



Rôle de la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA dans l'arthrite

Thèse

Anne-Claire Duchez

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Anne-Claire Duchez, 2015

Résumé

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune systémique affectant près de 1% de la population mondiale. L'inflammation articulaire est caractérisée par une infiltration leucocytaire majoritaire de neutrophiles, la formation d'un pannus et la destruction du cartilage et de l'os. De nombreux acteurs cellulaires et moléculaires dont les plaquettes et leurs microparticules (MPs) ainsi que la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA (sPLA₂-IIA) contribuent à cette pathologie. Récemment, nous avons mis en évidence que les plaquettes activées libèrent certes des MPs mais aussi des mitochondries libres que nous avons appelées freeMitos. Les MPs et les freeMitos sont détectées dans les fluides synoviaux de patients arthritiques.

Au cours de nos recherches, nos résultats indiquent que la sPLA₂-IIA hydrolyse les phospholipides membranaires des MPs et des freeMitos. Elle libère des lysophospholipides et des acides gras, dont l'acide arachidonique (AA). L'ADN mitochondrial est aussi relâché à la suite de l'hydrolyse des freeMitos par la sPLA₂-IIA. Ces différents produits induisent la libération de leucotriènes et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la formation de *neutrophil extracellular trap* (NET) par les neutrophiles.

La sPLA₂-IIA cible aussi les MPs qui sont riches en enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique (AA). Cet AA est majoritairement métabolisé en 12-Hydroxyeicosatetraenoic acide (12-HETE) par la 12-lipoxygénase (12-LO) des MPs. Le 12(S)-HETE issue de l'action concertée de la sPLA₂-IIA et la 12-LO, induit l'internalisation des MPs par les neutrophiles *in vitro* et *in vivo*. Les MPs transfèrent leur cargaison en facteurs de transcription, en acides nucléiques et en mitochondries aux neutrophiles. Les MPs modulent le transcriptome et les fonctions du neutrophile. Les MPs et les produits d'hydrolyse par la sPLA₂-IIA induisent une augmentation de la génération de leucotriènes, la formation de NETs et une résistance à l'apoptose. Ces deux enzymes sont aussi impliqués dans la sévérité de l'arthrite inflammatoire murine.

En somme, nos études apportent une meilleure connaissance sur le contenu des MPs de plaquette. Un mécanisme finement régulé, d'internalisation des MPs par les neutrophiles, a été mis en évidence.

Abstract

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease affecting 1% of the world population. This pathology is characterized by a symmetric articular involvement where takes place a synovial hyperplasia accompanied with an infiltration of leukocytes, mainly neutrophils, and a destruction of cartilage and bone. Several cellular and molecular actors including platelets, platelet microparticles (MPs) and the secreted phospholipase A₂ group IIA (sPLA₂-IIA) contribute to this pathology. Recently, we highlighted that activated platelets produce also extracellular mitochondria (freeMitos) which we detected in the synovial fluids from arthritic patients.

In our research, our results indicate that sPLA₂-IIA hydrolyzes membrane phospholipids of freeMitos and MPs, releasing lysophospholipids and arachidonic acid (AA). Mitochondrial DNA is also liberated after sPLA₂-IIA hydrolysis. These products induce leukotrienes production, proinflammatory cytokine release and neutrophil extracellular trap (NET) formation by neutrophils.

sPLA₂-IIA also targets MPs that contain enzyme involved in AA metabolism. AA is mainly metabolized in 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) by 12-lipoxygenase (12-LO) from MPs. It induces MP internalization in the human and murine neutrophils. MPs transfer their elaborated cargo, rich in transcription factors, nucleic acids and mitochondria, to neutrophils. MPs modulate transcriptome and functions of neutrophils. MPs and the products of hydrolysis by sPLA₂-IIA, induce increase of leukotrienes production, NET release and apoptosis resistance. 12-LO and sPLA₂-IIA are involved in inflammatory murine arthritis severity.

Our work brings a better knowledge on the content of the platelet MPs. It highlights a tightly regulated mechanism implicated in MP internalization in neutrophils.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières	VII
Liste des tableaux.....	XV
Liste des illustrations.....	XVII
Liste des abréviations	XXI
Remerciements.....	XXIX
Avant-propos.....	XXXIII

Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. Arthrite rhumatoïde	1
1.1.1. Définition et épidémiologie	1
1.1.2. Pathologie.....	1
1.1.2.1. Les symptômes	1
1.1.2.2. Les causes potentielles	2
1.1.2.3. Le développement de l'arthrite rhumatoïde avec ses acteurs cellulaires et moléculaires.....	3
1.1.2.3.1. Initiation de l'arthrite rhumatoïde.....	4
1.1.2.3.2. Propagation de l'arthrite rhumatoïde	5
1.1.2.3.3. Dommages articulaires de l'arthrite rhumatoïde.....	8
1.1.2.3.4. Les médiateurs lipidiques dans l'arthrite rhumatoïde.....	8
1.1.3. Les modèles animaux d'étude de l'arthrite	10
1.1.3.1. Généralités.....	10
1.1.3.2. Le modèle K/BxN.....	10
1.2. Les neutrophiles	14
1.2.1. Introduction sur les neutrophiles.....	14
1.2.2. Les neutrophiles dans l'immunité innée	14
1.2.2.1. Migration des neutrophiles aux sites infectieux	14
1.2.2.2. Reconnaissance des pathogènes	16
1.2.2.3. Élimination des pathogènes.....	17

1.2.2.3.1. La phagocytose.....	17
1.2.2.3.2. La NETose.....	19
1.2.2.3.3. Les ectosomes	20
1.2.3. Les neutrophiles et l'immunité adaptative.....	20
1.2.4. Rôles des neutrophiles dans l'arthrite	22
1.2.4.1. Caractéristiques des neutrophiles dans l'arthrite	22
1.2.4.1.1. Les neutrophiles arthritiques et l'apoptose.....	22
1.2.4.1.2. Les neutrophiles arthritiques et la migration.....	23
1.2.4.2. Rôle des neutrophiles dans la propagation de l'arthrite.....	23
1.2.4.3. Rôle des neutrophiles dans la destruction du cartilage et de l'os	24
1.3. Les plaquettes	25
1.3.1. Origine et physiologie des plaquettes.....	25
1.3.1.1. Origine des plaquettes.....	25
1.3.1.2. Structure caractéristique des plaquettes	26
1.3.1.3. Contenu des plaquettes	27
1.3.2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase	30
1.3.2.1 Adhésion plaquettaire	30
1.3.2.2. Activation plaquettaire et coagulation sanguine	33
1.3.3. La 12-lipoxygénase plaquettaire.....	33
1.3.3.1. Expression de la 12-lipoxygénase.....	33
1.3.3.2. Activité enzymatique de la 12-lipoxygénase	33
1.3.3.3. Rôle des produits de la 12-lipoxygénase	34
1.3.4. Rôles des plaquettes dans l'immunité.....	35
1.3.4.1. Recrutement des plaquettes aux sites inflammatoires	35
1.3.4.2. Rôle des plaquettes face aux microorganismes	35
1.3.4.3. Interactions des plaquettes avec les cellules immunitaires.....	35
1.3.4.4. Interactions entre les neutrophiles et les plaquettes	36
1.3.5. Les plaquettes et leurs microparticules dans l'arthrite	37
1.4. Les microvésicules	39
1.4.1. Définition des vésicules extracellulaires	39
1.4.2. Formation des microparticules.....	39

1.4.2.1. Réarrangements des phospholipides membranaires	39
1.4.2.2. Réarrangements du cytosquelette	40
1.4.3. Hétérogénéité des microparticules de plaquettes	41
1.4.4. Contenu des microparticules.....	42
1.4.4.1. Protéome des microparticules.....	42
1.4.4.2. Lipidome des microparticules	43
1.4.4.3. Contenu en acides nucléiques des microparticules	43
1.4.4.4. Contenu en organelles des microparticules	43
1.4.5. Rôle physio-pathologique des microparticules	44
1.4.5.1. La communication cellulaire	44
1.4.5.2. L'inflammation.....	46
1.5. La mitochondrie.....	47
1.5.1. Structure des mitochondries	47
1.5.2. Fonctions des mitochondries	48
1.5.2.1. Respiration cellulaire.....	48
1.5.2.2. Mort cellulaire	48
1.5.3. Implications des DAMPS mitochondriaux dans les pathologies rhumatismales	49
1.6. Les phospholipases A₂	52
1.6.1. Généralités sur les phospholipases A₂	52
1.6.1.1. Les phospholipases A ₂ indépendantes du calcium (iPLA ₂)	52
1.6.1.2. Les phospholipases A ₂ dépendantes du calcium	53
1.6.1.2.1. Les phospholipases A ₂ cytosoliques	53
1.6.1.2.2. Les phospholipases A ₂ sécrétées.....	53
1.6.2. La phospholipase A₂ sécrétée de type IIA.....	54
1.6.2.1. Historique : de la découverte au clonage.....	54
1.6.2.2. Expression de la sPLA ₂ -IIA	55
1.6.2.3. Activité enzymatique de la sPLA ₂ -IIA.....	56
1.6.2.3.1. Hydrolyse des phospholipides membranaires par la sPLA ₂ -IIA	56
1.6.2.3.2. Activité bactéricide de la sPLA ₂ -IIA	56
1.6.2.4. Activité non enzymatique de la sPLA ₂ -IIA.....	57

1.6.2.4.1. Les récepteurs de la sPLA ₂ -IIA.....	57
1.6.2.4.2. Fonction non enzymatique de la sPLA ₂ -IIA	58
1.6.2.5. Implication patho-physiologique de la sPLA ₂ -IIA	58
1.6.2.5.1. Cancer.....	58
1.6.2.5.2. Inflammation	59
1.6.2.5.3. Arthrite	59
1.7. Objectifs de l'étude.....	60
Chapitre 2. Les plaquettes libèrent leurs mitochondries servant de substrat à la bactéricide phospholipase A₂ sécrétée de type IIA afin de promouvoir l'inflammation	62
2.1. Avant-propos.....	63
2.2. Résumé.....	64
2.3. Abstract	66
2.4. Introduction	66
2.5. Results.....	67
2.5.1. Distribution of mitochondria in platelets	67
2.5.2. Activated platelets release functional mitochondria	67
2.5.3. Relevance of extracellular mitochondria in health	69
2.5.4. The mitochondrion is an endogenous substrate for the bactericidal secreted phospholipase A ₂ -IIA.....	70
2.5.5. Extracellular mitochondria interact with neutrophils	71
2.5.6. Inflammation is amplified by the combined action of extracellular mitochondria and sPLA ₂ -IIA	72
2.6. Discussion	73
2.7. Materials and Methods	76
2.7.1. Mice	76
2.7.2. Cells and human fluid preparation.....	76
2.7.3. Isolation of mouse liver mitochondria	76
2.7.4. High sensitivity flow cytometry (hs-FCM) configuration.....	77
2.7.5. Platelet stimulation.....	77
2.7.6. Mitochondrial activity.....	78

2.7.7. Air pouch model.....	78
2.8. Acknowledgment.....	79
2.9. Funding.....	79
2.10. References.....	79
2.11. Figures.....	85
2.12. Supplementary informations.....	98
2.12.1. Supplementary materials and methods.....	98
2.12.1.1. Isolation and quantification of free mitochondria.....	98
2.12.1.2. Mitochondrial DNA quantification in platelet concentrates associated with acute transfusion reactions.....	98
2.12.1.3. Transmission electron microscopy and determination of relative position of mitochondria within platelets.....	99
2.12.1.4. Scanning electronic microscopy imaging.....	99
2.12.1.5. Live cell imaging of platelet activation and confocal immunofluorescence microscopy.....	100
2.12.1.6. Internalization of mitochondria by human neutrophils.....	101
2.12.1.7. Multiphoton microscopy and leukocyte speed quantification.....	101
2.12.1.8. Generation of recombinant sPLA ₂ -IIA Alexa Fluor 488-conjugated.....	101
2.12.1.9. sPLA ₂ -IIA binding to mitochondria.....	102
2.12.1.10. Mass spectrometry analysis of lysophospholipids and fatty acid released from mitochondrion membranes by human recombinant sPLA ₂ -IIA.....	103
2.12.1.11. Stimulation of neutrophils for leukotriene generation.....	103
2.12.1.12. NET quantification.....	103
2.12.1.13. Quantification of mitochondrial DNA release following incubation with human recombinant sPLA ₂ -IIA.....	104
2.12.1.14. mRNA quantification of inflammatory genes.....	104
2.12.2. Supplementary figures.....	107

Chapitre 3. Les microparticules de plaquette sont internalisées par les neutrophiles via l'activité concertée de la 12-lipoxygénase et de la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA.....	119
3.1. Avant propos.....	119
3.2. Résumé.....	120

3.3. Abstract	122
3.4. Introduction	122
3.5. Results.....	124
3.5.1. Microparticle internalization by neutrophils.....	124
3.5.2. Lipidomics of platelet microparticles	126
3.5.3. Microparticle internalization in disease	127
3.5.4. Transfer of an elaborated microparticle cargo inside neutrophils	128
3.5.5. Concerted action of sPLA ₂ -IIA and 12-LO <i>in vivo</i>	129
3.6. Discussion	130
3.7. Materials and methods.....	134
3.7.1. Patients.....	134
3.7.2. Mice	134
3.7.3. Arthritis induction in mice.....	134
3.7.4. Cells and microparticles.....	135
3.7.4.1. Platelet MPs.....	135
3.7.4.2. Human primary neutrophils.	136
3.7.4.3. Neutrophil-like cell line.	136
3.7.5. Confocal microscopy	137
3.7.5.1. Cell preparation.	137
3.7.5.2. Image analyses.	137
3.7.6. Lipidomics	138
3.7.7. Statistics	138
3.8. Acknowledgments.....	138
3.9. References.....	139
3.10. Figures	147
3.11. SI appendix.....	159
3.11.1. Supplementary methods.....	159
3.11.1.1. Characterization of MPs.....	159
3.11.1.1.1. Stimulation of platelets.....	159
3.11.1.1.2. Density gradient.....	159
3.11.1.1.3. Size analysis	159

3.11.1.2. MP localization	160
3.11.1.3. Genotyping.....	160
3.11.1.4. Generation of recombinant sPLA ₂ -IIA	160
3.11.1.5. Analysis of TXB ₂ and 12-HETE by HPLC	160
3.11.1.6. Reagents for confocal microscopy.....	161
3.11.1.7. Electronic microscopy	161
3.11.1.8. Immunoblotting analyses.....	161
3.11.1.9. Detection of transcription factors	162
3.11.1.10. DNA precipitation assay	162
3.11.1.11. RNA detection in platelet MPs and neutrophils	162
3.11.1.12. Quantitative RT PCR.....	163
3.11.1.13. MicroRNA functional assays.....	163
3.12.2. Supplementary figures.....	166

Chapitre 4. Les microparticules de plaquettes en présence de sPLA₂-IIA modulent le transcriptome et des fonctions du neutrophile.....181

4.1. Avant propos.....181

4.2. Résumé181

4.3. Introduction181

4.4. Résultats.....182

4.4.1. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA influencent plusieurs voies métaboliques du neutrophile. 182

4.4.2. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA induisent une diminution de l'expression de la caspase 3 clivée dans les neutrophiles 182

4.4.3. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA induisent une augmentation des fonctions phagocytaires du neutrophile..... 182

4.4.4. Les microparticules de plaquettes via la sPLA₂-IIA contribuent à la biosynthèse de lipides inflammatoires. 183

4.5. Conclusion-Discussion183

4.5. Matériel et méthodes.....185

4.5.1 Cellules

4.5.1.1. Les plaquettes

4.5.1.2. Les neutrophiles	185
4.5.2. Analyse bio-informatique	185
4.5.3. Détection de la caspase 3 clivée.....	185
4.5.4. Microscopie confocale	186
4.5.5. HPLC	186
4.5.6. Analyse statistique	186
4.6. Figures	187
4.7. Références.....	189
Chapitre 5. Discussion générale	191
5.1. Les freeMitos.....	191
5.1.1. Les freeMitos et leurs DAMPs	191
5.1.3. L'activation des neutrophiles par les freeMitos.....	194
5.1.4. L'internalisation des freeMitos par les neutrophiles.....	195
5.2. Les microparticules de plaquettes.....	195
5.2.1. Hydrolyse des MPs par la sPLA ₂ -IIA	196
5.2.2. Mécanismes d'internalisation des MPs par les neutrophiles	198
5.2.3. Modulation des fonctions du neutrophile par les MPs.....	202
5.3. Pertinence de notre modèle à d'autres contextes cellulaires	204
Annexe 1	209
7. Bibliographie.....	227

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1-1. Les modèles animaux d'arthrite..	11
Tableau 1-2. Les protéines impliquées dans les mécanismes d'internalisation de particules bactériennes, virales.	18
Tableau 1-4. Les DAMPs mitochondriaux.	51

Chapitre 2

Supplementary Table 2-1: Description of synovial fluid specimen from rheumatoid arthritis patients.	117
---	-----

Liste des illustrations

Chapitre 1 :

Figure 1-1. Articulation en santé et atteinte d'arthrite rhumatoïde.	2
Figure 1-2. Evolution de l'arthrite rhumatoïde.	4
Figure 1-3. Les médiateurs lipidiques et leurs récepteurs.	10
Figure 1-4. Le modèle K/BxN.	12
Figure 1-5. Diapédèse des neutrophiles et molécules associées.	15
Figure 1-6. Trafic des particules endocytées ou phagocytées dans les différents compartiments cellulaires.	19
Figure 1-7. La voie de biogenèse des microRNAs dans les mégacaryocytes et dans les plaquettes.	29
Figure 1-8. Les fonctions plaquettaires dans l'hémostase.	30
Figure 1-9. Les récepteurs de surface de la plaquette permettant l'adhésion et l'activation des plaquettes.	31
Figure 1-10. Signalisation du récepteur GPVI.	32
Figure 1-11. Interactions des plaquettes avec différents types cellulaires.	36
Figure 1-12. Mécanismes inflammatoires utilisés par les plaquettes dans l'arthrite rhumatoïde.	38
Figure 1-13. Mécanismes de formation des microparticules.	41
Figure 1-14. Hétérogénéité des microparticules de plaquettes.	42
Figure 1-15. Les microparticules de plaquette contiennent diverses molécules lipidiques, protéiques et d'acides nucléiques.	44
Figure 1-16. Les mécanismes d'interaction des microparticules avec leurs cellules cibles	45
Figure 1-17. La respiration mitochondriale.	49
Figure 1-18. Le rôle des mitochondries dans l'apoptose.	50
Figure 1-19. Site d'hydrolyse des phospholipases.	52
Figure 1-20. Les PLA ₂ sécrétées.	54

Chapitre 2

Figure 2-1. Mitochondrial distribution within resting platelets.	85
Figure 2-2. Activated platelets release extracellular mitochondria.	87
Figure 2-3. Extracellular mitochondria are present in various situations where platelets are known to be activated.	89
Figure 2-4. The mitochondrion is a substrate for the bactericidal secreted phospholipase A ₂ - IIA (sPLA ₂ -IIA).	91
Figure 2-5. Extracellular mitochondria interact with neutrophils.	93
Figure 2-6. The interaction of human neutrophils with the mitochondria/sPLA ₂ -IIA complex promotes the release of proinflammatory mediators.	95
Figure 2-7. Extracellular mitochondria and sPLA ₂ -IIA amplify inflammation <i>in vivo</i>	97

Supplementary Figure 2-1. Relative positioning of mitochondria within the platelet.	107
Supplementary Figure 2-2. Characterization of platelet supernatants.	108
Supplementary Figure 2-3. Magnetic purification of freeMitos.	109
Supplementary Figure 2-4. Platelet are activated under various stimuli.....	110
Supplementary Figure 2-5. Extracellular mitochondria are present in various sterile inflammatory pathologies.....	111
Supplementary Figure 2-6. Exogenous mitochondria are internalized via an endocytosis-dependent pathway by human neutrophils.	113
Supplementary Figure 2-7. sPLA ₂ -IIA and cPLA ₂ - α work in concert to promote generation of 5-lipoxygenase products in human neutrophils.	114
Supplementary Figure 2-8. Localization of extracellular mitochondria following their intravenous injection.	115
Supplementary Figure 2-9. sPLA ₂ -IIA and mtDNA levels increase in platelet concentrates during storage.	116

Chapitre 3

Figure 3-1. Internalization of platelet MPs in neutrophils.	147
Figure 3-2. sPLA ₂ -IIA promotes the release of multiple lipid mediators from MPs.	149
Figure 3-3. The 12-LO product, 12(S)-HETE, is the trigger of MP internalization.	151
Figure 3-4. The concerted action of sPLA ₂ -IIA and 12-LO in MP internalization.	153
Figure 3-5. Platelet MPs can transfer complexes cargo such as transcription factors, nucleic acids and organelles inside neutrophils.	155
Figure 3-6. sPLA ₂ -IIA and 12-LO concerted activities promote inflammation.	157
Figure 3-7. Model.....	158
Supplementary Figure 3-1. Platelet MP characterization.....	167
Supplementary Figure 3-2. Platelet MPs bind neutrophils.	168
Supplementary Figure 3-3. Platelet MPs obtained by various agonists are internalized by neutrophils.	169
Supplementary Figure 3-4. Platelet MPs localize at the endomembrane system in neutrophils.	171
Supplementary Figure 3-5. MP internalization is dependant of endocytic pathway.	172
Supplementary Figure 3-6. Quantification of the lipids released by sPLA ₂ -IIA from MPs.	173
Supplementary Figure 3-7. MP internalization occurs independently of lysophospholipids and cyclooxygenase activity.....	174
Supplementary Figure 3-8. Molecular content of MPs.	175
Supplementary Figure 3-9. Platelet MPs are internalized in presence of 12(S)-HETE in a neutrophilic cell line.....	176
Supplementary Figure 3-10. Characterization of sPLA ₂ -IIA ^{TGN} ALOX12 ^{-/-} mice	177
Supplementary Figure 3-11. Platelet MPs modulate the transcriptome of neutrophils.	178

Chapitre 4

Figure 4-1. Evaluation des voies métaboliques du neutrophile modulées par les MPs de plaquette.....	187
Figure 4-2. Evaluation de l'expression de la caspase 3 clivée des neutrophiles	188
Figure 4-3. Evaluation des capacités de liaison et de phagocytose de billes en polystyrène par les neutrophiles..	188
Figure 4-4. Evaluation de la synthèse de leucotriènes par les neutrophiles en présence de MPs de plaquette et de sPLA ₂ -IIA.....	189

Chapitre 5

Figure 5.1. Rôle de la sPLA ₂ -IIA sur les MPs et les freeMitos avec le neutrophile, en condition inflammatoire.	205
Figure 5.2. Perspectives à long terme sur l'internalisation des MPs via le 12-HETE sur plusieurs types cellulaires.	207

Annexe 1

Figure 1. Platelet microparticle subtypes.....	219
Figure 2. Cryo-electron microscopy (EM) for the assessment of platelet microparticle diversity.	220

Liste des abréviations

A23187	calcium ionophore
AA	acide arachidonique (AA)
ACA	anticorps dirigé contre les cardiolipines
ACPA	anti-citrullinated protein antibodies
AD	actinomycine D
ADA	adénosine déaminase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN CpG	ADN riche en cytosine et guanine
ADP	adénosine di-phosphate
AJI	arthrite juvénile idiopathique
ALA	alpha-linolenic acid
AMPC	adénosine mono-phosphate cyclique
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
APC	actived protein C
AR	arthrite rhumatoïde
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
AT2	angiotensine II
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
autoAc	auto-anticorps
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BDCA2	plasmacytoid dendritic cell-specific antigen
BH3	Bcl-2 homology-3
Bid	interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer

Bim	Bcl-2 interacting protein
BiP	binding-immunoglobulin
Ca ²⁺	calcium
cAMP	adenosine monophosphate cyclique
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCR	chemokine (C-C motif) receptor
CD	chondrocyte
CD	cluster of differentiation
CD	cytochalasine D
CHX	cycloheximide
CIA	collagen-induced arthritis
CL	cardiolipine
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2
CLR	récepteurs lectine de type C
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CMV	Cyto Megalo Virus
COX	cyclooxygenases
CP	concentré plaquettaire
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CR	récepteur du complément
CRP	collagen related peptide
DAMPs	motifs moléculaires associés aux dommages
DC	cellules dendritiques
DCIR	dendritic cell immunoreceptor
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DGLA	dihomo-gama-linoleic acid
DHA	acide docosahexaénoïque
DISC	death inducing signalling complex
DMS	demarcation membrane system
DTS	dense tubular system
EBV	virus epstein-barr

EC	cellules endothéliales
ECT	ectosome
EDA	eicosadienoic acid
EGF β	epidermal growth factor β
EMCV	encephalo-myocarditis virus
EPA	acide eicosapentaénoïque
EV	vésicule extracellulaire
FADD	FAS associated death-domain
FAP	polypose adénomateuse familiale
FLIPR	flow-induced protrusions
FLS	fibroblast like synoviocyte
fMLP	peptide formylé
FPR1	récepteur au fMLP
FR	facteur rhumatoïde
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor
GPI	glucose 6 phosphate isomérase
GTP	guanosine triphosphate
hCMV	cytomégalovirus humain
HIF	hypoxia inducible factor
HLA	human leucocyte antigen
Hsp 90	heat shock protein 90
HSPG	héparane sulfate des protéoglycans
HTLV-1	virus t-lymphotropique humain 1
IC	complexe immun
ICAM-1	inter cellular adhesion molecule
IFN	interferon
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IP	récepteur de PGI ₂
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITP	idiopathic thrombocytopenic purpura
JAM	junctional adhesion molecules
LA	linoleic acid
LB	lymphocyte B
LFA-1	lymphocyte function associated antigen
LO	lipoxigénase
LT	lymphocyte T
LTA ₄	leucotriène A ₄
LTB ₄	leucotriène B ₄
LTC ₄	leucotriène C ₄
LTE ₄	leucotriène E ₄
LXA ₄	lipoxine A ₄
MAC-1	macrophage antigen 1
MaR ₁	marésine 1
MCP-1	monocyte chemotatic protein
MEB	microscopie électronique à balayage
MEC	matrice extracellulaire
MET	microscopie électronique à transmission
miARN	microARN
MICL	lectine myéloïde inhibitrice de type C
MK	mégacaryocytes
MLS	macrophage like synoviocyte
MMP	métalloprotéinases
MO	moelle osseuse
MP	microparticule
MPO	myéloperoxydase
MVB	multi-vesicular bodies
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NET	neutrophils extracellular traps
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer

NLR	NOD like receptor
NO	oxyde nitrique
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OA	osteo arthritis ou arthrose
OB	ostéoblaste
OC	ostéoclaste
OCS	open canalicular system
OMS	organisation mondiale pour la santé
OPG	osteoprotegerin
PAD	protéine-arginine déaminase
PAF	platelet activating factor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAMPs	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PF4	platelet factor 4
PG	phosphatidylglycerol
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGF ₂ α	prostaglandine F ₂ α
PGH ₂	prostaglandine H ₂
PGI ₂	prostaglandine I ₂ ou prostacycline
PI3K	phosphatidylinositide 3-kinases
PKC	protein kinase C
PMA	phorbol myristate acetate
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRR	pathogen recognition receptor
PS	phosphatidylsérine
PSGL-1	p-selectin glycoprotein ligand 1
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

ROCK1	rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1
ROS	reactive oxygen species
RvD ₁	résolvine D ₁
RvD ₂	résolvine D ₂
RvD ₅	résolvine D ₅
RvE ₁	résolvine E ₁
SAM	sorting and assembly machinery
STS	staurosporine
T°	température
TGFβ ₁	transforming growth factor beta 1
TGN	trans golgi network
THP-1	Human monocytic leukemia cell line
TLR	toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRBP2	TAR RNA-binding protein 2
TXB ₂	thromboxane B ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
VDAC	voltage dependent action channel
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4	very late antigen-4
vWF	facteur von Willebrand
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
12-HpETE	12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid
12-HETE	12-hydroxyeicosatetraenoic acid
12-LO	12-lipoxygénase
15-LO	15-lipoxygénase
5-LO	5-lipoxygénase

A mes parents, à mon frère,

« En persévérant, on arrive à tout ».

Théocrite

Remerciements

Le manuscrit que vous vous apprêtez à lire résume le travail de mes quatre années de doctorat. La thèse est un travail de longue haleine, un défi tant intellectuel que personnel. Cette aventure est accessible lorsque l'encadrement, la bonne ambiance et le soutien des proches sont combinés. Ces quelques paragraphes seront destinés aux remerciements des personnes impliquées de près ou de loin dans mon doctorat.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury composés du Dr Caroline Gilbert, du Dr. Marek Rola-Pleszczynski et du Dr. Paul Naccache d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Mes premiers remerciements vont à mon mentor le docteur Eric Boilard. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour la formation scientifique de qualité qu'il m'a transmise, pour tous les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ma thèse et qui seront sans aucun doute des atouts pour mon futur. Le Dr Boilard n'est pas seulement un excellent superviseur scientifique et pédagogue, c'est aussi une personne ayant à cœur qu'une bonne ambiance règne dans son équipe et que ses étudiants se sentent bien. Je lui suis reconnaissante ainsi qu'à sa femme Clémence, pour leur accueil, un certain 20 août 2010 où la soirée avec eux me permit de faire leur connaissance et d'amorcer un début d'adaptation. Je le remercie d'avoir organisé de nombreuses soirées sous la forme de 5à7 et de barbecues, pour souligner toutes les occasions spéciales (subventions, papiers, revues..). J'en garde de très bons souvenirs.

J'aimerais aussi témoigner ma gratitude à la docteure Nathalie Cloutier pour le temps qu'elle a consacré et pour son aide tout au long de mon cheminement. Nathalie est un des moteurs de l'équipe avec qui il est très agréable de travailler. J'ai aussi beaucoup apprécié nos nombreuses discussions sur les randonnées et les voyages.

Je voudrais aussi remercier Tania Lévesque, professionnelle au doigt de fée. Elle m'a appris avant son arrivée dans le laboratoire à préparer des neutrophiles. Elle a commencé ses premiers protocoles dans l'équipe avec moi, sur les microparticules et l'utilisation de

très petites quantités de neutrophiles pour le HPLC. Je n'oublierai pas les moments à l'extérieur du laboratoire, avec son accueil chaleureux pour une fondue, ou repas de cabane à sucre. Je ne peux pas omettre son côté proche de la nature et des animaux qui m'ont fait découvrir des espèces insolites.

Je voudrai aussi remercier le docteur Luc Boudreau pour nos nombreuses discussions au sujet des médiateurs lipidiques, pour notre collaboration très intéressante et fructueuse au sujet du rôle de la sPLA₂-IIA sur les mitochondries. Je n'oublierai pas les soirées et les fréquentes discussions sur le hockey en saison régulière, mais surtout en série. Je le remercie aussi de m'avoir fait découvrir l'Acadie et ses coutumes, à partir de Québec.

Je remercie aussi « Manue » ou le docteur Emmanuelle Rollet-Labelle. Avant son arrivée dans notre équipe, elle était déjà ma « maman » québécoise, toujours veillante sur mon bien-être personnel et scientifique. Merci pour nos nombreuses discussions scientifiques notamment sur le monde des neutrophiles et la signalisation cellulaire. Je lui suis aussi reconnaissante pour son aide dans les nombreuses relectures de mon papier ainsi que ses divers enseignements. Je la remercie aussi pour nos discussions France/Québec et pour son soutien.

Je remercie Matthieu ou plutôt le docteur Rousseau, pour sa disponibilité et pour nos diverses discussions scientifiques. Je n'oublierai pas ses petites blagues qu'il prenait un malin plaisir à me faire. Nous aurons passé aussi de bons moments à l'extérieur du laboratoire avec tout « le groupe des Français ».

Merci à ma collègue et amie Geneviève Marcoux. Elle est arrivée au laboratoire pour faire sa maîtrise et va continuer au doctorat sur la suite de mes différents projets, ce qui me réjouit. Je suis persuadée que ces différentes études donneront à leur tour de belles découvertes. Je n'oublierai pas l'intermotivation que nous avons pour aller nager tôt le matin avant de nous rendre au laboratoire.

Je remercie Imène, Nicolas et Yann, pour les bons moments passés dans le laboratoire et à l'extérieur. Je vous souhaite une belle aventure pour vos doctorats respectifs dans le laboratoire. Je tiens aussi à remercier les personnes que j'ai pu côtoyer dans le laboratoire, Valérie Garceau, Morgane Baron, Maxime, Antony, Eloïse et Andréa pour les bons moments que nous avons passés.

Je tiens à remercier tout le groupe d'étudiants sur le 1^{er} étage du bloc T, Jouda Gamara et son mari Sofiène, Geneviève Marcoux et Simon, Geneviève Bertheau-Mailhot, Aurélie Corduan et son mari Nicolas Lescarret, Audrey Hubert et Yanis, Benoit Laffont et Nadège, Matthieu Rousseau et Caroline, Mathieu Iampietro et Sharon, Halima, Weili, Irina, Abderrahim, Audrey Magron et Eric, ainsi que le groupe d'étudiant du troisième étage, Caroline, Mickael, Raifish et Akin pour tous les bons moments passés dans les laboratoires ou à l'extérieur.

Je remercie aussi tous mes amis de France (Jérôme, Aurélie et Claire, Marie Jo, Pauline, Koulmig, Romain et Céline, Anne et Maximilien), les amis du Club de plein air (Véronika, Yang, Charline, Audrey, Jean) et les amis de Québec (Sonia et Bruno, Dan et Laurie, Jean-François, Louis-Philippe et Audrey, Dominique et Carol) pour leur amitié et leur soutien.

Je remercie ma belle-famille ou deuxième famille d'adoption qui m'a accueillie comme si j'étais leur fille. Je remercie Christiane et Marc, pour leur accueil et leur compréhension de mes horaires. Je remercie Caroline et Patrick, avec qui nous développons une belle amitié.

Je remercie mon conjoint Maxime pour la patience dont il a fait preuve ces quelques années passées. Merci de m'avoir supportée tout au long de ma thèse, où pratiquement tous les soirs et fins de semaine, j'étais sur mon ordinateur à lire et à écrire. Je lui suis très reconnaissante pour son support moral, ses nombreux encouragements et le bonheur qu'il m'apporte.

Enfin, je tiens à souligner que le soutien de ma famille fut très important. Je remercie mes parents Janine et Jean qui m'ont soutenue dans mes choix et m'ont encouragée. C'est grâce à eux que je suis là aujourd'hui c'est pourquoi je leur dédis ma thèse. Je tiens à préciser que mes parents ont tout mis en œuvre, pour que leurs deux enfants puissent faire leurs études sereinement, même s'il fallait faire de nombreux sacrifices. Ils ont toujours cru en moi, en mes capacités (même si moi-même je n'étais pas convaincue). Je les remercie de l'éducation qu'ils m'ont inculquée, le goût du travail, la soif d'apprendre et d'avoir développé cette curiosité qui m'habite.

Je remercie aussi mon frère, Jean-Bernard, lui aussi en thèse, mais dans un tout autre domaine : la physique. Nous avons toujours eu une belle complicité, alors séparé de 6000 km, Skype et Facebook nous ont permis de faire un pont entre les 2 continents à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit, peu importe le fuseau horaire. Ses voyages en Amérique du Nord ciblaient toujours la côte Est pour que je puisse le rejoindre et passer quelques jours en sa compagnie.

Avant-propos

Dans les années 1980, une des premières phospholipases A₂ sécrétées (sPLA₂) fut découverte dans les articulations et liquides synoviaux (liquide lubrifiant les articulations) des patients atteints d'arthrite. Il s'agit de la sPLA₂-IIA appelée aussi PLA₂ synoviale ou inflammatoire. Au cours des trente années qui suivirent sa détection, son activité enzymatique et ses fonctions bactéricides ont été dévoilées. Cependant, son rôle et ses cibles dans l'arthrite restèrent non élucidés.

Quelques mois avant mon arrivée au laboratoire, mon superviseur le Dr Boilard observe et publie dans le journal EMBO Molecular Medicine que la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA (sPLA₂-IIA) est impliquée dans la sévérité de l'arthrite dans un modèle murin. En parallèle, il constate et publie dans le journal Science que les plaquettes et leurs microparticules jouent un rôle dans l'arthrite. Les plaquettes sont des éléments anucléés du sang impliqués dans la coagulation. Elles produisent des microparticules par bourgeonnement, lesquelles sont abondantes dans les liquides synoviaux des patients arthritiques. Nous avons alors posé les questions suivantes : est-ce que les microparticules peuvent être une cible de la sPLA₂-IIA dans les liquides synoviaux ? Existe-t-il d'autres cibles de la sPLA₂-IIA dans ces fluides ? Quelles sont les conséquences de ces interactions entre la sPLA₂-IIA et ses cibles, sur les cellules impliquées dans la pathologie ?

Dans cette thèse de doctorat, nous apportons des réponses à ces questions. Deux cibles de la sPLA₂-IIA ont été mises en évidence. Elles sont dévoilées dans les chapitres 2 et 3. Les impacts de ces interactions entre la sPLA₂-IIA et ses cibles sont décrits dans les chapitres 2 à 4. Les résultats obtenus au chapitre 2 et 3 ont été publiés dans le journal Blood et PNAS respectivement. Plusieurs projets sur l'implication de la sPLA₂-IIA dans l'arthrite inflammatoire ont été menés. Ces projets sont en cour de finalisation pour publication et ne seront pas insérés dans ce manuscrit par soucis de clarté.

Plusieurs projets scientifiques développés dans le laboratoire durant mon doctorat ont amené de nouvelles connaissances sur les sPLA₂ et sur les microparticules de plaquette. J'ai participé à la revue de littérature et à la rédaction d'une revue sur l'hétérogénéité des

microparticules de plaquettes publiée dans Current Opinion in Hematology. Elle est présentée dans l'Annexe 1. J'ai contribué à quelques collectes de résultats publiés et cités ci-dessous. Ces travaux n'étant pas en lien direct avec mon projet de doctorat, ils ne seront pas insérés dans mon manuscrit.

« Platelet biochemical properties and microparticle release during extended storage of platelet concentrates. »

Geneviève Marcoux, **Anne-Claire Duchez**, Matthieu Rousseau, Tania Lévesque, Luc H. Boudreau, Louis Thibault and Eric Boilard soumis à Vox Sanguinis 2015.

« Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function. »

Benoit Laffont, Aurélie Corduan, Matthieu Rousseau, **Anne-Claire Duchez**, Éric Boilard, Patrick Provost soumis à Thrombosis and Haemostasis 2015.

« Action of secreted phospholipase A₂ on microparticles from different cellular lineages. Impact of membrane hydrolysis on microparticle detection and quantification.»

Matthieu Rousseau, Clémence Belleannée, **Anne-Claire Duchez**, Nathalie Cloutier, Tania Lévesque, Frédéric Jacques, Jean Perron, Peter A. Negrovic, Mélanie Dieude, Marie-Josée Hébert, Michael H. Gelb and Eric Boilard PLoS One. 2015 Jan 14;10(1)

« Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. »

Laffont B, Corduan A, Plé H, **Duchez AC**, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Blood. 2013 Jul 11; 122(2): 253-61.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Arthrite rhumatoïde

1.1.1. Définition et épidémiologie

Dès l'Antiquité, les Grecs utilisaient le mot *arthritis* pour désigner une atteinte articulaire inflammatoire. Ce terme peut regrouper plus d'une centaine de pathologies affectant les articulations dont les plus communes sont l'arthrite rhumatoïde (AR), l'arthrite juvénile idiopathique (AJI) et la goutte. L'arthrose ne fait pas partie de ces pathologies car elle résulte d'une détérioration mécanique des articulations au fil de la vie. L'AR est quant à elle, une maladie auto-immune systémique, douloureuse qui détruit les articulations menant à une incapacité motrice progressive. Cette pathologie est incurable même s'il existe des traitements visant à améliorer la qualité de vie des patients.

Selon les chiffres de l'organisation de la santé mondiale (OMS, 2003), l'AR affecte 0,3 à 1% de la population mondiale. Au Canada, 4,6 millions de personnes de plus de 15 ans souffrent de l'AR, soit un adulte sur six. L'incidence de l'AR est plus élevée chez les femmes (ratio 1 pour 3). Elle peut se développer à n'importe quel âge cependant l'AR est souvent diagnostiquée vers 50 ans.

1.1.2. Pathologie

1.1.2.1. Les symptômes

Les symptômes articulaires dans l'AR sont caractérisés par l'inflammation de la synovie (membrane qui tapisse l'intérieur des articulations) accompagnée d'une infiltration de cellules immunitaires et la formation d'un pannus (épaississement des membranes synoviales dû à une prolifération des synoviocytes) conduisant à la destruction du cartilage et de l'os (Figure 1-1). Les patients atteints d'AR présentent des complications périarticulaires qui se manifestent au niveau cardiaque (péricardite), des yeux (épisclérite), des vaisseaux sanguins (vascularite) et de la peau (nodule rhumatoïde).¹⁻⁵ Enfin, le risque de maladies cardiovasculaires et de développement de cancer, notamment des lymphomes, est élevé pour les patients atteints d'AR.⁶⁻⁸

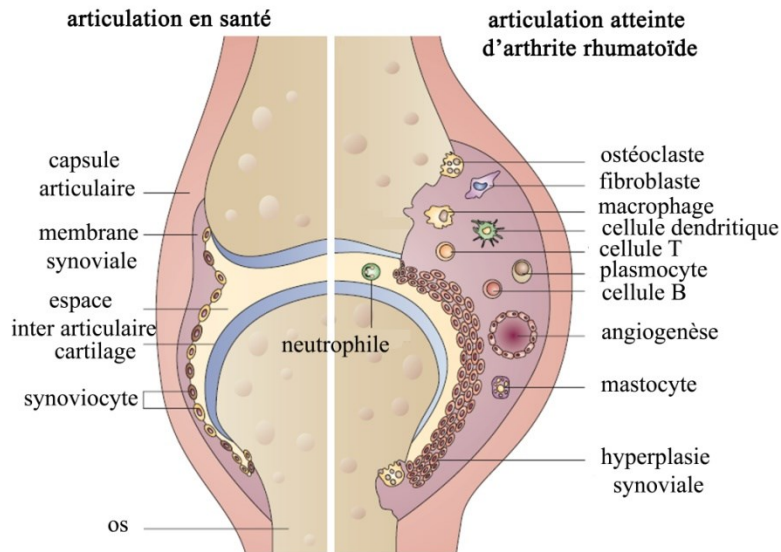


Figure 1-1. Articulation en santé et atteinte d'arthrite rhumatoïde. Modifiée à partir de Strand et al.⁹

1.1.2.2. Les causes potentielles

Les causes exactes de l'AR sont inconnues, toutefois, l'AR une pathologie multifactorielle avec des prédispositions génétiques et épi-génétiques pouvant être influencées par des facteurs environnementaux (comme la pollution, la cigarette et le microbiome) et des facteurs hormonaux (tel que les œstrogènes).¹⁰⁻¹⁴ Les femmes sont plus susceptibles de développer une maladie auto-immune en partie, attribuée à leur second chromosome X et à leurs hormones.¹⁵⁻¹⁷

Le développement de l'AR serait lié au patrimoine génétique des patients où la prévalence de l'AR est plus forte chez les vrais jumeaux que chez les faux jumeaux.¹⁸ Plusieurs gènes notamment ceux codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH) DR sont associés à l'AR. Le *locus* majoritaire exprimé chez les patients atteints d'AR est le HLA-DRB1.^{19,20} Les *loci* HLA-DR4, -DR14, -DR1 et CTLA4 sont aussi liés à la maladie.¹⁹⁻²² Certains polymorphismes dans les gènes non HLA tels que les gènes PTPN22, PADI4, FCRL3 et CD244 accroissent aussi la susceptibilité à l'AR.²³⁻²⁵ Cette liste de gène est non exhaustive et a récemment été complétée par la détection d'une quarantaine de nouveaux *loci* associés à l'AR grâce à une méta-analyse du génome humain avec une cohorte de 100 000 patients européens et asiatiques.²⁶

La plupart des pathologies immunitaires dont l'AR sont influencées par l'environnement extérieur tel que le stress, la pollution et l'hygiène de vie (tabagisme, consommation d'alcool et de café, mauvaise alimentation).²⁷⁻³¹ Les diètes méditerranéennes, riches en acides gras omega3, quant à elles, protègent de l'AR.^{32,33}

Le microbiote peut aussi influencer fortement la réponse immunitaire innée ainsi que le développement des maladies auto-immunes telles que l'AR.³⁴⁻³⁶ Une perte de la tolérance du système immunitaire face aux bactéries commensales induit une dysbiose intestinale et mucoale, qui joue un rôle important dans le développement de l'AR.^{34,37,38} Dans les modèles animaux d'arthrite inflammatoire, les souris *germ free* développent une arthrite modérée contrairement aux souris dans un environnement non contrôlé. Ces observations indiquent que le microbiote joue un rôle dans la pathologie de l'AR.³⁹⁻⁴¹ Enfin certains virus tels que le parvovirus B19, le cytomégalo virus humain (hCMV), le virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV-1), le virus de l'herpès et le virus Epstein-Barr (EBV) sont aussi soupçonnés d'être des acteurs de l'initiation de l'AR.⁴²⁻⁴⁵

1.1.2.3. Le développement de l'arthrite rhumatoïde avec ses acteurs cellulaires et moléculaires

De nombreuses études tendent à diviser le développement de la maladie en plusieurs étapes. Les premières phases correspondent au développement de la réponse immune à un agent inconnu avec la génération d'auto-anticorps tels que les anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (ACPA), de complexes immuns (ICs) et de facteurs rhumatoïdes (FR). Cependant certains patients arthritiques n'ont pas de FRs ou d'ACPA. Les étapes qui suivent l'apparition des auto-anticorps se caractérisent par la manifestation de symptômes articulaires avec des dommages irréversibles causés par la réponse inflammatoire (Figure 1-2). L'évolution de la maladie peut dépendre de plusieurs facteurs, dont les traitements qui peuvent diminuer l'état inflammatoire des patients mais les rendent aussi plus susceptibles à développer des infections.

