :

- **un réactif 1a** constitué par une population 1 d'ACM spécifiques de structures membranaires plaquettaires, ou par de l'Annexine V ou tout autre marqueur spécifique
20 des phospholipides membranaires, marqués avec un fluorochrome 1,
- **un réactif 1b** constitué par une population 2 d'ACM spécifiques de structures membranaires plaquettaires, marqués avec un fluorochrome 2, ledit fluorochrome 2 étant différent du fluorochrome 1,
- **un réactif 2** constitué par :
25
 - une population de billes de positionnement de la fenêtre d'analyse des MPP marquée par le fluorochrome 1 ou 2, ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux,
 - une population de billes de comptage non marquée ou marquée par le fluorochrome 1 ou 2, ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux,
 - une population de billes seuils, préférentiellement constituée par deux sous-
30 populations de billes de deux niveaux, marquées par le fluorochrome 1,

- une population de billes seuils, préférentiellement constituée par deux sous-populations de billes de deux niveaux marquées par le fluorochrome 2, et, de préférence,
- **un réactif 3** constitué par un tampon de dilution.

5 Préférentiellement, les réactifs 1, 2 et 3 sont mélangés.

Selon une variante avantageuse, le réactif 1a est constitué par de l'annexine V. Dans ce cas, le tampon de dilution du réactif 3 est un tampon calcique, par exemple constitué par un mélange Hepes/NaCl/CaCl₂, car la fixation de l'annexine aux phospholipides
10 est dépendante de la présence de calcium (15). On évitera évidemment dans ce cas d'utiliser un échantillon traité par l'EDTA.

Le réactif 1b est avantageusement composé d'un mélange d'ACM de spécificités différentes, et préférentiellement anti-CD61 et anti-CD42b.

15 Plus particulièrement, le réactif 1b est constitué par un mélange d'ACM P18, 4F8 (anti-CD61) et SZ2 (anti-CD42b).

On utilise de préférence le FITC comme fluorochrome 1 et la PE comme fluorochrome 2.

20

Pour assurer une bonne conservation, tous les réactifs du kit de l'invention peuvent contenir de l'azide de sodium à 0.09 % (0,09 g/l).

Selon un autre aspect complémentaire, l'invention a pour objet un procédé de détection
25 et de quantification des MPP, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en présence et incubation d'un échantillon sanguin avec un monoréactif tel que défini ci-dessus, de sorte à obtenir un marquage en double couleur desdites MPP, et
- b) analyse cytométrique des événements doublement marqués.

L'invention vise enfin l'utilisation d'un monoréactif tel que défini précédemment ou d'un kit de diagnostic comprenant ledit monoréactif, dans une méthode de détection et de suivi d'un état prothrombotique.

- 5 Le principe de la méthode d'analyse cytométrique utilisée dans le cadre de l'invention est rappelé ci-après :

Analyse cytométrique :

- 10 Pour effectuer la lecture cytométrique, se rapporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.

Avant l'analyse, homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

Pour la réalisation du protocole, sont nécessaires :

- 1 cytogramme FSXSS
- 15 - 2 histogrammes FL1 LOG, un conditionné par le cytogramme FSXSS (pour les billes A de positionnement) et l'autre conditionné par le cytogramme FSXSS (pour les billes B de comptage)
- 2 cytogrammes FL1 LOG/FL2 LOG, un cytogramme conditionné sur les billes seuil (C et D) et l'autre conditionné sur les billes A + MPPs.

20

Construire un cytogramme FS LOG x SS LOG. Positionner un seuil discriminant pour éliminer les éventuels contaminants (bruit de fond de l'appareil). Dessiner 3 fenêtres d'analyse autour des différentes populations de billes :

- Fenêtre R1 pour les billes de positionnement de 0.8µm
- 25 - Fenêtre R2 pour les billes de comptage de 5 à 10 µm
- Fenêtre R3 pour les billes seuils de 3µm.

Créer 2 histogrammes FL1 LOG, un pour les billes de positionnement (conditionné par la fenêtre R1), l'autre pour les billes de comptage (conditionné par la fenêtre R2).

30

Créer 2 cytogrammes FL1 LOG/FL2 LOG, un cytogramme pour les billes seuils C et/ou D (conditionné par la fenêtre R3) et l'autre pour les MPPs (conditionné par la fenêtre R1).

- 5 Pour des conditions d'analyses optimales, ajuster le voltage du photomultiplicateur FL1 et FL2 de telle sorte que la bille haute seuil (C ou D) soit positionnée au début de la 4ème décade en FL1 ou FL2 respectivement.

Le réglage des compensations est effectué sur les billes seuils (C et D).

10 Réglage de la compensation FL2

Sur le cytogramme FL1 LOG/FL2 LOG conditionné sur la fenêtre d'analyse "R3" des billes D, positionner 2 fenêtres (R4 et R5) , sur les nuages correspondants, respectivement, à la bille haute et à la bille basse. Compenser la fluorescence FL2 (FL2 -x % FL1) jusqu'à équivalence des moyennes de fluorescence (MFI) FL2 LOG

- 15 des fenêtres R4 et R5.

Réglage de la compensation FL1

Ne pas changer les réglages de fluorescence FL1 LOG, FL2 LOG (voltages des photomultiplicateurs, PMT FL1 et FL2) précédemment fixés, pour le reste du

- 20 protocole.

Procéder de la même manière que précédemment décrit. Sur le cytogramme FL1 LOG/FL2 LOG conditionné sur la fenêtre d'analyse "R3" des billes C, positionner 2 fenêtres (R6 et R7) , sur les nuages correspondants, respectivement, à la bille haute et à la bille basse. Compenser la fluorescence FL1 (FL1 -x % FL2) jusqu'à équivalence des

- 25 MFI FL1 LOG des fenêtres R6 et R7.

Les exemples ci-après, illustrent la présente invention.

Exemple n°1 : Etude des billes seuils d'un monoréactif selon l'invention.

Le monoréactif illustré ci-après est basé sur un double marquage des MPP par l'annexine V-FITC et le CD 41-PE.

5

1.1 Préparation des billes seuils

Les billes seuils ont été préparées à partir de billes de polystyrène de 3µm coatées à l'aide de quantités différentes d'une IgG murine non réactive avec les éléments figurés du sang. La charge en IgG murine est choisie selon le niveau d'intensité de fluorescence recherché pour cette bille seuil. Les billes sont marquées en fluorescence par contact avec un réactif anti IgG murines correspondant soit à :

- FITC labeled sheep F(ab')₂ anti-mouse IgG (H+L), human absorbed
- FITC labeled goat Fab anti-mouse IgG (H+L), human absorbed
- 15 - PE labeled sheep F(ab')₂ anti-mouse IgG (H+L), human absorbed
- PE labeled goat Fab anti-mouse IgG (H+L), human absorbed

a. Préparation des billes coatées IgG

20 Le lot de billes est choisi pour donner une intensité moyenne de fluorescence décalée par rapport à une population de plaquettes non marquées (ex. moyenne de fluorescence des billes 10 fois plus fortes que la moyenne de fluorescence des plaquettes).