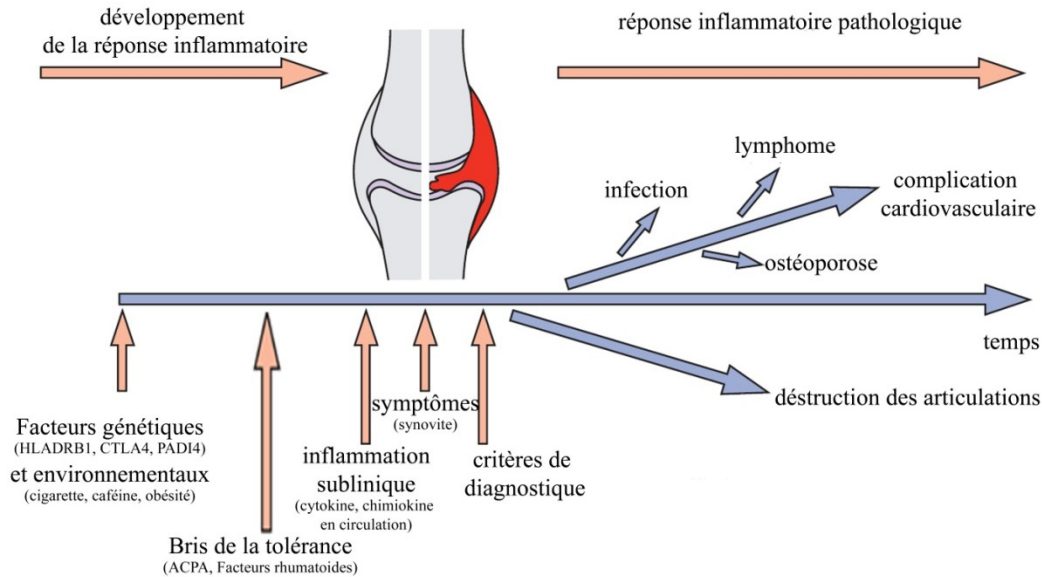


Figure 1-2. Evolution de l'arthrite rhumatoïde. Modifiée à partir de Isaacq et al et Klareskog et al.^{46,47}

1.1.2.3.1. Initiation de l'arthrite rhumatoïde

L'AR est une maladie inflammatoire, dans laquelle le système immunitaire est activé. Les causes de cette activation sont inconnues et plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer les causes de la maladie. Certaines études évoquent les infections bactériennes ou virales, d'autres suggèrent l'implication du microbiome et des facteurs environnementaux.

Les patients atteints d'AR souffrent précocement d'inflammation péribronchique et périodontale où notamment des bactéries telles que *Porphyromonas gingivalis* sont fréquemment impliquées.^{48,49} Les agents pathogènes peuvent être reconnus par différents récepteurs dont les récepteurs Toll (TLR) exprimés notamment pas les mastocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques (DCs). Les TLRs sont des récepteurs de surface et endosomaux, reconnaissant spécifiquement des molécules microbiennes et endogènes. Les TLRs de surface (2, 3, 4) et endosomaux (7 et 9) sont surexprimés dans le synovium des patients atteints d'AR⁵⁰⁻⁵² où ils contribuent aux processus inflammatoires et à la destruction des articulations.⁵²

L'activation des TLRs ainsi que les polluants peuvent augmenter l'expression de la protéine-arginine déaminase (PAD),⁵³ qui convertit les acides aminés arginine en citrulline et par conséquent augmente la citrullination des protéines. Ce processus crée de nouveaux antigènes qui serviront de cibles à l'auto-immunité, chez l'humain et la souris.⁵⁴ Les tissus et liquides synoviaux de patients arthritiques surexpriment les PAD2 et 4.⁵⁵⁻⁵⁸ Elles citrullinent plusieurs protéines dont la vimentine, la filagrine, l' α -énolase, le fibrinogène, le collagène de type I et II, la fibronectine, les histones et la protéine de choc thermique hsp90, lesquelles sont détectées dans les poumons et le *synovium* des patients atteints d'AR.⁵⁹⁻⁶⁹ La majorité de ces protéines citrullinées décorent les *neutrophils extracellular traps* (NET) et les autres types d'*extracellular traps* (ET) provenant de l'activation des mastocytes par exemple.^{68,70,71}

Des peptides de protéines citrullinées sont présentés par les DCs aux lymphocytes T (LT) dans des tissus lymphoïdes ectopiques localisés dans les poumons des patients atteints d'AR. Ces LTs activent en retour les lymphocytes B (LB) et promeuvent leur maturation en plasmocytes. Des anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (ACPA), le collagène de type II, le hnRNP, la glucose phosphate isomérase (GPI), la protéine BiP et les FRs sont produits dans les poumons.^{48,69,72-74} Les FRs sont des anticorps qui reconnaissent la portion Fc des immunoglobulines (Ig) de type G, M et A.⁷⁵ Dans l'AR, toutes les immunoglobulines sont représentées (IgA, IgE, IgG, IgM). Ces Ig et les FRs sont détectés en abondance dans le le sérum des patients AR avant les symptômes pathologiques, ainsi que dans les articulations.^{76,77}

En résumé, les pathogènes et les polluants activent les leucocytes et le système immunitaire devient intolérant notamment aux protéines citrullinées menant à la production d'auto-anticorps. Les ACPAs, les FRs et les autres anticorps peuvent se lier à leurs antigènes et forment aussi des complexes immuns (ICs) qui se retrouvent en circulation.

1.1.2.3.2. Propagation de l'arthrite rhumatoïde

Les ICs et FRs en circulation contribuent à la pathologie de diverses manières. Les ICs lient des récepteurs de surface cellulaire (récepteur Fc), induisent des vasculites en se

déposant dans les veinules de la membrane synoviale et atteignent le synovium où ils peuvent reconnaître des antigènes spécifiques au cartilage.

Les récepteurs Fc sont classés selon leur capacité à reconnaître la chaîne lourde des Ig et par conséquent la lettre grecque suivant les Fc correspond à l'isotype de l'immunoglobuline. Ainsi les Fc ($\alpha, \gamma, \epsilon, \mu$) correspondent respectivement à la reconnaissance des IgA, IgG, IgE et IgM. Chez l'homme neufs récepteurs Fc γ sont exprimés dont Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, FcRn, FcRL5 et TRIM21.⁷⁸ Chez l'homme, ces récepteurs Fc γ sont exprimés sur les neutrophiles (Fc γ RI, IIA, IIB, III), les mastocytes (Fc γ RIIB1, III), les macrophages (Fc γ RI, IIA, IIB2), les éosinophiles (Fc γ RI, IIA, IIB2, III), les LBs (Fc γ RIIb1), les DCs (Fc γ RI, IIA), les cellules NKs (Fc γ RIII) et les plaquettes (Fc γ RIIA). Les ICs permettent le pontage de plusieurs récepteurs Fc et déclenchent une cascade de signalisation menant à l'activation de la cellule. Le récepteur Fc γ RIIB possède quant à lui un *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* (ITIM) sur sa portion cytoplasmique qui ne peut pas induire de cascade de signalisation menant à l'activation cellulaire. Les récepteurs Fc γ RIIb et Fc γ RIII sont impliqués dans l'AR.⁷⁹⁻⁸¹

La microvasculature des membranes synoviales de patients arthritiques est altérée et perméable.⁸²⁻⁸⁶ Dans l'AR, les ICs en circulation contribuent à la perméabilité vasculaire des vaisseaux sanguins via la stimulation des récepteurs Fc γ RIII des mastocytes induisant la sécrétion des granules riches en sérotonine et histamine qui mènent au « flare » ou à la vasodilatation rapide des vaisseaux.^{85,87,88} Par ailleurs, GPVI permet l'activation des plaquettes qui peuvent produire alors des microparticules (MPs) en libérant aussi la sérotonine de leurs granules denses.⁸⁹ La sérotonine est une des origines de la formation des gaps (espacement) au niveau des cellules endothéliales (ECs) de la vasculature péri-articulaire.⁸⁹ Les processus de vasodilatation peuvent être induits par plusieurs molécules telles que le facteur activant les plaquettes (PAF), le thromboxane A₂ (TXA₂), la prostacycline (PGI₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine E₂ (PGE₂), le 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) et les leucotriènes B₄ et B₅ (LTB₄ et LTB₅).⁹⁰⁻⁹⁴ Ces espacements entre les ECs pourraient laisser passer les ICs et les MPs impliquées dans

la sévérité de la maladie.^{89,95-98} L'implication des plaquettes et des MPs dans l'AR sera développée au point 1.3.5.

Les ICs et les ACPAs rejoignent les articulations où ils s'associent à leurs épitopes dans le synovium et le cartilage.⁹⁹ Les anticorps dirigés contre le collagène du cartilage induisent notamment l'activation de la voie du complément classique et alternative.¹⁰⁰⁻¹⁰² Le système du complément est composé de protéines plasmatiques qui opsonisent les pathogènes et certaines de ces protéines telles que C3a, C5a, C5b-9 et le facteur B ont été identifiés dans les tissus articulaires pathologiques.¹⁰³⁻¹⁰⁸

Les protéines du complément, les ICs et les MPs activent les cellules dans les articulations arthritiques à produire des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des protéases.^{95,96,109,110} Les cytokines et chimiokines sont variées dans les tissus et les liquides synoviaux arthritiques dont les plus connues sont le TNF α , le GM-CSF, l'IFN γ , l'IL-6 et l'IL-8.^{110,111} L'AR est considérée comme une maladie dépendante des cellules Th1 caractérisées par les cytokines IFN γ et TNF α . L'IFN γ active plusieurs types cellulaires, dont les macrophages et les synoviocytes fibroblastiques (FLS) à produire des cytokines pro-inflammatoires. Le TNF α quant à lui stimule la production d'autres cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF contribuant à amplifier la réponse inflammatoire. Plusieurs traitements de l'AR visent à neutraliser les cytokines ou leurs récepteurs. Les traitements anti-TNF α dont l'éтанercept, l'infliximab, l'adalimumab, le golimumab et le certolizumab sont efficaces et ont donc révolutionné les thérapies pour l'AR. L'IL-6, le *monocyte chemotatic protein* (MCP-1) et l'IL-8 sont sécrétées par les FLS et MLS pour attirer les macrophages et neutrophiles dans l'articulation.^{112,113}

En somme, les ICs contribuent à l'inflammation en activant les cellules. Par ailleurs, la libération de sérotonine induit la fenestration des vaisseaux sanguins qui pourrait permettre le passage des MPs et des ICs. Ces derniers activent les cellules des tissus et des liquides synoviaux à produire des cytokines et chimiokines pour attirer d'autres leucocytes notamment. L'inflammation chronique s'installe à la suite de la production incessante de cytokines et de leucotriènes par les cellules dans l'articulation.

1.1.2.3.3. Dommages articulaires de l'arthrite rhumatoïde

La formation du pannus dans l'AR est imputée aux FLS.¹¹⁴ Ces cellules sont sensibles aux cytokines, aux eicosanoïdes et aux conditions hypoxiques des *synovium* arthritiques.¹¹⁵⁻¹¹⁸ HIF1 α et les cytokines telles que IL-1 β induisent notamment la sécrétion d'eicosanoïdes dont la PGE₂, de facteurs de croissance tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8 et le M-CSF.^{119,120} Ces molécules stimulent divers processus actifs dans l'AR dont l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, la prolifération des FLS (formation du pannus) et la chimiotaxie de leucocytes.¹²¹⁻¹²⁴ Cette croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques augmente l'alimentation des articulations en cellules immunitaires, en nutriments et en ICs.¹²⁵⁻¹²⁷ Le pannus envahit le cartilage où les FLS sécrètent des métalloprotéinases (MMP) telles que les collagénases (MMP1 et MMP13), la MMP3, les aggrecanases et les cathepsines, qui dégradent la matrice cartilagineuse et donc le cartilage.^{114,120,128}

Le remodelage osseux est un processus finement régulé entre la synthèse de matrice osseuse par les ostéoblastes (OBs) et la destruction de cette matrice par les ostéoclastes (OCs). Un déséquilibre en faveur de l'ostéoclastogénèse est observé dans l'AR où la différenciation en OCs est activée via les fortes concentrations de RANKL, produites par différentes cellules dans l'articulation dont les FLS.¹²⁹⁻¹³¹ Par ailleurs, les ACPA spécifiquement dirigés contre la vimentine induisent la différenciation en OCs matures qui résorbent la matrice osseuse en sécrétant des métalloprotéinases (MMP9), cathepsine K et des protons H⁺.¹³²

1.1.2.3.4. Les médiateurs lipidiques dans l'arthrite rhumatoïde

Les médiateurs lipidiques sont impliqués dans la pathogenèse de l'AR. Cependant, il est difficile de cerner les moments où ils interviennent dans l'initiation et la propagation de la maladie.

Les médiateurs lipidiques appelés aussi eicosanoïdes regroupent les leucotriènes et les prostaglandines. Ils sont produits par différents types cellulaires dont les neutrophiles,

les plaquettes et les FLS.¹³³⁻¹³⁸ La formation des eicosanoïdes est issue de l'action de diverses enzymes (détaillées dans la figure 1-3) sur les acides gras libérés des membranes plasmiques par les PLA₂. Les acides gras tels que l'acide arachidonique (AA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont détectés en forte quantité dans le *synovium* arthritique.¹³⁹ L'AA peut être métabolisé par diverses enzymes abondantes dans le *synovium* des patients atteints d'AR comme la COX-1, la COX-2, la 5-lipoxygénase (5-LO) et la 15-lipoxygénase (15-LO).^{140,141} La voie des COX et des prostaglandines synthases génèrent du TXB₂, de la PGI₂, de la PGE₂ et de la PGF₂α, qui sont plus abondants dans les liquides synoviaux des patients atteints d'AR comparés aux personnes en santé^{139,142,143} et sont aussi suspectées être importantes dans la pathologie. Certains traitements tels que l'Indoprofen et les *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) ciblent les dérivés de COX et améliorent les symptômes de la maladie.¹⁴³ Le LTB₄ est détectés dans les liquides synoviaux de patients arthritiques^{144,145} ainsi que d'autres eicosanoïdes tels que le 5,12(S)-diHETE, la lipoxine LXA₄, la marésine MaR₁ et la résolvine RvD₅.¹³⁹ Les lipoxines, les marésines et les resolvines sont des lipides anti-inflammatoires permettant la résolution de l'inflammation.¹⁴⁶ En effet, LXA₄ diminue les dommages tissulaires causés par les neutrophiles en induisant une meilleure adhésion de ces derniers aux ECS, et en inhibant leur migration.^{147,148} La RvE₁ inhibe la résorption de l'os par les OCs au niveau du périoste et la chimiotaxie du neutrophile.¹⁴⁹ La RvD₁ inhibe aussi la transmigration des neutrophiles tandis que la RvD₂ diminue l'adhésion des neutrophiles aux ECs.^{150,151}

Les liquides et les tissus synoviaux contiennent des phospholipases A₂ sécrétées (sPLA₂) dont les majoritaires sont la sPLA₂-IIA et la sPLA₂-V qui sont impliquées dans la sévérité de la maladie.¹⁵²⁻¹⁵⁷ Ces sPLA₂ hydrolysent les phospholipides membranaires libérant des acides gras et des lysophospholipides. Ces derniers comme le LPC, le LPS et le LPE sont détectés en abondance dans les liquides synoviaux des patients arthritiques comparés à des patients arthrosiques.^{139,158}

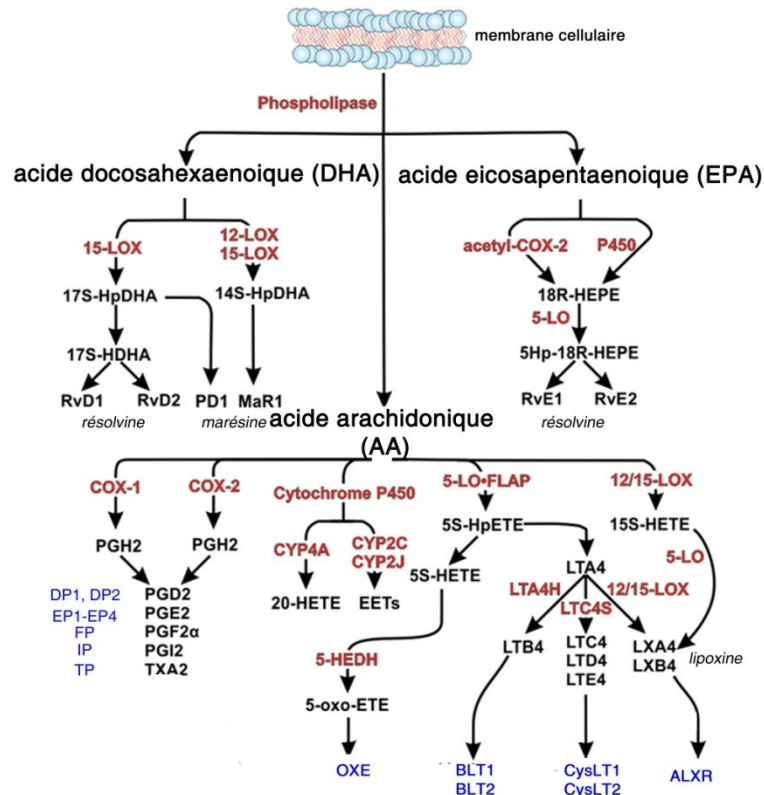


Figure 1-3. Les médiateurs lipidiques et leurs récepteurs. Modifiée à partir de J.P O'Connor et al.¹⁵⁹ Les enzymes sont écrites en rouge, leurs produits en noir et les récepteurs des eicosanoïdes en bleu.

1.1.3. Les modèles animaux d'étude de l'arthrite

1.1.3.1. Généralités

De nombreux modèles animaux sont utilisés à l'heure actuelle pour étudier l'AR et sont résumés ci-dessous (Tableau 1-1). Le modèle d'arthrite induit au collagène (CIA) est le modèle murin le plus utilisé dans les industries pharmaceutiques. Dans notre laboratoire nous utilisons le modèle K/BxN qui sera détaillé au point 1.1.3.2.

1.1.3.2. Le modèle K/BxN

Le modèle K/BxN a été découvert de manière fortuite après le croisement de souris KRN [TCR transgénique qui reconnaît un peptide bovin pancréatique de ribonucléase (RNase 45-56) présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II) avec la molécule I-A^k] et d'une souris NOD (non obèse diabétique).^{160,161}

Tableau 1-1. Les modèles animaux d'arthrite. Modifié à partir de Van de Berg et al.¹⁶²
 IC : complexe immunitaire, LT : modèle dépendant des lymphocytes T.

Modèle animal	Abbréviation	Espèce	Caractéristique	IC	LT
Modèle induit					
Stimuli immuns non spécifiques					
Arthrite induite par adjuvant	AA	rat Lewis	Auto-immune	-	+
Arthrite induite par huile	OIA	rat DA	Auto-immune	-	+
Arthrite induite par pristane	PIA	rat DA	Auto-immune	-	+
Auto-immunité dirigée contre le cartilage					
Arthrite induite par le collagène	CIA	souris DBA/1		+	+
Arthrite induite par le protéoglycan	PGIA	souris Balb/c		+	+
Agents infectieux/déclencheur exogènes					
Paroi cellulaire de streptocoques	SCW-A	rat Lewis		-	+
Flare	SCW-F	souris	Th17	-	+
Arthrite induite par antigène	AIA	souris, lapin		+	+
Flare	AIA-F	souris	Th17	-	+
Modèle transgénique spontané					
Arthrite induite par HTLV	HTLV	souris	Antigène viral tax	-	+
Arthrite KRN	KRN	souris K/BxN	Antigène GPI	+	+
Arthrite SKG	SKG	souris	Déficiences ZAP-70	-	+
Arthrite GP130	GP130	souris	Surexpression de TNF	-	-
Arthrite TNF transgénique	TNFg	souris	Cellules T auto-immunes	+/-	+
Arthrite IL-1ra transgénique	IL1-ra-/-	souris Balb/c	Surexpression IL-1	-	-
Arthrite IL-1 transgénique	IL-1Tg	souris			
Complexes immuns					
Collagène de type II	CIA ou AIA	souris DBA/1		+	-
Sérum K/BxN	GPI	souris K/BxN		+	-
Poly-L-lysine-lysozyme	PLL-L	souris DBA/1		+	-

Les souris issues de cet accouplement se nomment K/BxN. Elles développent spontanément une arthrite inflammatoire symétrique présentant plusieurs caractéristiques communes avec l'AR chez l'humain. L'invasion de leucocytes, en majorité de neutrophiles, la prolifération des synoviocytes, la formation d'un pannus, l'érosion du cartilage et de l'os sont retrouvés dans ce modèle murin.^{160,161} Les souris K/BxN développent l'arthrite lorsqu'elles sont âgées de quatre semaines et la maladie persiste toute leur vie.

L'initiation de l'arthrite dans les souris K/BxN est une réaction auto-immune. Dans le contexte de la molécule de CMH de classe II Ag⁷ provenant de la souris NOD, le TCR provenant de la souris KRN reconnaît un second peptide dérivé d'une protéine ubiquitaire

la glucose 6 phosphate isomérase (GPI).¹⁶³ Les LTs exprimant le TCR transgénique, induisent la maturation et la différenciation des LBs en plasmocytes productrices d'anticorps arthritogéniques anti-GPI^{163,164} qui se déposent dans les articulations initiant le processus inflammatoire (Figure 1-4).

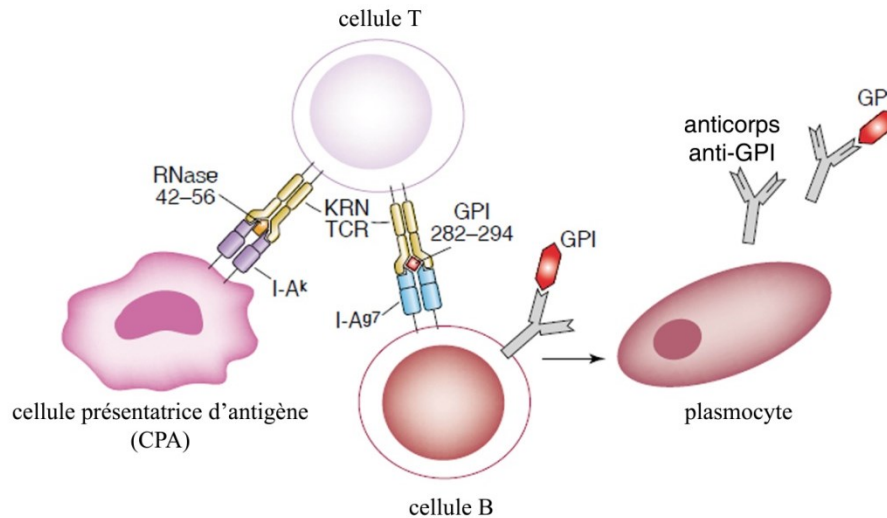


Figure 1-4. Le modèle K/BxN. Modifiée d'après Ditzel et al.¹⁶⁵

Le transfert du sérum des souris K/BxN à des souris de souches diverses (Balbc, C57BL6 etc..) induit une arthrite rapide (en 24 heures) et transitoire (résolution de la maladie après 15 jours). Ce sérum ne contient pas de FRs cependant, il est riche en anticorps anti-GPI (>10mg/ml) qui ciblent les GPI endogènes dans le cartilage.^{167,174,175} Les Ig dont les IgG₁ sont à l'origine d'une arthrite soutenue et érosive après le transfert.¹⁶⁶ Chronologiquement, l'injection du sérum K/BxN induit dans la première heure la dégranulation des mastocytes. Puis un à deux jours après l'injection de sérum, les neutrophiles migrent dans l'articulation.^{167,168} L'hyperplasie synoviale accompagnée d'une migration de cellules mononucléaires, la formation du pannus et l'érosion de l'os et du cartilage sont observées une semaine après l'injection de sérum K/BxN.¹⁶⁰ Le modèle de transfert de sérum K/BxN induit une arthrite inflammatoire indépendamment des LTs et des LBs. Toutefois, les neutrophiles, les mastocytes, les plaquettes et les FLS comme dans l'AR chez l'homme sont aussi impliqués dans le développement de l'arthrite après transfert de sérum K/BxN.^{87,96,169-171}

Les cytokines, les TLRs, les protéines du complément et les eicosanoïdes impliqués dans l'AR chez l'humain jouent aussi un rôle dans le modèle K/BxN.^{172,173} En effet, les cytokines telles que l'IL-1, le TNF, l'IL-6 et l'IL-17 ainsi que les TLRs sont reportés comme nécessaire dans le modèle K/BxN.^{50-52,173-179} Les souris déficientes en C3, C5, C5a et en facteur B ne développent pas l'arthrite dans ce modèle contrairement aux souris déficiente en C1q, C4, C6.^{87,177,180} Les souris déficientes en COX-1, en IP, en 5-LO et en LTA₄H ne développent pas ou faiblement l'arthrite,^{181,182} contrairement aux souris déficientes en COX-2, PGE synthase et en thromboxane synthase qui développent une arthrite équivalente aux souris contrôles.^{96,181,182} Les souris déficientes en 12-LO leucocytaire et en LTC₄ synthase développeraient une arthrite légèrement plus forte que les souris contrôles.^{182,183} Les souris déficientes pour les récepteurs BLT₁ et BLT₂ développent une arthrite plus faible que les souris sauvages dans le modèle K/BxN.^{184,185} Toutes ces observations suggèrent que les produits de COX-1, le récepteur IP, le LTB₄ et le 12-HETE sont impliqués dans le modèle K/BxN. Enfin, les phospholipases A₂ sont aussi impliquées dans la sévérité de l'arthrite induite par le sérum K/BxN. La sPLA₂-V protège de l'arthrite tandis que la sPLA₂-IIA promeut l'inflammation¹⁵² et que la sPLA₂-X ne contribue pas au développement de l'arthrite induite par le sérum K/BxN.¹⁵² L'implication de la cPLA₂α dans le modèle K/BxN n'est pas connue tandis qu'elle est nécessaire au développement de l'arthrite dans le modèle CIA par exemple.¹⁸⁶

En somme, l'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune complexe. Elle touche majoritairement les articulations où les cellules telles que les neutrophiles et les plaquettes cohabitent avec des enzymes comme la sPLA₂-IIA, des complexes immuns et un cocktail de cytokines variées incluant le TNF et le GM-CSF. Les neutrophiles, les plaquettes et la sPLA₂-IIA contribuent significativement à la sévérité de la maladie autant chez l'humain que dans le modèle murin K/BxN. Au cours de mes travaux de recherche, je me suis tout particulièrement intéressée à ces trois entités qui seront définies dans les sections suivantes.

1.2. Les neutrophiles

1.2.1. Introduction sur les neutrophiles

Les neutrophiles sont décrits pour la première fois par le médecin Paul Ehrlich au début du XXe siècle. Il les dépeint comme des leucocytes présentant un noyau caractéristique plurilobé et des granules réagissant aux colorants basiques et acides (May-Grünwald-Giemsa).

Ils appartiennent à la famille des granulocytes et sont les leucocytes les plus abondants (50 à 70%) en circulation chez l'humain. Les neutrophiles proviennent de la maturation et différenciation de progéniteurs granulocytaires de la moelle osseuse (MO) qui sous l'influence de cytokines telles que le G-CSF, produisent quotidiennement 10^{11} neutrophiles dont la durée de vie moyenne en circulation est de 5,4 heures.^{187,188}

1.2.2. Les neutrophiles dans l'immunité innée

1.2.2.1. Migration des neutrophiles aux sites infectieux

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires innées qui migrent à travers les capillaires sanguins au site inflammatoire ou infectieux. Cette migration se nomme diapédèse. Les ECs qui tapissent le vaisseau sanguin, s'activent sous l'influence de cytokines issues du site inflammé. Elles expriment alors les sélectines (P-sélectine et E-sélectine) qui lient en quelques secondes les molécules *P Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1) et CD44 présentes sur les neutrophiles. Cette adhésion transitoire ralentit le neutrophile dans le flux sanguin.

L'adhésion ferme du neutrophile aux ECs survient avec les liaisons de *Macrophage Antigen 1* (MAC-1), *Lymphocyte Function associated Antigen* (LFA-1) ou *Very Late Antigen-4* (VLA-4) avec les molécules exprimées sur les ECs comme l'*Inter Cellular Adhesion Molecule* (ICAM-1 et ICAM-2) et le *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM-1). Le neutrophile peut migrer soit entre deux ECs soit à travers une EC (migration trans-endothéliale) via les *Junctional adhesion Molecules* (JAM) (Figure 1-5). Suite à leur migration, les neutrophiles expriment des intégrines ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$) et sécrètent des MMPs

dégradant la matrice extracellulaire (MEC) pour former des sites cryptiques nécessaires à leur migration.¹⁸⁹

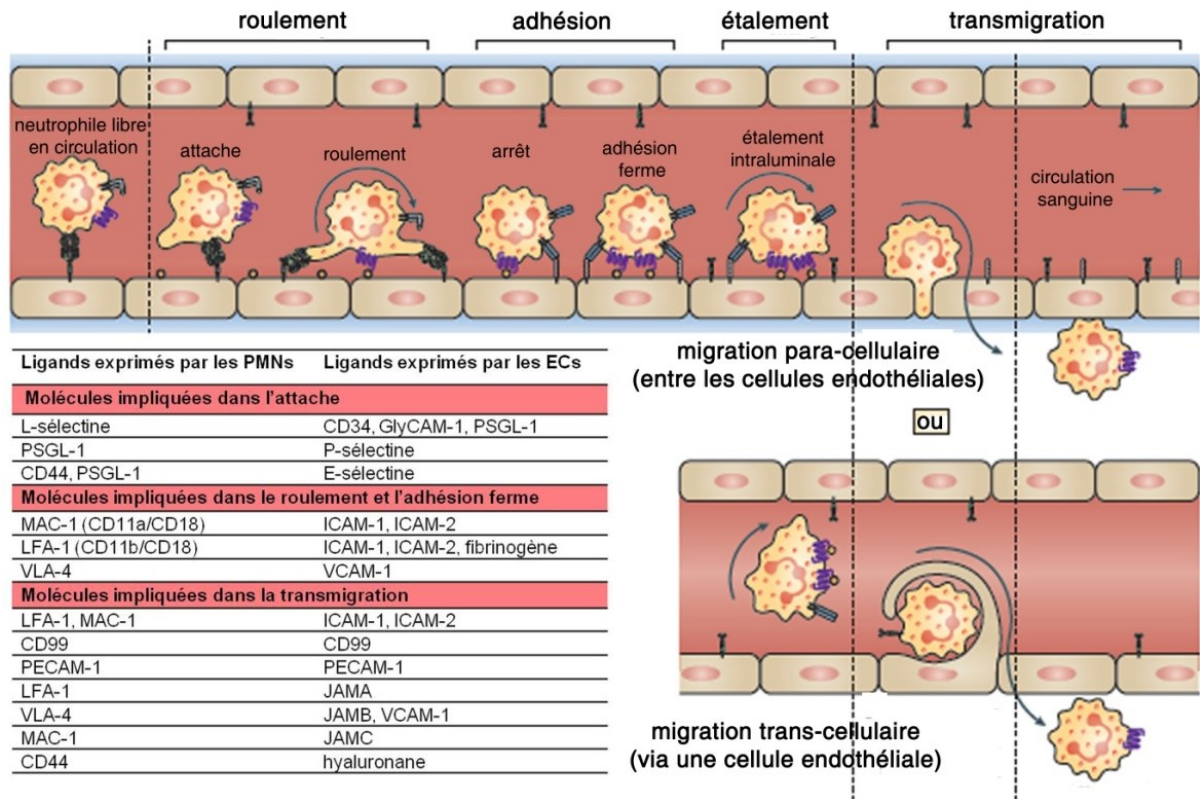


Figure 1-5. Diapédèse des neutrophiles et molécules associées. Modifiée à partir de E.Kolaczowska et al.¹⁹⁰ PMNs : neutrophiles

La migration des neutrophiles dans les tissus est guidée par des gradients chimiotactiques.¹⁹¹ Les neutrophiles sont attirés par les peptides formylés (fMLP), les protéines du complément (C3a et C5a), les phospholipases A₂, les eicosanoïdes tels que le LTB₄, le 5-HETE, 5,12(R)-HETE et le 15-HETE, ainsi que les chimiokines de type CXC dont l'IL-8 chez l'humain.¹⁹²⁻¹⁹⁷ Le fMLP est restreint aux bactéries et aux mitochondries libérées à la suite d'un traumatisme.¹⁹⁷ Les protéines S100 sont aussi des chimioattractants. Elles induisent l'expression de sélectine et Mac-1 et par conséquent sont impliquées dans l'adhésion des neutrophiles aux ECs.¹⁹⁸

La migration des neutrophiles aux sites inflammatoires est finement régulée, afin de l'amener à reconnaître les pathogènes et à les éliminer efficacement.

1.2.2.2. Reconnaissance des pathogènes

Les neutrophiles sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) grâce à la famille de récepteurs *Pattern recognition receptors* (PRR). Les neutrophiles expriment un vaste répertoire de PRRs incluant les *Toll Like receptor* (TLR), des récepteurs lectine de type C (CLR), des *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (pour NOD) like receptor* (NLR) et des récepteurs au complément.

Les neutrophiles murins et humains expriment tous les membres de la famille TLR à l'exception des TLR3 et 7 chez l'humain.¹⁹⁹⁻²⁰³ Ces récepteurs reconnaissent de manière spécifique des motifs bactériens et d'acides nucléiques. La stimulation des TLRs du neutrophile induit la relâche d'IL-8, la génération de superoxyde, l'inhibition de la chimiotaxie et augmente les capacités phagocytaires du neutrophile.¹⁹⁹⁻²⁰³

Les neutrophiles murins et humains expriment plusieurs CLRs dont le *myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor* (MICL), le *C-type lectin-like receptor 2* (CLEC2) et le *dendritic cell immunoreceptor* (DCIR).²⁰⁴⁻²⁰⁷ Les CLRs se lient au mannose, fucose et aux structures glucan carbohydrate. Cette liaison mène à l'internalisation des pathogènes, à leur dégradation puis à la production de cytokines.

Les NLRs sont quant à eux des senseurs cytoplasmiques. Ils constituent l'inflammasome (NLRP-1, NLRP-3, NLRP-12 et NLRC-4).²⁰⁸ *Staphylococcus aureus* induit la sécrétion d'IL-1 β de manière dépendante de NLRP-3 chez les neutrophiles.²⁰⁹ De même *Yersinia pestis* provoque la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18, dépendamment de NLRP-12, par les cellules péritonéales incluant les neutrophiles.²¹⁰

Les neutrophiles humains expriment à leur surface, les récepteurs CR1 et C5aR lesquels reconnaissent C1q, C3b, C4b et C5a.²¹¹ Les récepteurs CR3 et CR4 sont localisés au niveau des granules et vésicules sécrétoires des neutrophiles.²¹¹

De manière indirecte, les neutrophiles reconnaissent des pathogènes opsonisés avec des Ig via leurs récepteurs Fc. Les récepteurs Fc les plus abondants et importants sur les neutrophiles sont les Fc γ . Les récepteurs Fc γ RIIA (CD32a) et le Fc γ RIIIB (CD16b) sont les plus exprimés sur les neutrophiles humains.^{78,212} Le récepteur Fc γ RI (CD64) n'est pas exprimé constitutivement par les neutrophiles humains cependant il peut être induit par l'IFN γ .²¹³ Les neutrophiles humains expriment aussi le Fc γ RIIC²¹⁴ et seulement 4% des neutrophiles expriment le Fc γ RIIb.^{78,215} Parmi ces différents récepteurs Fc, certains sont activateurs puisqu'ils contiennent un motif ITAM dans leur queue cytoplasmique (Fc γ RI et Fc γ RIIA) ou lié à une ancre GPI (Fc γ RIIIB). Sinon d'autres récepteurs comme le Fc γ RIIIB possèdent un motif ITIM dans sa queue cytoplasmique lui conférant une fonction inhibitrice. Les particules opsonisées par plusieurs Ig, mènent à une oligomérisation des récepteurs Fc, laquelle est une condition essentielle de leur activation. Ce processus évite d'activer les cellules en présence d'Ig libres en circulation et induit une activation efficace avec une signalisation intracellulaire (influx calcique, phosphorylation des résidus tyrosine) menant à la phagocytose des pathogènes et à la production d'anion superoxyde, par exemple.^{216,217}

Les neutrophiles possèdent ainsi tous les récepteurs nécessaires à la reconnaissance et à l'ingestion des pathogènes en vue de les dégrader.

1.2.2.3. Élimination des pathogènes

1.2.2.3.1. La phagocytose

L'ingestion des particules étrangères est régulée selon différents mécanismes en fonction de la taille et des récepteurs cellulaires impliqués. Les particules dont la taille est inférieure à 0.5-1 μ m seront endocytées lorsqu'elles sont reconnues par un récepteur ou pinocytées. Les particules supérieures à 0.5-1 μ m seront phagocytées, liées ou non à des récepteurs du neutrophile.²¹⁸

Généralement, les agents infectieux sont opsonisés par des anticorps ou protéines du complément reconnus respectivement par les récepteurs Fc et les CRs.^{219,220} Ces récepteurs induisent une cascade de signalisation impliquant Syk, Vav1, les petites protéines G (Rac et Cdc42), ARP 2/3 et les *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP) menant à la

polymérisation des filaments d'actine avec la formation de protrusions membranaires communément appelées : pseudopode (Tableau 1-2).²²¹ Le rapprochement des pseudopodes implique l'activité de la PI3K, RhoA, ROCK et des myosines, puis les pseudopodes fusionnent pour former un phagosome. Ce dernier peut fusionner avec les lysosomes et les granules du neutrophile afin d'acquérir des enzymes microbicides, des V-ATPases et les complexes de NADPH oxydase (Figure 1-6)²²² qui permettent l'afflux de protons H⁺ dans le but d'augmenter le pH dans le phagosome. Il s'en suit la formation de *reactive oxygen species* (ROS) qui permettent l'élimination des bactéries. Parmi les ROS, le superoxyde est généré par une des sept isoformes de la NADPH oxydase soit la NOX₂, localisée au niveau des phagosomes des neutrophiles.^{223,224} Les ROS peuvent aussi être produits par les mitochondries du neutrophile.²²⁵

Tableau 1-2. Les protéines impliquées dans les mécanismes d'internalisation de particules bactériennes et virales. Modifié à partir de Kumari et al.²²⁶

Mécanisme d'internalisation	phagocytose	macropinocytose	endocytose	
			clathrine dépendante	cavéoline dépendante
Taille de la particule	>0.5µm-1µm	0.2-10µm	150-200 nm	120 nm
Dépendance à clathrine/cavéoline	non	non	clathrine	cavéoline
Dépendance à la dynamine	oui		oui	oui
Petites protéines G impliquées	Rac, RhoA, Cdc42	Rac1, Cdc42	Rab5	
Autres protéines impliquées	actine, Arp2/3, WASP, PI3K	actine, PI3K, Ras, Src	actine, AP2	actine
Types de particules	corps apoptotiques bactéries	bactéries	virus, bactéries	virus

Le cytosquelette d'actine, les microtubules et des protéines adaptatrices telles que la dynamine interviennent dans les processus d'endocytose,^{227,228} qui permet le recyclage des particules et des protéines lesquelles sont dirigées vers les endosomes et vers le *trans golgi network* (TGN). La fusion des endosomes tardifs avec les *multi-vesicular bodies* (MVB) et les lysosomes permet la dégradation des produits ingérés (Figure 1-6).

Les neutrophiles sont capables de phagocyter via les récepteurs Fc et au complément notamment,²²⁹ d'endocyter via les dynamines et clathrine²²⁷ mais aussi de pinocyter les éléments du milieu extracellulaire. Il est à noter que les neutrophiles n'ont pas de caveoline.²³⁰

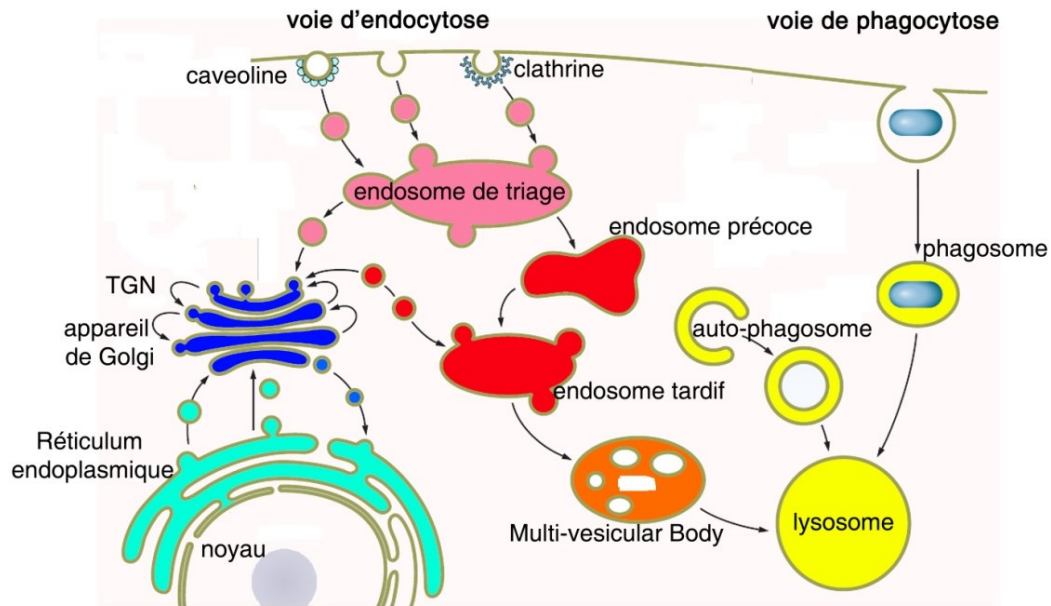


Figure 1-6. Trafic des particules endocytées ou phagocytées dans les différents compartiments cellulaires. TGN pour *Trans Golgi Network*

1.2.2.3.2. La NETose

Les NETs sont des réseaux fibreux composés principalement d'ADN. Décrite pour la première fois en 2004, la NETose est une stratégie du neutrophile pour piéger les pathogènes bactériens (comme *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis*), les pathogènes viraux (tels que VIH), les pathogènes fongiques (comme *Candida albicans* et *Aspergillus sp*), les parasites (incluant *Toxoplasma gondii*), les helminthes et les hydres fongiques. Les NETs limitent ainsi la dissémination des pathogènes en les capturant mais aussi grâce à leur contenu riche en enzymes bactéricides, défensines, lysosimes, élastase et myéloperoxydase (MPO).²³¹ Les NETs peuvent être dégradés par l'action de la DNase1 et endocytés par les macrophages.²³²

Les patients atteints de pathologies granulomateuses présentent des mutations dans la NADPH oxydase et leurs neutrophiles ne génèrent pas de NETs suggérant que ce processus est dépendant des ROS.²³³ Les cytokines, les immunoglobulines, les plaquettes (notamment via le TLR4) dans la circulation sanguine induisent la NETose. Les NETs sont aussi détectés lors des infections ou des maladies inflammatoires telles que le lupus et l'AR.^{70,234-237}

1.2.2.3.3. Les ectosomes

Les neutrophiles libèrent des microparticules (MPs) appelées ectosomes (ECTs) qui sont bactéricides et contiennent notamment de la myéloperoxydase (MPO), de l'élastase et d'autres enzymes protéolytiques.^{238,239}

Les ECTs adhèrent aux ECs, aux monocytes et aux macrophages via leurs molécules de surface telles que le CD66b, le CD62L, l'Annexin A1, le FcγRII, le FcγRIII et le CD87.^{238,240} Les ECTs induisent une réponse anti-inflammatoire, la sécrétion de TGFβ1, une diminution de l'adhésion des neutrophiles aux ECs. Ils inhibent aussi la migration des neutrophiles dans un modèle de poche d'air où l'IL-1β est injectée.^{240,241}

En résumé, les neutrophiles participent à l'immunité innée en migrant aux sites inflammatoires où ils reconnaissent et éliminent les pathogènes.

1.2.3. Les neutrophiles et l'immunité adaptative

Les neutrophiles sont connus pour leur implication dans l'immunité innée pourtant, de récentes études indiquent que les neutrophiles interviennent de diverses manières dans l'immunité adaptative.

Sous l'influence de cytokines telles que l'IL-4, le GM-CSF et le TNFα, les neutrophiles acquièrent un nouveau phénotype avec une néoexpression de HLA-DR, CD80 et CD49d.²⁴² Leurs fonctions sont aussi modifiées avec une diminution de la migration et de la relâche de la MPO, tandis que la phagocytose, la libération de

superoxyde, de cytokines telle que l'IL-8 est augmentée.²⁴² Les neutrophiles inflammatoires comme dans l'AR acquièrent les caractéristiques moléculaires de cellules présentatrices d'antigènes avec l'expression du CD84, CD40, CCR6, CD80 et CD86.²⁴³⁻²⁴⁵ Les neutrophiles murins issus de la MO après un traitement au GM-CSF peuvent exprimer des marqueurs de DCs comme le CD11c, le CMH-II, le CD80 et le CD86.²⁴⁵ Ils acquièrent aussi les propriétés des DCs comme la présentation d'antigène aux LTs CD4⁺, tout en conservant leur faculté de phagocytose et de NETose.²⁴⁵ Par ailleurs, les neutrophiles migrent aux ganglions lymphatiques en suivant un gradient des chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les cellules stromales et endothéliales dans les nœuds lymphatiques.²⁴⁶

Les neutrophiles interagissent avec différents leucocytes dont les DCs, les LTs et LBs et ont un impact sur leurs activités et leurs maturations. Ils se lient aux DCs par l'intermédiaire de MAC-1 et de DC-SIGN notamment.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Les cytokines, les médiateurs lipidiques, les ECTs, l'élastase ainsi que la MPO, libérés par les neutrophiles peuvent moduler la maturation, la survie et les fonctions des DCs.^{248,250-252} Les neutrophiles peuvent moduler la survie, la maturation et la différenciation des LBs en sécrétant les cytokines BAFF et APRIL.²⁵³⁻²⁵⁵ Les neutrophiles peuvent servir de *B cell helpers* (N_{BH}) lesquels sont détectés dans la zone marginale de la rate de macaques et de souris.²⁵⁶ Ces N_{BH} produisent les cytokines BAFF, APRIL et IL-21 qui induisent l'*immunoglobulin switching class* ainsi que la production d'anticorps par les LBs de la zone marginale.²⁵⁶ Ces N_{BH} sont différents des neutrophiles en circulation. Ils produisent de l'IL-10 comme les ECs sinusoïdales de la rate et les macrophages.²⁵⁷ Enfin, les N_{BH} capturent les produits bactériens via des NETs qui sont projetés dans la zone marginale. Les NETs induisent alors l'activation des LBs par l'engagement de leurs récepteurs aux immunoglobulines et TLRs. Cette interaction entre LB et NETs mène à la formation d'un répertoire d'anticorps pré-immuns d'antigène bactérien.²⁵⁶ Les cytokines sécrétées par les LTs, telles que l'IFN γ , le TNF α et le GM-CSF, activent les neutrophiles lesquels produisent des ROS, des NETs et dégranulent. A l'inverse les neutrophiles peuvent moduler les activités des LTs. En effet, les neutrophiles murins ont la capacité de migrer du derme vers la MO afin de présenter un antigène, aux LT CD8⁺, LT Th1 et Th17.²⁵⁸⁻²⁶⁰ De même, les neutrophiles humains interagissent avec les Th1 et Th17.²⁶¹

1.2.4. Rôles des neutrophiles dans l'arthrite

1.2.4.1. Caractéristiques des neutrophiles dans l'arthrite

Les neutrophiles dans les articulations arthritiques ont un phénotype de DCs. Ils expriment le CMH-II. Le CD80 et le CD86 sont cependant absents de la surface des neutrophiles, mais ils sont confinés dans les granules.^{243,244}

1.2.4.1.1. Les neutrophiles arthritiques et l'apoptose

Les neutrophiles résident dans les tissus et liquides synoviaux des articulations de patients atteints d'AR. Ils y acquièrent une résistance à l'apoptose laquelle peut être dépendante de la voie mitochondriale (voie intrinsèque) ou dépendante des récepteurs de mort (voie extrinsèque).

Les neutrophiles expriment des protéases impliquées à la fois dans la voie intrinsèque et la voie extrinsèque telles que les caspases 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 et 14.²⁶² Ils expriment aussi des membres de la famille Bcl-2 dont certains sont pro- et d'autres anti-apoptotiques tels que *Bcl-2 associated X protein* (Bax), *Bcl-2 antagonist/killer* (Bak), *Bcl-2 associated death promoter* (Bad), *Bcl-2 homology-3 (BH3) interacting domain death agonist* (Bid), *Bcl-2 interacting protein* (Bim) et *Bcl-2 interacting killer* (Bik).²⁶² Les neutrophiles contiennent de faible quantité de cytochrome c requis aussi pour l'activation des caspases.²⁶³ Afin de parer à cette défaillance, les neutrophiles expriment de fortes quantités d'*apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1). De plus, les cathepsines des granules azurophiles clivent la caspase 8 et Bid lesquels clivent la caspase 3 pour l'activer.^{264,265} Les calpaines participent aussi à l'apoptose notamment en clivant Bax.^{270,271}

Les articulations des patients arthritiques contiennent de nombreuses cytokines et médiateurs lipidiques pouvant être impliqués dans la survie des neutrophiles. En effet, ces fluides sont riches en GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-15, IL-32 γ , TNF α , G-CSF et IFN γ , lesquels peuvent protéger les neutrophiles de l'apoptose spontanée. Les cytokines GM-CSF, TNF α et IL32 γ protègent les neutrophiles de l'apoptose induite par les ICs *in vitro*.²⁶⁶⁻²⁶⁸ L'adénosine des liquides synoviaux influence cette résistance à l'apoptose. L'utilisation de l'adénosine déaminase (ADA) sur les neutrophiles incubés avec les liquides synoviaux,

induit la mort des neutrophiles.²⁶⁶ Le LTB₄ et les nucléotides tels que l'ATP, dans les articulations arthritiques, reporteraient dans le temps, l'apoptose des neutrophiles.^{145,269,270} Par ailleurs, les articulations arthritiques sont sous conditions hypoxiques. La faible pression en oxygène (O₂) induit une régulation d'IκBα et de NFκB dépendante de HIF-α qui prolonge la survie des neutrophiles.^{271,272}

1.2.4.1.2. Les neutrophiles arthritiques et la migration

Les neutrophiles sont affectés par les constituants des liquides synoviaux arthritiques dont les ICs et les cytokines qui diminuent leur faculté de migration.^{273,274} Cependant, les neutrophiles extraits des liquides synoviaux de patients arthritiques ne répondent plus au signal de chemo-attraction du fMLP contrairement aux neutrophiles en circulation.²⁷⁵

1.2.4.2. Rôle des neutrophiles dans la propagation de l'arthrite

Les neutrophiles sont reconnus pour être de forts producteurs de cytokines, de médiateurs lipidiques, et de protéines associées à des DAMPs, permettant le recrutement de cellules immunitaires et l'alimentation de l'inflammation. Ils génèrent des médiateurs lipidiques tels que le LTB₄ qui attirent les leucocytes comme les macrophages et les neutrophiles. De fortes concentrations de LTB₄ provoquent aussi sur les neutrophiles la relâche de superoxyde et des granules contenant diverses protéases dont certaines clivent les pro-cytokines. Le LTB₄ peut aussi promouvoir la sécrétion d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-8 ainsi que la synthèse d'IgE par les LBs. Les neutrophiles sécrètent aussi un vaste répertoire de cytokines, telles que BAFF et APRIL, qui activent les cellules B, lesquelles produisent en retour des cytokines et anticorps. Les protéines S100, notamment l'hétérodimère S100A8/A9 nommé calprotectine, et la protéine S100A12, sont détectées en abondance dans les liquides synoviaux de patients arthritiques.²⁷⁶ Le neutrophile représente une des sources majeures de libération de ces protéines, même si les chondrocytes, les macrophages et les plaquettes contribuent aussi à leur libération. Les protéines S100 pourraient intervenir dans les processus de dommage à l'articulation, notamment par l'induction de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire (IL-1) ou des ROS.²⁷⁷

1.2.4.3. Rôle des neutrophiles dans la destruction du cartilage et de l'os

Dans les articulations arthritiques, les neutrophiles se concentrent au niveau de la bordure pannus-cartilage où les chondrocytes sécrètent abondamment de l'IL-8. Cette cytokine attire les neutrophiles et les rend agressifs envers le cartilage.^{278,279} De plus, les chondrocytes présentent à leur surface des dépôts d'ICs et de FRs qui permettent l'adhésion des neutrophiles via leurs récepteurs Fc. L'adhésion des neutrophiles au cartilage et à l'os, est comparable à la zone de scellement des OCs sur la matrice osseuse. La libération du contenu des granules riche en élastase, en gélatinase, en collagenase ainsi que la sécrétion de ROS et de cathepsine, contribue à l'érosion du cartilage.^{280,281} En parallèle, les neutrophiles expriment plusieurs régulateurs de l'ostéoclastogénèse tels que RANKL et OPG qui activent les OCs à résorber l'os.^{129,130}

En résumé, les neutrophiles sont des phagocytes professionnels impliqués dans la réponse immunitaire innée contre les pathogènes. Ils migrent dans les articulations arthritiques où ils sont agressifs. Les neutrophiles produisent des leucotriènes, des ROS, des cytokines et des MMPs qui contribuent à l'activation des cellules immunitaires et à la dégradation du cartilage et de l'os.

1.3. Les plaquettes

Historiquement les plaquettes, ou thrombocytes, sont décrites pour la première fois en 1873 par Osler, qui les décrit comme des disques circulant dans le sang et capables de s'agréger. En 1881, Bizzozero identifie aussi les plaquettes et découvre leur rôle dans l'hémostase et la thrombose. Il fut le premier à observer que les plaquettes adhèrent aux vaisseaux sanguins et forment des caillots recrutant aussi des leucocytes. Il fut aussi le premier à découvrir les mégacaryocytes qui sont les cellules progénitrices des plaquettes. Mes travaux de doctorat portent essentiellement sur l'activation des plaquettes et la génération de vésicules extracellulaires. Je serai donc brève sur la description des plaquettes.

1.3.1. Origine et physiologie des plaquettes

1.3.1.1. Origine des plaquettes

Les plaquettes sont produites dans la MO par leurs cellules progénitrices appelées mégacaryocytes (MKs). Les MKs sont issus des mégacaryoblastes issus de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques communes aux progéniteurs myéloïdes. Dans la MO, les mégacaryoblastes prolifèrent. Les mégacaryoblastes réalisent plusieurs cycles d'endomitose (processus où l'ADN est répliqué et suivi d'une mitose incomplète ne donnant pas naissance à deux cellules filles). Les mégacaryoblastes se différencient ainsi en mégacaryocytes (MKs). Les MKs sont des cellules plurinucléées pluriploïde (jusqu'à 128N) ayant une taille comprise entre 50 et 100 μ m. Ils résident dans la MO et migrent selon un gradient de SDF-1 proche des vaisseaux sinusoïdaux,²⁸² mais ils peuvent aussi se nicher dans les poumons et le sang. Les mécanismes qui permettent la formation et la relâche des plaquettes sont controversés. Plusieurs modèles ont été proposés incluant le bourgeonnement des plaquettes, la formation de pro-plaquettes et la fragmentation du cytoplasme des MKs. Selon Italiano et Hartwig, les MKs forment de longs lamellipodes dans la circulation sanguine nommés pro-plaquettes lesquels peuvent se fragmenter en plaquettes.²⁸³ Quotidiennement, 10^{11} plaquettes sont produites, soit 200 à 300.10⁹ plaquettes par litre de sang chez l'adulte en santé. La durée de vie des plaquettes en circulation est de 8 à 9 jours en moyenne.²⁸⁴

1.3.1.2. Structure caractéristique des plaquettes

La microscopie électronique à balayage (MEB), puis à transmission (MET) ont permis de visualiser la surface lisse des plaquettes versus une surface plissée avec des pseudopodes sur les plaquettes activées ainsi que l'organisation interne des plaquettes.

Les plaquettes sont de petits éléments de 2 à 5µm qui présentent de nombreuses invaginations au niveau de leur membrane plasmique, appelées *open canalicular system* (OCS). Les OCS permettant les échanges entre les plaquettes et le plasma, et ils sont aussi une voie d'assimilation de produits tels que le fibrinogène, du plasma vers les granules α des plaquettes. A l'inverse, les canaux de l'OCS permettent aussi la relâche de produits emmagasinés dans les vésicules de sécrétion pendant l'activation plaquettaire. La formation de lamellipode requiert les OCS en combinaison avec les *demarcation membrane system* (DMS) qui constituent une source de production des membranes.

Outre son système canaliculaire, les plaquettes contiennent différentes granules (α , δ , λ). Les granules α sont les plus abondantes et sont au nombre de 50 à 80 par plaquettes. Leur taille varie entre 200 et 500nm. Elles contiennent majoritairement des protéines membranaires et molécules solubles. Des études récentes de protéomique sur les granules α révèlent un contenu complexe en molécules d'adhésion (P-selectine, α IIb β 3 et GPIb α), des chimiokines (CXCL4 et CXC12), des facteurs mitogéniques (VEGF, PDGF et angiostatin), des facteurs de croissance (EGF et IGF), des facteurs de coagulation (facteur V, IX et plasminogen). La taille, la structure et le contenu de ces granules sont hétérogènes. Contrairement aux granules α , les granules δ ou corps denses sont peu nombreux (3 à 6 par plaquettes). Ces granules renferment de fortes concentrations de nucléotides (ADP, ATP, GTP) ainsi que des ions tels que le Ca^{2+} et le PO_3^- . De plus, elles contiennent des amines bioactives telles que l'histamine et la sérotonine. La relâche du contenu des granules denses influence le tonus vasculaire alors que le contenu des granules λ ou lysosomales, contenant des protéases et des glycosidases, module la rétraction du caillot plaquette-fibrine afin de promouvoir la régénération tissulaire et la cicatrisation.

Les plaquettes contiennent divers organelles dont l'appareil de Golgi, des mitochondries, des lysosomes et des reliquats de reticulum endoplasmique des MKs, appelé *dense tubular system* (DTS).²⁸⁵⁻²⁸⁷ Ce dernier permet principalement le stockage du calcium et la production de lipides tels que le thromboxane A₂.

1.3.1.3. Contenu des plaquettes

Les plaquettes humaines sont des éléments anucléés du sang et sont dépourvues d'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique. Elles n'ont pas les éléments nécessaires à la transcription à l'exception du génome mitochondrial qui code pour 13 acides ribonucléiques (ARNs) messagers (ARNm) et 2 ARNs ribosomiaux (ARNr).²⁸⁸ Les plaquettes contiennent toutefois des facteurs de transcription transmis par les MKs comme NFκB et PPARγ.^{289,290} Les plaquettes renferment aussi différents acides ribonucléiques (ARN) tels que des ARNm, des ARNs de transfert (ARNt) et ARNr ainsi que des microARNs (miARN).²⁹¹⁻²⁹³

Les MKs transfèrent aux plaquettes plusieurs copies d'ARNm fonctionnels et les éléments essentiels à leur traduction.²⁹³⁻²⁹⁵ Les facteurs régulant la stabilité des ARNm tel que HuR, ou permettant leur traduction via TIA-1, en se liant aux sites *AU-rich element* (ARE) en 3'UTR des ARNm sont présent dans les plaquettes.^{296,297} Les plaquettes ont aussi la capacité d'épisser les ARNm tels que l'ARNm de l'IL-1.²⁹² Les plaquettes contiennent aussi des facteurs d'initiation de la traduction tels qu'eIF4E et eIF2α, lesquels permettent le recrutement notamment d'ARNt à la sous unité ribosomale 40S.^{294,295} La machinerie nécessaire à la traduction tels que les facteurs de traduction, les ribosomes (40S, 60S, S6), et les ARNt sont présents dans les plaquettes.^{296,298,299} Les plaquettes peuvent synthétiser des protéines de manière constitutive dont les protéines membranaires GPIb, GPIIb, GPIIIa et le fibrinogène^{299,300} cependant, la majorité des protéines des plaquettes sont fournies par les MKs. C'est le cas de l'*epidermal growth factor β* (EGFβ) et du *platelet factor 4* (PF4) qui sont entreposées dans les granules α ainsi que des protéines de surfaces GPIb, GPIIb, GPIIIa. Certaines protéines peuvent aussi être traduites à la suite de l'adhésion des plaquettes aux constituants de la MEC et à l'exposition à des agonistes solubles tels que le *platelet activating factor* (PAF) et la thrombine.²⁹⁴ Enfin, certaines amines (sérotonine) et

protéines plasmatiques telles que l'albumine, le fibrinogène et les immunoglobulines, sont absorbées et séquestrées dans les granules α des plaquettes.^{301,302} Les protéines traduites dans les MKs et les plaquettes peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la palmitoylation, et la phosphorylation.^{303,304}

Les plaquettes contiennent des précurseurs de miARN (pre-miARN) et des miARNs transmis par les MKs. Les miARNs sont de petits ARNs non codants de 19 à 24 nucléotides. Ce sont des régulateurs clés de l'expression génique notamment par leur action de *RNA silencing*, menant à l'inhibition de la traduction de certaines protéines. Ces miARNs sont transcrits à partir du génome de mégacaryocytes majoritairement via la RNA polymérase II, en miARNs primaires (pri-miARN).³⁰⁵ Cette transcription est régulée par des facteurs de transcription et des régulateurs épigénétiques.³⁰⁶ Les pri-miARNs ont plusieurs structures tiges-boucles contenant les miARNs, lesquels sont reconnus puis clivés en pre-miARN par un complexe micro-processeur formé par la RNase nucléaire III Drosha et la protéine *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8).²⁹¹ Ces pré-miARNs mesurent entre 60 et 70 nucléotides et sont caractérisés par leur structure en épingle à cheveux (*hairpin*). Cette morphologie particulière est reconnue par le complexe Exportin 5-RAN GTP qui permet son transfert du noyau vers le cytoplasme. Ces pre-miARNs vont subir une seconde étape de maturation dans le cytoplasme. Dans la voie canonique de biogenèse des miARNs, le pré-miARN est incorporé dans un complexe protéique, formé de la RNase III Dicer et de *TAR RNA-binding protein 2* (TRBP2) exprimées à la fois dans les MKs et les plaquettes. Le pré-miARN est ensuite clivé par Dicer à la base de sa boucle menant à la production de 2 miARNs matures partiellement complémentaires. Les miARNs sont incorporés dans un complexe ribonucléoprotéique (RNP) contenant argonaute 2 (Ago2) afin de les protéger notamment contre les RNAses. Cette seconde étape de maturation des miARNs se déroule dans le cytoplasme des MKs et dans les plaquettes (Figure 1-7). Cependant, il existe d'autres voies de maturation des miARNs. En effet, miR-451 est exprimé dans les MKs ainsi que les plaquettes et est mûré indépendamment de Dicer.^{306,307} Le pre-miARN-451 est clivé par Ago2, puis raccourci par une exonucléase spécifique de la queue polyA (PARN).³⁰⁸

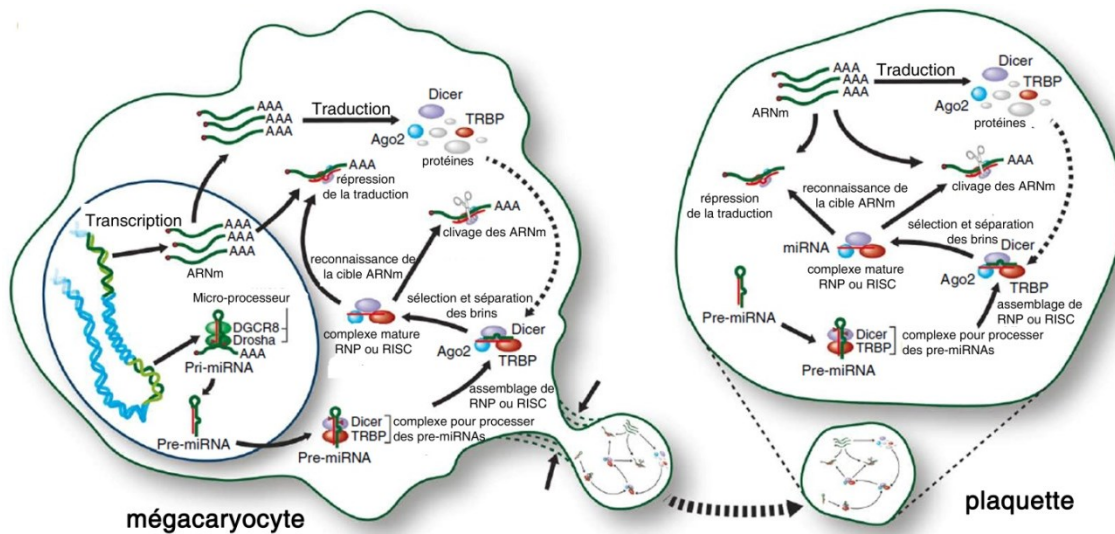


Figure 1-7. La voie de biogenèse des microRNAs dans les mégacaryocytes et dans les plaquettes. Modifiée à partir de Landry et al.²⁹¹

Enfin, les plaquettes possèdent soit un système d'inhibition de la traduction de protéines (via les miARNs) soit un système d'élimination de ces dernières via le protéasome. Toutefois, peu d'études portent sur ce sujet. Le protéasome est un gros complexe protéique qui dégrade les protéines mal-formées ou à durée de vie limitée. Le protéasome des plaquettes est actif.^{309,310} L'ubiquitination des protéines est un élément prépondérant dans l'adressage au protéasome et est active dans les plaquettes notamment par l'ubiquitination de Syk.³¹¹ Le protéasome plaquettaire est impliqué dans la durée de vie des plaquettes. L'aspirine, drogue inhibant la COX, peut inhiber le protéasome et mener à une réduction de la vie des plaquettes.^{312,313} L'inhibition du protéasome conduit à une diminution de l'agrégation plaquettaire et de la génération des MPs, à la suite d'une stimulation à la thrombine.³¹⁰ Les protéines sont aussi dégradées par la voie des calpaines dans les plaquettes. Les calpaines régulent les ATPases des membranes plasmiques, clivent la vinculine et la taline.³¹⁴⁻³¹⁶ Ces protéases permettent aussi la régulation de la sécrétion des granules, l'agrégation plaquettaire, la rétraction du caillot plaquettaire, mais aussi l'activation du protéasome.³¹⁷

Les plaquettes sont des éléments anucléés du sang qui contiennent toutefois divers ARNs et des facteurs de transcription. En effet, il a été rapporté que des facteurs nucléaires

tels que PPAR γ et NF κ B sont exprimés dans les plaquettes.^{289,290,318} Telle une cellule, elles peuvent traduire des protéines, les maturer et les éliminer via un protéasome notamment.

1.3.2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase

Les plaquettes jouent un rôle central dans le maintien de l'hémostase, les processus de thrombose et d'occlusion vasculaire.^{319,320} Les plaquettes sont recrutées au niveau des vaisseaux lésés où elles vont changer de forme, émettre de longs filopodes, adhérer, s'activer en libérant le contenu de leur granule α et des microparticules (MPs). Elles recrutent les plaquettes avoisinantes et s'agrègent ensuite pour former le caillot hémostatique ou thrombus (Figure 1-8).

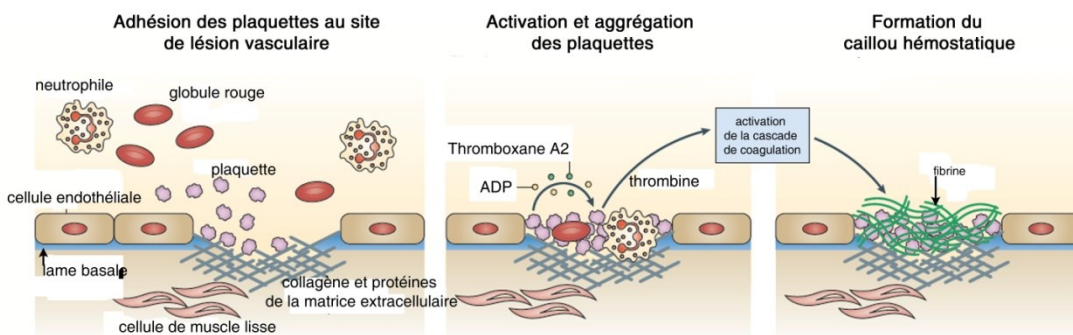


Figure 1-8. Les fonctions plaquettaire dans l'hémostase. Modifiée à partir de Semple et al.³¹⁷

1.3.2.1 Adhésion plaquettaire

Différents récepteurs de surface sont exprimés sur les plaquettes leur permettent de s'activer et d'adhérer au site lésé (Figure 1-9). Les plaquettes adhèrent au collagène (via GPVI et α 2 β 1), à la podoplanine (via CLEC-2), à la fibronectine (via α v β 3, α 5 β 1 et α I**II** β 3) et à la laminine (via α 6 β 1 et GPVI) dans les veines et artères, où les forces de cisaillement sont faibles (inférieures à 1000s⁻¹). Dans les petites artères ou micro-vaisseaux qui subissent des forces de cisaillement (supérieures à 1000s⁻¹), les plaquettes lient le facteur von Willebrand (vWF) via l'intégrine α I**II** β 3 et le récepteur GPI**a** du complexe GPI**b**-IX-V. Le vWF est une glycoprotéine synthétisée par les ECs et les MKs. Cette protéine induit une cascade de signalisation menant à l'activation de l'intégrine α I**II** β 3, laquelle permet aussi l'adhésion stable au vWF.³²¹

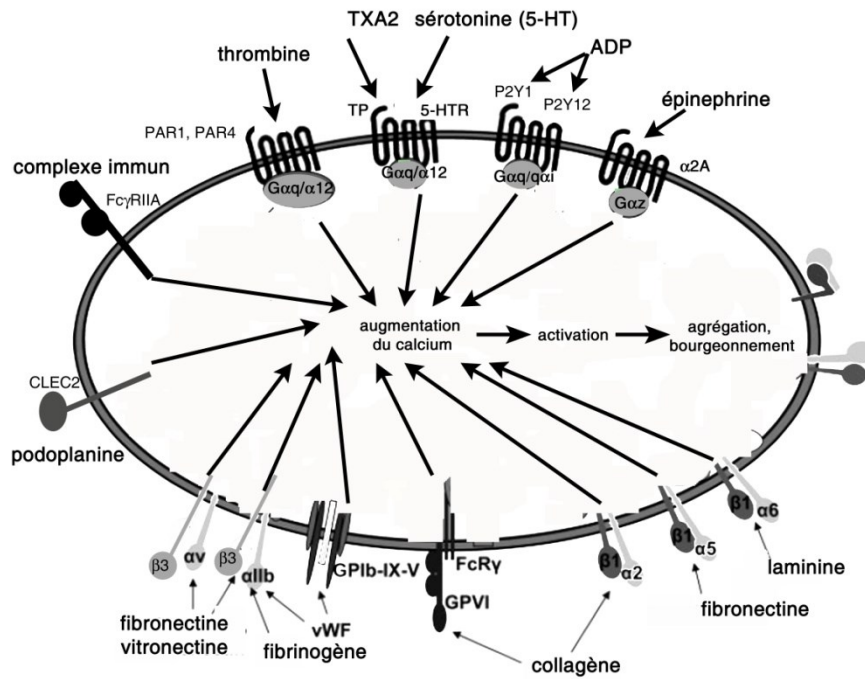


Figure 1-9. Les récepteurs de surface de la plaquette permettant l'adhésion et l'activation des plaquettes. Modifiée à partir de Varga-Szabo et al.³²²

Le collagène est un des constituants majeurs des parois des vaisseaux sanguins et de la matrice basale sous endothéliale. C'est un agoniste puissant qui se lie à deux récepteurs plaquettaires de faible affinité: GPVI et l'intégrine $\alpha2\beta1$ (appelée aussi GPIIa/IIb, VLA-2, CD49b/CD29). Le collagène se lie aussi indirectement à l'intégrine $\alpha11\beta3$ et GPIIb via le vWF.³²³ Le récepteur GPVI est le récepteur au collagène le plus abondant sur les plaquettes³²⁴ et sera particulièrement détaillé dans les prochains paragraphes. Il est impliqué dans l'activation des plaquettes par le collagène, résultant de la génération de MPs.^{96,286} Il joue un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrite, où les souris GPVI^{-/-} développent une arthrite modérée dans le modèle K/BxN.⁹⁶

Le récepteur GPVI a été mis en évidence dans les années 1970 par le groupe de Phillips.³²⁵ Il reconnaît le motif peptidique mimant le collagène : Gly-Pro-Hyp appelé aussi *collagen related peptide* (CRP)³²⁶ qui active fortement les plaquettes, spécifiquement lorsqu'il est cross-linké.^{326,327} Les ligands de GPVI sont nombreux, tels que la convulxine,

l'ophioluxine (deux lectines de type c dans le venin de serpent), l'alborhagine et la lamine.³²⁸⁻³³⁴

GPVI est constitué de deux domaines immunoglobulines extracellulaires dont le domaine D1 est spécifique à la reconnaissance du collagène, d'une région transmembranaire et d'une partie courte cytoplasmique (Figure 1-10). GPVI est associé à une chaîne Fcγ via un résidu arginine et aspartique sur les domaines transmembranaires respectifs de GPVI et Fcγ. Cette chaîne Fcγ porte un motif *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) permettant la transduction du signal. La stimulation de GPVI provoque la liaison du motif ITAM au domaine SH₂ de Syk, induisant son activation par phosphorylation. Par ailleurs Syk phosphorylée permet la phosphorylation de plusieurs autres protéines telles que Lat, SLP-76, PLCγ2 et PI3K menant à une augmentation du calcium cytosolique (Figure 1-10).³³⁵⁻³⁴⁰ La stimulation GPVI induit la sécrétion de TXA₂, l'activation de la 12-lipoxygénase (12-LO, décrite en détail plus bas), la libération de calcium déclenchant la sécrétion massive des granules α et des corps denses.^{341,342} L'augmentation du calcium intracellulaire induit un changement morphologique des plaquettes avec la formation de lamelipode et le bourgeonnement de MPs.³⁴³

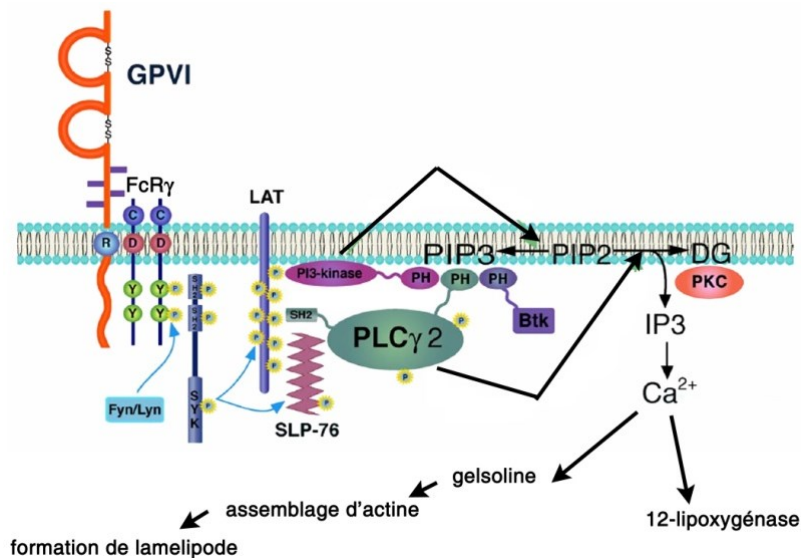


Figure 1-10. Signalisation du récepteur GPVI. Modifiée à partir de Moroi et al.³⁴⁴

1.3.2.2. Activation plaquettaire et coagulation sanguine

De nombreux agonistes solubles activent les plaquettes. L'ADP, le TXA₂, la thrombine et la sérotonine activent les plaquettes sur des récepteurs à sept traversées membranaires et couplés aux petites protéines G (P2Y₁, P2Y₁₂, TP, PAR1, PAR4 et 5-HTR) (Figure 1-9).^{346-348,350,361-363} Les complexes immuns, sont aussi des agonistes solubles qui peuvent activer le récepteur FcγRIIA des plaquettes.

Les facteurs de coagulation se lient à la PS des plaquettes et des MPs afin de générer les quantités appropriées de thrombine permettant la protéolyse du fibrinogène soluble en fibrine. Le fibrinogène soluble est nécessaire à l'agrégation des plaquettes entre elles et la fibrine quant à elle, permet l'ancrage du thrombus à la paroi vasculaire lésée et contribue à sa stabilité.³⁴⁵

1.3.3. La 12-lipoxygénase plaquettaire

1.3.3.1. Expression de la 12-lipoxygénase

Trois isoformes de la 12-LO existent et sont nommés selon la cellule où ils ont été identifiés, soit les plaquettes, les leucocytes et l'épiderme.³⁴⁶ La 12-LO leucocytaire est largement répartie entre les cellules, mais la distribution dans les tissus varie considérablement d'une espèce à l'autre.³⁴⁶ Les neutrophiles par exemple n'expriment pas la 12-LO. La 12-LO plaquettaire et épidermale sont présentes seulement dans les plaquettes et dans les kératinocytes respectivement.³⁴⁶

1.3.3.2. Activité enzymatique de la 12-lipoxygénase

L'activation de la 12-LO plaquettaire est induite notamment par le collagène et le CRP qui stimulent récepteur GPVI.³⁴⁷ La 12-LO interagit avec la cPLA_{2α} et les sPLA₂ de la plaquette, lesquelles permettent la libération d'AA.³⁴⁸

La 12-LO introduit un oxygène moléculaire au niveau du carbone 12 de l'AA pour produire un premier produit : l'acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque (12-HpETE) avec une configuration S- ou -R.³⁴⁶ La réduction de cet acide hydroperoxyde produit un acide gras hydroxylé plus stable : le 12-HETE. La 12-LO utilise aussi d'autres substrats différents de l'AA tel que l'acide dihomogamma-linoléique (DGLA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA)

pour générer du 12-HETE.³⁴⁹ L'acide alpha-linoléique (ALA) est un acide gras 5 fois moins utilisé par la 12-LO que l'AA.³⁴⁹ L'acide eicosadiénoïque (EDA) et l'acide linoléique (LDA) ne sont pas des substrats de la 12-LO.³⁴⁹

1.3.3.3. Rôle des produits de la 12-lipoxygénase

Le 12-HETE est impliqué dans les processus d'activation et d'agrégation des plaquettes. Il régule la mobilisation de calcium intracellulaire, prévient l'élévation d'AMPc dans les plaquettes³⁵⁰⁻³⁵² et il augmente l'agrégation médiée par la thrombine chez les plaquettes bovines.³⁵¹ Les inhibiteurs de la 12-LO inhibent l'agrégation médiée par le collagène et le fibrinogène.³⁵³ Le 12-HETE peut aussi inhiber la liaison des ligands aux récepteurs PGH₂/TXA₂ dans les plaquettes humaines, conduisant ainsi à une inhibition de l'agrégation médiée par le TXA₂.³⁵⁴ Les plaquettes des souris déficientes en 12-LO plaquettaire ne sont plus sensibles à l'ADP.³⁵⁵

Le 12-HETE interagit avec trois récepteurs couplés aux petites protéines G, avec plus ou moins d'affinité. Il s'agit des récepteurs *Leukotriene B4 receptor 1* et 2 (BLT₁ et BLT₂) ainsi que GPR31.³⁵⁶ Le 12(S)-HETE stimule le réarrangement des plaques d'adhésion, la dépolymérisation des filaments d'actine et intervient dans la motilité des cellules.³⁵⁷⁻³⁶⁰ Le 12(S)-HETE induit une rétraction des ECs des gros vaisseaux sanguins et augmente l'adhérence des cellules tumorales à la MEC.³⁶¹ Le 12-HETE est aussi impliqué dans l'athérosclérose, la neurotransmission, le psoriasis, l'hypertension et les problèmes rénaux.^{346,362-364} Dans le modèle d'arthrite K/BxN, la 12-LO leucocytaire protégerait les souris de la maladie car les macrophages 12-LO^{-/-} présentent une diminution de leur production d'un médiateur anti-inflammatoire : LXA₄.¹⁸³

Pour récapituler, le rôle majeur des plaquettes est d'assurer l'intégrité des vaisseaux sanguins et d'arrêter les saignements en cas de brèche. Ainsi, les plaquettes ont la capacité d'adhérer aux parois vasculaires, de s'activer au contact de divers substrats et de s'agréger pour former un thrombus.

1.3.4. Rôles des plaquettes dans l'immunité

1.3.4.1. Recrutement des plaquettes aux sites inflammatoires

Les plaquettes peuvent se déplacer rapidement et en grand nombre aux foyers infectieux et bris de l'endothélium vasculaire.³⁶⁵ *In vitro* et dans des modèles animaux, les plaquettes migrent aux sites riches en protéines du complément C3a et C5a.³⁶⁶ Par ailleurs, les plaquettes expriment le récepteur au fMLP³⁶⁷ et sont capables de migrer selon un gradient de fMLP *in vitro*.³⁶⁷ Elles migrent aussi aux sites inflammatoires, en étant liées à des cellules immunitaires comme les neutrophiles et les macrophages.

1.3.4.2. Rôle des plaquettes face aux microorganismes

Les plaquettes expriment de nombreux PRRs dont les TLRs et des récepteurs de lectine, mais aussi des récepteurs Fc. Les plaquettes expriment les TLRs 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 lesquels reconnaissent des motifs composants les bactéries ainsi que les virus tels que EMCV et CMV.³⁶⁸⁻³⁷¹ CLEC-2 sur les plaquettes lie le VIH.³⁷² Les plaquettes humaines expriment aussi les récepteurs FcγRIIA, FcαRI (ou CD89) et FcεR leur conférant plusieurs rôles dans l'inflammation, les allergies et la liaison des immunoglobulines attachées aux pathogènes.³⁷³⁻³⁷⁵ Par ailleurs, les plaquettes humaines participent à la génération de C3a et à la formation de C5b-9.³⁷⁶ En présence de pathogènes, les plaquettes relâchent leurs granules α riches en protéines bactéricides telles que les kinocidines qui détruisent les pathogènes.³⁷⁷ En liant les virus et les bactéries, les plaquettes limitent l'établissement et la propagation de l'infection, elles peuvent aussi les internaliser.^{372,378}

1.3.4.3. Interactions des plaquettes avec les cellules immunitaires

Les plaquettes peuvent interagir avec les différentes cellules circulantes dans le sang et les cellules des vaisseaux sanguins (Figure 1-11). Elles adhèrent i) aux ECs via l'interaction de GPIbα et d'ICAM-1 ii) aux leucocytes tels que les neutrophiles via la P-selectine, le GPIbα, l'ICAM-2, le CD40L et l'intégrine GPIIb/IIIa, iii) aux DCs via l'interaction Mac-1/JAM-C induisant leur maturation.³⁷⁹ Les plaquettes induisent l'expression de CD80 et CD86 aux monocytes permettent leur maturation en DCs.³⁸⁰

Les plaquettes sont une source majeure de CD40L ou CD154 contenu dans les granules α .^{381,382} Lorsque les plaquettes sont activées, le CD40L est exposé à la membrane et sécrété ou transféré aux MPs,³⁸³ qui contiennent aussi de nombreuses cytokines dont le TGF β , le RANTES et l'IL-1 β .^{317,384} Les plaquettes via les cytokines CXCL4 et RANTES, peuvent promouvoir la polarisation des cellules Th1 et Th17 et augmentent la sécrétion de l'IL-10, d'IFN γ , de TNF α et d'IL-17 notamment.³⁸⁵

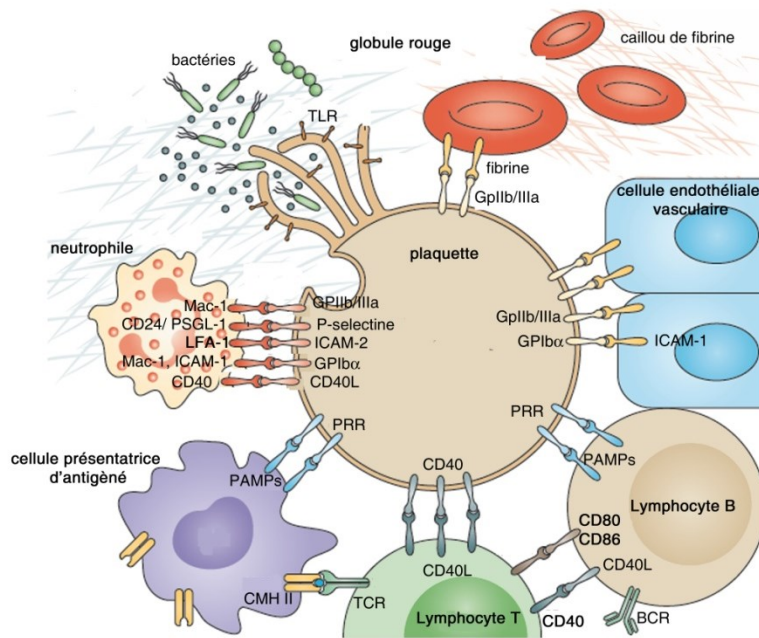


Figure 1-11. Interactions des plaquettes avec différents types cellulaires. Modifiée à partir de Yeaman et al.³⁶⁶

1.3.4.4. Interactions entre les neutrophiles et les plaquettes

Les plaquettes adhèrent aux neutrophiles dans la circulation sanguine en condition physiologique et pathologique.³⁸⁶⁻³⁸⁸ Cette liaison est réalisée entre PSGL1 et P-selectine, GPIb α /GPIIbIIIa et Mac-1, CD40 et CD40L, LFA-1 et ICAM-2 (Figure 1-11).³⁸⁸⁻³⁹¹ Cette interaction permet le ralentissement et l'adhésion de ces neutrophiles aux ECs par le biais des plaquettes déjà liées aux ECs. Les plaquettes peuvent aussi adhérer aux neutrophiles via TREM-1 et les activent.³⁹² De même, l'interaction via le CD40/CD40L augmente l'expression de P-selectin et de Mac-1 ainsi que la génération de ROS et d'IL-8. Enfin, les plaquettes peuvent aussi être phagocytées par les neutrophiles via la P-selectine et la PS.³⁹³ Les plaquettes et leurs MPs sont aussi associées aux neutrophiles en conditions physiologiques et pathologiques.^{96,394}

Les plaquettes comme les neutrophiles sont capables de générer différents eicosanoïdes. Les neutrophiles expriment la 5-LO et la 15-LO lesquelles produisent des leucotriènes. Les plaquettes quant à elles expriment la 12-LO et la 15-LO³⁹⁵ leur conférant la possibilité de libérer leurs produits respectifs 12-HETE et 15-HETE. Maclouf et al. ont mis en évidence que le 12-HpETE provenant des plaquettes induit une augmentation de production de LTB₄ par les neutrophiles.³⁹⁶ La 5-LO du neutrophile peut métaboliser l'AA en 5-HpETE qui peut être métabolisé par la 12-LO en lipoxine LXA₄.^{397,398} De plus, le 5-HETE généré par la 5-LO du neutrophile peut être converti par la 12-LO, en 5,12-diHETE dont les fonctions sont inconnues. Par ailleurs, les neutrophiles en présence de plaquettes génèrent un lipide anti-inflammatoire : la maresin 1 (Mar-1).³⁹⁹ Somme toute, l'activité concertée d'enzyme spécifique aux neutrophiles et aux plaquettes peut générer des lipides anti-inflammatoires. En effet, la LXA₄ permet de diminuer l'inflammation, les dommages tissulaires médiés par les neutrophiles, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'adhésion des neutrophiles aux ECs. Elle augmente aussi la capacité de phagocytose des neutrophiles et la production d'IL-10. La Mar-1 quant à elle induit une régénération des tissus et une réduction de l'inflammation.