Matériel

- 25 - AcM Sendo-3, anti-CD146, clone F439-E10, non réactif avec les éléments figurés du sang (Leucocyte Typing VI, Kishimoto, Kikutani et al.)
- Billes L300 (Estapor)
- Tampons (tableau 1):

30

TAMPONS	SOLUTIONS
Adsorption	PBS
Saturation	PBS, BSA 4 %
Lavage	PBS
Fixation	PBS, PFA 1%, azide 0,09%
Stockage	PBS, BSA 0,1%; azide 0,09%
Dilution	PBS

Méthode

Préparation des tampons

Préparer 1 litre de PBS, filtrer sur membrane de 0,22 μ m avec un système de filtration de 500ml.

Préparer 1 litre de PBS, PFA 1%, Azide de sodium 0,09%

Préparer 1 litre de PBS BA, filtrer sur membrane de 0,22 μ m avec un système de filtration de 500ml.

NB : Tous les tampons sont filtrés sur membrane de 0,22 μ m avant utilisation.

Préparation des réactifs de couplage

a) Dilution des IgG1

Les différents niveaux de charge des billes sont obtenus en faisant varier la concentration en IgG1 des solutions de coating.

1. Décongeler un aliquot de Sendo3 à 5mg/ml.
2. Préparer une solution de Sendo3 à 500 μ g/ml (dilution au 1/10) comme suit:
 - déposer dans un tube CMF 100 μ l de Sendo3 à 5 mg/ml
 - ajouter dans ce même tube 900 μ l de PBS
3. Préparer une solution de Sendo3 à 100 μ g/ml (dilution au 1/5) comme suit:
 - déposer dans un tube CMF 200 μ l de Sendo3 à 500 μ g/ml
 - ajouter dans ce même tube 800 μ l de PBS
4. Préparer les 2 solutions de coating comme indiqué dans le tableau 2:

	SE3 100 μ g/ml	PBS	Concentration finale en IgG1
Bille C	250 μ l	4,75ml	5 μ g/ml
Bille D	750 μ l	4,25ml	15 μ g/ml

b) Préparation des microsphères avant couplage

Protocole général de lavage des microsphères

Les lavages et changements de tampon sont tous réalisés comme suit :

- 5 1. Centrifuger les billes à 3000 tr / min pendant 8 min (1890g, rotor 8160), avec le frein.
2. Eliminer le surnageant à l'aide de la trompe à vide.
3. Avec une pipette ajouter le tampon de reprise.
4. Bien vortexer pour remettre le culot en suspension.

10

Lavage des billes avant le couplage

1. Déposer 6 ml de suspension de billes à 10 % (vérifié à environ 4.106 microsphères/ μ l)
2. Centrifuger, éliminer le surnageant.
- 15 3. Remettre le culot en suspension avec 7,5 ml de PBS.
4. Centrifuger, éliminer le surnageant.
5. Remettre le culot en suspension avec 6 ml de PBS.

Protocole de couplage

- 20 a. Vortexer le tube contenant les microsphères lavées.
- b. Vortexer le tube contenant la solution de coating.
- c. Maintenir le tube contenant la solution de coating en agitation sur le vortex. Ajouter rapidement 1ml de microsphères lavées avec une Gilson de 1ml, en une seule fois, verticalement au coeur de la solution.
- 25 d. Boucher le tube.
- e. Positionner le tube sur l'agitateur rotatif à +2-8°C.
- f. Répéter les étapes b à e avec les autres solutions de coatings.
- g. Incuber 1 nuit en agitation.
- h. Préparer le tampon de saturation (2g de BSA A7030 qsp 50ml de PBS), filtrer
- 30 0,22 μ m avec un filtre.

- i. Filtrer 100 ml de tampon de fixation sur membrane 0,22 µm avec un filtre seringue.
- j. Centrifuger, Eliminer les surnageants (Voir Protocole général de lavage des microsphères).
- 5 k. Reprendre les culots avec 5 ml de tampon de saturation, Vortexer.
- l. Centrifuger, Eliminer les surnageants.
- m. Reprendre les culots avec 10 ml de PBS, Vortexer.
- n. Centrifuger, Eliminer les surnageants.
- o. Reprendre les culots avec 10 ml de tampon de fixation, Vortexer.
- 10 p. Incuber 10 min. à TA en agitation.
- q. Centrifuger, Eliminer les surnageants.
- r. Reprendre les culots avec 10 ml de PBS-BA, Vortexer.
- s. Centrifuger, Eliminer les surnageants.
- t. Reprendre les culots avec 10 ml de PBS-BA, Vortexer.
- 15 u. Centrifuger, Eliminer les surnageants.
- v. Reprendre les culots avec 7,5 ml de PBS-BA, Vortexer

Les suspensions individuelles (solution à environ 500.000 microsphères /µl) sont prêtes et sont stockées à +2-8°C.

20

b. Préparation des billes seuils fluorescentes à l'aide de F(ab')₂ conjugués au FITC ou à la PE

Matériel

- 25 - F(ab')₂ d'immunoglobulines de mouton anti-souris couplées au FITC (Silenus , réf. DDAF)
- F(ab')₂ d'immunoglobulines de mouton anti-souris couplées à la PE (Silenus, réf. DDAPE)

Méthode

1. Pipeter 2.5 ml de bille L300 (Estapor) coatées en Sendo-3 (300.000 microsphères/ μ l)
Sendo-3 à 15 μ g/ml pour la bille FITC
- 5 Sendo-3 à 5 μ g/ml pour la bille PE
2. Centrifugation à 3000t/minute pendant 8 minutes. Elimination du surnageant
3. Reprise dans 500 μ l de tampon PBS BA 1X
4. Ajouter 12.5 ml de DDAF ou DDAPE au 1/100 en PBS BA 1X à la préparation de bille. Homogénéiser.
- 10 5. Incuber 1 heure à température ambiante sous agitation rotative
6. Effectuer 2 lavages comme suit :
Ajouter 25 ml de PBS BA 1X
Centrifugation à 3000t/minute pendant 8 minutes.
Elimination du surnageant.
- 15 7. Ajouter 2.5 ml d'une solution de gamma globuline de souris (Jackson, #015-000-002) à 100 μ g/ml sur le culot de billes, afin de neutraliser les sites anti-IgG de souris libres des réactifs DDAF et DDAPE
8. Incuber 1 heure à température ambiante sous agitation rotative
9. Effectuer 1 lavage comme décrit ci-dessus
- 20 10. Reprendre le culot de billes dans 2.5 ml de PBS BA 1X.

c. Préparation des billes seuls à l'aide de Fab conjugués au FITC ou à la PE**Matériel**

- 25 - Fab d'immunoglobulines de chèvre anti-souris couplées au FITC (Protos, réf. #341)
- Fab d'immunoglobulines de chèvre anti-souris couplées à la PE (Protos, réf. #441)

Méthode

Comme précédemment, sans les étapes 7, 8 et 9.