1.3.5. Les plaquettes et leurs microparticules dans l'arthrite

Les plaquettes se localisent au niveau des capillaires articulaires et dans le synovium des patients arthritiques.^{96,400-402} L'endothélium vasculaire des articulations arthritiques est endommagé laissant apparaître des composants de la MEC tels que le collagène et la laminine, lesquels activent le récepteur GPVI des plaquettes. Les plaquettes activées adhèrent au site lésé et débute la formation de caillots sanguins⁸² ainsi que la libération des MPs.^{89,96,175} L'endothélium vasculaire des articulations des patients atteints d'AR présentent des interstices entre les ECs, appelés Gaps.^{82,84,89,403} Ces fenestrations sont causées par la sérotonine présente en forte quantité dans les liquides synoviaux des patients atteints d'AR.^{85,89} Les plaquettes renferment la sérotonine, cependant chez les patients arthritiques, le taux de cette amine est bas comparé aux plaquettes de personne en santé suggérant sa libération.⁴⁰⁴ La sérotonine est en partie libérée par les plaquettes activées⁸⁹

qui contribueraient ainsi à la perméabilité vasculaire dans l'AR.⁸⁹ L'entrée des plaquettes et de leurs MPs dans l'articulation n'est pas élucidée. Cependant, quelques hypothèses ont été formulées telles que l'entrée des MPs via les gaps, l'entrée des plaquettes et MPs adhérentes sur les leucocytes tels que les neutrophiles ou monocytes qui migrent aussi aux articulations.^{89,405,406}

Les plaquettes et leurs MPs sont impliquées dans l'arthrite inflammatoire.^{96,171} Les MPs de plaquette et le CD40L sont augmentés dans le sang des patients arthritiques comparé aux personnes en santé.⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹ Ces MPs contiennent de forte quantité d'IL-1 et induisent la relâche de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 par les FLS.^{96,109} Les plaquettes confèrent aussi un phénotype inflammatoire aux monocytes dans le synovium via son récepteur CD147⁴¹⁰ et produisent la PGH₂ qui est transférée aux FLS lesquelles la métabolisent en PGI₂ (Figure 1-12).

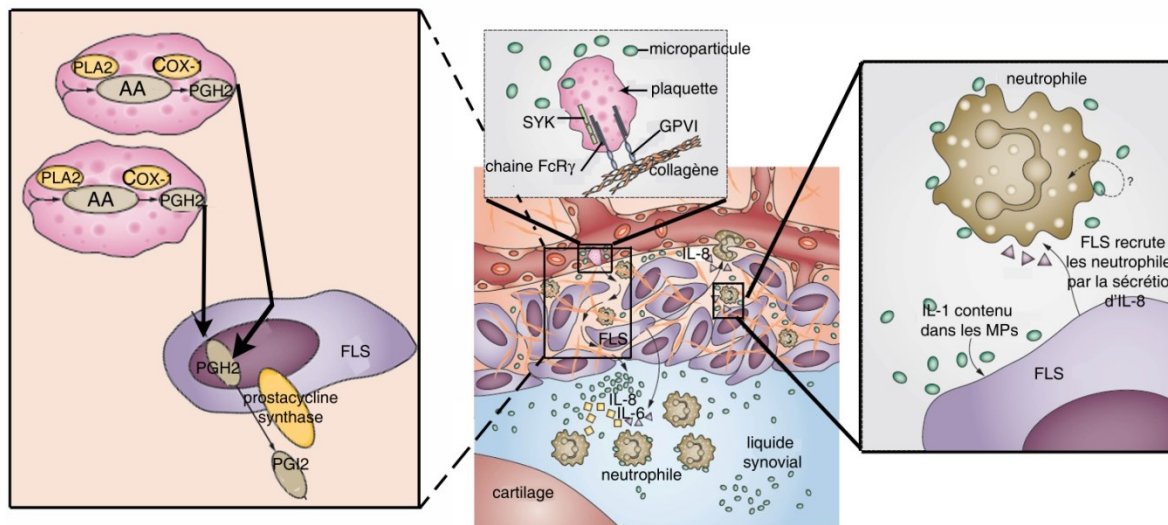


Figure 1-12. Mécanismes inflammatoires utilisés par les plaquettes dans l'arthrite rhumatoïde. Modifiée à partir de Boilard et al.⁹⁵

En somme, les plaquettes peuvent être considérées comme des cellules immunitaires permettant de piéger les pathogènes, et dans certains cas elles les endocytent. Les plaquettes contiennent divers types de molécules bioactives telles que les cytokines, des amines (sérotonine) et des eicosanoïdes qu'elles transmettent à leurs MPs. Les plaquettes et leurs MPs sont impliquées dans plusieurs pathologies, dont l'AR.

1.4. Les microvésicules

1.4.1. Définition des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (EVs) regroupent plusieurs types de vésicules issues de la stimulation des cellules ou de leur apoptose soit les exosomes, les MPs et les corps apoptotiques.⁴¹¹ Elles sont classées selon leur taille, leur processus de formation et leur contenu. Les exosomes sont les plus petites EVs dont la taille est comprise entre 40 et 100nm de diamètre. Ils ont pour origine les corps multi-vésiculaires (MVB) qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les EVs de taille intermédiaire (0.1 à 1µm) sont les microparticules (MPs), issues de l'activation cellulaire et du bourgeonnement de la membrane plasmique, ou suite à des stimuli apoptotiques. Ces MPs, et plus particulièrement celles de plaquettes font partie de mon projet de doctorat. Je les définirai plus en profondeur dans les prochains paragraphes. Enfin, les corps apoptotiques sont les plus grosses EVs générées à la suite de la fragmentation des cellules apoptotiques. Leurs tailles varient de 1 à 5µm. Les MPs et les exosomes sont retrouvées en conditions physiologiques et pathologiques dans différents fluides chez l'humain tels que le sang, les liquides synoviaux, le lait maternel, les fluides amniotiques, l'urine et le sperme.^{96,409,412-415}

1.4.2. Formation des microparticules

Les microparticules sont générées spontanément ou à la suite de divers *stimuli* d'activation ou d'apoptose, induisant un réarrangement des phospholipides de la membrane plasmique et du cytosquelette.

1.4.2.1. Réarrangements des phospholipides membranaires

Les phospholipides des membranes cellulaires sont asymétriquement distribués.^{416,417} Les phospholipides neutres tels que les phosphatidylcholines et les sphingomyélines résident dans le feuillet externe de la bicouche lipidique. Le feuillet interne est quant à lui composé de phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE). Cette asymétrie est contrôlée par trois enzymes : la flippase, la floppase et la scramblase dans les cellules quiescentes.

La flippase est une protéine dépendante de l'ATP pour transloquer un phospholipide du feuillet externe vers le feuillet interne dans une cellule quiescente. Lorsque les cellules sont activées ou en apoptose, le calcium intracellulaire augmente ce qui induit l'inhibition de l'activité de la flippase. Les phospholipides anioniques restent alors au niveau du feuillet externe des membranes plasmiques.

La floppase est une protéine dépendante de l'ATP pour le transport de phospholipide du feuillet interne vers le feuillet externe. La scramblase est quant à elle, impliquée dans le transfert bidirectionnel des phospholipides. Son activité est indépendante de l'ATP contrairement aux protéines précédentes. La scramblase s'active en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire causée par une activation de la cellule. La rupture de l'asymétrie des phospholipides dans les membranes plasmiques est ainsi assurée par la floppase et la scramblase suite à une activation cellulaire ou à l'apoptose.

L'externalisation du PS est une étape majeure dans la formation et la génération de microparticules (Figure1-13)⁴¹⁷ cependant les MPs n'expriment pas toutes la PS.^{98,383} L'inhibition de la rupture d'asymétrie bloque la production des MPs d'erythrocytes.⁴¹⁸ Par ailleurs, les cellules de personnes atteintes du syndrome de Scott ont un défaut d'exposition de la PS menant à des hémorragies.⁴¹⁹ Dans cette pathologie, les MPs sont faiblement présentes.⁴¹⁹

1.4.2.2. Réarrangements du cytosquelette

Le réarrangement des phospholipides membranaires est utile mais insuffisant pour former des MPs. Il est important qu'un réarrangement du cytosquelette d'actine s'opère pour le bourgeonnement des MPs. L'activation des cellules induit une augmentation du calcium intracellulaire, lequel active les calpaines, les caspases et les protéines RhoGTPases. Les calpaines clivent les protéines de liaison entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique et leur inhibition interrompt la formation des MPs.⁴²⁰ Les calpaines sont aussi capables de cliver les kinases responsables de la génération de PIP₂.⁴²¹ Or, une diminution de la concentration membranaire de PIP₂ favorise la relâche de MPs. Le PIP₂ permet le lien entre le cytosquelette d'actine et diverses protéines dont l' α -actinine, la spectrine et la moesine. Les caspases clivent le cytosquelette d'actine corticale et leur

inhibition par la calpeptine, conduit à l'absence de formation de filopodes qui se fragmentent en MPs.⁴²² De plus, l'activation de la caspase 3 mène au clivage du domaine inhibiteur de ROCK-1 qui peut alors phosphoryler la chaîne légère de la myosine, induisant la contraction des filaments d'actine puis le décrochage du réseau d'actine de la membrane plasmique (Figure 1-13).⁴²³⁻⁴²⁵ L'inhibition de la phosphorylation et de la dépolymérisation d'actine dans les plaquettes conduit à une absence de formation de MPs.^{286,426,427} En condition de flux, les MPs de plaquette se forment à partir de longue protusion de plaquette adhérente et activée, appelée *flow-induced protrusions* (FLIPR) qui peuvent mesurer jusqu'à 250µm.⁴²⁸

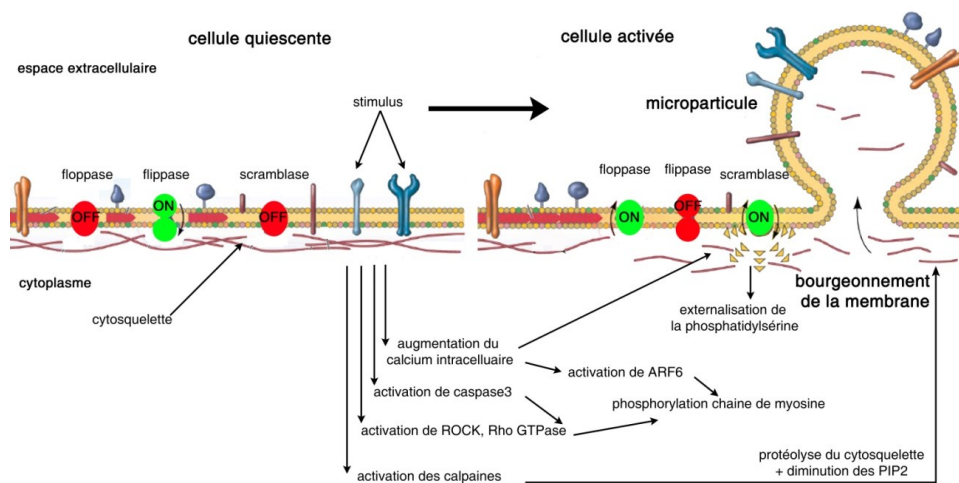


Figure 1-13. Mécanismes de formation des microparticules. Modifiée à partir de Alaarg et al.⁴²⁹

1.4.3. Hétérogénéité des microparticules de plaquettes

Plusieurs études, dont celles de notre laboratoire montrent que les MPs de plaquette sont hétérogènes, en taille, en morphologie et en organelles qu'elles contiennent. (Figure 1-14).^{98,286,383,430-433} Les MPs de plaquettes peuvent être sphériques ou tubulaires⁴³² et leurs tailles peuvent varier entre 200 et 800nm.^{95,98,432,433} Leurs surfaces peuvent être décorées de protéines citrullinées et de complexes immuns.⁹⁸ Les MPs peuvent exprimer la PS, cependant sa présence n'est pas systématique.^{98,383,432} Les MKs produisent efficacement des MPs qui cohabitent dans la circulation sanguine avec les MPs de plaquette. Les MPs de plaquette et de MK partagent quelques similitudes. Les MPs de MK n'expriment pas CD62P et LAMP-1 mais affichent GPVI et CLEC-2 alors que les MPs de plaquette

présentent CD62P, LAMP-1 et CLEC-2.^{434,435} Les mitochondries des plaquettes sont transférées aux MPs pendant le bourgeonnement et la relache des MPs, formant ainsi un sous-type de d'EVs nommés (MitoMPs).²⁸⁶ Des mitochondries libres peuvent également être relachées après l'activation des plaquettes et sont appelées freeMitos.

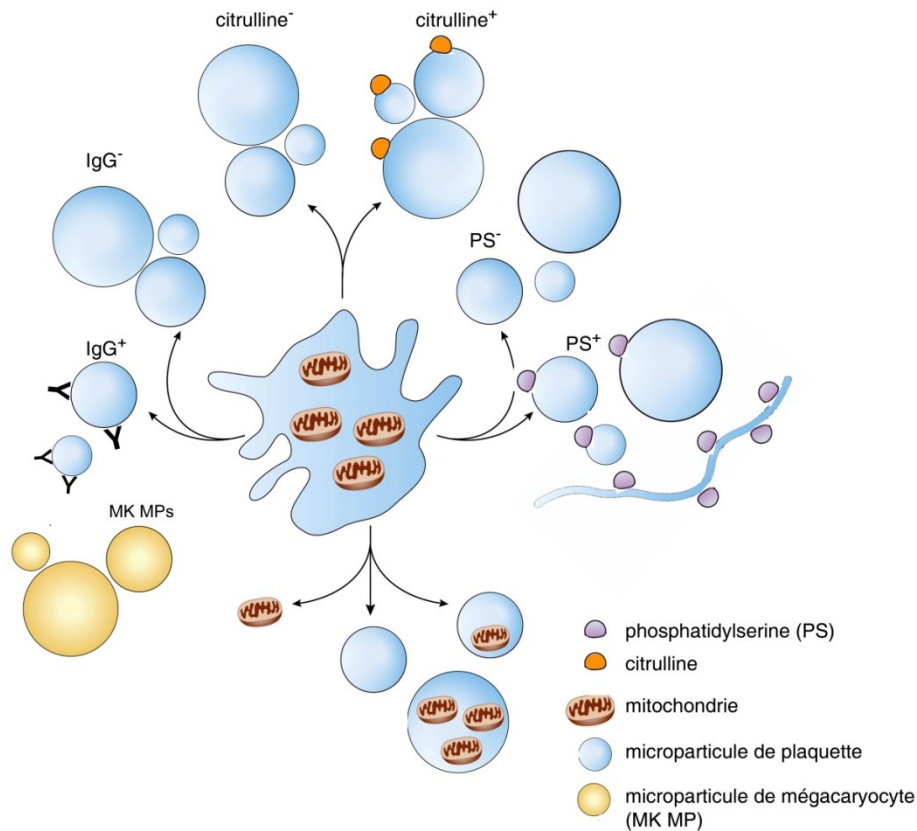


Figure 1-14. Hétérogénéité des microparticules de plaquettes. Modifiée à partir de la figure 1 en Annexe 1.

1.4.4. Contenu des microparticules

Le contenu des MPs varie selon l'origine cellulaire et la stimulation des cellules. Lorsqu'elles bourgeonnent, les MPs emmènent les antigènes de surface tels que le CD41, le CD3 et le CD15.^{96,241} Les plaquettes transfèrent aux MPs des protéines, des enzymes, des lipides et des acides nucléiques (Figure 1-15).^{430,434}

1.4.4.1. Protéome des microparticules

Les MPs transportent de nombreuses protéines du cytosquelette (actine, vimentine), des cytokines, des enzymes, des molécules d'adhésion ainsi que des facteurs de

transcription (PPAR γ et NF κ B).^{289,290,303,436-438} Plusieurs études protéomiques existent, toutefois je ne ferai pas une liste exhaustive des résultats retrouvés. Cependant, il est intéressant d'observer que les MPs de plaquettes contiennent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 ou RANTES.⁹⁶ Ces cytokines induisent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion des ECs menant à la liaison des neutrophiles. Elles induisent aussi le recrutement des monocytes, et peuvent activer les FLS à produire de l'IL-8, cytokine attractive pour les neutrophiles.⁹⁶

1.4.4.2. Lipidome des microparticules

La composition phospholipidique et lipidique des MPs de diverses origines est connue.⁴³⁹⁻⁴⁴¹ Les concentrés plaquettaires pour transfusion (CPs) contiennent des MPs et des exosomes dont l'analyse lipidomique révèle une forte expression de céramide, de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine.⁴³⁶ Les MPs renferment dans leur membrane de l'AA et de l'acide linoléique, qu'elles peuvent transmettre à d'autres cellules ou les métaboliser.^{442,443} Les MPs possèdent la machinerie nécessaire au métabolisme des lipides, leur permettant de produire divers eicosanoïdes qui peuvent être transmis à d'autres cellules.^{442,444} C'est le cas du 12-HETE des MPs de plaquette qui peut être métabolisé par les mastocytes et les neutrophiles en lipoxine.^{397,398,443} Ainsi les MPs de plaquette peuvent moduler le profil lipidique des leucocytes.⁴⁴⁵

1.4.4.3. Contenu en acides nucléiques des microparticules

Les MPs contiennent différents acides nucléiques. Les MPs de leucocyte notamment renferment de l'ADN.⁴⁴⁶ Elles peuvent aussi inclure des ARNm, des ARNt et des ARNr ainsi que des pre-miARN et miARNs.⁴⁴⁶⁻⁴⁵² Les MPs de plaquette contiennent ces différents acides nucléiques à l'exception de l'ADN nucléaire.^{430,452} Les ARNm et miRNA transférés aux cellules cibles via les MPs induisent des modifications au niveau du transcriptome des cellules et peuvent les reprogrammer.⁴⁵²

1.4.4.4. Contenu en organelles des microparticules

Une étude de spectrométrie de masse a mis en évidence la présence de protéines mitochondriales et de reticulum endoplasmique dans les MPs de plaquette.⁴⁵³ Récemment, notre laboratoire a confirmé que les MPs contiennent des mitochondries et qu'elles sont

fonctionnelles.²⁸⁶ Les protéines relatives au lysosome et à l'appareil de Golgi sont cependant absentes des MPs de plaquette.⁴⁵³

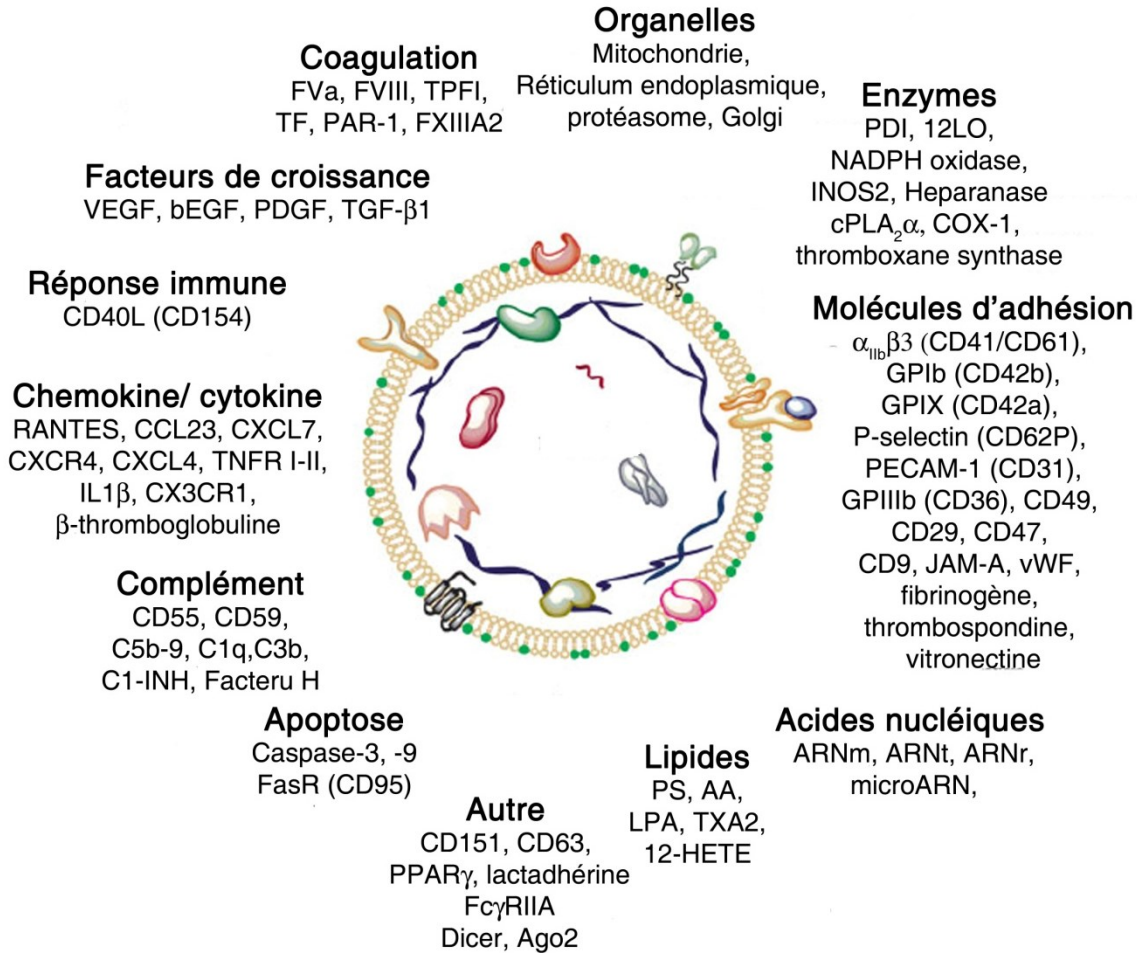


Figure 1-15. Les microparticules de plaquette contiennent diverses molécules lipidiques, protéiques et d'acides nucléiques. Modifiée à partir de Aatonen et al.⁴³⁰

1.4.5. Rôle physio-pathologique des microparticules

1.4.5.1. La communication cellulaire

Les MPs de plaquettes interagissent avec les cellules de diverses manières : i) en adhérant aux cellules transitoirement ou fermement en se liant aux molécules d'adhésion pour transférer des protéines ou induire une cascade de signalisation dans la cellule cible, ii) en étant internalisée pour libérer son contenu, transférer son contenu (Figure 1-16). Les MPs peuvent fusionner avec les membranes des cellules et transmettent ainsi leur contenu en acides nucléiques, protéines et lipides lesquels peuvent les reprogrammer.^{449,452} Elles

transfèrent aussi leurs récepteurs de surface tels que le CCR5 et le CXCR4 aux cellules qui pourront alors, par exemple, lier le VIH-I.^{454,455} Les MPs de plaquette transfèrent des antigènes de plaquettes tels que le CD41, le CD61, le CD62P, le CXCR4 et le PAR-1 aux cellules souches de progéniteurs hématopoïétiques.⁴⁵⁶ Elles peuvent aussi transférer aux neutrophiles leur récepteur GPIIb/IIIa, lequel coopère avec les intégrines $\beta 2$ pour l'activation de NF κ B.⁴⁵⁷ Les MPs de plaquette peuvent moduler l'inflammation et l'immunité en régulant la synthèse de cytokines des macrophages, en modulant la différenciation des DCs et des LTs régulateurs.^{458,459} Elles expriment des récepteurs au complément tels que le C1q et peuvent activer la voie classique du complément.^{460,461} Enfin, les MPs peuvent être internalisées par diverses cellules par phagocytose et endocytose impliquant les dynamines, clathrines et cavéolines.⁴⁶²⁻⁴⁶⁵

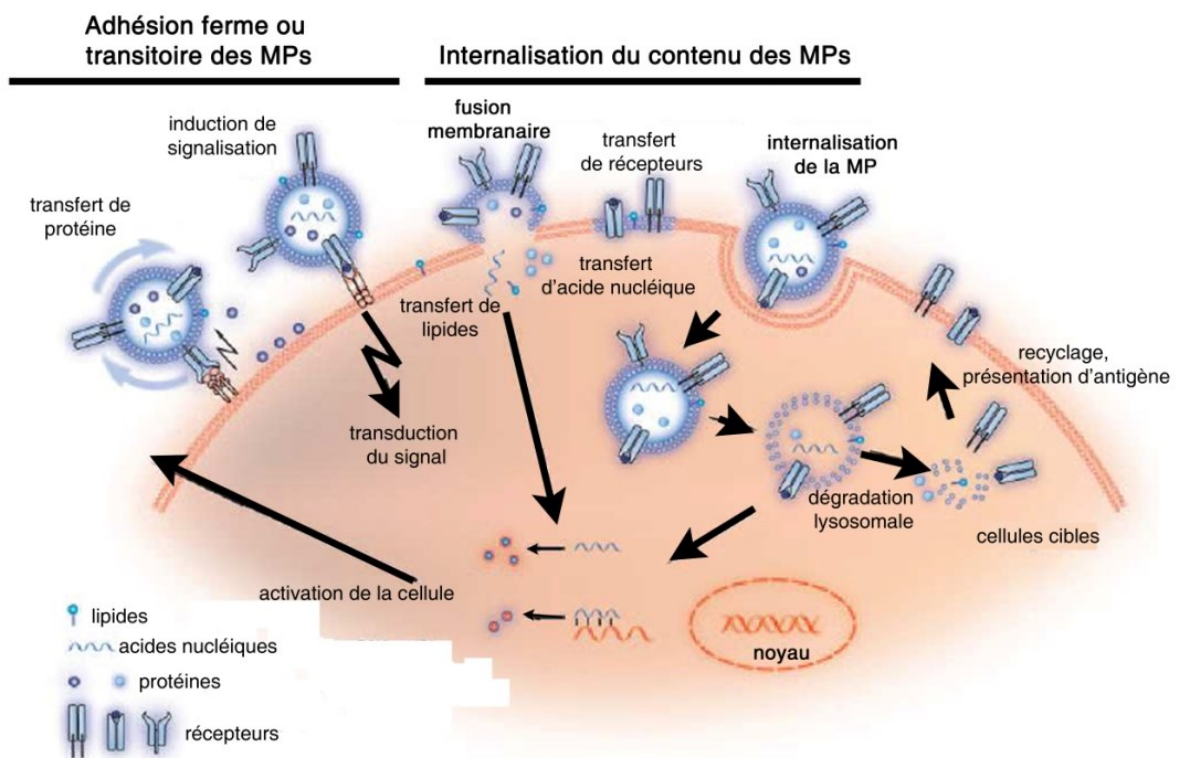


Figure 1-16. Les mécanismes d'interaction des microparticules avec leurs cellules cibles. Modifiée à partir de Mause et al.⁴⁶⁶

1.4.5.2. L'inflammation

Les MPs circulantes sont souvent plus abondantes dans les fluides de patients atteints de cancers et de maladies inflammatoires chroniques telles que l'AR, le lupus, et l'athérosclérose. Les cellules cancéreuses relâchent abondamment des MPs qui contiennent comme les MPs de plaquette, des facteurs de croissance dont le VEGF, impliqués dans les processus d'angiogénèse et de neo-vascularisation.^{430,467,468} Les MPs dont celles de plaquette peuvent induire des métastases.⁴⁶⁹ Les MPs sont aussi impliquées dans les processus de coagulation^{441,470-472} où l'expression de la PS et du facteur de tissulaire (TF) offre des propriétés pro-coagulantes aux MPs.^{473,474} En effet, la PS chargée négativement interagit avec les protéines de coagulation chargée positivement (facteur VII, IX, X et prothrombine). Les MPs de monocytes sont une des sources de TFs et expriment toutefois la thrombomoduline qui est un inhibiteur de la voie du facteur tissulaire et donc de la coagulation.^{475,476}

1.5. La mitochondrie

Les mitochondries ont été observées pour la première fois dans les années 1840 et ont été nommées dans un premier temps « bioblast » par Altmann.⁴⁷⁷ Le nom de mitochondrie fut introduit en 1898 par Brenda et al, provenant des mots grecs *mitos* et *chondros* signifiant respectivement fil et granule, référant à l'apparence de granule allongée et filamentaire.⁴⁷⁷

1.5.1. Structure des mitochondries

Les mitochondries sont de petits organelles de 1µm environ. Elles migrent grâce au cytosquelette et fusionnent entre elles, lorsque les cellules sont activées. Elles reviennent à leur état unique par le processus de scission dans les cellules quiescentes.⁴⁷⁸ Les études de MET ont révélé la structure caractéristique des mitochondries à savoir les crêtes mitochondriales.⁴⁷⁹ Les mitochondries ont une double membrane avec une membrane externe perméable aux molécules inférieures à 4-5kDa. Les plus grosses molécules passent à travers des complexes protéiques appelés porines, tels que le translocon Tom, le complexe *sorting and assembly machinery* (SAM) et la porine *voltage dependent action channel* (VDAC). La membrane interne se plisse dans la matrice pour former les crêtes mitochondriales et contient les protéines responsables de la chaîne respiratoire, la synthèse d'ATP et l'échange de métabolites tel que des acides aminés carbohydrates. La membrane interne mitochondriale exprime aussi trois translocases telles que TIM23 qui importe des précurseurs de protéines à cliver, TIM22 qui importe des protéines par la voie d'importation de cargos et Oxa1p qui est responsable de l'insertion dans la membrane interne des protéines qui ont été synthétisées dans la mitochondrie.⁴⁸⁰ La matrice contient des copies d'ADN génomique et de facteurs impliqués dans l'expression des gènes mitochondriaux comme les ribosomes et les ARNt. Le génome mitochondrial humain est constitué d'un ADN double brin circulaire dépourvu d'intron. Il code 37 gènes, dont 2 ARNr, 22 ARNt et 13 polypeptides correspondant à des sous-unités du complexe enzymatique du système de phosphorylation oxydative. La plupart des processus métaboliques, tels que le cycle de l'acide citrique, l'oxydation des acides gras et la régénération de l'ATP (Figure 1-17) se déroulent dans la matrice. La mitochondrie est une

organelle semi-autonome dans les cellules eucaryotes, qui contrôle des processus cellulaires importants comme la production d'énergie et l'apoptose.

1.5.2. Fonctions des mitochondries

1.5.2.1. Respiration cellulaire

La mitochondrie est souvent considérée comme la source énergétique de la cellule. Elle absorbe les produits de la glycolyse, tels que le pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs et produit des protons. Le NADH est utilisé par les complexes de la chaîne d'échange d'électrons dans la membrane interne de la mitochondrie. Le complexe I catalyse le transfert de 2 électrons du NADH, à la coenzyme Q (CoQ). Le complexe II reçoit les électrons à partir de la réduction du succinate, et le transmet à la coenzyme Q. Cette coenzyme Q est un transporteur mobile d'électron. Le complexe III reçoit les électrons de la coenzyme Q et les transmet au cytochrome c. Ce dernier est un autre transporteur mobile d'électrons qui transfère les électrons du complexe III au complexe IV. Le complexe V est une pompe à protons (Figure 1-17).

1.5.2.2. Mort cellulaire

La mort cellulaire programmée ou apoptose peut être initiée par les récepteurs de mort (voie extrinsèque) ou via les mitochondries (voie intrinsèque). L'engagement des récepteurs de mort, tel que FAS, mène à l'assemblage d'un complexe sous membranaire appelé *death inducing signalling complex* (DISC) composé de l'adaptateur protéique *FAS associated death-domain* (FADD), de la pro-caspase 10. La pro-caspase 10 est activée et libère la caspase 8 qui active alors la voie des caspases.

La voie intrinsèque peut être enclenchée suite à un stimulus comme un dommage à l'ADN, une réponse à une protéine mal formée ou à un stress. La protéine BID est clivée et forme BID tronqué (tBID). tBID induit l'oligomérisation de BAX et de BAK qui forment des pores dans la membrane externe de la mitochondrie, laissant sortir le cytochrome c ainsi que SMAC. Le cytochrome c lie l'*apoptotic protease activating factor -1* (APAF-1) dans le cytoplasme.

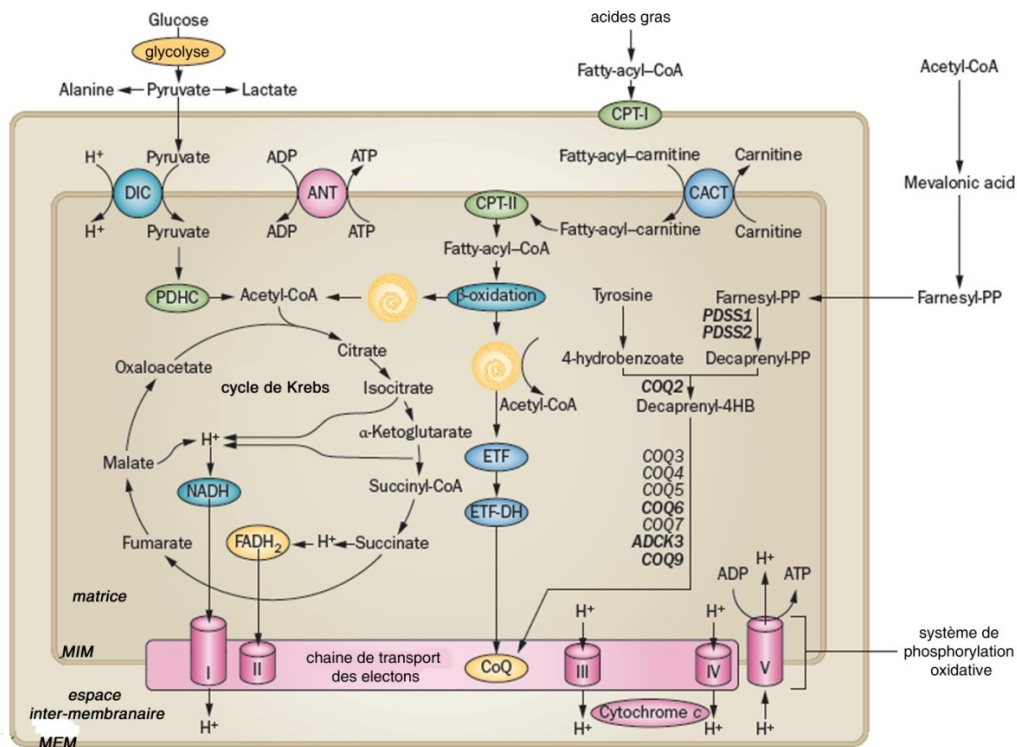


Figure 1-17. La respiration mitochondriale. Modifiée à partir de Di Mauro et al.⁴⁸¹ Membrane interne mitochondriale (MIM), membrane externe mitochondriale (MEM)

APAF-1 est un monomère qui contient un domaine de recrutement aux caspases (CARD), un domaine d'oligomérisation et un site de liaison du cytochrome c. Le complexe cytochrome c-APAF-1 se lie avec 6 autres complexes identiques pour former l'apoptosome. La pro-caspase 9 se lie à l'apoptosome et permet l'activation de la caspase 3 et 7. Cependant, il existe des régulateurs de l'apoptose comme Hsp27 qui inhibe la relâche de cytochrome c. De plus, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) empêchent l'activation des caspases et peuvent être elles-mêmes inhibées par SMAC qui est sécrétée par la mitochondrie (Figure 1-18).

1.5.3. Implications des DAMPS mitochondriaux dans les pathologies rhumatismales

D'après la théorie de l'endosymbiose, les mitochondries dérivent d'une *α-proteobacterium* rickettsiale, qui aurait fusionnée avec une cellule eucaryote il y a environ 2 milliards d'années.⁴⁸¹ Cette théorie propose qu'une cellule eucaryote ait survécue à la colonisation de son cytoplasme par une bactérie.

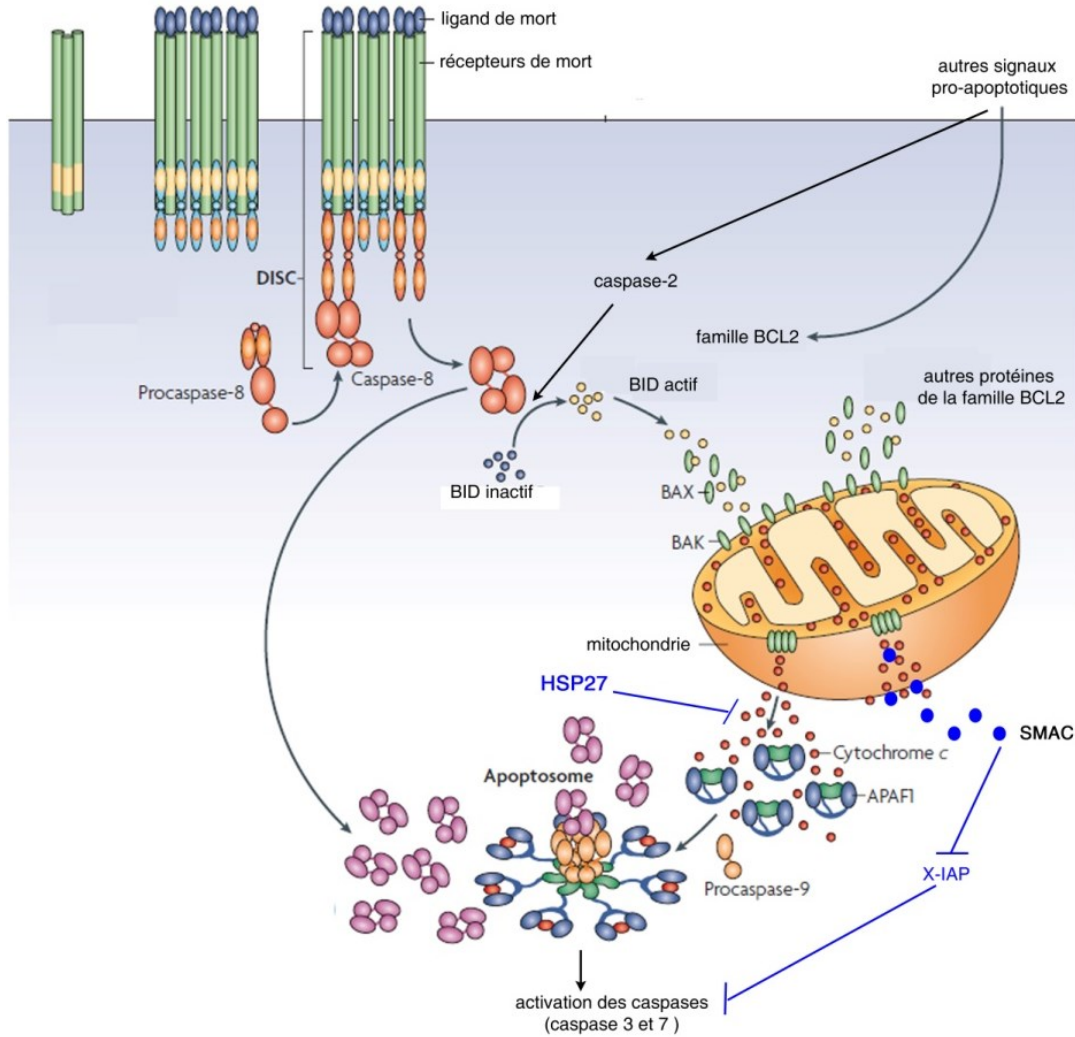


Figure 1-18. Le rôle des mitochondries dans l'apoptose. Modifiée d'après Yong-Ling P.Ow et al.⁴⁸²

Les deux entités vivent en symbiose, jouissant des bénéfices mutuels tels que la réduction des molécules carbonées et l'échange d'ATP. Initialement, cette théorie est née de la ressemblance des mitochondries aux bactéries. Plusieurs évidences laissent penser que les mitochondries ont une origine bactérienne et sont reliées aux eubactéries, notamment avec les études phylogéniques basées sur l'ARN 16S, confortées par des études sur les protéines de choc thermique (hsp) ou sur les dismutases superoxyde.

Les composants des mitochondries comme les dérivés bactériens sont une source de DAMPs, tel que résumé dans le tableau 1-4. L'ADN mitochondrial, riche en motifs CpG, est hautement inflammatoire.¹⁹⁷ Il active principalement le TLR9 des monocytes, des macrophages et des neutrophiles. L'injection d'ADN mitochondrial dans les articulations de souris induit l'arthrite.⁴⁸³ Le fMLP des mitochondries extracellulaires intervient dans les processus inflammatoires. Le fMLP active les cellules exprimant le récepteur FRP1, telles que les monocytes/macrophages et les neutrophiles.^{191,484} Il induit la dégranulation et la production de ROS dans les neutrophiles. Le fMLP mitochondrial peut chimioattirer les neutrophiles.⁴⁸⁵ Les membranes mitochondriales contiennent un phospholipide spécifique soit le diphosphatidylglycerol appelé aussi cardiolipine. Le cytochrome c, l'ATP et les ROS provenant des mitochondries peuvent activer les cellules et induire la sécrétion de cytokines.⁴⁸⁶

Tableau 1-4. Les DAMPs mitochondriaux. Modifié à partir de *A. Phillip West et al.*⁴⁸⁷

DAMPs	récepteur	activité inflammatoire
ADN CpG	TLR9, AIM2	activation des monocytes, macrophages, neutrophiles mobilisation du Ca ²⁺ , dégranulation, chimiotaxie (neutrophiles) activation des caspases et sécrétion de cytokines
fMLP	FRP1	activation monocytes mobilisation du Ca ²⁺ , dégranulation, chimiotaxie, respiration oxydative (neutrophiles)
ATP	P2RX7, P2Y2, NLRP3	activation de la caspase 1 sécrétion de cytokine
ROS	NLRP3	activation de la caspase 1 sécrétion de cytokine

1.6. Les phospholipases A₂

Les phospholipases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des phospholipides. Elles forment une famille de quatre membres nommées de A₁, A₂, C et D identifiées selon leur site d'hydrolyse sur un phospholipide présent dans les membranes cellulaires (Figure 1-19). Les phospholipases A₂ hydrolysent spécifiquement la liaison ester en position sn-2 du glycérophospholipide, libérant un lysophospholipide et un acide gras qui peut correspondre à l'AA. Cet acide gras comme l'AA peut ensuite être métabolisé en divers eicosanoïdes par différentes enzymes (Figure 1-3).

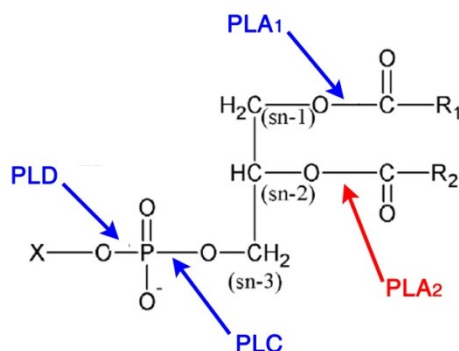


Figure 1-19. Site d'hydrolyse des phospholipases. Modifiée à partir de Birts et al.⁴⁸⁸

1.6.1. Généralités sur les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) forment une large famille d'hydrolases composée d'une vingtaine d'isoformes chez les mammifères. Contrairement aux PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂), les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) et les PLA₂ sécrétées (sPLA₂) ont besoin du calcium pour leur activité enzymatique. D'autres enzymes moins décrites font partie de la grande famille des PLA₂ telle que les *Platelet-activating factor acetylhydrolases* (PAF-AHs), les lysosomales PLA₂s, et les *adipose-specific* PLA₂. Par souci de clarté, je définirai les trois classes les plus décrites dans la littérature à savoir les iPLA₂, les cPLA₂ et les sPLA₂.

1.6.1.1. Les phospholipases A₂ indépendantes du calcium (iPLA₂)

Les iPLA₂ ou PLA₂ du groupe VIA sont indépendantes du calcium pour hydrolyser les phospholipides membranaires. Elles sont intracellulaires et ont une taille de 85kDa. Il existe neuf membres de la famille des iPLA₂ aussi référée comme la famille contenant un

domaine phospholipase patatine (PNPLA). Les iPLA₂-VIA (iPLA₂β) présentent cinq variants épissés, dont les variants 1 et 2 qui possèdent un domaine catalytique complet, alors que les trois autres variant iPLA₂-VIA-3, -Ankyrin-1 et -Ankyrin-2 ont perdu leur site catalytique du à une queue C terminale tronquée. Les iPLA₂-VIB (iPLA₂γ) ont un domaine catalytique, mais ont perdu le domaine ankyrine. Le site catalytique de ces iPLA₂ se situe au niveau d'un résidu sérine. Les iPLA₂ peuvent avoir plusieurs fonctions, dont la régulation de l'activation des plaquettes chez la souris, la diminution de l'inflammation et l'activation des ECs cardiaques.⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹

1.6.1.2. Les phospholipases A₂ dépendantes du calcium

1.6.1.2.1. Les phospholipases A₂ cytosoliques

Les cPLA₂ (ou groupe IV) existent sous plusieurs isoformes (α, β, γ, δ, ε, ζ) dont la taille varie entre 61 et 114kDa. Ces cPLA₂ possèdent un site catalytique sérine ainsi qu'un domaine de liaison au calcium sauf pour la cPLA₂γ. La cPLA₂α est la plus étudiée. Elle peut être impliquée dans des processus physiologiques tels que la parturition et l'implantation du fœtus. Elle joue aussi un rôle dans les processus inflammatoires et pathologiques tels que l'arthrite inflammatoire dans le modèle CIA, le diabète auto-immun et la résorption osseuse inflammatoire.^{186,492-494}

1.6.1.2.2. Les phospholipases A₂ sécrétées

La famille des sPLA₂ regroupe diverses enzymes exprimées chez les mammifères, les insectes, les plantes, bactéries, champignons et virus. Elles se retrouvent aussi dans divers venins provenant de serpents et d'abeilles. Il existe 10 isoformes de phospholipase A₂ chez l'humain et 11 chez la souris qui sont divisés en trois groupes soit le groupe des sPLA₂ conventionnelles (I, II, V et X), le groupe III et et le groupe XII. Les sPLA₂ conventionnelles sont des enzymes de 14 à 19kDa avec un site de liaison au calcium et un site catalytique histidine-aspartate, hautement conservés. Elles sont classées selon leur homologie de séquence, leur structure, le nombre et la position de leurs ponts disulfures (Figure 1-20).

1.6.2. La phospholipase A₂ sécrétée de type IIA

1.6.2.1. Historique : de la découverte au clonage

La sPLA₂-IIA est aussi appelée sPLA₂ synoviale ou inflammatoire puisqu'elle a été détectée pour la première fois dans les liquides synoviaux de patients arthritiques.¹⁵⁷ Cette enzyme est codée sur le chromosome 1 humain, par le gène *Pla2g2a* lequel est composé de 5 exons.^{495,496} Il existe potentiellement 7 transcrits alternatifs dont plusieurs ne fournissent pas de protéine. La séquence génique de *Pla2g2a* a permis le clonage de cette enzyme dans un vecteur inséré dans *E.Coli*⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹ et permet la production de protéines recombinantes respectant la conformation tridimensionnelle et la position des ponts disulfures.

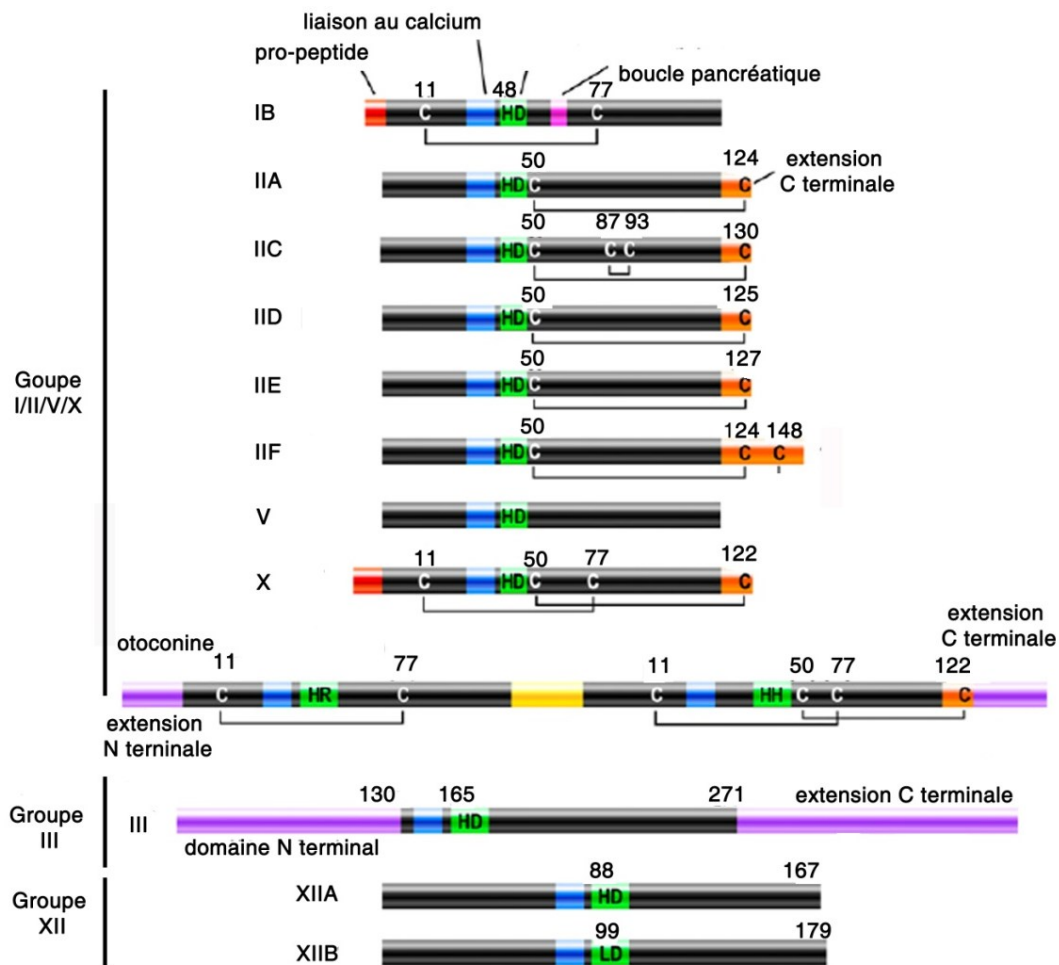


Figure 1-20. Les PLA₂ sécrétées. Modifiée à partir de Murakami et al.⁵⁰⁰

Les études cristallographiques montrent que la sPLA₂-IIA est hautement basique comme la sPLA₂-IB et présente un pont disulfure caractéristique entre la cystéine 50 et la

cystéine terminale ainsi qu'une extension en C terminale (Figure 1-20).^{501,502} Son site catalytique est en position histidine 48 et son remplacement par un glutamate conduit à un mutant inactif enzymatiquement appelé sPLA₂-IIA H48Q, lequel conserve les repliements tridimensionnels et sa capacité à lier les phospholipides.⁵⁰³ Les activités catalytiques de cette sPLA₂-IIA seront développées au paragraphe 1.6.2.3.

Chez certaines lignées de souris (C57BL6, 129/Sv, B10.RIII) la sPLA₂-IIA murine n'est pas exprimée. Dans le génome des souris C57BL6, le gène de la sPLA₂-IIA sur le chromosome 4 n'est pas transcrit à cause d'une mutation dans l'exon 3 qui modifie le cadre de lecture. Il s'agit d'une insertion d'une thymine (T) en position 166 à partir de l'ATG de l'ADN complémentaire menant à un codon-stop. Cependant, la sPLA₂-IIA murine est présente dans les lignées de souris telles que les Balbc, C3H/HE, DBA/1, DBA/2, NZB/B1N, et MRL *lpr/lpr*.⁵⁰⁴ Enfin, une souris transgénique exprimant la sPLA₂-IIA humaine (sPLA₂-IIA^{TGN}) et une souris exprimant la sPLA₂-IIA murine (sPLA₂-IIA^{+/+}) ont aussi été générées dans un fond C57BL6.^{152,505}

1.6.2.2. Expression de la sPLA₂-IIA

La sPLA₂-IIA est détectée dans différents organes humains dont la rate et les organes reproducteurs mâles au niveau des testicules et du plasma séminal où elle contribue à la maturation du sperme.⁵⁰⁶⁻⁵¹⁰ Elle est aussi produite dans la MO, la rate et le thymus chez le rat,⁵¹¹⁻⁵¹³ et dans les cellules de Paneth de l'intestin humain et murin.^{514,515} Plusieurs cellules sont identifiées toutefois pour sécréter la sPLA₂-IIA, telles que les cellules mésangiales, les cellules endothéliales, les cellules de muscles lisses, les hépatocytes, les mastocytes, les macrophages, les plaquettes.⁵¹⁶⁻⁵²⁰ La sPLA₂-IIA est présente dans les larmes et sa concentration augmente très fortement dans les fluides biologiques (notamment le sang) après un traumatisme, une intervention chirurgicale, une infection et dans les maladies auto-immunes.^{152,521-526} L'induction de sa synthèse est dépendante des endotoxines et des cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF.⁵²⁷ Toutefois, son expression est diminuée par les glucocorticoïdes et la dexaméthasone.⁵²⁸

1.6.2.3. Activité enzymatique de la sPLA₂-IIA

1.6.2.3.1. Hydrolyse des phospholipides membranaires par la sPLA₂-IIA

L'ensemble de la protéine et le site de reconnaissance des phospholipides de la sPLA₂-IIA sont chargés positivement. Cette enzyme se caractérise par son affinité pour les phospholipides anioniques comme le PG, la PE, la PS.^{497,529-531} Les résidus tryptophanes dans le site de reconnaissance interfacial sont importants pour la reconnaissance des phospholipides neutres tels que la PC. La sPLA₂-IIA n'a pas de résidu tryptophane et a une faible affinité pour les surfaces zwitterioniques dont les cellules quiescentes.^{529,530} L'insertion d'un tryptophane dans la zone d'interface de la sPLA₂-IIA augmente son interaction avec les phospholipides zwitterioniques et permet l'hydrolyse du PC.⁵³² La sPLA₂-IIA, en présence de sphingomyélinase, est capable d'utiliser les microparticules de globules rouges comme substrat et permettre la production de médiateurs lipidiques tels que l'acide lysophosphatidique (LPA).⁵³³

1.6.2.3.2. Activité bactéricide de la sPLA₂-IIA

In vitro, la sPLA₂-IIA humaine est capable de lyser les bactéries gram⁺ incluant *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus arthracis*.⁵³⁴⁻⁵³⁷ Par ailleurs *in vivo*, les souris sPLA₂-IIA^{TGN} résistent et survivent aux infections de bactéries gram⁺ telles que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus anthracis*.⁵³⁸⁻⁵⁴⁰ Cependant, la sPLA₂-IIA intestinale murine est capable de lyser les bactéries gram⁻ comme *Escherichia coli*.^{514,539} Une récente étude présente de manière élégante l'implication de la sPLA₂-IIA dans l'éradication de souches bactériennes dans la fibrose kystique (FC). Cette PLA₂ est connue pour éliminer les surfactants bronchiques.⁵⁴¹ Les jeunes patients atteints de FC présentent des expectorats avec de forts taux de sPLA₂-IIA et de *Staphylococcus aureus* alors que les patients plus âgés ont une flore bronchique majoritairement composée de *Pseudomonas aeruginosa*. Les auteurs mettent en évidence que *Pseudomonas aeruginosa* induit la production de sPLA₂-IIA par les ECs bronchiques, suffisamment pour éradiquer *Staphylococcus aureus*.⁵⁴²

Afin d'exercer son activité bactéricide sur *Staphylococcus aureus* par exemple, la sPLA₂-IIA doit i) se lier à la surface anionique des bactéries, ii) atteindre la paroi cellulaire

en passant à travers le peptidoglycan anionique, iii) hydrolyser les phospholipides des membranes bactériennes, iiiii) activer les autolysines bactériennes.⁵⁴³ La charge négative des parois bactériennes est causée par la présence de PG, de cardiolipine, d'acide teichoïque et lipotechoïque, lesquels peuvent lier la sPLA₂-IIA.⁵⁴⁴ D'autre part, pour lyser les bactéries la sPLA₂-IIA travaille avec les protéines du complément C7 et C9 qui forment le complexe d'attaque membranaire.⁵⁴⁵ La sPLA₂-IIA collabore aussi avec les neutrophiles qui sécrètent des ROS, des lysozymes et une protéine bactéricide BPI menant à la mort des bactéries.^{546,547} Les bactéries en division sont plus susceptibles d'être lysées par la sPLA₂-IIA.⁵⁴³

1.6.2.4. Activité non enzymatique de la sPLA₂-IIA

1.6.2.4.1. Les récepteurs de la sPLA₂-IIA

Historiquement, les récepteurs N-type (dans le cerveau) et M-type (découvert dans les muscles lisses du lapin) sont les premiers groupes de protéines liant les sPLA₂. Ils furent identifiés en utilisant une sPLA₂ de venin de serpent appelé OS₂. La sPLA₂-IIA humaine lie faiblement le récepteur N-type et son affinité pour le récepteur M-type humain demeure inconnue à ce jour. Cependant, une forme inactive de sPLA₂-IIA humaine semble activer les neutrophiles via le récepteur M-type suggérant que la sPLA₂-IIA puisse agir comme un ligand de ce récepteur,⁵⁴⁸ qui est exprimé sur les neutrophiles et macrophages alvéolaires.⁵⁴⁸⁻⁵⁵⁰ La liaison de la sPLA₂-IIA sur les récepteurs M-type des macrophages alvéolaires et des neutrophiles induit respectivement la sécrétion d'IL-6 ainsi que la sécrétion d'élastase et l'adhésion des neutrophiles au fibrinogène.^{548,551} La sPLA₂-IIA lie le récepteur M-type des mastocytes de la MO et induit l'activation de la cPLA₂α.⁵⁵²

La nature cationique de la sPLA₂-IIA lui permet d'interagir de manière électrostatique avec les chaînes d'héparane sulfate des protéoglycans (HSPG), versican et glypican chargés négativement.^{331,553-556} Par ces liaisons, la sPLA₂-IIA peut lier les plaquettes,³³¹ améliorer sa capacité à hydrolyser les membranes des cellules vivantes ou en apoptose,⁵⁵³⁻⁵⁵⁶ ou être internalisée dans des compartiments vésiculaires et périnucléaires grâce à une endocytose dépendante des raft et cavéoline.^{553,554,557} La sPLA₂-IIA lie aussi la decorin et versican dans les plaques d'athérosclérose.^{558,559}

Les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$ sont aussi des ligands de la sPLA₂-IIA lesquelles induisent des signaux de prolifération et activent aussi les intégrines.^{560,561} Enfin, la sPLA₂-IIA peut aussi se lier à la vimentine sur les cellules apoptotiques.⁵⁶²

1.6.2.4.2. Fonction non enzymatique de la sPLA₂-IIA

La sPLA₂-IIA lie les corps apoptotiques et induit leur internalisation dans les cellules monocytaires THP-1 différenciées en macrophage, indépendamment de son activité catalytique.⁵⁶³ La différenciation des cellules THP-1 en macrophage nécessite un traitement au PMA lequel induit l'expression de HSPG qui permet la liaison à la sPLA₂-IIA.⁵⁶³ La sPLA₂-IIA se lie au facteur Xa grâce à ses résidus basiques, induisant une diminution de l'activité prothrombine et inhibition de la coagulation.⁵⁶⁴ Cependant, la sPLA₂-IIA peut aussi induire l'afflux de calcium menant à l'agrégation des plaquettes, et la formation de thromboxane B₂.⁵⁶⁵ De même elle induit la mobilisation calcique, l'activation de la voie des MAPK et l'activation de la cPLA₂ sur les astrocytes.^{566,567}

1.6.2.5. Implication patho-physiologique de la sPLA₂-IIA

1.6.2.5.1. Cancer

La sPLA₂-IIA est fortement exprimée dans les cancers chez l'homme notamment au niveau du système digestif touchant l'œsophage, l'estomac, les voies biliaires, le pancréas, l'intestin et l'intestin grêle, et le colon, mais aussi dans les cancers du sein.^{506,568-577} La majorité des tumeurs contiennent de forts taux de sPLA₂-IIA (marquage immunohistochimique), c'est un indice de mauvais pronostic dans le cancer de la prostate.^{587,595,597} L'expression de l'ARNm de la sPLA₂-IIA est associée avec une apoptose tardive et pourrait avoir un effet protecteur dans les adénocarcinomes gastriques.⁵⁷⁸ Les cancers colorectaux peuvent être précédés de maladie précurseur de cancer telle que la polypose adénomateuse familiale (FAP). Un modèle murin existe pour étudier la FAP, il s'agit du modèle murin APC^{min/+} où la sPLA₂-IIA pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les cancers colorectaux.^{579,580} Les mutations dans le gène *Pla2g2a* chez l'homme ne sont pourtant pas liées à la FAP et aux cancers colorectaux.⁵⁸¹⁻⁵⁸³ Cependant, ces études n'excluent pas le rôle de la sPLA₂-IIA qui est très abondante dans les adénomes de patients atteints de FAP. Elle pourrait fournir l'AA pour la production d'écossanoïdes.⁵⁸⁴

Contrairement aux cancers colorectaux, les différentes études sur le cancer de la prostate supportent un rôle protumoral de la sPLA₂-IIA. Les souris exprimant la sPLA₂-IIA présentent des tumeurs de la prostate très vascularisées, des métastases osseuses et une diminution de la survie au cancer corrélant avec la survie des patients avec tumeurs contenant de fortes quantités de sPLA₂-IIA.^{570,585}

1.6.2.5.2. Inflammation

La sPLA₂-IIA joue un rôle important dans l'inflammation. Elle est abondante dans les tissus et liquides biologiques de plusieurs maladies inflammatoires comme l'athérosclérose, la maladie de Crohn, la pancréatite et l'asthme.⁵⁸⁶ Sa présence est fortement corrélée avec la sévérité de ces pathologies. La sPLA₂-IIA est aussi fortement exprimée lorsque le système nerveux central est lésé et dans les maladies neurologiques telles que Alzheimer. Elle est souvent associée aux astrocytes et à la neuro-dégénération via l'apoptose.^{587,588} La sPLA₂-IIA induit l'activation de la lignée astrocytaire humaine.^{566,567} La sPLA₂-IIA est principalement exprimée par les cellules musculaires lisses des artères humaines en santé. Elle est cependant surexprimée dans les plaques d'athérosclérose notamment dans les régions riches en macrophages et dans les corps lipidiques. Elle est aussi détectée au niveau de la MEC et est associée avec les fibres de collagène.^{558,589,590} Par ailleurs, les fortes concentrations plasmatiques de sPLA₂-IIA corrélerent avec les accidents cardiovasculaires.⁵⁹¹⁻⁵⁹⁵

1.6.2.5.3. Arthrite

La sPLA₂-IIA est fortement exprimée dans les liquides synoviaux et les cellules synoviales dans les articulations des patients atteints d'AR contrairement aux personnes en santé.^{152-157,586} Elle est localisée dans l'endothélium, les muscles vasculaires lisses, les mastocytes ainsi que dans les synoviocytes macrophages et FLS.¹⁵³ Son expression est augmentée en présence d'IL-1 β .¹⁵⁴ Dans l'AR, la sPLA₂-IIA active la COX-2 et par conséquent la production de prostaglandine par les FLS dépendamment et indépendamment de son activité catalytique.^{596,597} La contribution de la sPLA₂-IIA a été mise en évidence grâce au modèle murin d'arthrite. Les souris déficientes en sPLA₂-IIA tel que les C57BL6 développent une arthrite faible en comparaison aux souris exprimant la sPLA₂-IIA murine ou la sPLA₂-IIA humaine (sPLA₂-IIA^{TGN}) dans un fond génétique C57BL6.¹⁵²

1.7. Objectifs de l'étude

Les travaux présentés dans cette thèse visent à étudier le rôle de la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA (sPLA₂-IIA) dans l'AR. Cette enzyme est localisée dans le *synovium* et les liquides synoviaux des patients arthritiques où sa présence est accrue.^{152,156,157} Son implication dans la sévérité de l'arthrite a été montrée récemment dans un modèle murin.¹⁵² Cependant, les mécanismes par lesquels la sPLA₂-IIA contribue à la gravité de l'arthrite restent indéterminés et font l'objectif principal de mon projet de doctorat. Nous avons émis l'hypothèse que la sPLA₂-IIA de part son activité enzymatique pourrait avoir des cibles dans les liquides synoviaux arthritiques, et que les produits d'hydrolyse pourraient aussi avoir un impact sur l'inflammation. Afin d'éclaircir le rôle de la sPLA₂-IIA dans la pathogenèse de l'AR nous avons eu trois objectifs axés sur l'identification des cibles de la sPLA₂-IIA et l'impact des interactions de la sPLA₂-IIA avec ses cibles.

Notre premier objectif fut de déterminer les cibles de la sPLA₂-IIA. Cette enzyme est bien connue pour son activité bactéricide.⁵³⁴⁻⁵⁴⁰⁵¹⁴ Or les liquides synoviaux des patients arthritiques contiennent des mitochondries extracellulaires, qui sont des vestiges bactériens fortement inflammatoires.^{286,598,599} Par ailleurs, la sPLA₂-IIA est inactive sur les membranes cellulaires. Elle possède tout de même de l'affinité pour les phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (PS) lequel est abondant dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce PS est exposé sur les MPs de plaquettes qui sont abondantes dans les liquides synoviaux des patients atteints d'AR.^{96,409} De plus, ces MPs expriment à leur surface de la vimentine qui est aussi un ligand de la sPLA₂-IIA,^{562,600} qui peut les hydrolyser.⁵³³

Notre second objectif fut d'étudier les impacts de l'association de la sPLA₂-IIA avec les mitochondries et les MPs avec les leucocytes les plus abondants dans les liquides synoviaux arthritiques et qui contribuent à la maladie : les neutrophiles. Etant donné que les MPs de plaquette lient les neutrophiles,^{96,393,394} et que la sPLA₂-IIA permet l'internalisation des corps apoptotiques dans les cellules monocytaires,⁵⁶³ la sPLA₂-IIA pourrait augmenter la liaison et l'internalisation des MPs de plaquette par les neutrophiles. Par ailleurs, les

plaquettes et les bactéries induisent la NETose et la production de leucotriènes par les neutrophiles.^{236,396} La sPLA₂-IIA pourrait interférer dans ces processus.

Notre troisième objectif fut de caractériser le contenu des MPs de plaquette et son transfert dans les neutrophiles. Les MPs sont connues pour contenir des acides nucléiques, des lipides bioactifs et des protéines qu'elles transfèrent aux cellules cibles, telles des professionnelles de la communication intercellulaire.⁴⁵²

Les réponses à ces différents objectifs permettront de dévoiler quelques fonctions de la sPLA₂-IIA dans l'arthrite ainsi que sur les microparticules de plaquettes et les mitochondries libres.

Chapitre 2. Les plaquettes libèrent leurs mitochondries servant de substrat à la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA bactéricide afin de promouvoir l'inflammation

2.1. Avant-propos

Le Dr Eric Boilard a conçu et dirigé le projet de recherche. Il a participé à l'analyse des données et corrigé l'article.

Les Drs Luc Boudreau, Nathalie Cloutier, Steve Lacroix, Marc Pouillot, Louis Thibault, John W. Semple et Michael H Gelb ont conçu les expérimentations.

Les Drs Luc Boudreau, Nathalie Cloutier, Denis Soulet ainsi que Nicolas Martin, James Bollinger, Alexandre Paré, Matthieu Rousseau, Gajendra S. Naika, Geneviève Marcoux, Tania Lévesque, Cynthia Laflamme ont réalisé les expériences.

Les Drs Peter A. Nigrovic, Hamzeh-Cognasse, Fabrice Cognasse, Olivier Garraud, Helga Guderley, Gérard Lambeau, Richard W. Farndale, Louis Thibault et Michael H. Gelb ont fourni des réactifs primordiaux.

Les Drs Luc Boudreau, Nathalie Cloutier, Denis Soulet, Nicolas Martin, James Bollinger, Helga Guderley, Louis Thibault et Michael H Gelb ont analysé les données.

J'ai conçu et réalisé les expériences, analysé et interprété les données, réalisé les analyses statistiques et aidé à la rédaction de certaines parties du manuscrit.

Ce chapitre a été publié dans Blood le 31 juillet 2014.

2.2. Résumé

Les plaquettes sont très abondantes dans le sang où elles jouent un rôle dans l'hémostase. Dépourvues de noyau, elles contiennent des mitochondries fonctionnelles. Lorsque les plaquettes sont activées, elles produisent des microparticules (MPs). Nous avons émis l'hypothèse que les plaquettes activées relâchent aussi des mitochondries. En effet, elles libèrent leurs mitochondries fonctionnelles, encapsulées dans des MPs appelées mitoMPs ou libres appelées freeMitos. Ces freeMitos sont retrouvées dans les concentrés plaquettaires (CP) utilisés pour les transfusions. Leurs concentrations augmentent dans les CPs qui ont causés des réactions aiguës chez les patients transfusés. Les mitochondries sont des substrats des phospholipases A₂ sécrétées de type IIA (sPLA₂-IIA), une phospholipase bactéricide. Elles sont hydrolysées par la sPLA₂-IIA libérant des médiateurs inflammatoires (lysophospholipides, acides gras, ADN mitochondrial) lesquels induisent l'activation des leucocytes. Les freeMitos interagissent aussi avec les neutrophiles *in vivo*, menant à leurs adhésions aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ainsi, les freeMitos produites par les plaquettes sont au centre d'un mécanisme puissant menant à une réponse inflammatoire.

Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA secreted phospholipase A₂ to promote inflammation

Luc H. Boudreau¹, Anne-Claire Duchez^{1*}, Nathalie Cloutier^{1*}, Denis Soulet², Nicolas Martin³, James Bollinger⁴, Alexandre Paré², Matthieu Rousseau¹, Gajendra S. Naika⁴, Tania Lévesque¹, Cynthia Laflamme¹, Geneviève Marcoux¹, Gérard Lambeau⁵, Richard W. Farndale⁶, Marc Pouliot¹, Hind Hamzeh-Cognasse⁷, Fabrice Cognasse⁷, Olivier Garraud⁷, Peter A. Nigrovic⁸, Helga Guderley³, Steve Lacroix², Louis Thibault⁹, John W. Semple¹⁰, Michael H. Gelb⁴ and Eric Boilard¹

¹ Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

² Axe Neurosciences, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Département de Psychiatrie et Neurosciences, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

³ Département de Biologie, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1K 7P4

⁴ Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, WA, USA, 98195

⁵ Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Centre National de la Recherche Scientifique - Université Nice Sophia Antipolis, Valbonne, France, 06560

⁶ Department of Biochemistry, University of Cambridge - Downing Site, Cambridge, UK CB2 1QW

⁷ Etablissement Français du Sang Auvergne-Loire & Université de Lyon, F-42023, GIMAP- EA3064, Saint-Etienne, France

⁸ Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Brigham and Women's Hospital, and Division of Immunology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, 02115

⁹ Research and Development, Héma-Québec, Québec, QC, Canada, G1V 5C3

¹⁰ The Keenan Research Center in the Li Ka Shing Knowledge Institute, St. Michael's Hospital, Toronto, ON, Canada, M5B 1W8

* These authors contributed equally to this work

2.3. Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a highly potent inflammatory trigger and is reportedly found outside the cells in blood in various pathologies. Platelets are abundant in blood where they promote hemostasis. Although lacking a nucleus, platelets contain functional mitochondria. On activation, platelets produce extracellular vesicles known as microparticles. We hypothesized that activated platelets could also release their mitochondria. We show that activated platelets release respiratory-competent mitochondria, both within membrane-encapsulated microparticles and as free organelles. Extracellular mitochondria are found in platelet concentrates used for transfusion and are present at higher levels in those that induced acute reactions (febrile nonhemolytic reactions, skin manifestations, and cardiovascular events) in transfused patients. We establish that the mitochondrion is an endogenous substrate of secreted phospholipase A₂ IIA (sPLA₂-IIA), a phospholipase otherwise specific for bacteria, likely reflecting the ancestral proteobacteria origin of mitochondria. The hydrolysis of the mitochondrial membrane by sPLA₂-IIA yields inflammatory mediators (ie, lysophospholipids, fatty acids, and mtDNA) that promote leukocyte activation. Two-photon microscopy in live transfused animals revealed that extracellular mitochondria interact with neutrophils in vivo, triggering neutrophil adhesion to the endothelial wall. Our findings identify extracellular mitochondria, produced by platelets, at the midpoint of a potent mechanism leading to inflammatory responses.

2.4. Introduction

Platelets are small (2-4 μ m) discoid anucleate cell fragments released by megakaryocytes resident in the bone marrow.¹ During this process, megakaryocytes transfer components to daughter platelets, including mRNA² and microRNA,³ as well as cytoplasmic organelles, such as granules and mitochondria.^{4,5}

Platelets are highly abundant in blood where they promote hemostasis.⁶ However, platelets are also activated in multiple inflammatory responses in which they participate via the liberation of their broad arsenal of mediators.^{7,8} On platelet activation, platelet cytoplasmic granules (α , dense, and lysosomes) fuse with the plasmamembrane leading to the release of granule contents into the extracellular milieu.⁹ Activated platelets also shed thrombotic and proinflammatory membrane vesicles termed microparticles (MPs).⁷

Mitochondria are thought to be descendant of the Alphaproteobacterium *Rickettsia prowazekii*,¹⁰ and as a result, they can generate highly potent proinflammatory signals when present extracellularly.¹¹⁻¹⁵ In blood circulation, platelets appear as a major reservoir of mitochondria. Although platelet mitochondria have been implicated in platelet activation and thereby thrombosis,^{16,17} whether platelets can release their mitochondria is unknown. We made the surprising observation that stimulated platelets relocate mitochondria toward the cell membrane and then release respiratory-competent mitochondria into the extracellular milieu, both as free organelles and encapsulated within microparticles. Extracellular mitochondria are internalized by bystander leukocytes and, importantly, become a substrate for bactericidal secreted phospholipase A₂, leading to the liberation of proinflammatory lipid mediators and mitochondrial DNA (mtDNA). Taken together our work identifies a novel mechanism by which platelets mediate inflammation, with considerable relevance to blood transfusion, and provides a potential explanation for the increased levels of extracellular mtDNA reported in blood in multiple pathologies.^{13,18,19}

2.5. Results

2.5.1. Distribution of mitochondria in platelets

Using fluorescence and TEM, we found that unactivated platelets contain an average of ~4 mitochondria, frequently located in the vicinity of the plasma membrane (Figure 2-1A-C, Supplementary video 1 and Supplementary Figure 2-1A). Remarkably, a fraction of these mitochondria promptly localize in pseudopodia upon activation by thrombin, a serine protease that participates in blood coagulation (Supplementary video 2 and Supplementary Figure 2-1B).

2.5.2. Activated platelets release functional mitochondria

In addition to promoting release of granule contents,²⁴ platelet activation triggers cytoplasmic membrane budding and the shedding of submicron vesicles called MPs.^{7,25} Taking into account the localization of mitochondria in the vicinity of the cytoplasmic membrane, we hypothesized that mitochondria may be packaged within MPs and form mitochondria-containing microparticles (mitoMPs).

Mitochondria are recognized as the powerhouse of the cell, producing the energy (adenosine triphosphate) required for most metabolic reactions, mostly via oxidative phosphorylation.²⁶ To determine whether platelets release mitochondria, we first evaluated specific mitochondrial O₂ consumption, mediated by flux through complexes I to IV, using specific inhibitors of complexes I and III (rotenone and antimycin A, respectively). Unless mitochondria have been isolated and free in the milieu, permeabilization of the cytoplasmic membrane is necessary to allow the access of exogenous substrates added exogenously to stimulate mitochondrial respiration.^{27,28} To evaluate respiration by putative mitoMPs in platelet-free supernatants, we thus used an established permeabilization method for our assays.²⁸ We found that the supernatant from activated platelets harvested by centrifugation (cell-free; supplemental Figure 2-2) consumes O₂ (Figure 2-2A). In contrast, the supernatant from isolated resting platelets exhibited no detectable O₂ consumption (Figure 2A). Quite unexpectedly, significant O₂ consumption was detected even in the absence of detergent (Figure 2-2A). These observations suggest that, in addition to active mitoMPs, platelets may also release respiration-competent free mitochondria (freeMito) into the extracellular milieu (Figure 2-2B).

We next examined the presence of freeMitos and mitoMPs, using a series of quantitative and qualitative approaches. Using a monoclonal antibody directed against a specific mitochondrial outer membrane receptor (TOM22; supplemental Figure 2-3), we found intact freeMitos in the supernatants from thrombin-activated platelets, quantified by a PCR approach targeting mtDNA sequences (Figure 2-2C). TEM and confocal fluorescence microscopic analyses using fluorescent dyes to discriminate the plasma membrane and mitochondria further establish the production of freeMitos and mitoMPs by activated platelets (Figure 2-2D-E).

Whereas the transfer of organelles from megakaryocytes to platelets is mediated by cytoskeleton components,⁴ we assessed whether the cytoskeleton is also involved in the extrusion of mitochondria from platelets. Using actin and tubulin polymerization inhibitors along with hs-FCM29 to resolve the submicron particle populations (ie, MPs, mitoMPs, and freeMitos; Figure 2-2B) produced by platelets, we observed that the release of mitochondria (freeMitos and mitoMPs) implicates actin and occurs independently of

microtubules (Figure 2-2F-G). Thus, via cytoskeletal contribution, activated platelets are a source of mitoMPs and respiration-competent freeMitos.

Thrombin is a highly potent agonist of platelet activation, and we next aimed at determining whether thrombin and other wellrecognized platelet stimuli (supplemental Figure 2-4A-B) promote the release of extracellular mitochondria. We found that all the platelet stimuli tested lead to the production of both mitoMPs and freeMitos (Figure 2-2H). Interestingly, freeMitos were found to fulfill the current structural definitions of conventionalMPs. In fact, freeMitos are smaller than intact platelets and have submicron dimensions and a membrane moiety (Figure 2-2F), providing an explanation for the recognized heterogeneity found among platelet-derived MPs.³⁰

2.5.3. Relevance of extracellular mitochondria in health

The broad diversity of stimuli capable of promoting concomitant release of mitochondria and MPs points to the biological relevance of this phenomenon. We thus sought to determine whether mitochondria are released *in vivo* in sterile inflammatory pathologies where platelet MPs are known to be produced. Using hs-FCM, anti-TOM22 coprecipitation of mtDNA, and TEM, we could detect significant levels of extracellular mitochondria in synovial fluid from patients with RA (Figure 2-3A-C), consistent with the accumulation of platelet MPs^{29,31,32} and mtDNA³³ reported in RA synovial fluid. For comparison, lower concentrations of extracellular mitochondria of platelet origin (CD411 mitoMPs) were measured in the synovial fluid of osteoarthritis patients (Figure 2-3A), a joint disease in which platelet MPs are also less abundant.^{31,32} Similar observations were made in bronchoalveolar lavage fluids from the experimental transfusion-related acute lung injury (TRALI) mouse model (supplemental Figure 2-5A-B). Although the identified CD411 mitoMPs are very likely produced by platelets, damaged cells and activated mast cells are potential sources of freeMitos.^{11,12} We thus endeavored to confirm the platelet origin of extracellular mitochondria in a relevant biological context where platelets have been reported to release MPs *ex vivo*. Given their pivotal functions in hemostasis,³⁴ platelet transfusion is frequently used to restore optimal platelet levels in thrombocytopenic patients. In contrast to red blood cell (RBC) concentrates, which are stored at ; 4°C for up to 42 days, platelet concentrates used for transfusion are stored at 20°C to 24°C. Adverse reactions (febrile nonhemolytic reactions [fever or chills], anaphylaxis, transfusion-related

sepsis, and TRALI) are more frequently observed with platelet than RBC transfusion.^{35,36} It is generally thought that this difference may be due to the presence of bacteria in platelet concentrates grown at permissive temperatures. From a phylogenetic view, mitochondria are thought to have originated from the endosymbiosis of alphaproteobacteria (Rickettsiales) during the early evolution of eukaryotic cells.³⁷ We hypothesized that extracellular mitochondria (organelles that are lacking in RBCs) present in platelet concentrates might trigger adverse reactions similar to those observed with infectious agents.

We thus evaluated the presence of extracellular mitochondria in platelet concentrates used for human transfusion in the course of their conservation. As measured using the O₂ consumption assay, as well as by TOM22 coprecipitation of mtDNA, hs-FCM, and TEM, we demonstrate significant levels of freeMitos and mitoMPs in platelet concentrates (Figure 2-3D-G). In keeping with the coupling of O₂ utilization with energy production, mitochondria present in MPs and free mitochondria in platelet concentrates display JC-1 dye aggregates, a cationic dye that accumulates in energized cell mitochondria (Figure 2-3H). Most importantly, we established that platelet concentrates that had been associated with adverse transfusion reactions in human recipients contain higher concentrations of extracellular mitochondria (Figure 3I). Thus, extracellular mitochondria, which have the alphaproteobacterium *Rickettsia prowazekii*¹⁰ as an ancestor, are present in platelet concentrates used for transfusion, particularly in those that triggered transfusion related incidents, and exhibit a significant degree of functionality.

2.5.4. The mitochondrion is an endogenous substrate for the bactericidal secreted phospholipase A₂-IIA

What are the implications of the release of free mitochondria by platelets? Extracellular mitochondria are already well recognized as highly potent damage-associated molecular patterns (DAMPs), capable of mediating inflammation locally^{12,14} and systematically^{13,15} through their bacteria-like components (ie, N-formylated peptides and mtDNA). In this study, we aimed to identify unprecedented roles for extracellular mitochondria in inflammation. The sPLA₂-IIA, initially identified in platelets³⁸ and present abundantly in this cellular lineage (Figure 2-4A), hydrolyzes the sn-2 acyl bond of glycerophospholipids,

resulting in the release of free fatty acids and lysophospholipids. sPLA₂-IIA is found in plasma and is induced in chronic and acute inflammatory conditions.³⁹ Although the promotion of host defense via bacterial membrane hydrolysis is an established function for this enzyme,³⁹ sPLA₂-IIA is only poorly active toward the plasma membrane of eukaryotic cells, including platelets,⁴⁰ and its endogenous substrate in sterile inflammation has thus far remained unclear.

The ancestral similarities between bacteria and mitochondria^{10,37} prompted us to examine whether the mitochondrial membrane is susceptible to hydrolysis by sPLA₂-IIA. We observed that sPLA₂-IIA binds mitochondria (Figure 2-4B-C), leading to the release of various lysophospholipids and free fatty acids (Fig 2-4D-E), and in so doing, severely affects mitochondrial structural integrity (Figure 2-4F). Similarly to bacteria, the mitochondrial genome is rich in unmethylated CpG motifs, a recognized DAMP¹³ and which is found outside cells in multiple disorders.^{13,18,19} To determine whether mitochondrial digestion by sPLA₂-IIA might lead to mtDNA release, we used confocal microscopy and an assay specifically designed to quantify soluble DNA. With this combination of approaches, we identified sPLA₂-IIA as an enzyme capable of promoting the liberation of mtDNA (Figure 2-4G-H). Thus, the mitochondrion is an endogenous substrate of sPLA₂-IIA, and its hydrolysis leads to the generation of recognized proinflammatory signals (arachidonic acid,⁴¹ lysophospholipids,⁴² and mtDNA¹³). Further, this result raises the possibility that a previously unrecognized function of sPLA₂-IIA is to assist in the degradation of free Mitos released by platelets and potentially other cells.

2.5.5. Extracellular mitochondria interact with neutrophils

We next endeavored to identify a relevant cellular lineage that may be regulated by extracellular mitochondria. We found that fluorescent mitochondria intravenously injected in mice associate with neutrophils, a polymorphonuclear leukocyte cell lineage that plays key roles in inflammation⁴³ (Figure 2-5A). Intravital investigations in mice using 2-photon microscopy demonstrated that extracellular mitochondria present in the bloodstream prompt neutrophil interactions with the vascular wall and rolling (Figure 2-5B; supplemental Movie 3). Using qualitative scanning electron microscopy, we found that extracellular mitochondria consistently lead human neutrophils to display striking

ultrastructural features, similar to pseudopodia (Figure 2-5C). Together, these observations suggest that extracellular mitochondria can interact with neutrophils, there by modulating the activities of the latter.

2.5.6. Inflammation is amplified by the combined action of extracellular mitochondria and sPLA₂-IIA

To address the possibility that the combination of sPLA₂-IIA and mitochondria might trigger activities other than those induced by either mitochondria or sPLA₂-IIA alone, we assessed whether sPLA₂-IIA and extracellular mitochondria could associate together with neutrophils. Interestingly, fluorescent sPLA₂-IIA and exogenously labeled mitochondria rapidly associate with human neutrophils and colocalize intracellularly (Figure 2-6A-B) through dynamin, clathrin, and caveolin-dependant endocytosis (Figure 2-6C; supplemental Figure 6). Arachidonic acid (20:4, n-6) liberated by sPLA₂-IIA may contribute to the biosynthesis of inflammatory eicosanoids such as leukotrienes by neighboring leukocytes.⁴¹ To determine whether the association of mitochondria, sPLA₂-IIA, and neutrophils might promote cell activation, we measured the release of leukotriene B4 (LTB₄) by neutrophils. We found that neutrophils produce copious amounts of LTB₄ when both extracellular mitochondria and sPLA₂-IIA are present (Figure 2-6D). Importantly, such LTB₄ production is strictly dependent on sPLA₂-IIA catalytic activity because it takes place even in presence of the cPLA_{2a} inhibitor pyrrophenone, and it is not observed when a catalytically inactive sPLA₂-IIA mutant form is used (Figure 2-6D; supplemental Figure 7).

Platelets are implicated in the activation of neutrophils and participate in the formation of neutrophil extracellular traps (NETs),⁴⁴ a recognized feature found in RA and transfusion adverse reactions like TRALI.^{45,46} Interestingly, freeMitos are also NET inducers, a phenomenon that is amplified in the presence of sPLA₂-IIA (Figure 2-6E). Consistent with their recognized proinflammatory potency, the different hydrolytic products derived from sPLA₂-IIA activity (arachidonic acid, lysophospholipids, and mtDNA) are all highly potent at inducing NETosis (Figure 2-6E). Thus, the sPLA₂-IIA/ mitochondria complex associates with neutrophils and promotes cellular activation that is dependent on sPLA₂-IIA activity.

We next examined the significance of this pathway in the inflammatory response *in vivo*. In this set of experiments, we used C57BL/6J mice (which naturally lack sPLA₂-IIA) to evaluate whether mitochondrial hydrolytic products are active. Consistent with our *in vitro* observations, we found that the products derived from freeMitos via human recombinant sPLA₂-IIA activity promote a rapid, significant decrease of body temperature (Figure 2-7A) and induce proinflammatory cytokine release when injected in sPLA₂-IIA-deficient mice (Figure 2-7B). Conversely, intact freeMitos injected in these mice elicited only a modest response, confirming that freeMitos can trigger an inflammatory response that is dependent on hydrolysis by sPLA₂-IIA. To determine whether endogenous sPLA₂-IIA can produce mediators from freeMitos *in vivo*, we examined the effect of intact freeMitos injected in transgenic C57BL/6J mice expressing sPLA₂-IIA. Interestingly, we found that the latter treatment induced a delayed but albeit significant lowering of body temperature (Figure 2-7A), suggesting that the endogenous sPLA₂-IIA expression is sufficient to promote inflammatory reactions. To determine whether freeMitos can modulate physiological processes in discrete organs, we evaluated their localization on injection via tail vein. We observed that the bulk of injected freeMitos accumulate in the liver, kidney, lungs, and lymph nodes (supplemental Figure 8A). Consistent with the concomitant localization of sPLA₂-IIA (supplemental Figure 8B) and neutrophils⁴⁷ in the liver, freeMito accumulation in this organ triggers the expression of a broad variety of proinflammatory genes recognized as relevant to neutrophil functions (Figure 2-7C). Our observations demonstrate that the combined activity of extracellular mitochondria and sPLA₂-IIA generates inflammatory signals *in vivo*.