1.2 Analyse cytométrique

Les 2 types de billes seuils FITC et PE préparées ont été testées seules en tampon PBS BA ou en présence de l'ensemble des autres réactifs constituant le monoréactif (AcMx
5 couplés FITC ou PE et billes A de 0.85 μm de positionnement). Les paramètres de
scatters (scatter axial noté ici FS, scatter perpendiculaire noté ici SS) sont analysés en
échelle logarithmique, avec un discriminateur réglé sur SS.

Les résultats sont reportés sur la figure 1, dans laquelle :

- 10 - la figure 1a) représente l'analyse des billes seuils en tampon PBS BA.
- la figure 1b) représente l'analyse des billes seuils avec les billes A dans le monoréactif.

Dans ces figures, la fenêtre R1 correspond aux billes seuils FITC et PE de 3 μm , la
fenêtre R3 à la fenêtre d'analyse des MPP en double scatter, les billes D aux billes
15 seuils FITC et les billes C aux billes seuils PE.

1.3 Conclusion

Il est possible d'utiliser le mélange de billes 3 μm marquées en FITC et PE comme
20 décrit pour positionner une fenêtre (notée ici Q2) d'analyse d'éléments doublement
marqués. Dans l'exemple, le seuil sur FL2 log (seuil vertical) a été choisi au niveau de
la valeur moyenne des billes D, le seuil sur FL1 log (seuil horizontal) a été choisi égal
à 1/3.5 la valeur moyenne des billes C.

25 La fonctionnalité d'une association extemporanée des différentes catégories de billes
(billes seuils FITC et PE de 3 μm permettant de positionner une zone de mesure Q2 et
billes FITC de 0.85 μm permettant de positionner la fenêtre R3 d'analyse des MPP)
nécessaires à la réalisation du test en un monoréactif est démontrée.

Exemple n°2 : Test du monoréactif selon l'invention.**2.1 Matériel**

- 5 - **CD61** : P18-FITC (purifié et marqué selon les procédures standards connues de l'homme de métier) (réactif filtré 0.1µm)
P18 (McGregor JL, Thromb.Haemost. 1987, 58, 507)
- **CD41a** : P2-PE (Réf. IM1416, Immunotech)
P2 (Réf. IM0145, Immunotech)
- 10 - **Annexin V FITC** (Réf. BMS306FI/a, Bender Medsystems)
- **Billes de positionnement (A) de 0.85µm** (Cat. VFP 08525 Avidin coated Yellow, Spherotec)
- **Billes seuils (C et D) conjuguées F(ab')₂ FITC et PE** précédemment décrites
- 15 - **Tampon CaCl₂ 1X** (Hepes 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 2.5mM)
- **Tampon CaCl₂ EDTA** (Hepes 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 2.5mM, EDTA 6,2mM pH7.4)

20

2.2 Protocole

1. Pipeter 30 µl de Sang total prélevé sur Citrate de sodium ou EDTA et dilué au 1/10 en PBS BA 1X
- 25 2. Pipeter 10 µl AcMx non couplés ou de tampon (PBS BA 1X ou CaCl₂ ou CaCl₂ EDTA)
3. Incuber 10 minutes à température ambiante.
4. Ajouter 10 µl AcM couplé au FITC ou Annexin V couplé au FITC.
5. Pipeter 10 µl AcM couplé à la PE.
- 30 6. Pipeter 5 µl de billes seuil FITC (200.000 microsphères/□l)
7. Pipeter 5 µl de billes seuil PE (200.000 microsphères/□l)

8. Pipeter 5 µl de billes Spherotec de 0.85µm diluées au 1/20 en PBS BA 1X
9. Incuber 20 minutes à température ambiante.
10. Ajouter 1 ml de tampon (PBS BA 1X ou CaCl₂ ou CaCl₂ EDTA)
11. Analyse cytométrique : temps d'analyse de 2 minutes, vitesse de flux lente.

5

Remarque :

1. Dans le cadre de ces essais de monoréactif, les billes seuils jouent le rôle de billes de comptage des MPP.
 2. Dans le cas des inhibitions de fixation des AcMx couplés aux fluorochromes,
- 10 une pré-incubation de 10 minutes à température ambiante de l'échantillon sanguin avec les AcMx non couplés est réalisée.

2.3 Conditions Opératoires

REACTIFS	TESTS				
	A	B	C	D	E
P18-FITC à 20µg/ml (5 µg/ml final)	X		X	X	X
P2-PE Immunotech	X	X	X	X	
P2 à 100 µg/ml (20 µg/ml final)			X		
P18 à 100 µg/ml (20 µg/ml final)				X	
Annexin V-FITC au 1/40 en CaCl ₂		X			
Annexin V-FITC au 1/40 en CaCl ₂ EDTA					X
Tampon PBS BA	X		X	X	
Tampon CaCl ₂		X			
Tampon CaCl ₂ EDTA					X

15

Le test A permet de numérer les MPP et les plaquettes de taille inférieure ou égale à 0.85 µm et correspondant à des événements CD61 +/- CD41a +.

- 20 Le test B permet de numérer les MPP et/ou les plaquettes activées de taille inférieure ou égale à 0.85 µm correspondant à des événements Annexin V +/- CD41a +. Seul ce test permet de mettre en évidence les éléments d'origine plaquettaire issus du sang, de taille inférieure ou égale à 0.85 µm et présentant un phénotype activé (de par la

présence au niveau de la membrane cellulaire externe des plaquettes et des MPP de résidus Phosphatidylserine révélés par l'annexin V).

Les tests C, D, et E permettent d'établir la spécificité des réactifs CD41a, CD61, et AnnexinV respectivement.

5

2.4 Test du monoréactif en sang total

a) Principe de positionnement de la fenêtre R3 d'analyse des MPP en double scatter en sang total

10

L'exemple ci-dessous illustre le principe d'analyse des MPP en double scatter en sang total. L'échantillon sanguin correspond au test A (CD61-FITC/CD41-PE).

Les différentes étapes de l'analyse cytométrique sont reportées sur la figure 2.

15

La fenêtre **R3** d'analyse des MPP est conditionnée à l'aide des singlets de billes de positionnement de 0.85µm, fluorescentes FITC dans la masse (Billes A). Une large fenêtre **R3** en double scatter est tout d'abord conditionnée autour de ces billes (ETAPE #1). Un cytogramme FL1-LOG/FL2-LOG conditionné sur R3 permet de repérer en

20 FL1 ces billes de positionnement par une fenêtre R2 (ETAPE #2). Une fenêtre R3 est alors redéfinie en double scatter et une mesure de la valeur moyenne du paramètre FS Log est faite sur cette population de singlet de billes A (ETAPE #3).