2.6. Discussion

Mitochondrial components secreted from cells might act as autopathogens, a term first coined by Zhang and colleagues.¹¹ Owing to their numerous similarities to bacteria, extracellular mitochondria can stimulate the immune system and thereby trigger inflammation. Indeed, cell-free mtDNA levels are increased in blood in several pathologies and can be used as potent biomarker. Our study establishes that platelets can release functional mitochondria (free or shuttled via MPs), which can be transferred to other cells such as neutrophils.

The concentration of sPLA₂-IIA is increased in inflammatory exudates, such as in the plasma of septic shock patients and RA synovial fluid.^{48,49} Consistently, the sPLA₂-IIA expressing transgenic mice used in our study²⁰ display higher levels of plasma sPLA₂-IIA and develop accelerated blood vessel inflammation and autoimmune arthritis.^{49,50} Although sPLA₂-IIA is a bactericidal enzyme that has been studied for decades, its endogenous substrates in sterile inflammation were thought to be limited to dying cells⁵¹ and MPs.⁵² Our study identifies mitochondria as an overlooked source of biologically active mediators that can be liberated via sPLA₂-IIA. In addition to arachidonic acid conversion to eicosanoids,⁴¹ other lipid mediators may also promote inflammation (Figure 2-7D). Lysophospholipids are released through sPLA₂-IIA activity toward the mitochondrial membrane and can trigger inflammation.^{39,42} In the context of platelet transfusion, lysophospholipid levels accumulate in platelet concentrates during storage⁵³ and promote adverse effects.⁵⁴ It is thus highly plausible that these lysophospholipids are in fact derived from sPLA₂-IIA activity, which is also abundant in platelet concentrates (supplemental Figure 9A), toward extracellular mitochondria. Beyond the release of lipid mediators, sPLA₂-IIA also participates in the extrusion of mtDNA (Figure 2-4F-H). This process may occur in an inflammatory microenvironment where sPLA₂-IIA and freeMitos (originating from platelets, mitoMPs, or other activated/damaged cell lineages) are both present, such as in RA,⁴⁹ as well as in the context of transfusion. Indeed, soluble mtDNA concentrations in platelet storage bags increase concomitantly with sPLA₂-IIA levels (supplemental Figure 9A-B) and are higher in concentrates associated with adverse transfusion reactions (Figure 2-3I). Because intravenous injection of mtDNA triggers lung inflammation,¹³ this may provide insight into how platelet transfusions induce lung injury.

Mitochondrial components that are not dependent on sPLA₂-IIA activity might also contribute to the promotion of inflammation. Respiratory competence displayed by platelet-derived mitochondria implies an increased production of ATP, a recognized DAMP,⁵⁵ as well as an upsurge in extracellular reactive oxygen species, which are danger signals also.⁵⁶ Similar to bacteria, mitochondria express N-formylated peptides that can recruit leukocytes to the site(s) of inflammation.^{12,57} The presence of these different inflammatory components, whose production does not require sPLA₂-IIA, may explain how intravenous

injection of mitochondria induce neutrophil rolling along the vascular wall (Figure 2-5B; supplemental Movie 3), which is typically reminiscent of neutrophil priming, and how intact mitochondria may induce significant NETosis (Figure 2-6E).

Although we focused our study on innate and acute inflammatory responses triggered by extracellular mitochondria, the latter may also be involved in adaptive immune responses and chronic inflammation. Indeed, the generation of antibodies directed against mitochondrial components may occur in chronic rheumatic diseases in which mitochondria are constantly liberated by activated platelets and in patients repeatedly transfused with extracellular mitochondria. Interestingly, cardiolipin, a phospholipid uniquely expressed by mitochondria (and bacteria), may be also highly antigenic, providing an explanation for the prevalence of anticardiolipin in rheumatic diseases implicating platelets such as systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome.⁵⁸ We predict that future investigations will determine to what extent mitochondria contribute in these processes.

Platelet activation under flow condition induces the formation of long tubes, called flow-induced protrusions, and the plasma of healthy subjects contains tubular extracellular vesicles. We thus foresee that these tubular structures might also express mitochondria.^{59,60} Keeping in mind that platelets rapidly respond to vascular injuries to prevent bleeding and that mitochondria might also be released in this context, we further speculate that extracellular mitochondria could contribute to the hemostatic functions of platelets. Like MPs, mitochondria might serve to tissue factor deposition and to the initiation of the coagulation cascade, which is by itself a well-controlled inflammatory reaction.⁶¹ Subsequent studies will undoubtedly uncover additional physiological role(s) played by extracellular mitochondria.

Platelets are classically considered first and foremost as key players in hemostasis. However, mounting evidence suggests that these cells actively participate in inflammation.⁸ The identification of mitochondria, with their bacterial ancestry, and of a bactericidal phospholipase A₂, sPLA₂-IIA, as entities that are released from platelets and that work together in many inflammatory disorders suggests that they may both be key mediators in sterile inflammatory conditions.

2.7. Materials and Methods

More details are presented in **supplementary materials and methods section**.

2.7.1. Mice

All studies were approved by the institutional review board protocol (Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval). Guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed in a protocol approved by the Animal Welfare Committee at Laval University. For our studies, we used for 6- to 10-week-old male mice (C57BL/6N and BALB/c; Charles River). For in vivo experiments in which secreted phospholipaseA₂ IIA (sPLA₂-IIA) contribution is evaluated, we used C57BL/6J (Jackson Laboratories) and sPLA₂-IIA-sufficient mice as previously reported.²⁰

2.7.2. Cells and human fluid preparation

Blood was obtained from healthy human volunteers (citrate as anticoagulant) under an approved institutional review board protocol (CRCHUQ; Université Laval) and in accordance with the Declaration of Helsinki. Platelets, platelet MPs (96% of them expressing CD41), and human polymorphonuclear leukocytes were prepared as previously described.²¹ Platelet-free plasma (PFP) was obtained from platelet storage bag preparations as previously reported.²² Briefly, leukoreduced platelet concentrates were prepared from 6 healthy blood donors and incubated for 5 days at 20°C to 24°C with agitation. PFP samples were obtained on days 0, 1, and 5 and were monitored immediately after collection (without freezing). An increase in platelet P-selectin expression was, 2% during total storage time (day 1 vs day 5). Synovial fluids of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis patients were obtained from volunteers under the approval of the institutional review board protocol (Brigham and Women's Hospital) and were used to assess mitochondria-containing MPs (mitoMPs). The freshly obtained synovial fluid of RA patients (supplemental Table 1) was cleared of leukocytes by centrifugation at 1900g for 30 minutes at 4°C.

2.7.3. Isolation of mouse liver mitochondria

Mitochondria were isolated from the liver of C57BL/6N mice with the Qproteome mitochondria isolation kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. The

mitochondria pellet was resuspended in Tyrode Buffer pH7.4 (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose and 0.5 mg/ml BSA), labeled with MitoTracker® Deep Red (100 nM, Invitrogen) and counted by flow cytometry on a BD FACS Canto II SORP small particle option.

2.7.4. High sensitivity flow cytometry (hs-FCM) configuration

A forward scatter (FSC) coupled to a photomultiplier tube (PMT) “small particles option” (FSC-PMT) (rather than the usual diode) with a 488 nm solid state, 100 mW output blue laser (rather than the conventional 20 mW), a 633 nm HeNe, 20 mW output red laser and a 405 nm solid state diode, 50 mW output violet laser were mounted on the BD FACS Canto II Special Order Research Product used for all our studies (BD Biosciences). The chosen parameters were optimal to detect particles from 100 to 3,500 nm simultaneously on the FSC-PMT.

2.7.5. Platelet stimulation

Platelets were labeled with MitoTracker® Deep Red and PKH67 Green Fluorescent Cell Linker as described above. Platelets were washed, and then were left non-activated or activated using heat-aggregated IgG (HA-IgG) 1 mg/ml; thrombin 0.5 U/ml; collagen 5 µg/ml; CRP-XL 1 µg/ml or PMA 100 nM for 4 h at RT. Platelets (20 µl) were then diluted into 500 µl of PBS and analyzed by flow cytometry. For extracellular mitochondria release experiments, platelets were treated with cytochalasin E (4 µM, Cayman Chemical), latrunculin A (10 µM, Cayman Chemical) or 5 µM nocodazole (5 µM, Sigma-Aldrich). To process the data quantitatively, 100,000 polystyrene microsphere (15 µm diameter) (Polysciences) were added to each tube, and 1,000 microspheres were acquired. The included MitoTracker⁺ and/or PKH67⁺ events were portrayed as FSC-PMT versus side scatter (SSC) graph, and the relative dimensions were displayed according to the acquisition of Sky Blue microspheres of mean diameter of 90, 220, 450, 840 and 3,200 nm (Spherotech).

2.7.6. Mitochondrial activity

Oxygen consumption was measured with mitochondrial preparations (final concentration of ~0.15 mg protein/ml) using a temperature-controlled polarographic O₂ monitoring system with 1 ml chambers (Rank Brothers Ltd). Temperature was maintained at 37°C by a circulating refrigerated water bath (Haake G8, Polyscience). The oxygen probes were calibrated with air-saturated reaction buffer and corrected for temperature and atmospheric pressure. All components were dissolved in reaction buffer (140 mM KCl, 20 mM HEPES and 5 mM K₂HPO₄, pH 7.3 with 0.5% fatty acid free bovine serum albumin), except rotenone and antimycin A that were dissolved in 95% ethanol.

Oxygen consumption due to flux through complexes I-IV was estimated from rates of pyruvate + malate + succinate oxidation (3.45 mM, 0.37 mM and 6 mM) in the presence of 5 mM ADP and corrected for residual rates after inhibition of complex I by rotenone (1 µg/ml final concentration) and complex III by antimycin A (5 µg/ml final concentration). Preliminary experiments showed that 5 mM adenosine diphosphate was sufficient to maintain state 3 rates for the time required for the complete series of measurements. Preliminary experiments also established optimal substrate and inhibitor concentrations for these measurements from platelet mitochondria.

Mitochondria membrane potential was performed as described in the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit protocol (Cayman Chemical). Platelet supernatant was incubated with JC-1 (1/10) as recommended by the manufacturer and with 5 µl of anti-CD41a-APC (BD Biosciences) for 30 min at 37°C. Samples were diluted and analyzed using hs-FCM.

2.7.7. Air pouch model

The air pouch model was performed on C57BL/6N mice as previously reported.²³ Briefly, sterile air was subcutaneous injected on days 0 and 3. Tumor necrosis factor-α (50 ng) was injected into the pouch on day 6. On day 7, mitochondrial membrane hydrolysis products (100 mL of 5x10⁸ mitochondria treated with sPLA₂-IIA), diluent (PBS), sPLA₂-IIA, or mitochondria alone were injected in the air pouch. After 4 hours, the air pouch was washed with 1.2 mL PBS. Cytokines were quantified using the BD Cytometric Bead Array System

(BD Biosciences) by flow cytometry on a BD FACS Canto II and analyzed using FCAP Array Software (version 3.0).

2.8. Acknowledgment

We acknowledge the Bioimaging platform, CHU Research Center at Université Laval and the Service de microscopie IBIS for technical assistance in transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. We are thankful to Sandrine Laradi for her precious technical assistance.

2.9. Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (EB, DS), The Arthritis Society (EB), Canadian Arthritis Network (EB, LHB, ACD), Fonds de Recherche du Québec en Santé (EB, LHB), British Heart Foundation (RWF), Fonds de Recherche des maladies Rhumatismales de l'Université Laval (ACD), NIH R21 AR062328-01 and Cogan Family Fund (PAN), CNRS and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (GL), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (HG, MR), Canadian Funds for Innovation (DS, EB), Agence Nationale de la Recherche" (ANR-12-JSV1-0012-01), The National Safety Agency for Drug and Health Products (ANSM - AAP-2012-011)(OG and FC). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

2.10. References

- 1 Thon, J. N. & Italiano, J. E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*, 3-22, doi:10.1007/978-3-642-29423-5_1 (2012).
- 2 Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379-391, doi:10.1016/j.cell.2005.06.015 (2005).
- 3 Landry, P. *et al.* Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature structural & molecular biology* **16**, 961-966, doi:10.1038/nsmb.1651 (2009).
- 4 Richardson, J. L., Shivdasani, R. A., Boers, C., Hartwig, J. H. & Italiano, J. E., Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet

- production. *Blood* **106**, 4066-4075, doi:2005-06-2206 [pii] 10.1182/blood-2005-06-2206 (2005).
- 5 Machlus, K. R. & Italiano, J. E., Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* **201**, 785-796, doi:10.1083/jcb.201304054 (2013).
 - 6 Davi, G. & Patrono, C. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England journal of medicine* **357**, 2482-2494, doi:10.1056/NEJMra071014 (2007).
 - 7 Boilard, E., Blanco, P. & Nigrovic, P. A. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature reviews. Rheumatology* **8**, 534-542, doi:10.1038/nrrheum.2012.118 (2012).
 - 8 Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* **11**, 264-274, doi:nri2956 [pii] 10.1038/nri2956 (2011).
 - 9 Koseoglu, S. & Flaumenhaft, R. Advances in platelet granule biology. *Current opinion in hematology* **20**, 464-471, doi:10.1097/MOH.0b013e3283632e6b (2013).
 - 10 Andersson, S. G. *et al.* The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140, doi:10.1038/24094 (1998).
 - 11 Zhang, B., Asadi, S., Weng, Z., Sismanopoulos, N. & Theoharides, T. C. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One* **7**, e49767, doi:10.1371/journal.pone.0049767 (2012).
 - 12 McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* **330**, 362-366, doi:10.1126/science.1195491 (2010).
 - 13 Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104-107, doi:nature08780 [pii] 10.1038/nature08780 (2010).
 - 14 Marques, P. E. *et al.* Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* **56**, 1971-1982, doi:10.1002/hep.25801 (2012).
 - 15 Oka, T. *et al.* Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* **485**, 251-255, doi:10.1038/nature10992 (2012).
 - 16 Jobe, S. M. *et al.* Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* **111**, 1257-1265, doi:blood-2007-05-092684 [pii] 10.1182/blood-2007-05-092684 (2008).

- 17 Liu, F. *et al.* Mitochondrially mediated integrin alphaIIb beta3 protein inactivation limits thrombus growth. *J Biol Chem* **288**, 30672-30681, doi:10.1074/jbc.M113.472688 (2013).
- 18 Nakahira, K. *et al.* Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS medicine* **10**, e1001577, doi:10.1371/journal.pmed.1001577 (2013).
- 19 Kohler, C. *et al.* Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Molecular cancer* **8**, 105, doi:10.1186/1476-4598-8-105 (2009).
- 20 Grass, D. S. *et al.* Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2233-2241, doi:10.1172/JCI118664 (1996).
- 21 Cloutier, N. *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*, doi:10.1002/emmm.201201846 (2013).
- 22 Thibault, L., Beausejour, A., de Grandmont, M. J., Lemieux, R. & Leblanc, J. F. Characterization of blood components prepared from whole-blood donations after a 24-hour hold with the platelet-rich plasma method. *Transfusion* **46**, 1292-1299, doi:TRF00894 [pii] 10.1111/j.1537-2995.2006.00894.x (2006).
- 23 Willoughby, D. A., Sedgwick, A. D., Giroud, J. P., Al-Duaij, A. Y. & de Brito, F. The use of the air pouch to study experimental synovitis and cartilage breakdown. *Biomed Pharmacother* **40**, 45-49 (1986).
- 24 Flaumenhaft, R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1152-1160, doi:10.1161/01.ATV.0000075965.88456.48 01.ATV.0000075965.88456.48 [pii] (2003).
- 25 Gyorgy, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2667-2688, doi:10.1007/s00018-011-0689-3 (2011).
- 26 Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**, 1488-1493 (1999).

- 27 Kuznetsov, A. V. *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965-976, doi:nprot.2008.61 [pii] 10.1038/nprot.2008.61 (2008).
- 28 Clerc, P. & Polster, B. M. Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons. *PLoS One* **7**, e34465, doi:10.1371/journal.pone.0034465 PONE-D-12-04772 [pii] (2012).
- 29 Cloutier, N. *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* **5**, 235-249, doi:10.1002/emmm.201201846 (2013).
- 30 Dean, W. L., Lee, M. J., Cummins, T. D., Schultz, D. J. & Powell, D. W. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* **102**, 711-718, doi:10.1160/TH09-04-243 (2009).
- 31 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:327/5965/580 [pii] 10.1126/science.1181928 (2010).
- 32 Collins, L. V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I. M. & Tarkowski, A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology* **75**, 995-1000, doi:10.1189/jlb.0703328 (2004).
- 33 George, J. N. Platelets. *Lancet* **355**, 1531-1539, doi:S0140-6736(00)02175-9 [pii] 10.1016/S0140-6736(00)02175-9 (2000).
- 34 Silliman, C. C., Fung, Y. L., Ball, J. B. & Khan, S. Y. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): current concepts and misconceptions. *Blood Rev* **23**, 245-255, doi:S0268-960X(09)00044-7 [pii] 10.1016/j.blre.2009.07.005 (2009).
- 35 Shaz, B. H., Stowell, S. R. & Hillyer, C. D. Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back. *Blood* **117**, 1463-1471, doi:blood-2010-04-278135 [pii] 10.1182/blood-2010-04-278135 (2011).
- 36 Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481 (1999).
- 37 Kramer, R. M. *et al.* Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* **264**, 5768-5775 (1989).

- 38 Lambeau, G. & Gelb, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry* **77**, 495-520, doi:10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007 (2008).
- 39 Bartoli, F. *et al.* Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem* **269**, 15625-15630 (1994).
- 40 Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875, doi:10.1126/science.294.5548.1871 294/5548/1871 [pii] (2001).
- 41 Silliman, C. C. *et al.* Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest* **101**, 1458-1467, doi:10.1172/JCI1841 (1998).
- 42 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 43 Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine* **17**, 1381-1390, doi:10.1038/nm.2514 (2011).
- 44 Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784-2794, doi:blood-2013-04-457671 [pii] 10.1182/blood-2013-04-457671 (2013).
- 45 Caudrillier, A. *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2661-2671, doi:10.1172/JCI61303 (2012).
- 46 Jenne, C. N. & Kubes, P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* **14**, 996-1006, doi:ni.2691 [pii] 10.1038/ni.2691 (2013).
- 47 Kitadokoro, K., Hagishita, S., Sato, T., Ohtani, M. & Miki, K. Crystal structure of human secretory phospholipase A2-IIA complex with the potent indolizine inhibitor 120-1032. *Journal of biochemistry* **123**, 619-623 (1998).
- 48 Boilard, E. *et al.* A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol Med* **2**, 172-187, doi:10.1002/emmm.201000072 (2010).
- 49 Ivandic, B. *et al.* Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1284-1290 (1999).

- 50 Atsumi, G. *et al.* The perturbed membrane of cells undergoing apoptosis is susceptible to type II secretory phospholipase A2 to liberate arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* **1349**, 43-54 (1997).
- 51 Fourcade, O. *et al.* Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**, 919-927 (1995).
- 52 Silliman, C. C. *et al.* Analysis of the priming activity of lipids generated during routine storage of platelet concentrates. *Transfusion* **36**, 133-139 (1996).
- 53 Wyman, T. H. *et al.* A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1592-1603, doi:10.1152/ajpcell.00540.2001 00540.2001 [pii] (2002).
- 54 Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 860-875, doi:nrc3380 [pii] 10.1038/nrc3380 (2012).
- 55 Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221-225, doi:nature09663 [pii] 10.1038/nature09663 (2011).
- 56 Schiffmann, E., Corcoran, B. A. & Wahl, S. M. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1059-1062 (1975).
- 57 Garcia, D., Akl, E. A., Carr, R. & Kearon, C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood* **122**, 817-824, doi:10.1182/blood-2013-04-496257 (2013).
- 58 Owens, A. P., 3rd & Mackman, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* **108**, 1284-1297, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233056 (2011).

2.11. Figures

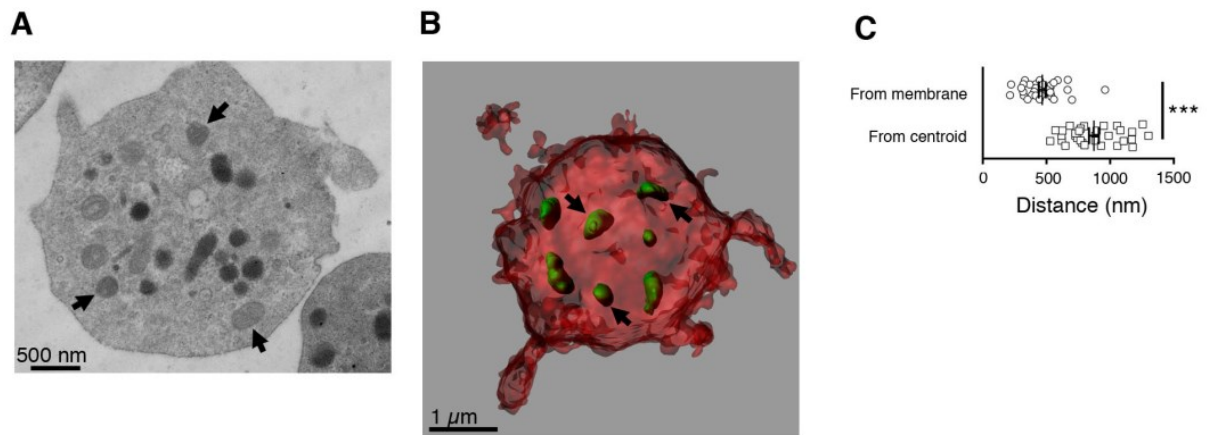


Figure 2-1. Mitochondrial distribution within resting platelets.

Mitochondria (*black* arrows) in resting platelets examined by (A) transmission electron microscopy (TEM) and (B) confocal scanning laser microscopy (CSLM). (C) Mitochondria are located proximally to the platelet plasma membrane ($n=31$; data represent the mean \pm SEM, *** $P<0.0001$, t -test).

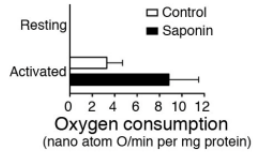
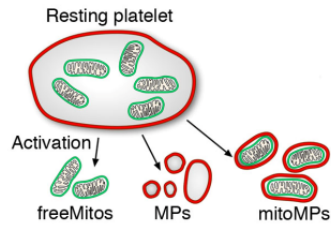
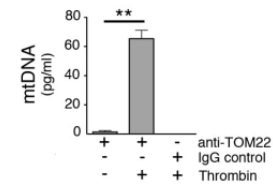
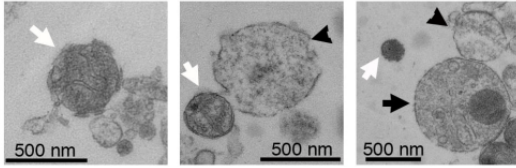
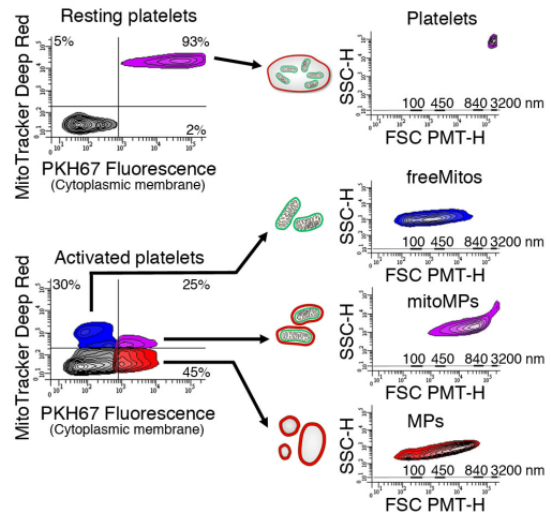
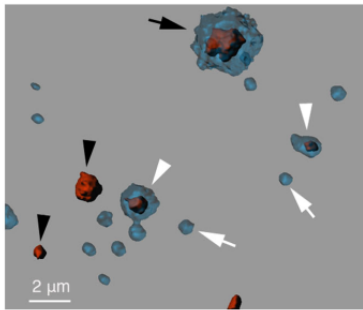
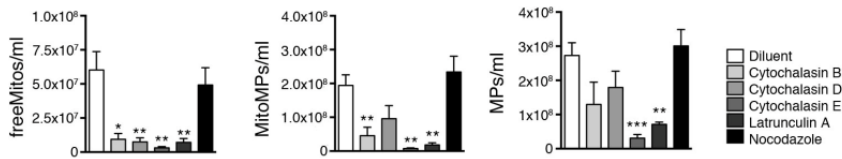
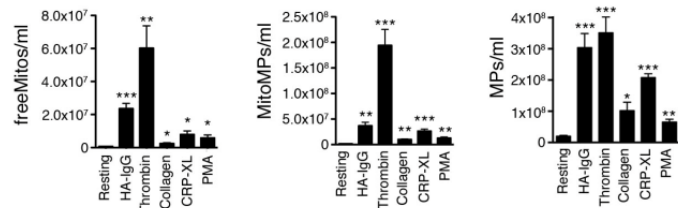
A**B****C****D****F****E****G****H**

Figure 1-2. Activated platelets release extracellular mitochondria.

(A) Platelet-free supernatants resulting from the isolation of thrombin-activated platelets consume O₂ via the electron transport chain following cell permeabilization with saponin detergent (50 µg/ml). No O₂ consumption is detected in supernatants obtained from resting platelets (n=4; data are mean ± SEM). (B) Three predicted types of extracellular microparticles (MPs) produced upon platelet activation: mitochondria (freeMitos), mitochondria-containing MPs (mitoMPs) and MPs lacking mitochondria (MPs). (C) Isolation of freeMitos using anti-TOM22 microbeads (or IgG control) in thrombin-stimulated platelets and mitochondrial DNA (mtDNA) quantification (n=4; data are mean ± SEM, **P<0.005, t-test). (D) TEM visualization of freeMitos (white arrows), mitoMPs (black arrows) and MPs (black arrowheads) released from thrombin-activated platelets. (E) 3D-CSLM reconstruction of the supernatant of thrombin-activated platelets. Populations represented in image are platelets (black arrow), MPs (white arrows), mitoMPs (white arrowheads) and freeMitos (black arrowheads). (F) High-sensitivity flow cytometry (hs-FCM) analysis of resting platelets (upper panel, top right quadrant) and thrombin-activated platelets, which show 3 additional, distinct populations of particles, i.e. freeMitos (bottom panel, top left quadrant, blue), mitoMPs (bottom panel, top right quadrant, pink) and mitochondria-free MPs (bottom panel, bottom right quadrant, red). Bottom left quadrant of both upper and lower panel represent background noise (gray). FSC-PMT and SSC dot plots of platelets (first right panel) and 3 populations of microparticles, freeMitos (second right panel), mitoMPs (third right panel) and MPs (fourth right panel). The relative diameters are presented according to size-defined microsphere calibrations. (G) Release of freeMitos (left panel), mitoMPs (middle panel) and MPs (right panel) from thrombin-activated platelets require intact actin microfilament dynamics. Mitochondrial release is significantly reduced upon addition of actin inhibitors (cytochalasin B, D, E and latrunculin A), but not tubulin polymerization inhibitor (nocodazole) (n=4; data are mean ± SEM, *P<0.05, **P<0.005 and ***P<0.001, t-test). (H) Heat-aggregated IgG (HA-IgG), thrombin, collagen, cross-linked collagen related peptide (CRP-XL) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) trigger the release of extracellular freeMitos (left panel), mitoMPs (middle panel) and MPs (right panel) quantified by hs-FCM (n=4; data are mean ± SEM. *P<0.05, **P<0.005 and ***P<0.001 vs. supernatant from resting platelets, t-test).

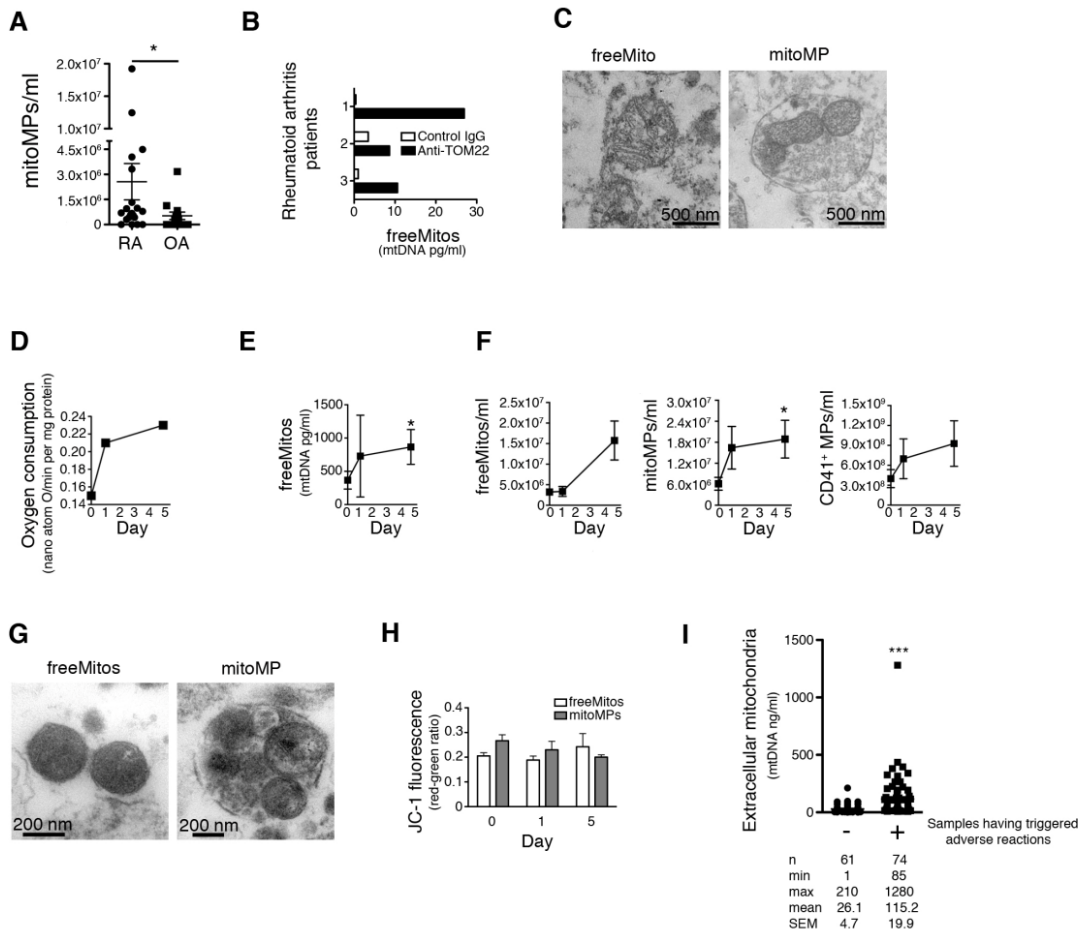


Figure 2-3. Extracellular mitochondria are present in various situations where platelets are known to be activated.

(A) Platelet mitoMPs (CD41⁺MitoTracker⁺) are found in higher concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients (RA, $n=20$) than in the synovial fluid of osteoarthritis patients (OA, $n=14$; data are mean \pm SEM, $*P<0.05$, Mann Whitney test). (B) FreeMitos are detected in fresh SF of RA patients. Isolation of freeMitos in RA SF (from 3 different patients) with anti-TOM22 microbeads (or control IgG, Supplementary Figure 3) and mtDNA quantification. (C) TEM imaging of a freeMito (*left* panel) and a mitoMP (*right* panel) from fresh RA SF. (D) O₂ consumption is observed in platelet-free plasma (PFP) obtained at the indicated time intervals from platelet storage bags. (E) Isolation of freeMitos (Supplementary Figure 3) in PFP along with mtDNA quantification reveals an abundance of freeMito at day 5 ($n=6$; data are mean \pm SEM, $*P<0.05$ vs. day 0, paired t -test). (F) High-sensitivity flow cytometry (hs-FCM) analysis and quantification of freeMitos (*left* panel), MitoMPs (*middle* panel) and CD41+MPs do not contain mitochondria (*right* panel) from platelet storage bags at different day (0, 1 and 5). $n=6$, data are mean \pm SEM, $*P<0.05$ vs. day 0, paired t -test. (G) TEM imaging of PFP collected on day 5 confirming the presence of freeMitos (*left* panel) and mitoMPs (*right* panel). (H) Mitochondrial membrane potential is detected in freeMitos and mitoMPs collected from PFP, as measured by a JC-1 assay using hs-FCM (*red* to *green* ratio) ($n=5$; data are mean \pm SEM). (I) Extracellular mitochondria (as detected by mtDNA quantification) are found at higher concentration in PFP of platelet storage bags that have cause adverse transfusion reaction to the recipient (no adverse reaction group ($n=61$) vs adverse reaction group ($n=74$) matched in term of storage duration; data are mean \pm SEM, $***P<0.001$, t -test). Adverse reaction measured include mainly febrile non-hemolytic reactions, skin manifestations such as itching or skin rash and cardiovascular events such as hypotension or tachycardia.

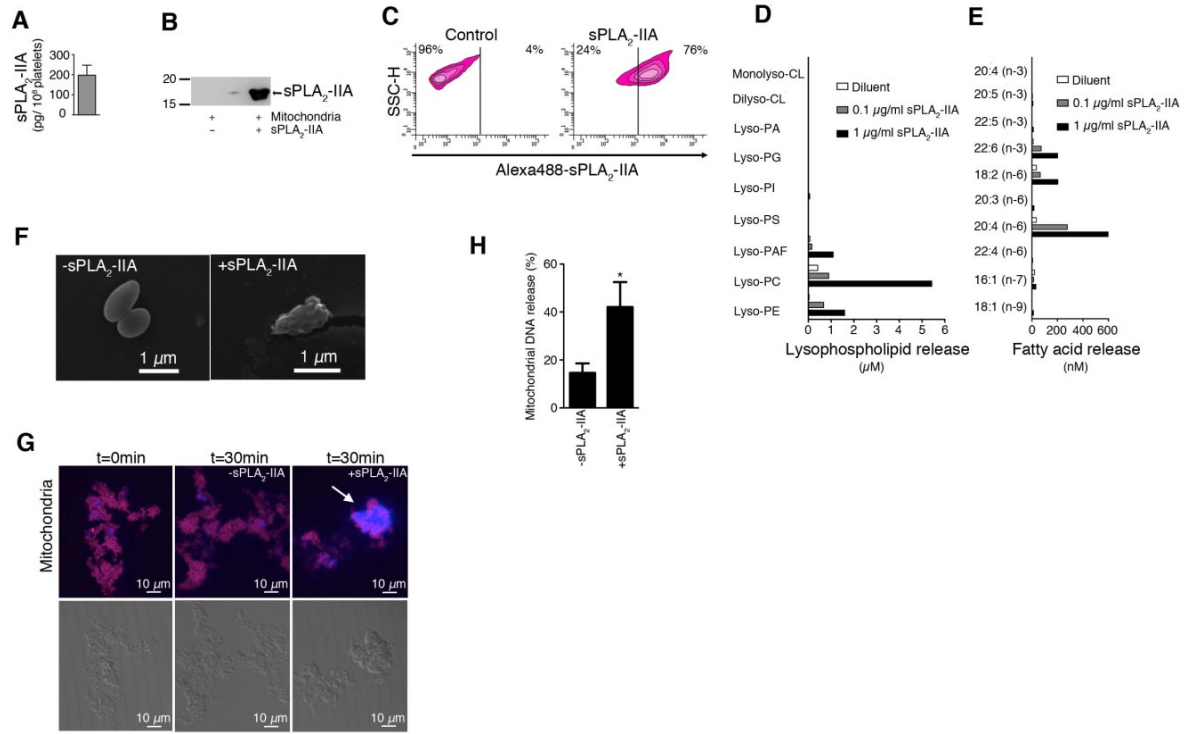


Figure 2-4. The mitochondrion is a substrate for the bactericidal secreted phospholipase A₂-IIA (sPLA₂-IIA).

(A) Quantification of sPLA₂-IIA in human platelets by time-resolved immunofluorescence ($n=3$; data are mean \pm SEM). (B) sPLA₂-IIA immunoblotting of mitochondria isolated with anti-TOM22 microbeads reveals binding of human recombinant sPLA₂-IIA to mitochondria (Supplementary Figure 3). (C) Mitochondria were incubated in the absence (*left* panel) or presence (*right* panel) of Alexa488-conjugated sPLA₂-IIA and analyzed by hs-FCM. The significant shift in the fluorescent population size (*right* panel) indicates that sPLA₂-IIA binds mitochondria. (D, E) Catalytic activity of human recombinant sPLA₂-IIA (or PBS as vehicle) towards mitochondria. Mitochondrial membrane phospholipid hydrolysis by sPLA₂-IIA yields lysophospholipids (D) and fatty acids (E) as quantified by mass spectrometry. (F) sPLA₂-IIA affects mitochondrial structural integrity. Scanning electronic micrographs of mitochondria incubated in the absence (*left* panel) or presence (*right* panel) of human recombinant sPLA₂-IIA. (G) Mitochondria (*magenta*) release mtDNA (*blue*) upon incubation with recombinant sPLA₂-IIA (*upper* panels). Extracellular mtDNA accumulation (arrow) is apparent in the presence of sPLA₂-IIA. Differential interference contrast images are shown for reference (*lower* panels). (H) mtDNA extrusion is amplified in presence of human recombinant sPLA₂-IIA (0.2 μ g/ml, 30 min at 37°C), as quantified by Sytox® Green nucleic acid stain assay ($n=6$; data are mean \pm SEM, * $P<0.05$, t -test).

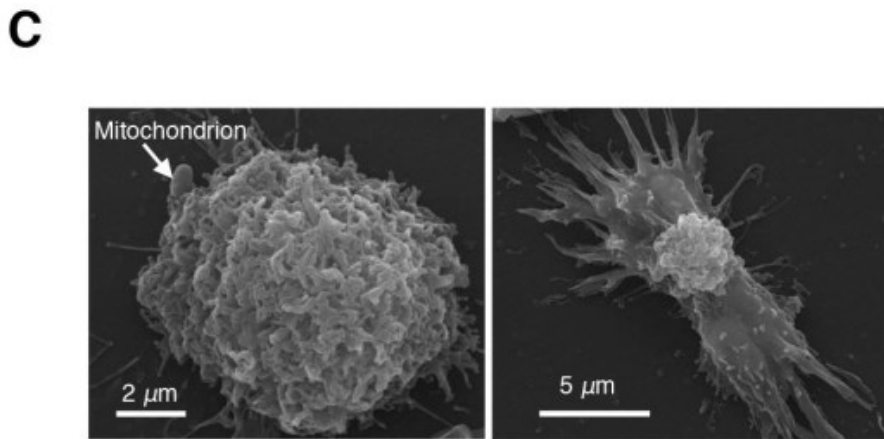
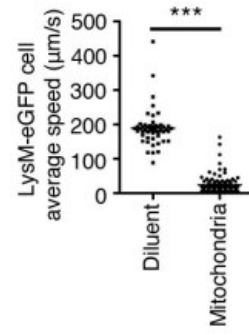
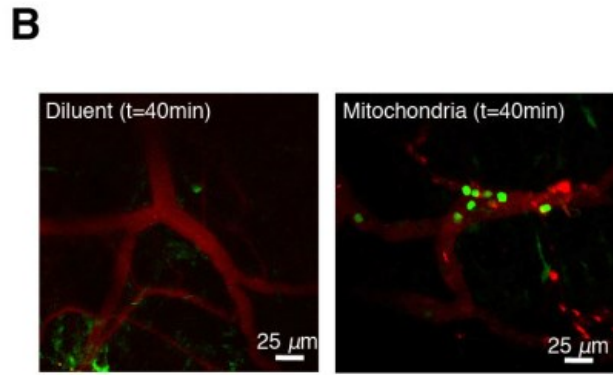
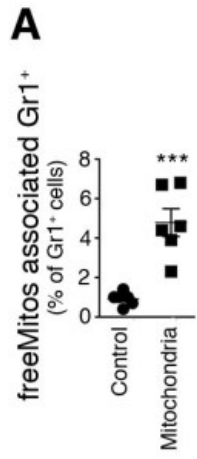


Figure 2-5. Extracellular mitochondria interact with neutrophils.

(A) Intravenously injected fluorescence-labeled mitochondria (MitoTracker® Deep Red) associate with mouse neutrophils (Gr1+ cells) *in vivo* as measured by flow cytometry ($n=6$; data are mean \pm SEM, *** $P<0.001$, *t*-test). (B) Intravenous injection of mitochondria induces neutrophil rolling in LysM-eGFP mice. Neutrophil (*green*) velocity is significantly reduced (*middle* and *right* panel ($n=89$), Supplementary video 3) in blood (*red*) following intravenous injection of mitochondria when compared to Tyrode Buffer as vehicle (*left* panel ($n=51$), data are mean \pm SEM, *** $P<0.001$, *t*-test) (C) Scanning electronic micrographs of mitochondria in association with freshly isolated human neutrophil (*left* panel) and ensuing neutrophil structural change ($29.2 \pm 2.11\%$, $n=3$) after 30 min incubation in presence of human recombinant sPLA₂-IIA (*right* panel).

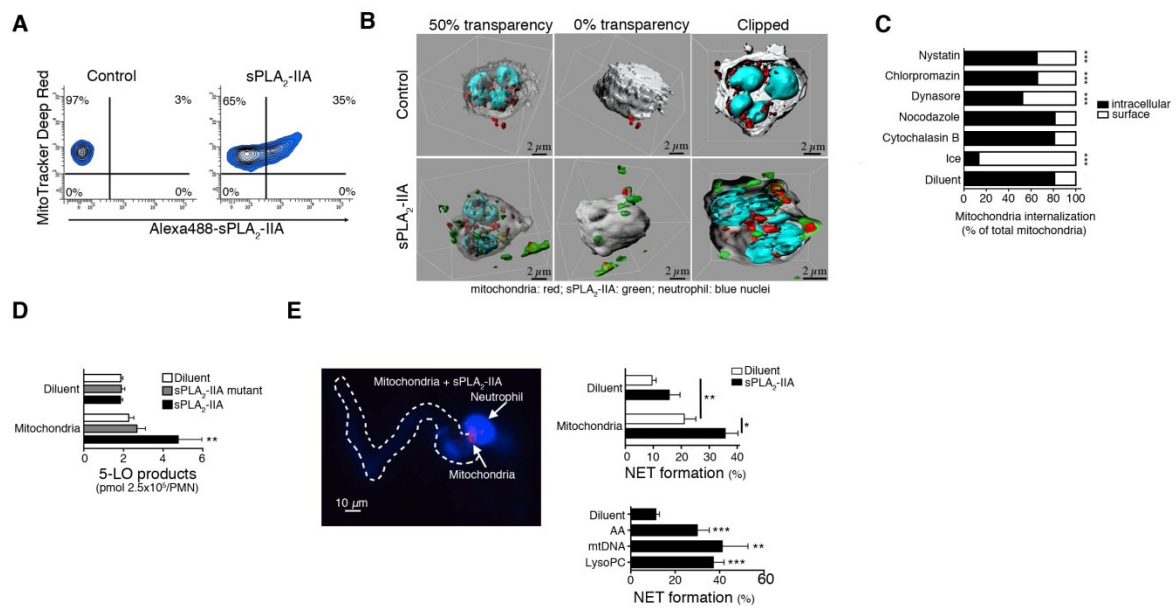


Figure 2-6. The interaction of human neutrophils with the mitochondria/sPLA₂-IIA complex promotes the release of proinflammatory mediators.