La fenêtre **R3** d'analyse des microparticules plaquettaires peut alors être positionnée

25 en double scatter selon les critères suivants (ETAPE #4) :

- Limite haute FS-LOG : égale à la valeur moyenne du paramètre FS LOG pour la population de singlet de billes A, mesurée dans l'étape précédente.
- Limite basse FS-LOG : ne pas prendre le premier canal du paramètre FS LOG.
- Limite haute SS-LOG : contre le nuage de singlet de billes A
- 30 - Limite basse SS-LOG : discriminateur sur le paramètre SS LOG réglé au minimum

Enfin, l'analyse en double scatter d'échantillons (sang total + monoréactif) avec les différentes fenêtres d'analyses cytométriques peut être faite (ETAPE #5).

5 **b. Analyses d'échantillons**

Le test de la fonctionnalité du monoréactif et de la spécificité de ses composants a été réalisé sur 19 sangs totaux : 11 sangs prélevés sur **EDTA** et 7 sangs prélevés **sur citrate de sodium**.

- 10 Les tests A, B, C, D, et E ont été effectués selon le protocole décrit ci-dessus, à partir de sang dilué au 1/10.

Résultats cytométriques sont reportés sur la figure 3.

- 15 **Résultats quantitatifs** sont exprimés en nombre d'évènements par μ l de sang total.

L'analyse est effectuée à partir des éléments numérés dans la fenêtre Q2.

- Anticoagulant EDTA :

20

Echantillon	Test A	Test B
1	6113	1094
2	6030	1540
3	6776	1628
4	9060	1115
5	7428	974
6	5158	1822
7	3131	1636
8	4401	1189
9	5777	666
10	12981	756
11	7105	504
Moyenne	6724	1175
Ecart Type	2603	436

- Anticoagulant Citrate Na :

Echantillon	Test A	Test B
12	7002	716
5	5610	879
13	3205	400
9	8095	1190
10	10680	781
14	5344	960
15	13620	896
Moyenne	7651	832
Ecart Type	3528	243

5 - Tests d'inhibition (anticoagulant EDTA) :

			Pourcentage d'inhibition		
Echantillon	Test A	Test B	Test C	Test D	Test E
2	6030	1540	99.32%	99.25%	97.01%
3	6776	1628	98.86%	98.27%	94.35%
4	9060	1115	98.45%	98.65%	92.56%
6	5158	1822	96.76%	93.68%	98.30%
7	3131	1636	95.02%	93.42%	93.46%
8	4401	1189	96.68%	94.75%	95.63%

REFERENCES

1. Assembly of the Platelet Prothrombinase Complex Is Linked to Vesiculation of the Platelet Plasma Membrane. Studies in Scott syndrome : an isolated defect in platelet procoagulant activity". P.J. Sims, T. Wiedmer, C.T. Esmon, H.J. Weiss, and S. J. Shattil. J. Biol. Chem., vol. 264, no. 29, 17049-17057, 1989.
2. Microparticle generation during in vitro platelet activation by anti-CD9 murine monoclonal antibodies. S. Nomura, H. Nagata, M. Suzuki, K. Kondo, S. Ohga, T. Kawakatsu, H. Kido, T. Fukuroi, K. Yamaguchi, K. Twata, M. Yanabu, T. Soga, T. Kokawa, and K. Yasunaga. Thrombosis Research, 62, 429-439, 1991.
3. Platelet Microparticles Bind, Activate and Aggregate Neutrophils In Vitro. W. Jy, W.-W. Mao, L.L. Horstman, J. Tao, Y.S. Ahn. Blood Cells, Molecules and Diseases. 21, 217-231, 1995.
4. A new lupus anticoagulant neutralization test based on platelet-derived vesicles. J. Arnout, E. Huybrechts, M. Vanrusselt, and J. Vermynen. British Journal of Haematology. 80, 341-346, 1992.
5. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. R.F.A. Zwaal, P. Comfurius and E. M. Bevers. Biochimica et Biophysica Acta. 1180, 1-8, 1992.
6. Demonstration of Platelet-Derived Microvesicles in Blood from Patients with Activated Coagulation and Fibrinolysis Using a Filtration Technique and Western Blotting. P.A. Holme, N.O. Solum, F. Brosstad, M. Roger. Thrombosis and Haemostasis. 72 (5), 666-71, 1994.
7. WO 96/03655 (8 février 1996) - Inventeurs : J.M. Freyssinet, B. Antoni, F. Donie, H. Lill.

8. Direct Detection of Activated Platelets and Platelet-Derived Microparticles in Humans. C. S. Abrams, N. Ellison, A.Z. Budzyndki, and S.J. Shattil. *Blood*, vol. 75, no. 1, 128-138, 1990.
- 5
9. Annexin V as a Probe of Aminophospholipid Exposure and Platelet Membrane Vesiculation : A flow Cytometry Study Showing a Role for Free Sulfhydryl Groups. J. Dachary-Prigent, J.-M. Freyssinet, J.-M. Pasquet, J.-C. Carron, and A. T. Nurden. *Blood*, vol. 81, no. 10, 2554-2565, 1993.
- 10
10. Platelet-derived Microvesicles in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. M. Galli, A. Grassi, T. Barbui. *Thrombosis and Haemostasis*. 75 (3), 427-31, 1996.
- 15
11. A New Flow Cytometry Method of Platelet-derived Microvesicle Quantification in Plasma. V. Combes, F. Dignat-George, M. Mutin, J. Sampol. *Thrombosis and Haemostasis*. 77 1, 212-24, 1997.
- 20
12. WO 96/15449 (23 mai 1996) - Inventeurs A.D. Michelson, M.R. Barnard.
13. Terminology and Nomenclature for Standardization in Quantitative Fluorescence Cytometry. L.O. Henderson, G.E. Marti, A. Gaigalas, W.H. Hannon, R.F. Vogt Jr., *Cytometry*, 33:97-105, 1998.
- 25
14. Antiphospholipid antibody binding to bilayer-coated glass microspheres. A.R.Obringer, N.S. Rote, A. Walter, *J. Immunol. Methods*, 185 1, 81-93, 1995.
- 30
15. Ca^{2+} concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membrane. P.J. Trotter, M.A. Orchard, J.H. Walker *Biochem J.*, 308, 591-8, 1995.