(A) Human neutrophils associate with the mitochondria/sPLA₂-IIA complex *in vitro* as measured by flow cytometry analysis of human neutrophils incubated with fluorescently-labeled mitochondria (MitoTracker® Deep Red) in the absence (*left panel*) or presence (*right panel*) of Alexa488-conjugated sPLA₂-IIA. (B) 3D-CSLM reconstruction of mitochondria (*red*) and sPLA₂-IIA (*green*) colocalizing within neutrophils (*blue* nuclei, Hoechst stain and *gray* cytoplasm, CMPTX). (C) Mitochondria are internalized in human neutrophils via an endocytosis-dependent pathway. Graph bars representation of the relative localization (surface vs intracellular) of the mitochondria inside neutrophils following pre-treatment with indicated inhibitors (nystatin for inhibition of caveolin-mediated endocytosis; chlorpromazine for inhibition of clathrin-mediated endocytosis; dynasore for inhibition of dynamin-mediated endocytosis; nocodazole for inhibition of polymerization of microtubule (endocytosis and phagocytosis); cytochalasin B for inhibition of polymerization of actin (endocytosis and phagocytosis)). Data were obtained from 100 neutrophils per condition repeated 3 times ($n=3$, $*P<0.01$, $**P<0.001$, $***P<0.0001$, Mann Whitney test compare to diluent). (D) Mitochondrial hydrolytic products derived from the action of the mitochondria/sPLA₂-IIA complex (Figure 4D,E) induce proinflammatory responses in human neutrophils. The total 5-lipoxygenase products (5-LO products) were quantified by high-performance liquid chromatography ($n=4$; data are mean \pm SEM, $**P<0.005$, vs. control, *t*-test). (E) The freeMito fraction induces NET formation *in vitro* and is enhanced by sPLA₂-IIA. NET formation (*left panel*, DNA, *blue*, white dotted line) was confirmed by confocal imaging after treatment of mitochondria (*red*, *right panel*) with sPLA₂-IIA. sPLA₂-IIA significantly enhances NET formation by mitochondria (*upper right panel*, $n\geq 7$; data are mean \pm SEM, $*P<0.05$ and $**P<0.005$, *t*-test). Hydrolysis products from mitochondria/sPLA₂-IIA complex activity also induce significant NET formation (*lower right panel*, $n\geq 3$; data are mean \pm SEM, $**P<0.005$ and $***P<0.001$, *t*-test).

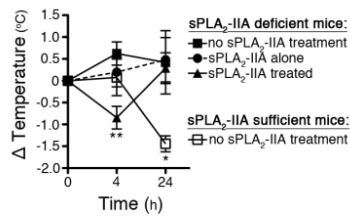
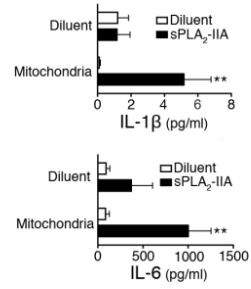
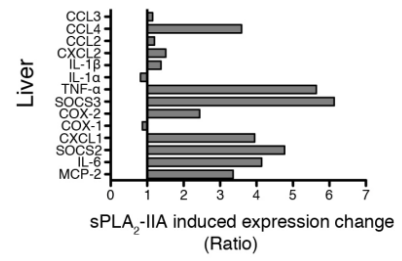
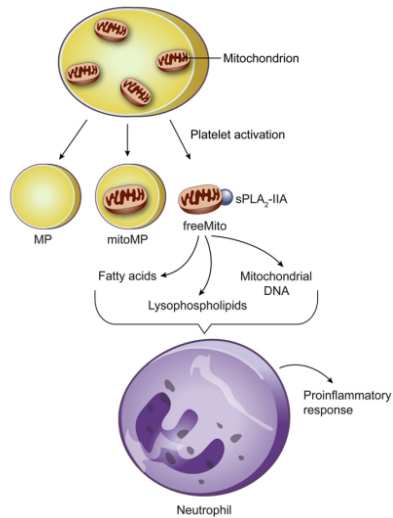
A**B****C****D**

Figure 2-7. Extracellular mitochondria and sPLA₂-IIA amplify inflammation *in vivo*.

(A) Intravenous injection of mitochondrial hydrolytic products (sPLA₂-IIA-treated mitochondria, black triangle) in sPLA₂-IIA-deficient mice significantly lowers body temperature (Δ temperature, vs. PBS-injected mice of respective background) after 4 h (n=6/group; data are mean \pm SEM, **P<0.005 compared to sPLA₂-IIA-untreated mitochondria (■) or sPLA₂-IIA alone (●)). Intravenous injection of mitochondria (sPLA₂-IIA-untreated, □) in sPLA₂-IIA-sufficient mice results significantly lowers body temperature after 24 h. Only modest temperature decrease was observed in sPLA₂-IIA-untreated mitochondria (■) in sPLA₂-IIA deficient mice (n \geq 3/group; data are mean \pm SEM, **P<0.005). (B) sPLA₂-IIA-generated mitochondrial products trigger inflammation *in vivo*. Mitochondria incubated in the presence of recombinant sPLA₂-IIA and injected into the air pouch of C57BL/6N mice induce the production of IL-1 β (left panel) and IL-6 (right panel). Diluent (PBS), sPLA₂-IIA alone or untreated mitochondria induce modest cytokine production when injected separately (n=7; data are mean \pm SEM, **P<0.005, compared to mitochondria incubated in the absence of sPLA₂-IIA). (C) Mitochondria accumulation in the liver induces numerous proinflammatory genes that are amplified in the presence of endogenous sPLA₂-IIA. Messenger RNA expression of inflammatory genes relevant to neutrophil function was quantified in the liver of sPLA₂-IIA-sufficient and -deficient mice intravenously injected with mitochondria (n=3 per group; data expressed as the ratio of specific mRNA expression ratio (sPLA₂-IIA-sufficient/-deficient mice). (D) Schematic representation of the mechanism of action of extracellular mitochondria and sPLA₂-IIA in sterile inflammatory conditions. Upon activation, platelets release MPs, mitoMPs and freeMitos. Mitochondrial membrane phospholipids may be hydrolyzed by sPLA₂-IIA, generating bioactive mediators (fatty acids, lysophospholipids and mtDNA) and promoting neutrophil proinflammatory responses.

2.12. Supplementary informations

2.12.1. Supplementary materials and methods

2.12.1.1. Isolation and quantification of free mitochondria

Free mitochondria were isolated from diverse samples with anti-TOM22 microbeads kit (Miltenyi Biotec) with a minor modification. The initial step consisting of cell lysis was omitted since only soluble free mitochondria were targeted for isolation. Free mitochondria were subsequently isolated via magnetic field. Mitochondrial DNA was extracted from eluted anti-TOM22 processed samples with the QIAamp DNA Micro extraction kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol and quantified by real-time quantitative PCR (Rotor Gene-3000, QIAGEN) with the Rotor-Gene Probe PCR kit (QIAGEN). Primers and probes (Integrated DNA Technologies) were used for specific amplification of human (forward 5'-ACGCCTGAGCCCTATCTATTA-3', reverse 5'-GTTGACCTGTTAGGGTGAGAAG-3' and probe 5'-/56-FAM/TGACAAGCG/ZEN/CCTATAGCACTCGAA/3IABkFQ/-3') and mouse (forward 5'-GGAACAACCCTAGTCGAATGAA-3', reverse 5'-GCTAGGGCCGCGA-TAATAAA-3' 5'-/56-FAM/ACAAAGCCA/ZEN/CCTTGACCCGA-TTCT/3IABkFQ/-3') mitochondrial DNA. The qPCR cycling condition consisted of an initial step of 95°C for 3 min followed by a two-step amplification of 95°C for 3 s and 60°C for 10 s (40 cycles). Mitochondrial DNA extracted from platelet was used for generation of standard curve.

2.12.1.2. Mitochondrial DNA quantification in platelet concentrates associated with acute transfusion reactions

Of the 10,600 apheresis platelet concentrate transfusions performed over 2 consecutive years, 30 platelet concentrates were associated to Acute Transfusion Reactions (ATRs). Only severe cases were considered in our study, Grade 3 of the International Society Blood Transfusion (ISBT) scale. Symptoms were mainly febrile non-hemolytic reactions (42% of ATRs), skin manifestations such as itching or skin rash (38% of ATRs) and cardiovascular events such as hypotension or tachycardia (20% of ATRs). Recipients were women in 53% of cases and mean age was 47.3 ± 10.5 years. All platelet concentrate collections were subjected to quality control to ensure their consistency and their conformity with French and European standards (EDQM, 16th Edition, 2010). Several parameters were assessed

including volume (mean volume = 419 ± 30 ml), mean platelet count ($5.6 \pm 0.6 \times 10^{11}$ platelets/bag), mean residual leukocyte count ($0.095 \pm 0.087 \times 10^6$ leukocytes/bag) and mean pH (7.3 ± 0.1).¹ MtDNA quantification in the platelet concentrates (ATR vs. matched controls storage duration) was performed by qPCR as described above.

2.12.1.3. Transmission electron microscopy and determination of relative position of mitochondria within platelets

Platelets and platelets MPs (freshly obtained and never frozen) were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 min at room temperature (RT) then stored at 4°C until paraffin inclusion. Samples were stained and analyzed on a FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope at 80kV.

Relative positioning was calculated using a custom made macro for NIH ImageJ. Each platelet contour was drawn with the free hand tool to calculate their centroid, which was subsequently marked on the picture as a landmark. Minimum and maximum radii of the platelet were then measured using the line tool. Centroids were also determined for each mitochondria and marked on the microphotograph. The distance between the platelet centroid and the mitochondria centroids was measured as well as the shortest distance between the mitochondria centroids and the plasma membrane.

2.12.1.4. Scanning electronic microscopy imaging

Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde for at least 24h then processed for standard dehydration. Briefly, samples were first washed (3 x 10 min) with sodium cacodylate buffer (0.1M, pH 7.3) then fixed with osmium tetroxide (1% in sodium cacodylate buffer) for 90 min. Samples were washed again (3 x 10 min) in sodium cacodylate buffer and subsequently processed for alcohol dehydration steps (50, 70, 95 and 100% EtOH, 10 min each steps). Samples were then dipped in 100% EtOH for 40 and 10 min respectively, and air-dried overnight. Samples were then coated with palladium and observed with a JEOL 6360LV scanning electron microscope (Tokyo, Japan).

2.12.1.5. Live cell imaging of platelet activation and confocal immunofluorescence microscopy

Mitochondrion staining was performed on isolated platelets (10^8 cells/ml) in the presence of MitoTracker® Green FM or Deep Red FM (100nM, Invitrogen) incubated for 45 min at 37°C. Cell membrane staining was achieved with the addition of wheat germ agglutinin (WGA) Alexa Fluor 594-conjugate (5 µg/ml, Invitrogen) or PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (0.75 µM, Sigma-Aldrich) that was added 15 min before the end of incubation. Cells for live cell imaging were incubated in 8 well-chamber slides and maintained at 22°C within a top-stage incubator (Tokai Hit ZILC-F1) during the entire acquisition. Single plane of platelets were acquired every 20 s for 105 min.

For confocal immunofluorescence microscopy, resting labeled cells were immediately fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 5 min at RT and smeared on a Superfrost Plus glass slide (Fisher Scientific). Fluoromount (Sigma-Aldrich) was added as mounting agent. For activated platelets, platelets were stimulated with 0.5 U/ml of thrombin for 2 h at RT. The supernatant of activated platelets was labeled with anti-CD41-V450 and MitoTracker® Deep Red FM (100nM) for 30 min at RT in the dark. The reaction was stopped with PFA 2% fixation and sample was smeared on a Superfrost Plus glass slide. Fluoromount was added and samples were then analyzed by confocal laser scanning microscopy. Confocal laser scanning microscopy was performed with an IX81-ZDC microscope equipped with a FV1000 scanning head and an Olympus 60X OSC NA 1.4 objective lens. Confocal images were acquired by sequential scanning with the 488nm, 546nm and 633nm laser lines, and the variable bandwidth filters were set optimally according to the spectral properties for MitoTracker® Green FM and WGA Alexa Fluor 594-conjugate. The Fluoview imaging software ASW3.1a (Olympus America Inc) was used to acquire and export the z-stacks. Maximum intensity projections and volume rendering were calculated using the Surpass module in Bitplane Imaris 7.5.1 (Zurich, Switzerland). Colocalization analysis was performed with the Bitplane Imaris 7.5.1 colocalization module using the Costes' estimation for automatic threshold, which compares the Pearson's coefficient for non-randomized vs. randomized images and calculates the significance.² Colocalization channel of mitochondria with sPLA₂-IIA was generated for visual representation, and Pearson's coefficients were calculated.

2.12.1.6. Internalization of mitochondria by human neutrophils.

Neutrophils (5×10^6 cell/ml) were labeled with CMPTX (1 μ M, Invitrogen) for 15 min at 37°C in HBSS1X. Neutrophils were pre-treated with 1 μ M final of cytochalasin B (Sigma), 10 μ M of nocodazol (Sigma), 50 μ M of dynasore (Sigma), 10 μ g/ml of nystatin (EMD milipore), and 40 μ M of chlorpromazine (LKT Laboratories) for 10 min at 37°C. Cells were then incubated for 30 min at 37°C in presence of 5×10^5 mitochondria/ μ l (labeled with 100 nM final of MitoTracker® Deep Red, Invitrogen). Cells were then labeled with Hoestch (1 μ g/ml) fixed in 2% PFA, cytopspined at 500 RPM for 3 min. Mitochondrial internalization in human neutrophils was then evaluated by confocal microscopy.

2.12.1.7. Multiphoton microscopy and leukocyte speed quantification

Heterozygous LysM-eGFP *knock-in* mice³ were anesthetized with 2-3% isoflurane in O₂, hairs from their right ear were removed using depilatory cream (Nair®) and the ear was held in place with physiological glue (MSI-EpiDermGlu). Vasculature was visualized by injecting 1% Qdot 705 (Life Technologies) diluted in sterile Tyrode Buffer pH7.4 in the tail vein. Blood vessels between 14-20 μ m in diameter were localized with epifluorescence and used for leukocyte speed quantification. A volume of 100 μ L of mitochondria (5×10^8) or Tyrode Buffer (diluent) was next injected, i.v., at which point continuous acquisition started for 40 minutes. The average leukocyte speed was measured as the distance travelled (in μ m) in a given number of images acquired at 0,859 frames per second. Body temperature was maintained at 37°C during all procedures with a temperature controlling device (RWD Life Science Co). All images were acquired on an Olympus FV1000 MPE 2-photon microscope as previously described.⁴ Images recorded for the 40 minutes quantification period and for stacks had a resolution of 256 X 256 and 320 X 320 pixels, respectively.

2.12.1.8. Generation of recombinant sPLA₂-IIA Alexa Fluor 488-conjugated

Recombinant sPLA₂-IIA labeled with an Alexa Fluor 488 fluorescent dye was prepared as follows. The S36C mutation was created using the QuickChange kit (Agilent Technologies) and confirmed by DNA sequencing of the full coding region of the protein expression plasmid.⁵ The inclusion body protein from bacterial expression was refolded to give the

protein containing an extra cysteine residue disulfide linked to cysteine-36.⁵ The disulfide was cleaved by mild dithiothreitol treatment and labeled with Alexa Fluor 488 C5-maleimide (Life Technologies). The labeling method and purification of the labeled protein free of excess dye reagent was carried out as described previously for site selective spin labeling of sPLA₂-IIA on surface cysteine residues.⁵ The catalytically inactive H48Q mutant of human sPLA₂-IIA was produced as previously described.⁶

2.12.1.9. sPLA₂-IIA binding to mitochondria

Mitochondria (10⁶) from mouse liver were labeled with 100 nM of MitoTracker® Deep Red and incubated with 10 ng of sPLA₂-IIA Alexa Fluor 488 (final volume 10 µl) in HBSS with 5 mM of CaCl₂ for 30 min on ice. Samples were diluted and the presence of sPLA₂-IIA Alexa Fluor 488 on fluorescent mitochondria was analyzed by flow cytometry.

Interaction between mitochondria and sPLA₂-IIA was also assessed by immunolabeling and co-elution. 10⁷ of unstained mouse liver mitochondria in HBSS with 5 mM CaCl₂ were incubated with 250 ng of sPLA₂-IIA (final volume 100 µl) for 30 min on ice. Anti-TOM22 microbeads labeling was then performed as described above and processed on a magnetic for mitochondria isolation. Mitochondria were then pelleted and lysed in 1X lysis buffer. Samples were electrophoresed, transferred onto membranes and incubated in 0.2% Milk/TBS-Tween solution containing rabbit anti-sPLA₂-IIA antibody (1/1000, Cayman Chemical) for 48 h at 4°C. The membrane was washed, treated with Peroxidase-AffiniPure anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoResearch) and reactive proteins were visualized by chemiluminescence (Perkin Elmer).

For immunofluorescence visualization, neutrophils (5 x 10⁶/ml) were labeled with CMPTX Cell Tracker (5 µM, Invitrogen) for 15 min at RT and incubated with 5 x 10⁵ mitochondria (pre-incubated with sPLA₂-IIA) during 30 min at 37°C. Hoechst (1 µg/ml) was added 10 min before the end of incubation time and reaction was stopped with addition of PFA 4%. Cells were analyzed by flow cytometry and were also prepared for microscopy using a cytospin protocol (500 rpm for 5 min at 4°C) and analyzed by confocal laser scanning microscopy as described below.

2.12.1.10. Mass spectrometry analysis of lysophospholipids and fatty acid released from mitochondrion membranes by human recombinant sPLA₂-IIA

Mitochondria were incubated in presence of 0.1 µg/ml and 1 µg/ml of human recombinant sPLA₂-IIA at 37°C for 0.5 and 6 h. Mitochondria were also incubated in absence of sPLA₂ to determine the content of basal free fatty acid. Following incubation, the reaction was stopped with the addition of 20 mM of EGTA. Lysophospholipid analysis by mass spectrometry was carried out as described.⁷ Samples of sPLA₂-IIA treated mitochondria (200 µl) was mixed with 800 µl of chloroform/methanol (2/1) followed by addition of 15 µl of internal standard mixture.⁸ Samples were extracted as described and analyzed by combined liquid chromatography/tandem mass spectrometry.⁷ Fatty acids were analyzed by conversion to their AMPP amide derivatives⁸ and then analyzed by combined liquid chromatography/tandem mass spectrometry.⁸

2.12.1.11. Stimulation of neutrophils for leukotriene generation

Human recombinant wild-type sPLA₂-IIA⁹, its catalytically inactive homologous form H48Q⁶ or vehicle diluent were incubated 18 h at 5 µg/ml in presence of mouse liver mitochondria (5 x 10⁵ mitochondria/µl in Tyrode Buffer pH 7.4 supplemented with 5 mM CaCl₂) at 37°C. Human neutrophils were primed and stimulated for leukotriene biosynthesis as previously described.^{10,11} To evaluate sPLA₂-IIA mediated release of arachidonic acid, cPLA₂α inhibitor pyrrophenone (100 nM) was added 5 min before stimulation. Stimulation was initiated by addition of 5 µl of pre-treated mitochondria, or control, to prime neutrophils. The reaction was stopped by addition of 500 µl of cold MeOH:CH₃CN (1:1) containing 12.5 ng of prostaglandin B₂ as internal standard. Samples were then processed and analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography using on-line extraction as previously described.¹²

2.12.1.12. NET quantification

Activated human neutrophils (5 x 10⁶ cells/ml) were incubated in presence of labeled mitochondria (5 x 10⁵ mitochondria/ml, MitoTracker® Deep Red, 100 nm) and sPLA₂-IIA (0.1 µg/ml) or diluent (PBS) for 2 h at 37°C. Cells were then fixed with PFA 2% and DNA staining was performed with Hoestch 33342 (0.01 µg/µl, Invitrogen). Cells were cytopspined

on a slide at 500 RPM for 3 min. NET formation (%) was determined by the following equation: (NETs / PMN counted) * 100. Preliminary experiments confirmed that mtDNA is readily distinguished from neutrophils NETs.

2.12.1.13. Quantification of mitochondrial DNA release following incubation with human recombinant sPLA₂-IIA

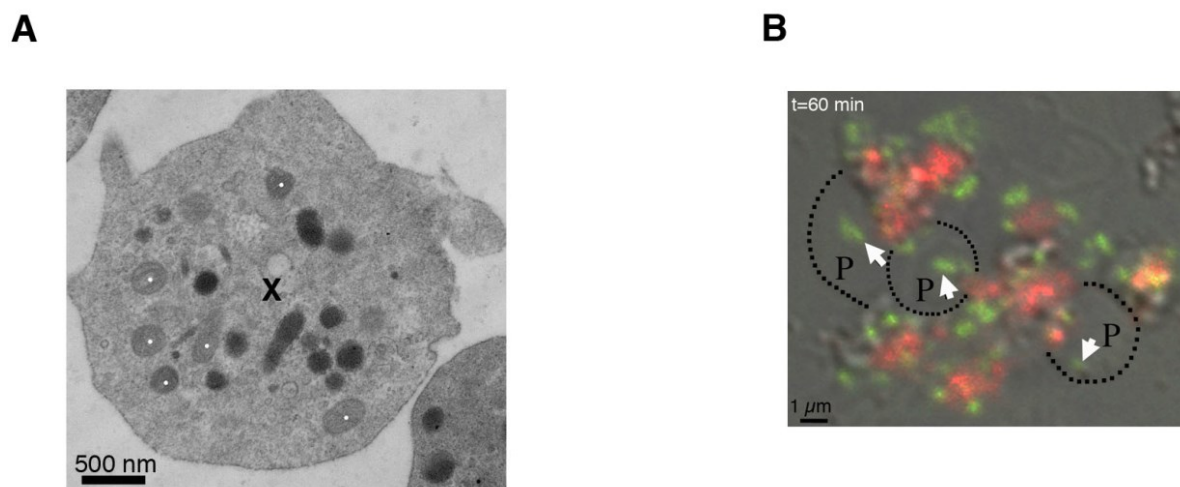
Mitochondria were seeded at 5×10^8 mitochondria/ml (Tyrode Buffer pH7.4 + 5 mM CaCl₂) in a flat bottom well plate (Costar, Corning). Human recombinant sPLA₂-IIA (5 µg/ml) or diluent (PBS) was added and samples were then incubated for 30 min at 37°C. Nucleic acid stain Sytox® Green (2.5 µM, Invitrogen) was added to the mix and incubated for 10 min at room temperature. Fluorescence was obtained with a Tecan apparatus. To calculate the percentage of mitochondrial DNA released in the milieu, Triton X-100 (0.1% PBS) lysis of an equivalent amount of mitochondria (5×10^8 mitochondria/ml) was performed, determining the total amount of mitochondrial DNA present per well.

2.12.1.14. mRNA quantification of inflammatory genes

Mitochondria (or Tyrode Buffer as diluent) were intravenously injected in sPLA₂-IIA sufficient or deficient mice. After 1h, mice were sacrificed and organs (liver, kidneys, lymph nodes and lungs) were recovered and immediately processed for total RNA extraction. Total RNA was isolated using Trizol (Life Technologies Inc) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified using a Qubit® Fluorometer (Life Technologies Inc). Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed as described previously.¹³ Briefly, cDNA amplification was carried out in a Rotor-Gene Q operated with the Q series software version 2.0.2 (Qiagen) using 35 cycles of 95°C for 17 s, 58°C for 25 s and 72°C for 25 s. Each sample consisted of 40 ng of cDNA, 2 µl of 10X buffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1.5% Triton X-100), 100 µM dNTP, 500 nM of primers, 0.1 unit of *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science) and SYBR® Green I dye (Life Technologies) in a reaction volume of 20 µL. For each gene of interest, specific primers were designed as described previously.¹³

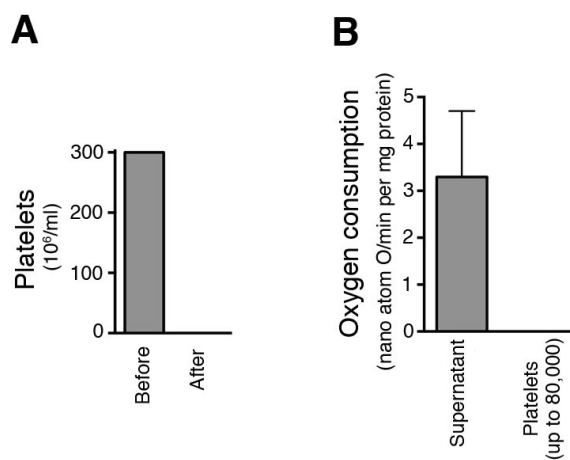
1. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, et al. Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions. *Transfusion*. 2013.
2. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J*. 2004;86(6):3993-4003.
3. Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood*. 2000;96(2):719-726.
4. Soulet D, Pare A, Coste J, Lacroix S. Automated Filtering of Intrinsic Movement Artifacts during Two-Photon Intravital Microscopy. *PLoS One*. 2013;8(1):e53942.
5. Canaan S, Nielsen R, Ghomashchi F, Robinson BH, Gelb MH. Unusual mode of binding of human group IIA secreted phospholipase A2 to anionic interfaces as studied by continuous wave and time domain electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30984-30990.
6. Edwards SH, Thompson D, Baker SF, Wood SP, Wilton DC. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry*. 2002;41(52):15468-15476.
7. Bollinger JG, Li H, Sadilek M, Gelb MH. Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2010;51(2):440-447.
8. Bollinger JG, Thompson W, Lai Y, et al. Improved sensitivity mass spectrometric detection of eicosanoids by charge reversal derivatization. *Anal Chem*. 2010;82(16):6790-6796.
9. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, et al. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48535-48549.
10. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*. 2013.
11. Flamand N, Lefebvre J, Surette ME, Picard S, Borgeat P. Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *J Biol Chem*. 2006;281(1):129-136.
12. Borgeat P, Picard S, Vallerand P, et al. Automated on-line extraction and profiling of lipoxygenase products of arachidonic acid by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*. 1990;187:98-116.
13. Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8:1-10.

2.12.2. Supplementary figures



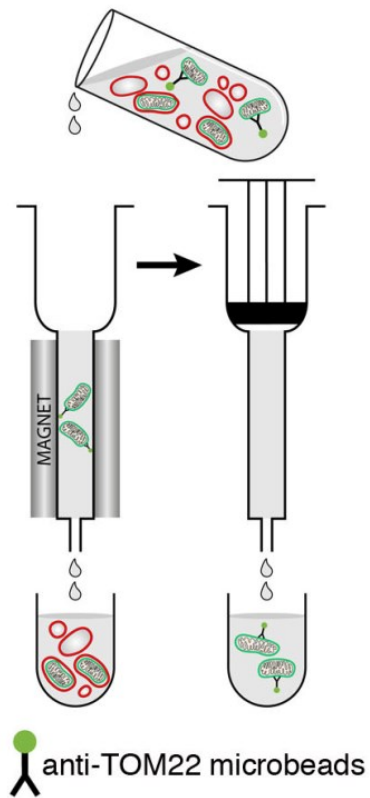
Supplementary Figure 2-1. Relative positioning of mitochondria within the platelet.

(A) Platelet centroid (indicated by X), as well as mitochondrial centroids (indicated by *white dots*), were calculated using a custom-made macro for NIH ImageJ and marked on the microphotograph. The distance between the platelet centroid and the mitochondrial centroids was measured along with the shortest distance between the mitochondrial centroids and the plasma membrane. (B) Time-lapse imaging of mitochondria movement in thrombin-activated platelets. A proportion of mitochondria (green, white arrow) are found within pseudopodia (P, dotted lines) of thrombin-activated platelets (t=60 min).



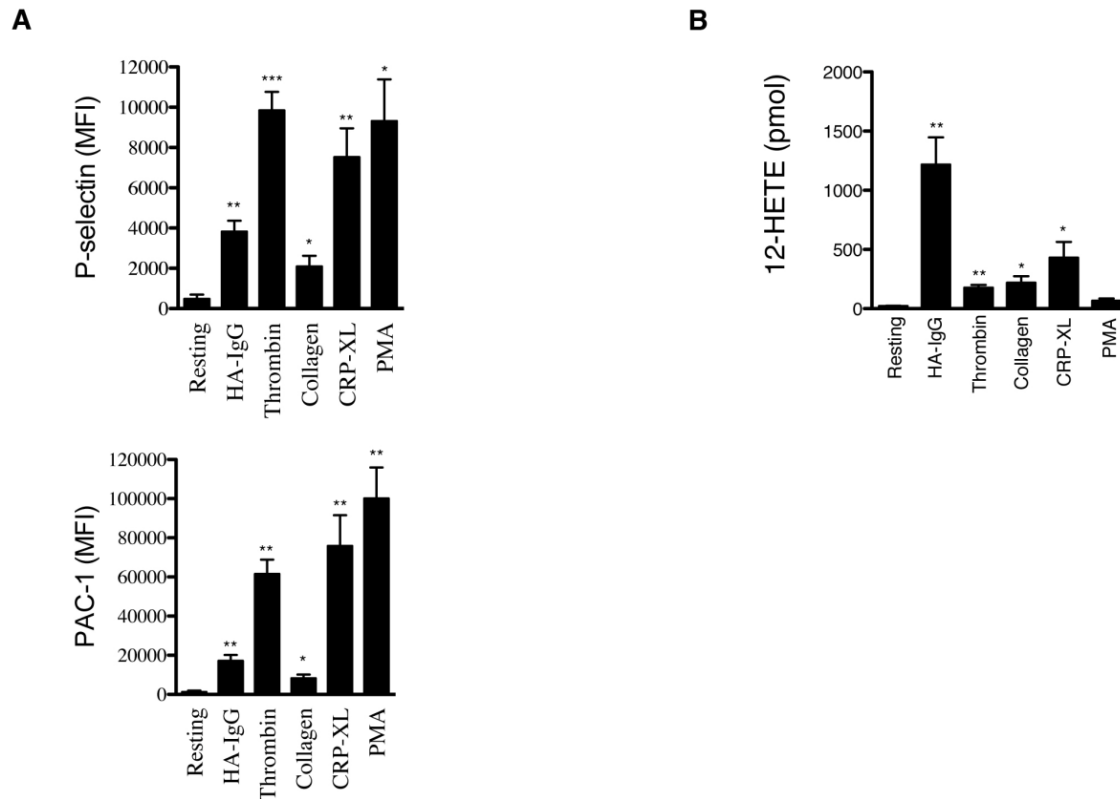
Supplementary Figure 2-2. Characterization of platelet supernatants.

(A) Platelets were counted in platelet preparations (*before*) and following centrifugation (*after*) by microscopy to detect residual platelet contamination in the supernatant. No detectable platelet remains in supernatants with the centrifugation protocol used. **(B)** No respiratory activity was detected in Tyrode's buffer following the addition of intact platelets ($\leq 80,000/\text{mL}$) indicating the detection limit of the approach. For comparison, the supernatant obtained after isolating activated platelets, which contains extracellular mitochondria, displays significant respiration.



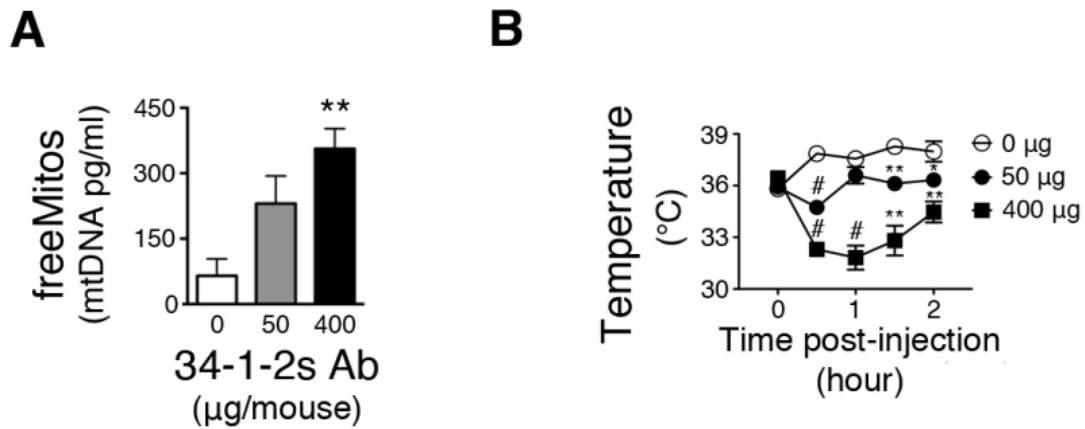
Supplementary Figure 2-3. Magnetic purification of freeMitos.

The platelet supernatant, which contains freeMitos, mitoMPs and MPs, is incubated with anti-TOM22 microbeads, and freeMitos are then isolated using a magnetic field. Magnetic field removal allows the elution of freeMitos from the column, which are then used for various purposes.



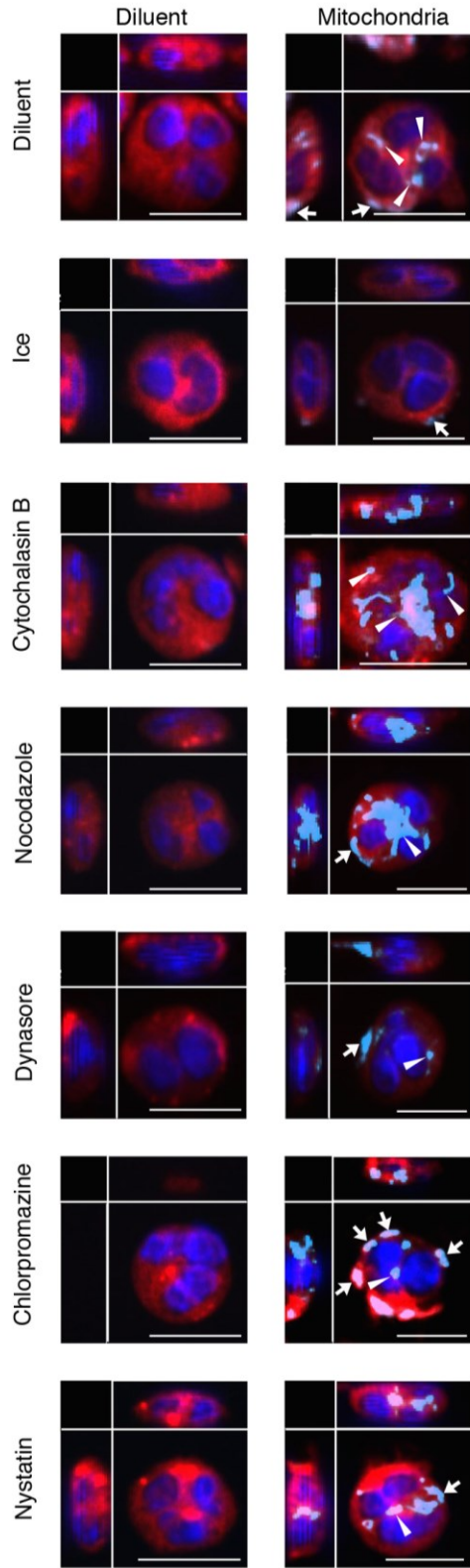
Supplementary Figure 2-4. Platelet are activated under various stimuli.

(A and B) Platelets were activated using heat-aggregated IgG (HA-IgG), thrombin, collagen, cross-linked collagen related peptide (CRP-XL) and *phorbol* 12-myristate 13-acetate (PMA) for 4 hours at room temperature. (A) P-Selectin (*upper panel*) and activated glycoprotein IIb/IIIa expressions (PAC-1 antibody, *lower panel*) in activated platelets by FCM. Values represent the mean fluorescence intensity (MFI) ($n=3$; data are mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.005$ and *** $P<0.001$ vs. resting platelets, *t*-test). (B) 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) quantification by high-performance liquid chromatography of activated platelets.



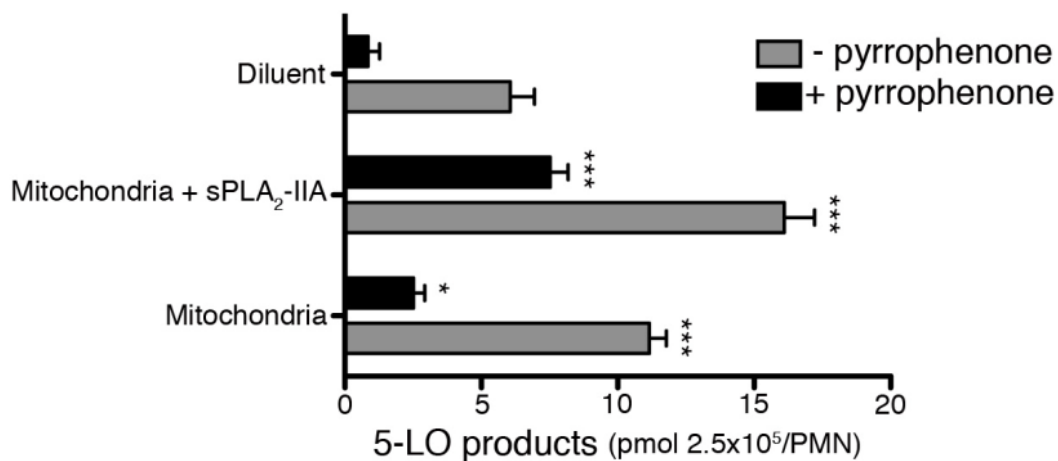
Supplementary Figure 2-5. Extracellular mitochondria are present in various sterile inflammatory pathologies.

(A and B) A transfusion-related acute lung injury (TRALI) animal model was obtained by intravenous injection of the indicated concentration of 34-1-2s antibody to BALB/c mice. A significant temperature drop is observed in mice 1 h after antibody injection, that correlates with an upsurge of freeMitos as measured by TOM22-mediated mtDNA isolation in bronchoalveolar lavages ($n=3$; data are mean \pm SEM, $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $\#P<0.001$ vs. control at 0 μg , t -test).



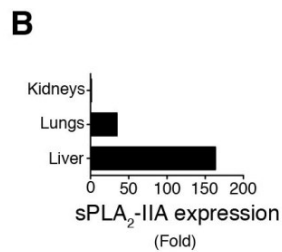
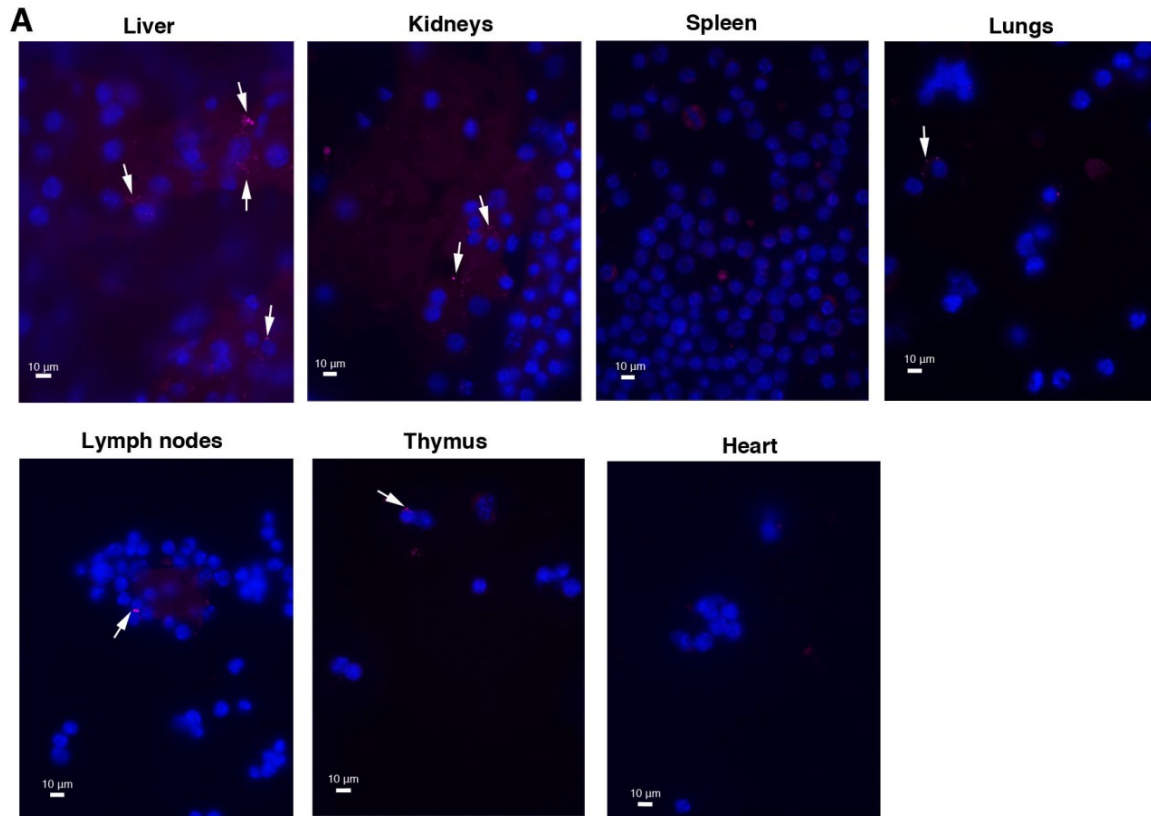
Supplementary Figure 2-6. Exogenous mitochondria are internalized via an endocytosis-dependent pathway by human neutrophils.

Representative confocal microscopy analyses of neutrophils cytoplasm and nuclei (shown in red and blue respectively) incubated with exogenous mitochondria (cyan) for 30 min at 37°C. To assess passive internalization (ice condition), exogenous mitochondria and neutrophils were incubated on ice for 30 min. Neutrophils were pre-treated with either cytochalasin B, nocodazol, dynasore, nystatin, or chlorpromazine for 10 min at 37°C. Cells were then incubated for 30 min at 37°C in presence of 5×10^5 mitochondria/ μl (labeled with 100 nM final of MitoTracker® Deep Red, Invitrogen) and recombinant human sPLA₂-IIA (0.2 $\mu\text{g/ml}$). Scale bars represent 10 μm . Data are representative of three independent experiments.



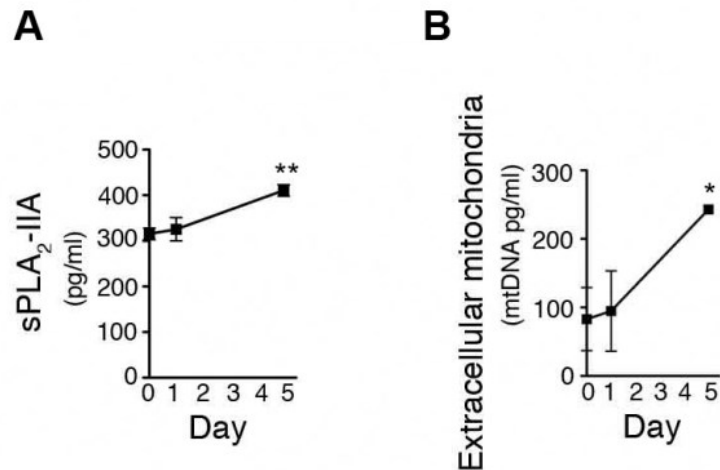
Supplementary Figure 2-7. sPLA₂-IIA and cPLA₂- α work in concert to promote generation of 5-lipoxygenase products in human neutrophils.

Human neutrophils pre-treated with the cPLA₂- α inhibitor pyrrophenone (or diluent) were incubated in presence of exogenous mitochondria and mitochondria/sPLA₂-IIA complex. Proinflammatory lipid mediators release was then evaluated. The total 5-lipoxygenase products (5-LO products) were quantified by high-performance liquid chromatography ($n=6$; data are mean \pm SEM, * $P<0.05$ and *** $P<0.001$ vs. control, t -test).



Supplementary Figure 2-8. Localization of extracellular mitochondria following their intravenous injection.

(A) Mitochondria (*magenta*, *white arrow*) are found primarily in liver, kidneys, lymph nodes and lungs (*blue nuclei*, Hoechst stain) of C57BL/6N mice. (B) Organ distribution of human sPLA₂-IIA mRNA expression in sPLA₂-IIA sufficient mice. sPLA₂-IIA mRNA was detected in lungs, kidneys and liver of sPLA₂-IIA sufficient mice. Relative fold increase of sPLA₂-IIA expression was obtained when comparing sPLA₂-IIA expression in lungs and liver compared to the level found in kidneys. sPLA₂-IIA is predominantly expressed in the liver of sPLA₂-IIA sufficient mice (*n*=3 for each phenotype).



Supplementary Figure 2-9. sPLA₂-IIA and mtDNA levels increase in platelet concentrates during storage.

Platelet storage bags ($n=6$) were incubated for the indicated time at 22°C with constant agitation. PFP samples were obtained on days 0, 1 and 5 for the following analyses: **(A)** quantification of sPLA₂-IIA by time-resolved immunofluorescence ($n=3$; data are mean \pm SEM, t -test); **(B)** extracellular mtDNA abundance by quantitative PCR ($n=3$; data are mean \pm SEM, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, t -test).