REVENDICATIONS

1. Monoréactif pour la détection et la quantification des microparticules plaquettaires (MPP) dans un échantillon sanguin par cytométrie de flux, comprenant :

5

a) un réactif 1 pour un double marquage des MPP comprenant :

- soit de l'Annexine V ou tout autre marqueur spécifique des phospholipides membranaires couplé à un fluorochrome 1,

10 - soit une population 1 d'ACM dirigés contre des structures membranaires plaquettaires marqués avec un fluorochrome 1, (réactif 1a), et,

une population 2 d'anticorps monoclonaux (ACM) dirigés contre des structures membranaires plaquettaires marqués avec un fluorochrome 2 (réactif 1b), et,

15 b) un réactif 2 constitué par un mélange de microsphères comprenant :

- une population de microsphères A marquée par l'un des deux fluorochromes 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux, servant à définir la région d'analyse des MPP en terme de taille (paramètres de diffusion lumineuse) et permettant leur différenciation (billes de positionnement),

20 - une population de microsphères B non marquée ou marquée par l'un des deux fluorochromes 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux, dont la concentration est connue, servant d'étalon interne au comptage des microparticules (billes de comptage),

25 - une population de microsphères C marquée uniquement par le fluorochrome 1, servant à définir sur le paramètre de fluorescence du fluorochrome 1 le seuil d'intensité minimum qui délimite la région d'analyse des microparticules sur lesquelles sont fixés les ACM 1 marqués au fluorochrome 1 ou l'Annexine V ou autre marqueur spécifique des phospholipides membranaires marqués au fluorochrome 1 (billes seuils),

30 - et une population de microsphères D, de diamètre identique à C, et marquée uniquement par le fluorochrome 2, servant à définir sur le paramètre de

fluorescence du fluorochrome 2 le seuil d'intensité minimum qui délimite la région d'analyse des microparticules sur lesquelles sont fixés les ACM 2 (billes seuils).

2. Monoréactif selon la revendication 1 caractérisé en ce que chaque population C et D
5 de billes seuils est composée de deux sous-populations de billes de deux niveaux.
3. Monoréactif selon la revendication 1 caractérisé en ce que les billes de comptage ont un diamètre supérieur ou égal à 5 μm .
- 10 4. Monoréactif selon la revendication 1 caractérisé en ce que les billes de comptage ont un diamètre compris entre 5 et 10 μm .
5. Monoréactif selon la revendication 1 caractérisé en ce que les billes de positionnement ont un diamètre compris entre 1 et 0.5 μm .
15
6. Monoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les billes seuils ont un diamètre de 3 μm .
7. Monoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les anticorps
20 monoclonaux (ACM) des populations 1 et 2 sont dirigés contre des structures membranaires plaquettaires choisies parmi les spécificités suivantes : CD61, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD49b, CD29, CD62P, CD63, protéine S et prothrombine.
8. Monoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que les populations 1 et 2
25 d'ACM sont constituées par un seul ACM, par plusieurs ACM de même spécificité mais dirigés contre des épitopes différents, ou par plusieurs ACM de spécificité plaquettaire différente.
9. Monoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif 1 du
30 monoréactif de l'invention est constitué d'annexine V ou autre marqueur spécifique des

phospholipides membranaires marqué par un fluorochrome 1 (réactif 1a), et d'une population 2 d'ACM marqués par un fluorochrome 2 (réactif 1b).

10. Monoréactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif 1 est constitué
5 par de l'annexine V marquée par un fluorochrome 1 et d'une population 2 d'ACM marqués par un fluorochrome 2.

11. Monoréactif selon la revendication 10, caractérisé en ce que la population 2 d'ACM est constituée par plusieurs ACM de spécificités différentes.

10

12. Monoréactif selon la revendication 10, caractérisé en ce que la population 2 d'ACM est constituée par des ACM anti-CD61 et des ACM anti-CD42b.

13. Monoréactif selon la revendication 10, caractérisé en ce que la population 2 est
15 constituée par les ACM P18 et 4F8 (anti-CD61) et SZ2 (anti-CD42b).

14. Monoréactif selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le fluorochrome 1 est le FITC et le fluorochrome 2 la PE.

20 15. Monoréactif selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'échantillon est du sang total.

16. Kit de diagnostic pour la détection et la quantification des MPP, caractérisé en ce qu'il comprend un monoréactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

25

17. Kit selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un tampon de dilution.

18. Kit selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

- **un réactif 1a** constitué par une population 1 d'ACM spécifiques de structures membranaires plaquettaires, ou par de l'annexine V ou tout autre marqueur spécifique des phospholipides membranaires, marqués avec un fluorochrome 1,
- **un réactif 1b** constitué par une population 2 d'ACM spécifiques de structures membranaires plaquettaires, marqués avec un fluorochrome 2,
- **un réactif 2** constitué par :
 - une population de billes de positionnement de la fenêtre d'analyse des MPP marquée par le fluorochrome 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux,
 - une population de billes de comptage non marquée ou marquée par le fluorochrome 1 ou 2 ou autre fluorochrome de spectre similaire à l'un des deux,
 - une population de billes seuils, préférentiellement constituée par deux sous-populations de billes de deux niveaux, marquées par le fluorochrome 1,
 - une population de billes seuils, préférentiellement constituée par deux sous-populations de billes de deux niveaux marquées par le fluorochrome 2.
- **un réactif 3** constitué par un tampon de dilution.

19. Kit selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que le réactif 1a est constitué par de l'annexine V et le réactif 1b par un mélange d'ACM de spécificités différentes.

20. Kit selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que le réactif 1b est constitué par un mélange d'ACM anti-CD61 et anti-CD42b.

21. Procédé de détection et de quantification des MPP, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en présence et incubation d'un échantillon sanguin avec un monoréactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 de sorte à obtenir un marquage en double couleur desdites MPP, et,
- b) analyse cytométrique des événements doublement marqués.

22. Utilisation d'un monoréactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 ou d'un kit de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 16 à 20 dans une méthode de détection et de suivi d'un état prothrombotique.

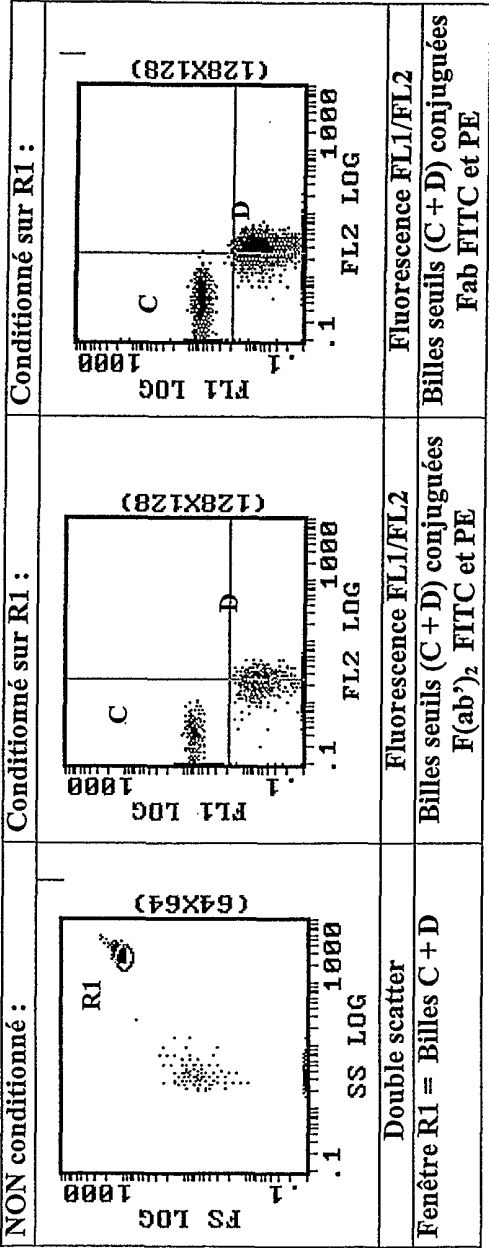


Fig. 1A

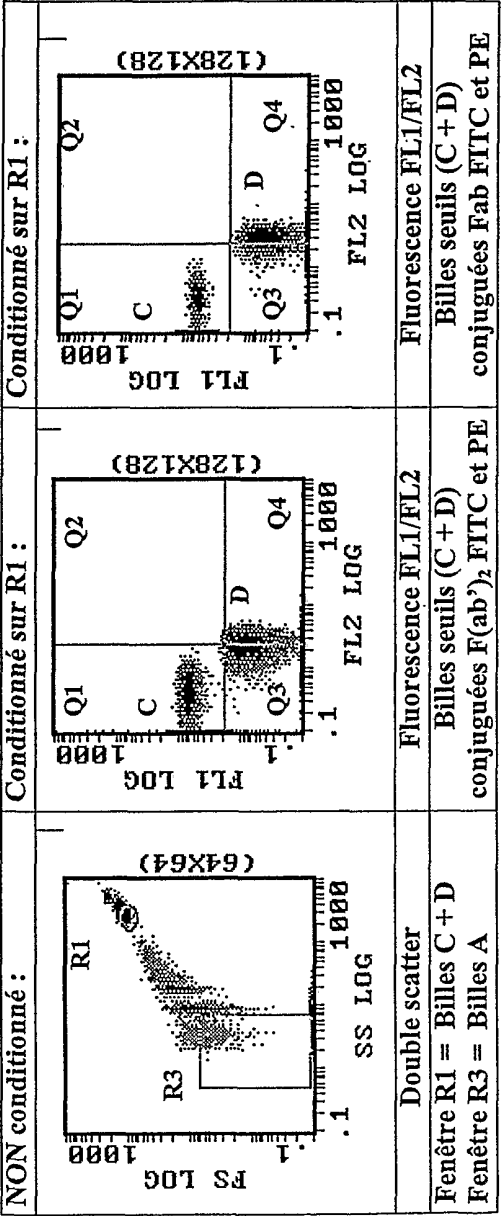


Fig. 1B

ETAPE #3

ETAPE #2

ETAPE #1

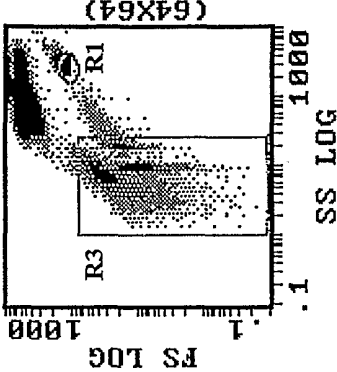
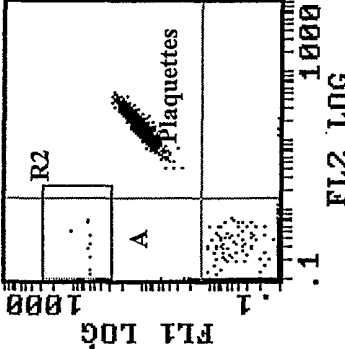
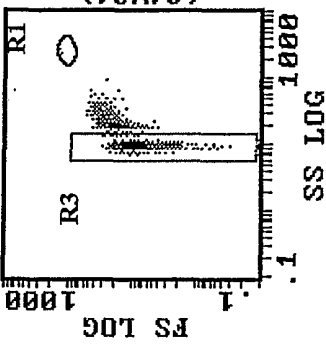
NON conditionné :	Conditionné sur R3 :	Conditionné sur R2 :
		
Double scatter : -Fenêtre R1 = Billes C + D -Fenêtre R3 = Billes A +Plaquettes -Cellules sanguines	CD61-FITC+/CD41-PE+ : - Fenêtre FL1+/FL2+ = Plaquettes - Fenêtre R2 = Billes A	Double scatter : Fenêtre R3 = singlets de billes A

Fig. 2.../.

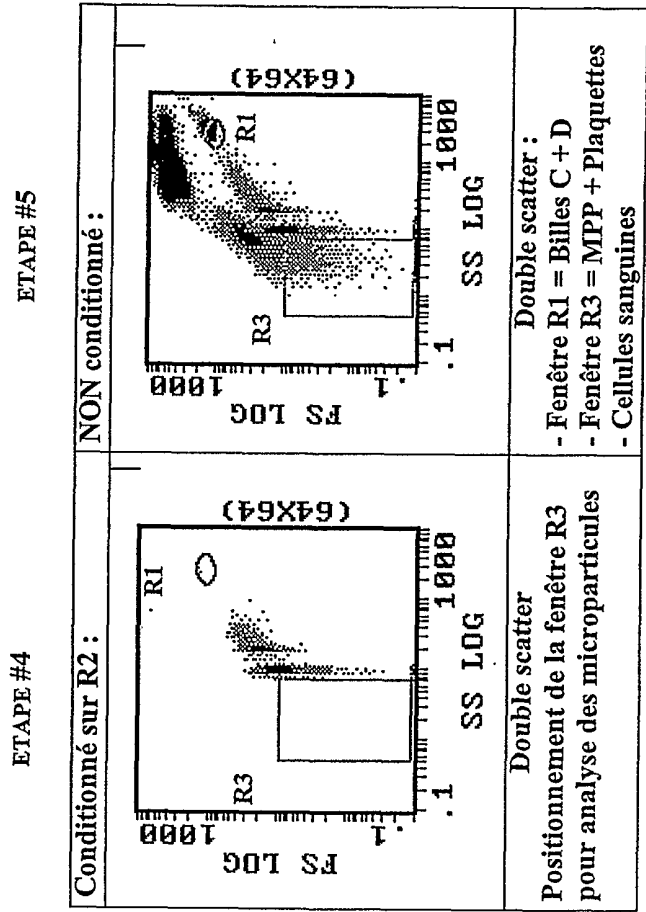


Fig. 2.

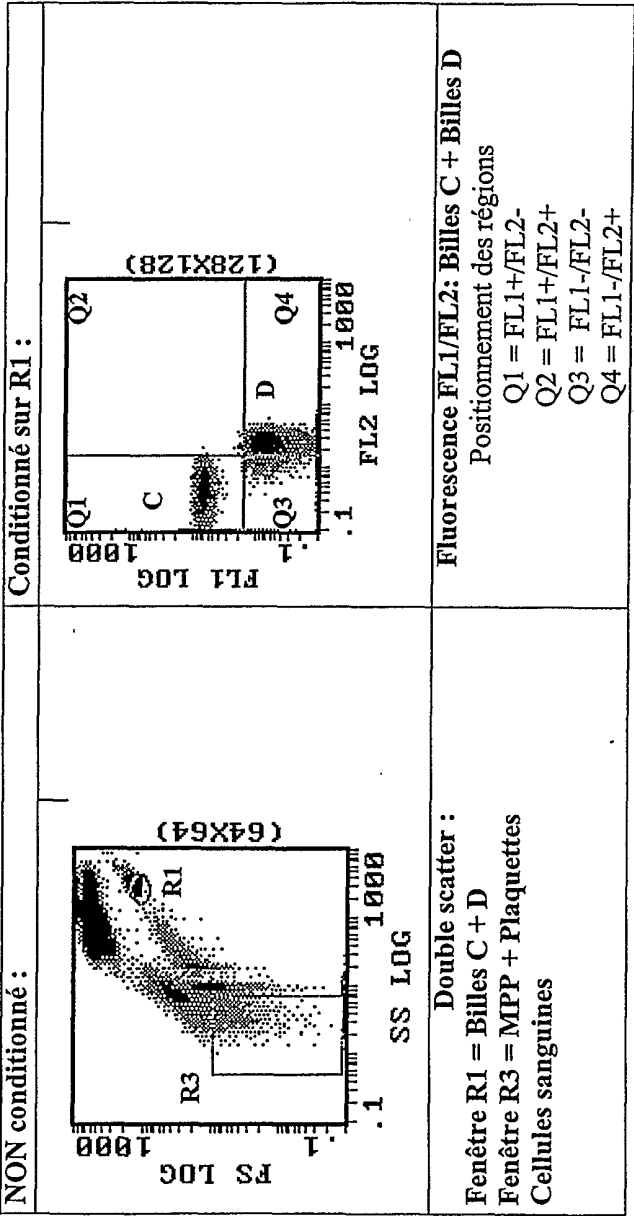


Fig. 3.../.

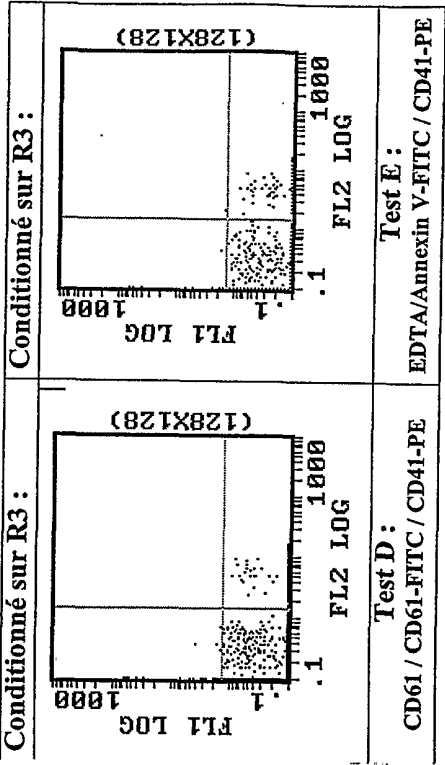
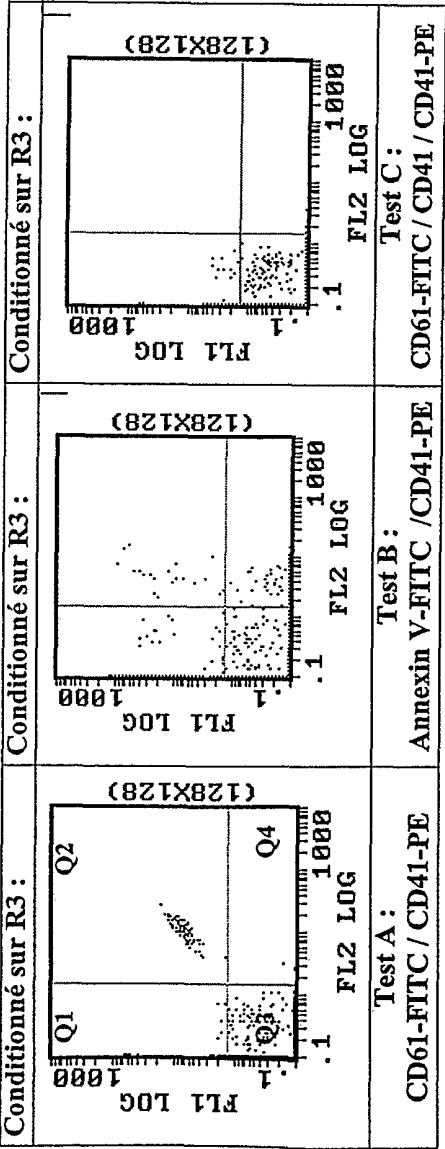


Fig. 3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/533 G01N33/86 G01N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COMBES V ET AL: "IN VITRO GENERATION OF ENDOTHELIAL MICROPARTICLES AND POSSIBLE PROTHROMBOTIC ACTIVITY IN PATIENTS WITH LUPUS ANTICOAGULANT" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION,US,NEW YORK, NY, vol. 104, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 93-102, XP000913435 ISSN: 0021-9738 abstract page 94, left-hand column, line 19 -right-hand column, line 10 page 95, left-hand column, line 14 -page 96, left-hand column, line 22 --- -/--	1,6-11, 14,15, 21,22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2001

Date of mailing of the international search report

03/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuyman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHARF RUEDIGER E ET AL: "Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries: Flow cytometric detection." ARTERIOSCLEROSIS AND THROMBOSIS, vol. 12, no. 12, 1992, pages 1475-1487, XP000998111 ISSN: 1049-8834 abstract page 1477, left-hand column, line 12 -right-hand column, line 23 page 1479, left-hand column, line 6 -page 1481, left-hand column, line 34	1,6-11, 14-18, 21,22
Y	LATGER V ET AL: "PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ACTIVATION CELLULAIRE. EXPLORATION DU PH-NOTYPE CELLULAIRE ADH-RENT PAR CYTOM-TRIE EN FLUX QUANTITATIVE" JOURNAL DES MALADIES VASCULAIRES,FR,MASSON, PARIS, vol. 24, no. 1, 1999, pages 11-18, XP000910966 ISSN: 0398-0499	16-18
A	abstract page 13, right-hand column, line 22 -page 14, left-hand column, line 6 page 14, right-hand column, line 25 - line 38 column 15; table 3	1,3,4,6, 7,9-13, 15,19, 20,22
A	ABRAMS C S ET AL: "DIRECT DETECTION OF ACTIVATED PLATELETS AND PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES IN HUMANS" BLOOD,US,W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, vol. 75, no. 1, 1990, pages 128-138, XP000564281 ISSN: 0006-4971 abstract figure 6 page 129, right-hand column, line 58 -page 130, left-hand column, line 37	1,10,11, 14,15
A	WO 91 00509 A (CARIBBEAN MICROPARTICLES CORP) 10 January 1991 (1991-01-10) abstract page 12, line 8 - line 20 page 15, line 1 - line 13 page 20, line 14 - line 30 page 30 -page 39; claims 1,2,6-8,13,18,20,21	1-6, 14-16,18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 380 663 A (SCHWARTZ ABRAHAM ET AL) 10 January 1995 (1995-01-10) claims 1-19 column 10, line 10 - line 59 ---	
A	MATZDORFF A C ET AL: "Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation in vitro." HAEMOSTASIS, vol. 28, no. 6, November 1998 (1998-11), pages 277-288, XP001023452 ISSN: 0301-0147 abstract page 278, right-hand column, line 40 -page 281, left-hand column, line 27 ---	1-22
P,X	FR 2 795 820 A (BIOCYTEX) 5 January 2001 (2001-01-05) the whole document -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9100509 A	10-01-1991	US 5093234 A	03-03-1992
		US 5380663 A	10-01-1995
		US 5073497 A	17-12-1991
		US 5073498 A	17-12-1991
		US 5084394 A	28-01-1992
		US 5089416 A	18-02-1992
US 5380663 A	10-01-1995	US 5089416 A	18-02-1992
		US 5084394 A	28-01-1992
		US 5093234 A	03-03-1992
		US 4857451 A	15-08-1989
		US 4774189 A	27-09-1988
		US 4767206 A	30-08-1988
		US 5314824 A	24-05-1994
		WO 9100509 A	10-01-1991
		US 5073497 A	17-12-1991
		US 5073498 A	17-12-1991
		US 4918004 A	17-04-1990
		GB 2172104 A,B	10-09-1986
		US 4714682 A	22-12-1987
		US 4868126 A	19-09-1989
		JP 1953186 C	28-07-1995
		JP 6084969 B	26-10-1994
		JP 61228349 A	11-10-1986
FR 2795820 A	05-01-2001	WO 0102835 A	11-01-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... de Internationale No

PCT/FR 01/01468

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/533 G01N33/86 G01N15/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	COMBES V ET AL: "IN VITRO GENERATION OF ENDOTHELIAL MICROPARTICLES AND POSSIBLE PROTHROMBOTIC ACTIVITY IN PATIENTS WITH LUPUS ANTICOAGULANT" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION,US,NEW YORK, NY, vol. 104, no. 1, juillet 1999 (1999-07), pages 93-102, XP000913435 ISSN: 0021-9738 abrégé page 94, colonne de gauche, ligne 19 -colonne de droite, ligne 10 page 95, colonne de gauche, ligne 14 -page 96, colonne de gauche, ligne 22 --- -/--	1,6-11, 14,15, 21,22



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 août 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/09/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Tuynman, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 01/01468

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SCHARF RUEDIGER E ET AL: "Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries: Flow cytometric detection." ARTERIOSCLEROSIS AND THROMBOSIS, vol. 12, no. 12, 1992, pages 1475-1487, XP000998111 ISSN: 1049-8834 abrégé page 1477, colonne de gauche, ligne 12 -colonne de droite, ligne 23 page 1479, colonne de gauche, ligne 6 -page 1481, colonne de gauche, ligne 34 ---	1,6-11, 14-18, 21,22
Y	LATGER V ET AL: "PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ACTIVATION CELLULAIRE. EXPLORATION DU PH-NOTYPE CELLULAIRE ADH-RENT PAR CYTOM-TRIE EN FLUX QUANTITATIVE" JOURNAL DES MALADIES VASCULAIRES,FR,MASSON, PARIS, vol. 24, no. 1, 1999, pages 11-18, XP000910966 ISSN: 0398-0499	16-18
A	abrégé page 13, colonne de droite, ligne 22 -page 14, colonne de gauche, ligne 6 page 14, colonne de droite, ligne 25 - ligne 38 colonne 15; tableau 3 ---	1,3,4,6, 7,9-13, 15,19, 20,22
A	ABRAMS C S ET AL: "DIRECT DETECTION OF ACTIVATED PLATELETS AND PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES IN HUMANS" BLOOD,US,W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, vol. 75, no. 1, 1990, pages 128-138, XP000564281 ISSN: 0006-4971 abrégé figure 6 page 129, colonne de droite, ligne 58 -page 130, colonne de gauche, ligne 37 ---	1,10,11, 14,15
A	WO 91 00509 A (CARIBBEAN MICROPARTICLES CORP) 10 janvier 1991 (1991-01-10) abrégé page 12, ligne 8 - ligne 20 page 15, ligne 1 - ligne 13 page 20, ligne 14 - ligne 30 page 30 -page 39; revendications 1,2,6-8,13,18,20,21 ---	1-6, 14-16,18
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 01/01468

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 380 663 A (SCHWARTZ ABRAHAM ET AL) 10 janvier 1995 (1995-01-10) revendications 1-19 colonne 10, ligne 10 - ligne 59 ----	
A	MATZDORFF A C ET AL: "Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation in vitro." HAEMOSTASIS, vol. 28, no. 6, novembre 1998 (1998-11), pages 277-288, XP001023452 ISSN: 0301-0147 abrégé page 278, colonne de droite, ligne 40 -page 281, colonne de gauche, ligne 27 ----	1-22
P, X	FR 2 795 820 A (BIOCYTEX) 5 janvier 2001 (2001-01-05) le document en entier -----	1-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. de Internationale No

PCT/FR 01/01468

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9100509	A	10-01-1991	US 5093234 A	03-03-1992
			US 5380663 A	10-01-1995
			US 5073497 A	17-12-1991
			US 5073498 A	17-12-1991
			US 5084394 A	28-01-1992
			US 5089416 A	18-02-1992
US 5380663	A	10-01-1995	US 5089416 A	18-02-1992
			US 5084394 A	28-01-1992
			US 5093234 A	03-03-1992
			US 4857451 A	15-08-1989
			US 4774189 A	27-09-1988
			US 4767206 A	30-08-1988
			US 5314824 A	24-05-1994
			WO 9100509 A	10-01-1991
			US 5073497 A	17-12-1991
			US 5073498 A	17-12-1991
			US 4918004 A	17-04-1990
			GB 2172104 A, B	10-09-1986
			US 4714682 A	22-12-1987
			US 4868126 A	19-09-1989
			JP 1953186 C	28-07-1995
JP 6084969 B	26-10-1994			
JP 61228349 A	11-10-1986			
FR 2795820	A	05-01-2001	WO 0102835 A	11-01-2001