Les films sont disponible à l'adresse :

<http://www.bloodjournal.org/content/124/14/2173.figures-only>

Supplementary video 1. Mitochondria localization in resting platelets. Non-activated platelets were labeled with the plasma membrane WGA Alexa Fluor® 594 (*red*) and mitochondrial MitoTracker® Green FM (*green*) dyes, and visualized by CSLM.

Supplementary video 2. Mitochondria relocate in the pseudopodia of activated platelets. Platelet plasma membrane and mitochondria were labeled with WGA Alexa Fluor® 594 (*red*) and MitoTracker® Green FM (*green*) dyes, respectively. Platelets were seeded in 8-well chamber slides maintained at 22°C (Tokai Hit ZILC-F1 stage-top incubator), and activated by addition of thrombin (0.5 U/ml) and CaCl₂ (5 mM). Single planes of platelets were acquired every 20 s for 105 min.

Supplementary video 3. Intravenous injection of mitochondria induces neutrophil rolling in LysM-eGFP mice. Neutrophil (*green*) velocity is significantly reduced in blood (*red*) following intravenous injection of mitochondria (**A**, t=40min) as opposed to Tyrode Buffer (**B**, vehicle).

Specimen	Gender	Age	Specimen description	RF	CCP
1	Male	48	Knee SF	N/A	N/A
2	Male	35	Knee SF	<30	3
3	Male	72	Knee SF	134	37

Supplementary Table 2-1: Description of synovial fluid specimen from rheumatoid arthritis patients.

SF: Synovial fluid; RF: Rheumatoid Factor; CCP: Cyclic citrullinated peptide; CRP: C-reactive protein; ESR: Erythrocytes sedimentation rate

Chapitre 3. Les microparticules de plaquette sont internalisées par les neutrophiles via l'activité concertée de la 12-lipoxygénase et de la phospholipase A₂ sécrétée de type IIA.

Titre court: Régulation de l'internalisation des microparticules

3.1. Avant propos

Le Dr Eric Boilard a conçu et dirigé le projet de recherche. Il a participé à l'analyse des données et corrigé l'article.

Les Drs Luc Boudreau et Clémence Belleannée ont planifié les expériences.

Les Drs Luc Boudreau, Denis Soulet, Clémence Belleannée, Nathalie Cloutier, Benoit Laffont, Raifish E. Mendoza-Villarroel, Tania Lévesque, Emmanuelle Rollet-Labelle, Matthieu Rousseau, Isabelle Allaëys ont réalisé les expériences.

Les Drs Luc Boudreau, Clémence Belleannée, James Bollinger, Jacques J. Tremblay et Michael H. Gelb ont analysé les données.

Les Drs Jacques J. Tremblay, Patrice E. Poubelle, Gérard Lambeau, Marc Pouliot, Patrick Provost, Denis Soulet et Michael H. Gelb ont fourni des réactifs primordiaux.

Les Drs Luc Boudreau, Clémence Belleannée, Denis Soulet, Emmanuelle Rollet-Labelle, Gérard Lambeau, Marc Pouliot, Patrice E. Poubelle et Patrick Provost ont participé à l'écriture du manuscrit.

J'ai conçu, planifié et réalisé les expériences, analysé et interprété les données, réalisé les analyses statistiques puis écrit l'article révisé par le Dr. Boilard.

Ce chapitre a été publié dans le journal PNAS le 23 juin 2015.

3.2. Résumé

Les microparticules de plaquette (MPs) sont de petites vésicules permettant une communication intercellulaire toutefois les mécanismes sous-jacents de leur internalisation ne sont pas compris. Nos résultats indiquent que les neutrophiles internalisent les MPs grâce aux activités concertées de la phospholipase A₂ IIA (sPLA₂-IIA), présente dans les liquides inflammatoires, et de la 12-lipoxygénase (12-LO), encapsulée dans les MPs. Ces enzymes produisent le 12(S)-hydroxyeicosatétranoïc acid (12(S)-HETE). La cargaison des MPs est riche en facteurs de transcription, en acides nucléiques et en mitochondries. Ce cargo est internalisé par les neutrophiles activés via le 12(S)-HETE. Les neutrophiles isolés des articulations de patients arthritiques ou de souris arthritiques exprimant la sPLA₂-IIA et la 12-LO, contiennent aussi des MPs de plaquettes. L'utilisation de souris génétiquement modifiées met en évidence que l'action concertée de ces deux enzymes favorise l'arthrite inflammatoire. Ainsi les MPs de plaquettes promeuvent leur internalisation dans les cellules via un mécanisme hautement régulé.

Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A₂-IIA

Anne-Claire Duchez^a, Luc H. Boudreau^a, James Bollinger^b, Clémence Belleannée^c, Nathalie Cloutier^a, Benoit Laffont^a, Raifish E. Mendoza-Villarroel^c, Tania Lévesque^a, Emmanuelle Rollet-Labelle^a, Matthieu Rousseau^a, Isabelle Allaëys^a, Jacques J. Tremblay^c, Patrice E. Poubelle^a, Gérard Lambeau^d, Marc Pouliot^a, Patrick Provost^a, Denis Soulet^e, Michael H. Gelb^b and Eric Boilard^{a1}

^a Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Département de microbiologie et immunologie, Québec, QC, Canada

^b Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, WA, USA

^c Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Département d'obstétrique, gynécologie et reproduction, Québec, QC, Canada

^d Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Centre National de la Recherche Scientifique - Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne, France

^e Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, Département de Psychiatrie et Neurosciences, Québec, QC, Canada

Running title: Regulation of microparticle internalization

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed:

Eric Boilard, PhD

Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie

Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec

Faculté de Médecine de l'Université Laval

2705 Laurier, room T1-49

Québec, G1V 4G2

Québec, Canada

E-mail: eric.boilard@crchudequebec.ulaval.ca

Keywords: platelets, microparticles, neutrophils, 12-lipoxygenase, phospholipase A₂

3.3. Abstract

Platelets are anucleated blood elements highly potent at generating extracellular vesicles (EV) called microparticles (MPs). Whereas EVs are accepted as an important means of intercellular communication, the mechanisms underlying platelet MP internalization in recipient cells are poorly understood. Here, lipidomic analyses identified 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid [12(S)-HETE] as the predominant eicosanoid generated by MPs. Mechanistically, 12(S)-HETE is produced through the concerted activity of secreted phospholipase A₂ IIA (sPLA₂-IIA), present in inflammatory fluids, and platelet-type 12-lipoxygenase (12-LO), expressed by platelet MPs. Platelet MPs convey an elaborate set of transcription factors, nucleic acids and contain mitochondria. We observed that MPs and their cargo are internalized by activated neutrophils at the endomembrane system via 12(S)-HETE. Platelet MPs are found inside neutrophils isolated from the joints of arthritic patients, and are found in neutrophils only in the presence of sPLA₂-IIA and 12-LO in an *in vivo* model of autoimmune inflammatory arthritis. Using a combination of genetically modified mice, we show that the coordinated action of sPLA₂-IIA and 12-LO promotes inflammatory arthritis. These findings identify 12(S)-HETE as a trigger of platelet MP internalization by neutrophils, a mechanism highly relevant to inflammatory processes. As sPLA₂-IIA is induced during inflammation, and 12-LO expression is mainly restricted to platelets, these observations demonstrate that platelet MPs promote their internalization in recipient cells through highly regulated mechanisms.

3.4. Introduction

Small extracellular vesicles (EVs) are implicated in physio (patho)logical contexts, such as immunity, reproduction, and cancer (1–4). They also include apoptotic bodies, the vesicles produced by apoptotic cells. Exosomes are EVs generated by exocytosis of multivesicular bodies ranging in size between 50 nm and 150 nm, whereas microparticles (MPs), also known as microvesicles, are vesicles of ~100–1,000 nm diameter shed from the plasma membrane by cellular budding and fission (2). EVs bear cellular components originating from the donor cells, and accumulating evidence suggests that they might transfer their

material to recipient cells. The regulatory events implicated in the transfer of the EV cargo remain mostly undefined, however.

Platelets circulate in blood and patrol the vasculature to promote hemostasis. Although any cell lineage might shed MPs, platelets are particularly proficient at this function. Consistent with this, the blood is rich in MPs expressing platelet (and megakaryocyte) surface markers, and levels of platelet MPs increase in diseases in which platelets are activated (5). Albeit anucleated, platelets represent a major blood reservoir of such components as nuclear factors (6, 7), messenger RNA (mRNA) (8, 9), microRNA (miRNA) (10), and mitochondria (11), which may be packaged inside MPs and transferred to nucleated recipients. A key event in the occurrence of such transfer is the binding of platelet MPs to cells. This may implicate selectins (12) and the recognition of phosphatidylserine, a phospholipid frequently exposed on MPs (13), by lactadherin (14) and developmental endothelial locus-1 (15). Indeed, miRNA-containing platelet MPs are internalized by endothelial cells, thereby altering the stability of mRNA in the recipient (16). Platelets are also active participants in immunity (17–20); platelet MPs are found in inflammatory conditions (1, 17, 21) and are ideally positioned to interact with immune cells.

Neutrophils patrol the vasculature and tissues at the ready to respond to an infectious agent or tissue insult (22). Although neutrophils are considered terminally differentiated granulocytes, they can undergo important phenotypical and functional changes once present in inflammatory exudates (23). For instance, in rheumatoid arthritis (RA), the most common form of autoimmune joint inflammation, neutrophils are represented preponderantly in the diseased joint fluid and display a prolonged lifespan and reduced migratory activity, suggesting the accumulation of factor(s) in RA that promote neutrophil plasticity (23–25). Using autoimmune arthritis as a model of inflammation in which both MPs and neutrophils contribute (21, 26), we reveal that MP cargo transfer from anucleated platelets to nucleated recipient neutrophils is dependent on the concerted activities of sPLA₂-IIA present in the extracellular milieu and of 12-lipoxygenase (12-LO) present in platelet MPs. Our observations demonstrate that platelet MPs are not passively internalized by neutrophils, but rather that MPs promote their own internalization via a lipid mediator of inflammation. Considering that platelets (i) represent a substantial source

of nuclear factors, noncoding RNAs, and functional organelles; (ii) are highly efficient at producing MPs; and (iii) are unique with respect to 12(S)-HETE expression, platelets might be specialized at transferring their material to other cells to modify them.

3.5. Results

3.5.1. Microparticle internalization by neutrophils

Assuming that the transfer of materials from platelets to neutrophils is biologically significant, we hypothesized that it necessarily would occur via finely controlled mechanisms. To identify key mediators involved in internalization, we further surmised that these mediators would be concomitantly expressed with platelet MPs. The secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) enzymes hydrolyze membrane phospholipids in the sn-2 position, generating free fatty acids and lysophospholipids (27). Although 10 different groups of sPLA₂ enzymes have been identified in humans, sPLA₂ group IIA (sPLA₂-IIA) is (nonexclusively) expressed by platelets and is induced in inflammation (27, 28). In RA, sPLA₂-IIA is overexpressed in joint lubricating synovial fluid (SF) and amplifies the disease (28). Whereas sPLA₂-IIA has limited activity on the cellular plasma membrane (27), it uses MPs as a substrate (27, 29, 30). Like sPLA₂-IIA, MPs accumulate in SF during RA, where they are frequently associated with neutrophils (11, 21, 28, 31, 32).

In a preliminary set of experiments, we generated platelet MPs to verify whether they are internalized by neutrophils and whether sPLA₂-IIA impacts this process. We used collagen to activate human platelets that had been labeled with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA), a probe that passes freely through the platelet cell membrane and is converted to a fluorescent cell-impermeable product by cytosolic esterases (33). Under these conditions, the fluorescent probe was encapsulated within platelets, and $96.8 \pm 0.25\%$ of the MPs shed from these platelets fluoresced (SI Appendix, Fig. S1A). MPs isolated by centrifugation contained $\sim 0.1\%$ remnant platelets and were of heterogeneous size (115 nm–538 nm; average, 346.3 ± 23.4 nm) (SI Appendix, SI Materials and Methods and Fig. S1 B, C, D, and F), consistent with the reported dimensions of platelet MPs (13).

We then verified different categories of markers expected in EVs in MP preparations. Whereas mitochondria are typically absent in exosomes, they can be packaged inside MPs (11, 34). Furthermore, the presence of a protein associated with the endosomal sorting

complex required for transport (ESCRT), tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101), is recognized in exosomes but underrepresented in MPs (34). Thus, the platelet EV preparations used in this study were enriched in MPs, because a subset contained mitochondrial markers, whereas ESCRT proteins were undetectable (SI Appendix, Fig. S1 E and G). To determine the contribution of inflammatory stimuli and sPLA₂-IIA to MP internalization by neutrophils, we treated the latter with autoimmune-relevant inflammatory stimuli [TNF/ GM-CSF and immune complexes, an agonist of the receptors for the Fc portion of IgG (FcγR)] in the presence or absence of sPLA₂-IIA. We observed that MPs rapidly bound neutrophils independently of sPLA₂-IIA and of any costimulation (SI Appendix, Fig. S2 A–E). In contrast, the combination of stimuli (TNF/GM-CSF and immune complexes) and sPLA₂-IIA was necessary for efficient internalization of MPs (Fig. 3-1 and SI Appendix, Fig. S3A), which were identified in the neutrophil's cytoplasm in the vicinity of the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and lysosome, but never by the recipient mitochondria (SI Appendix, Fig. S4 A–D). Accordingly, an average of 20 ± 4 and 38 ± 3 MPs were internalized in neutrophils in the presence of sPLA₂-IIA within 30 and 60 min, respectively. The internalization process occurred through dynamin-, clathrin-, and caveolin-dependent endocytosis (SI Appendix, Fig. S5), and was not unique to collagen-induced MPs. MPs generated by activating platelets with thrombin, a serine protease, and collagen related peptide, a specific glycoprotein VI agonist, also were internalized by neutrophils, and this was dependent on the presence of sPLA₂-IIA (SI Appendix, Fig. S3B). These results provide an ideal model for identifying the molecular process implicated in MP internalization following adhesion.

Although the sPLA₂-IIA enzyme generates potent lipid mediators, it also acts as a receptor ligand (27, 35–37). Thus, sPLA₂-IIA might promote internalization either through the production of lipid mediators or through receptor binding and signaling. To assess the contribution of sPLA₂-IIA catalytic activity to MP internalization, we made use of an inactive enzyme mutant, H48Q-sPLA₂-IIA (27). An important observation is that sPLA₂-IIA catalytic activity was critical for the promotion of MP internalization (Fig. 3-1), ruling out the role of sPLA₂-IIA receptor binding and pointing to the role of lipid mediator(s) in this process.

3.5.2. Lipidomics of platelet microparticles

We next sought to identify the lipid trigger implicated in MP internalization. sPLA₂-IIA generates lysophospholipids from MPs (27, 29); however, the complete set of lipid mediators expressed by MPs is unknown. Using tandem mass spectrometry to survey MP-derived lipid mediators, we confirmed that MPs are used as substrates by sPLA₂-IIA, generating diverse lysophospholipids and fatty acids, including arachidonic acid (AA; 20:4) (Fig. 3-2A–D and SI Appendix, Fig. S6 A and B). AA can be metabolized into eicosanoids, highly versatile mediators of multiple physiological and pathological processes (Fig. 3-2E) (38, 39). Indeed, examination of platelet MPs revealed, as in platelets (40), the presence of enzymes [i.e., cyclooxygenase 1 (Cox-1), thromboxane synthase (TXs), and 12-LO] that metabolize AA into the eicosanoids thromboxane A₂ (TXA₂) and 12(S)-HETE (Fig. 3-2F). These pathways are active in MPs as exogenous AA was metabolized into thromboxane B₂ (TXB₂; a stable metabolite of TXA₂) and 12(S)-HETE (Fig. 3-2G). Consistent with this was the identification of TXB₂ and 12(S)-HETE [12(S)-HETE >>TXB₂] by lipidomics as the predominant eicosanoids produced by sPLA₂-IIA from MPs (Fig. 3-2H and I and SI Appendix, Fig. S6C). Consequently, we added exogenous lipids to activated neutrophils and examined their role in internalization. We observed that, similar to sPLA₂-IIA, 12(S)-HETE was sufficient to promote internalization by inducing neutrophils to internalize MPs (Fig. 3-3 A and B and Movies S1 and S2). Conversely, lysophosphatidylcholine (SI Appendix, Fig. S7A), carbocyclic TXA₂ (TXA₂c; a stable analog of TXA₂), TXB₂, and 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (12-HHTrE) produced concurrently with TXA₂ by TXs (41) had no impact on MP internalization (Fig. 3-3B). Moreover, a COX inhibitor demonstrated no effect on MP internalization, confirming that the COX products are dispensable (SI Appendix, Fig. S7B). Next, to confirm that 12(S)-HETE is the lipid trigger implicated in sPLA₂-IIA-induced MP internalization, we produced fluorescent MPs from platelets isolated from platelet-type 12-LO⁻ deficient (ALOX12^{-/-}) mice and from their wild type (WT) control littermates (ALOX12^{+/+}). Remarkably, ALOX12^{-/-} MPs, which cannot metabolize AA into 12(S)-HETE (Fig. 3-3C), were not internalized by neutrophils, even in the presence of sPLA₂-IIA (Fig. 3-3D), demonstrating the critical involvement of platelet MP 12-LO in this process. Neutrophils express the 12(S)-HETE high-affinity receptor BLT2 and the leukotriene B₄ (LTB₄) highaffinity receptor BLT1. Using an antagonist of

BLT2 (LY255283), along with an antagonist of BLT1 (CP105696) for comparison, we confirmed the involvement of 12(S)-HETE and its receptor BLT2 in the internalization process (Fig. 3-3E). The contribution of BLT1 was significant, but less prominent, in agreement with the lower affinity of 12(S)-HETE for this receptor, or suggestive of a modest role for LTB₄ in this process (42).

Platelet-type 12-LO expressed by human platelets generates the S enantiomer of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), designated 12(S)-HETE, whereas the R enantiomer, 12(R)-HETE, is produced by the 12-LO expressed by leukocytes and skin fibroblasts, or through the noncatalytic derivation of AA by cytochrome P450 (43). To verify whether this mechanism of internalization might apply to other cell lineage MPs (deficient in platelet-type 12-LO), we compared the relative impacts of 12(S)-HETE and 12(R)-HETE on internalization. We found that 12(S)-HETE, but not 12(R)-HETE, is specifically involved in MP internalization (Fig. 3-3F). ALOX12^{-/-}MPs were not internalized even in the presence of exogenous 12(S)-HETE, providing further support for the contribution of platelet-type 12-LO in this process (Fig. 3-3D). In addition, using red fluorescent ALOX12^{-/-} platelets and green fluorescent ALOX12^{+/+} platelets to generate red ALOX12^{-/-} MPs and green ALOX12^{+/+} MPs, respectively, we found that 12(S)-HETE produced from MPs is incapable of promoting internalization of neighboring MPs lacking 12-LO (Fig. 3-3D), suggesting that the internalization process revealed here might be unique to 12(S)-HETE-expressing MPs (i.e., platelet MPs).

3.5.3. Microparticle internalization in disease

Neutrophils, platelet MPs (11, 21, 31, 32), sPLA₂-IIA (28), and inflammatory stimuli all coexist in RA SF. We used SF from patients with RA that contained an abundance of platelet MPs (Fig. 3-4A) to determine whether platelet MPs can be found within neutrophils. Using anti-CD41 and anti-CD66b monoclonal antibodies to label platelet MPs and neutrophils, respectively, we could discern significant platelet MP signals both at the surface and inside neutrophils (mostly near or at the nucleus) in RA SF (Fig. 3-4B and C). We observed a similar pattern of CD41+MP expression inside peripheral neutrophils that had been incubated with platelet MPs, but only in the presence of sPLA₂-IIA (Fig. 3-4B).

We next used the K/BxN serum transfer model of arthritis, a disease model in which both sPLA₂-IIA and platelet MPs are implicated (21, 28), to validate the MP internalization

process in inflammation. Because C57Bl6/J mice naturally lack sPLA₂-IIA (28), we used transgenic mice expressing human sPLA₂-IIA (sPLA₂-IIA^{TGN}, in a C57Bl6/J background) (44) and included WT C57Bl6/J mice as controls. We observed that on injection into the tail vein, fluorescent ALOX12^{+/+} MPs quickly localized inside neutrophils in the arthritic ankles of sPLA₂-IIA-expressing mice (Fig. 3-4D and E). An important observation is the absence of MP localization inside neutrophils in mice lacking sPLA₂-IIA, confirming the essential role of sPLA₂-IIA in the internalization process in vivo. The internalization was through MP-derived 12(S)-HETE; ALOX12^{-/-} MPs failed to localize in neutrophils, even in mice expressing sPLA₂-IIA (Fig. 3-4D and E). Thus, the concerted actions of sPLA₂-IIA- and MP-derived 12-LO trigger MP internalization during inflammation.

3.5.4. Transfer of an elaborated microparticle cargo inside neutrophils

Having confirmed efficient internalization of fluorescently labeled platelet MPs, we proceeded to verify the actual transfer of three distinct platelet components (i.e., a cytosolic protein, a nucleic acid, and an organelle) to neutrophils. Because megakaryocytes perform several rounds of endomitosis before platelet production, the platelet content can be particularly enriched in cellular components. Although lacking a nucleus (and thus transcription), the transcription factors NF- κ B (7) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) have been reported in the platelet cytosol (6). The complete set of transcription factors expressed by platelets is unknown, however, and whether they are encapsulated in MPs has not been investigated. We determined that 80 different transcription factors, belonging to seven distinct structural families (45) (SI Appendix, Dataset S1) are found in platelets (SI Appendix, Fig. S8A) and are packaged in MPs (SI Appendix, Fig. S8B), including NF- κ B and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TFI) (Fig. 3-5A). The latter, which is involved in neural maturation (46), was highly expressed in platelet MPs and was undetectable by immunofluorescence in neutrophils (Fig. 3-5B and SI Appendix, Dataset S1). We used this information to monitor the transfer of transcription factors to the recipient. We observed that through sPLA₂-IIA activity, COUP-TFI was efficiently transferred to neutrophils, where it remained in the cytosol (Fig. 3-5B). Furthermore, the COUP-TFI protein detected in the platelet MPs retained its DNA-binding activity, as revealed by DNA-protein

interaction assays (SI Appendix, Fig. S8C), thereby indicating that it might impact recipient cell transcription on translocation to the nucleus.

Platelets contain mRNAs (8, 47) and noncoding RNAs (ncRNAs) (10), encapsulated inside MPs on budding and shedding (16). We have established the repertoire of nucleic acids from platelet MPs, showing that MPs express a variety of mRNAs coding for proteins implicated in multiple biological processes (SI Appendix, Fig. S8D and Dataset S2). Of interest, ncRNAs, such as transfer RNAs, ribosomal RNAs, and miRNAs, also were identified in MPs. We performed a more precise assessment of MP miRNAs using miRNA arrays, which identified the presence of immature and mature miRNAs (SI Appendix, Dataset S3). An miRNA produced independently of Dicer activity, miR-451 (48), has been implicated in immunity and inflammation (49) and appeared to be one of the most abundantly expressed miRNAs in MPs (Fig. 3-5C and SI Appendix, Fig. S8E). Using a neutrophil-like cell line transfected with a specific DNA sequence regulated by miR-451, we demonstrated the occurrence of 12(S)-HETE-dependent MP internalization (SI Appendix, Fig. S9) and transfer of miR-451 to these recipient cells (Fig. 3-5D). Furthermore, we found that MP-derived miR-451 cleaved its cytoplasmic target sequence, establishing that platelet MPs can transfer functional nucleic acids to recipient cells through sPLA₂-IIA (Fig. 3-5D).

Platelets contain an average of four mitochondria, which can be packaged inside MPs, thereby forming mitochondria-containing MPs (11). Because only a subset of MPs contains mitochondria (11), we used confocal microscopic analyses and a combination of cytosolic and mitochondrial fluorescent dyes to distinguish mitochondria-deficient MPs and mitochondria-containing MPs. We found that the internalization of mitochondria-containing MPs by neutrophils depends on the presence of sPLA₂-IIA (Fig. 3-5E). The efficient transfer of mitochondria through MPs was further validated by electron microscopy (Fig. 3-5F). Thus, the activity of sPLA₂-IIA on MPs mediates the transfer of a broad repertoire of platelet components to neutrophils, including cytosolic proteins (e.g., transcription factors), nucleic acids (e.g., miRNA) and organelles (e.g., mitochondria).

3.5.5. Concerted action of sPLA₂-IIA and 12-LO *in vivo*

The internalization of MPs by activated neutrophils requires 12(S)-HETE; however,

whether this process is proinflammatory or anti-inflammatory is unknown. Under the hypothesis that the internalization of MPs by neutrophils might be biologically relevant, we verified the impact of the concerted activities of sPLA₂-IIA and 12-LO in vivo. To this end, we crossed ALOX12^{-/-} mice with sPLA₂-IIA^{TGN} mice, which reportedly exhibit skin abnormalities reminiscent of psoriasis but with no neutrophil infiltration (44), to generate sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice. We observed that ablation of the ALOX12 gene in sPLA₂-IIA^{TGN} mice had no effect on the skin phenotype, although 12-LO expression was eliminated in blood platelets (Fig. 3-6A and B). Furthermore, we also confirmed that neutrophilia, which has been reported in sPLA₂-IIA^{TGN} mice (50), occurred independently of 12-LO, and that the other blood cell lineages were unaffected in the transgenic mice (Fig. 3-6C and SI Appendix, Fig. S10). Taken together, these data suggest that the concerted actions of sPLA₂-IIA and 12-LO do not support neutrophil-independent psoriasis-like disease or neutropoiesis.

We next used the K/BxN model of inflammatory arthritis to examine the roles of sPLA₂-IIA and 12-LO in a relevant pathology in which both neutrophils and platelet MPs participate. In agreement with a previous study (28), we confirmed more marked development of arthritis in sPLA₂-IIA^{TGN} mice compared with sPLA₂-IIA-deficient mice (Fig. 3-6D). Moreover, the sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice developed only modest arthritis, similar to sPLA₂-IIA-deficient mice. Given that ablation of the ALOX12 gene in C57BL6 mice (deficient in sPLA₂-IIA) had no impact on arthritis, these data establish that sPLA₂-IIA and 12-LO work in concert to promote inflammation in vivo. Furthermore, i.v. injection of fluorescent ALOX12^{+/+} platelet MPs into these groups of mice showed preferential localization in neutrophils in the joints of sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} mice (Fig. 3-6E). The internalization of ALOX12^{+/+} MPs by neutrophils of sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice was more efficient than that for ALOX12^{-/-} MPs, suggesting that the former provide sufficient 12(S)-HETE for their internalization (Fig. 3-6F).

3.6. Discussion

The rich collection of components with apparently no or only modest roles in anucleated platelets, and the platelet's proficiency to produce MPs under a variety of inflammatory conditions was the impetus for our study. Our results identify sPLA₂-IIA as an enzyme

working in concert with platelet MP 12-LO to promote internalization (Fig. 3-7 and SI Appendix, Fig. S8G). The fact that two enzymes are required for MP internalization demonstrates that the internalization process is tightly regulated, in agreement with the potential significance of this process. Because sPLA₂-IIA is an extracellular enzyme induced only in inflammatory exudates, this ensures that MPs are not internalized in neutrophils, unless the neutrophils reach the inflammatory site. Furthermore, the fact that neutrophils require activation also points to an additional level of regulation. 12-LO is essentially present only in platelet-derived MPs and not in MPs from other cellular lineages, suggesting that the role of sPLA₂-IIA and 12-LO is to mediate specific platelet component transfer into neutrophils, potentially to impact their function. Of clinical relevance, the concerted actions of sPLA₂-IIA and platelet-type 12-LO mediate inflammation in a model of inflammatory arthritis.

Among the sPLA₂s, sPLA₂-IIA is by far the most abundantly expressed in inflammatory fluids and enhances inflammation in models of atherosclerosis and arthritis, conditions that involve platelet MPs (17, 21, 27). Whereas the AA liberated by MPs can be metabolized into eicosanoids by enzymes expressed by other cells in the vicinity (30), our lipidomic approach shows that the action of sPLA₂-IIA on MPs generates eicosanoids, a process requiring the activity of enzymes packaged inside MPs, consistent with our proteomic analyses and those reported by other investigators (51, 52). Thus, with their membrane composition and content of functional enzymes, platelet MPs represent an extraordinary source of lipid mediators implicated in a vast range of physio(patho)logical functions when bathed in an environment rich in sPLA₂-IIA. Although other sPLA₂ groups other than sPLA₂-IIA might potentially use MPs as a substrate if present in sufficient quantities, our findings support the proposal that a physiological role for sPLA₂-IIA is the promotion of platelet MP functional activities, such as internalization.

Whereas sPLA₂-IIA can use platelet MPs to generate proinflammatory 12(S)-HETE, other eicosanoids, produced by platelets and other cell lineages, also make significant contributions to arthritis. It was previously shown using the K/BxN serum transfer model of autoimmune arthritis that platelet COX-1 could generate large quantities of extracellular prostaglandin H₂, which itself was metabolized transcellularly by the prostacyclin synthase expressed by fibroblast-like synoviocytes (53). The generation of prostacyclin by

fibroblast-like synoviocytes amplifies inflammation, and, accordingly, the ablation of the gene coding for prostacyclin receptor reduces arthritis in vivo (54). The eicosanoid LTB₄ is also an important lipid mediator implicated in arthritis, and mice deficient in 5-lipoxygenase (the enzyme regulating its biosynthesis) and in BLT1 (the high-affinity receptor for LTB₄) are resistant to arthritogenic K/BxN serum (26, 55). Herein we shed light on the role of platelet-type 12-LO in inflammatory arthritis. Consistent with this is the observation that arthritis is also attenuated in mice deficient in BLT2, a high-affinity receptor for 12(S)-HETE (and 12-HHTrE) (56). Moreover, the contribution of platelet-type 12-LO could be determined only in mice expressing sPLA₂-IIA, providing further support for the coupling between sPLA₂-IIA and platelet-type 12-LO.

The internalization process revealed in this study occurs independently of COX-1, ruling out the involvement of other major lipid mediators produced by platelets, such as thromboxane and 12-HHTrE. Interestingly, collagen-induced platelet MPs dominantly produced 12(S)-HETE, consistent with the reported activation of 12-LO through the immunoreceptor-based activation motif-containing the FcR γ chain involved in collagen signaling (57). 12(S)-HETE is a too-often neglected mediator, and its exact clinical significance remains a matter of debate (58). It is thought to be involved in the reorganization of the actin cytoskeleton (59), hypertension (60), angiogenesis, and cancer (61). On the other hand, BLT2 is itself implicated in atherosclerosis (62, 63), cancer (64), and inflammation (65). Thus, it is probable that MP internalization might take place in a broad range of conditions, considering that it also might occur in BLT2-expressing cells other than neutrophils, such as mast cells, endothelial cells, and fibroblast-like synoviocytes (42, 66, 67). MPs lacking 12-LO were not internalized, even in the presence of exogenous 12(S)-HETE. Furthermore, the S enantiomer, but not the R enantiomer, of 12-HETE triggered MP internalization, suggesting that MPs from cell lineages other than platelets might engage distinct mechanisms that have yet to be identified. In humans, the S enantiomer of 12-HETE is produced primarily by platelet-type 12-LO, which might be transferred from platelets to other cells so that they too produce 12(S)-HETE. Indeed, studies have identified platelet-type 12-LO in skin fibroblasts and in fibroblast-like synoviocytes from patients with psoriasis and RA (68, 69), suggesting that MPs derived from these cells also might be capable of conveying 12-LO and of using 12(S)-HETE to

promote their internalization. Because both platelet MPs and sPLA₂-IIA are present in inflamed SF (21, 28), one might ask whether 12(S)-HETE is found in RA SF. Of interest is that 5,12 (S)-diHETE, which is produced only through the coordinated action of leukocyte 5-lipoxygenase and platelet 12-LO, is the most abundant eicosanoid in SF of patients with RA (70), thus suggesting the potential for platelet MP internalization in neutrophils. Future studies will undoubtedly uncover the role of 5,12(S)-diHETE in inflammation.

We report an extensive set of transcription factors and nucleic acids expressed by platelet MPs, which frequently localize near the nucleus and organelles once internalized by neutrophils. Given that miRNAs are recognized as potent modulators of mRNA expression, their transfer to the recipient cell through EVs has received considerable attention (16); however, we emphasize that the MP cargo is far more extensive and contains other modulators besides miRNAs, including mRNAs, ncRNAs, transcription factors, active enzymes (such as 12-LO), cytokines, unique lipids, and even organelles such as mitochondria (11), all of which are potentially capable of contributing to reprogramming of the recipient cell. Accordingly, MPs could regulate transcripts on internalization by neutrophils (SI Appendix, Fig. S11 A and B and Dataset S4), thereby potentially modulating the biological processes and primary functions of these recipient cells. Although these observations suggest that the internalization of MPs may alter neutrophil functions, a feature seen in RA (24), definitively identifying the actual contribution of each individual MP component to the recipient cell is premature. The present study serves to highlight the complexity of the platelet MP cargo and, most importantly, to reveal how platelet MP transfer occurs.

The EV content is highly diversified, with different cellular lineages producing EVs. Furthermore, depending on the biological context, distinct cellular recipients might require specific EV cargoes for their functions and might be specifically targeted by particular EVs. Consistent with this idea, we have demonstrated that platelet MPs are not passively internalized by recipient cells. Specific transfer of the extensive platelet MP cargo to target cells is regulated by a lipid mediator that is unique to and produced by MPs (Fig. 3-7).

3.7. Materials and methods

(more details are provided in SI Appendix, Supplementary methods)

3.7.1. Patients

The synovial fluids (SF) were obtained from the affected knees of 6 patients with RA (4 with positive rheumatoid factors (RFs), 2 with no detectable RFs) with their informed consent under the approval from the CHU de Quebec Ethic committee. Patients (5 females and 1 male aged between 20 to 60 years old) were not treated by any medications before SF collection.

3.7.2. Mice

Guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed for all our studies in a protocol approved by the Animal Welfare Committee at Laval University. Eight-week-old male C57BL/6J (sPLA₂-IIA^{-/-}), transgenic human sPLA₂-IIA (sPLA₂-IIA^{TGN}) (28, 44), and ALOX12^{-/-} (71) mice backcrossed 10 times in a C57BL/6J background were obtained from The Jackson Laboratory. sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{-/-} mice in a C57BL/6J background were crossed with sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} mice in a C57BL/6J background (sPLA₂-IIA^{TGN} hemizygous). sPLA₂-IIA^{TGN}12LO^{-/+} mice obtained from the progeny were crossed again with sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{-/-} mice to generate the desired genotype sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} identified by genotyping.

3.7.3. Arthritis induction in mice

Induction of arthritis was performed using arthritogenic K/BxN serum (100μl) transferred by intraperitoneal injection to recipient sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{+/+}; sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+}; sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-}; and sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{-/-} mice and arthritis development was monitored daily by measuring the thickness of the ankles at the malleoli as described¹⁵².

Experimental design for MP localization in vivo. To avoid any bias in quantitative analyses, each group of mice with comparable arthritis scores were used to assess MP localization in neutrophils *in vivo*. Preliminary experiments determined the volume of K/BxN serum necessary to induce comparable levels of disease in all groups of mice (*i.e.* clinical index plateau of 10 on a scale of 12, reached at day 5). At day 0 and 2, 150μl K/BxN serum was injected in sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{+/+}, sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{-/-}, sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-};

while 75µl K/BxN serum was necessary in sPLA₂-IIA^{TGN} ALOX12^{+/+} mice. At day 5 post-K/BxN serum transfer, arthritic mice from the four groups were injected in the tail vein with 1,5x10⁸ CMPTX ALOX12^{-/-} or ALOX12^{+/+} MPs. Three hours after MP injection, mice were sacrificed. The ankles were digested 3h at 37°C with collagenase IV (Worthington, 1mg/ml in white RPMI). Digestion products were sifted through a filter (cell stainer, Ø70µm). In these conditions, the number of neutrophils in digested ankles remained similar in each group of mice, and 40±6% of total Hoechst⁺ cells were GR1⁺ and displayed polylobbe nuclei. Cells were washed twice with RPMI and centrifuged at 1300g, 5min at room temperature (RT). Pellets were resuspended in HBSS1X and fixed with paraformaldehyde (PFA) 2% (final concentration) during 15min at RT. Fixed cells were cytopspined 3min at 500rpm for confocal microscopy investigations.

3.7.4. Cells and microparticles

3.7.4.1. Platelet MPs.

Human and mouse platelets were obtained respectively from citrated blood of healthy human donors under an approval institutional review board protocol (CRCHU de Québec-Université Laval) (31) and healthy mice aged 12 to 15 week old. Platelets were isolated after centrifugation of blood (282g, 10min at RT) then the supernatant (platelet rich plasma, PRP) was centrifuged at 600g, 5min at RT. The supernatant was centrifuged at 1300g, 5min at RT and the pellet containing platelets was resuspended in Tyrode's buffer pH7.4 containing calcium 5mM. Platelets were counted (Cellometer AutoM10, Nexcelom Bioscience) and adjusted to a density of 100.10⁶ cells/ml before stimulation with collagen (0.5µg/ml, 18h)(Takeda Austria GMBH). When required, platelets were pre-labeled with 1µM CMFDA (green fluorescent) or CMPTX (red fluorescent) (Invitrogen) for 15min at 37°C in the dark prior to stimulation. Contaminating remnant platelets were removed by centrifugation at 1300g, 5min at RT, performed twice. Supernatants containing platelet MPs were centrifuged at 18000g, 90min at 18°C. Pellets containing MPs were resuspended in Tyrode's buffer pH7.4 with 5mM calcium and quantified by flow cytometry using the BD FACSCanto II Special Order Research Product equipped with a small particle option (BD Biosciences) as described (31). The chosen parameters were optimal to detect polystyrene particles from 100 to 3500nm simultaneously on the FSC-PMT and all MP

preparations were confirmed not containing any trace of platelets (see SI Appendix, Fig. S1b).

3.7.4.2. Human primary neutrophils.

Polymorphonuclear neutrophils were isolated from citrated blood of healthy adult volunteers as described (72). Cells (density of 5×10^6 cells/ml) were kept in Mg^{2+} free HBSS 1X Ca^{2+} and left unstimulated (native) or primed with TNF and GM-CSF (100U/ml and 10ng/ml, respectively) (Peprotech)(72) and activated using immune complexes (heat aggregated (HA)-IgG, 1mg/ml final concentration) prepared by heat aggregation of human IgG (25mg/ml, 1h at $63^\circ C$) (Sigma-Aldrich). Human neutrophils (2.5×10^5) were labeled with $1 \mu M$ CMPTX for 15min at $37^\circ C$ (when required) and incubated for 2h at $37^\circ C$ with 17.5×10^6 fluorescent MPs (equivalent to $2 \mu g$ of proteins) or 70 MPs/neutrophil in a final volume of $50 \mu l$. Thus, MPs ($350\,000$ MPs/ μl) were incubated with neutrophils ($5 \cdot 10^6$ cells/ml) in $50 \mu l$. When the role of sPLA₂-IIA on internalization was assessed, the recombinant enzyme (73) or its inactive mutant was added ($0.1 \mu g/ml$ final concentration) 1h on MPs (on ice, to permit association of the enzyme with MPs) prior to MP addition to neutrophils. In some experiments, the BLT₁ receptor antagonist (CP105696, 10nM) (Pfizer Global Research & Development, Kent, generous gift from Dr. Pierre Borgeat, CHU de Quebec), the BLT₂ receptor antagonist (LY255283, 100nM) (Cayman) and lipid mediators (all from Cayman) 12(S)-HETE (0.1 to $10 \mu M$), 12(R)-HETE (0.1 to $10 \mu M$), 12-HHTrE ($1 \mu M$), TXB₂ ($1 \mu M$), TXA_{2c} ($1 \mu M$) were added to neutrophils prior to MP addition.

3.7.4.3. Neutrophil-like cell line.

PLB-985 cells (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) were kept at 0.2×10^6 cells/ml in RPMI containing 10% FBS and differentiated into neutrophil-like cells by adding 0.3mM of dibutyryl-cAMP (dbAMPc, Sigma-Aldrich) during 3 days. Cells, at a density of 5×10^6 cells/ml, were kept in Mg^{2+} free HBSS 1X Ca^{2+} , and labeled with $1 \mu M$ CMPTX, 15min at $37^\circ C$ in the dark when indicated. Neutrophil-like cells were primed and activated as described for primary neutrophils.

3.7.5. Confocal microscopy

3.7.5.1. Cell preparation.

Cells were fixed with 2% PFA (final concentration) 15min at RT and centrifuged using a cytospin protocol (500rpm, 3 min, RT). For intracellular CD41 and COUP TF-I detection, cells were permeabilized with 0.5% saponine (Sigma) in PBS1X, 5min, twice at RT. Then they were treated with saturation solution (0.05% saponine, 5% Foetal Cow Serum and 5% Horse Serum) during 20min at RT. Fluorescently conjugated markers were used to discriminate surface and intracellular compartments and to distinguish neutrophils and platelet MPs. Neutrophil surface was labeled with FITC-conjugated anti-CD66b (1µg/ml, Beckman Coulter), cytoplasm was labeled with 1µM of CMPTX and nuclei were labeled with either 1µg/ml of Hoechst33342 (Invitrogen) or DRAQ5 (1/100, Cell Signaling). When murine neutrophils were isolated from arthritic joints, fixed cells were labeled with Alexa Fluor 488-conjugated anti-GR1 (1,66µg/µl) (BD Bioscience) for 1h. For experiments using CD66b⁺ cells purified with magnetic beads (Stem Cells) from the SF of RA patients, PE-conjugated anti-CD41 (20µg/ml) (clone M148, Abcam) and FITC-conjugated anti-CD66b were used to label MPs and neutrophils, respectively. To determine the expression of COUP-TF I in human cells, antibody against COUP-TF I (1µg/ml) (R&D Systems, clone H8132) was used.

3.7.5.2. Image analyses.

(see also SI Appendix, Supplementary methods). To quantitatively assess localization of fluorescent MPs *in vitro*, images were processed after cropping individual neutrophils in a XYZ mode. Each MP (green) was analyzed for localization within neutrophil's cytoplasm (red), counted and classified in either intracellular or surface groups. MP internalization in 100 neutrophils per condition was quantified and repeated at least 3 times using neutrophils and MPs from different blood donors.

To quantitatively assess localization of fluorescent MPs *in vivo* and *ex vivo* (i.e. in arthritic joints), images were also processed after cropping individual neutrophils in a XYZ mode. As MPs internalized *in vivo* do not display punctate signals (possibly due to membrane metabolism in recipient), intracellular fluorescent signals were quantified slightly differently. The fluorescence corresponding to red MPs injected in mice, inside the

boundary given by the GR1 membrane labeling, was quantified using velocity software as mean of fluorescence intensity (MFI). The specific MP internalization was calculated after subtraction of MFI of neutrophils from mice injected with control diluent (PBS).

3.7.6. Lipidomics

(see also SI Appendix, Supplementary methods)

MPs (350 000 MP/ μ l or total 2.1×10^8 MPs in 600 μ l, equivalent to 23 μ g) were incubated in Tyrode's buffer (without BSA) at 37°C for 30min and 6h in presence or absence of human recombinant sPLA₂-IIA (0.1 μ g/ml and 1 μ g/ml). EGTA (20mM) was added to stop the reaction. Two hundred microliters of the reaction mixture was mixed with 800 μ l of chloroform/methanol (2/1) then, 15 μ l of internal deuterated standard mixture was added. Lysophospholipid, fatty acid and eicosanoid analysis by combined liquid chromatography/tandem mass spectrometry was performed as described (74,75).

3.7.7. Statistics

Number of replicates (*n*) indicates the number of replicated experiments using cells from *n* different blood donors. Statistical analyses (*t* test, ANOVA, Mann-Whitney) were performed using Prism software (version 5).

3.8. Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (EB), The Arthritis Society (EB), Canadian Arthritis Network (EB, LHB, ACD), Fonds de Recherche du Québec en Santé (EB, LHB), Fonds de Recherche des maladies Rhumatismales de l'Université Laval (ACD), Canadian Blood Services (PP, BL). CNRS (GL), the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: programme reference #ANR-11-LABX-0028-01 (GL) and National Institutes of Health (NIH) grant reference #R37 HL36235 (MHG). We are grateful to Richard Janvier from the microscopy core facility at Laval University. We warmly thank Dr. Maria Fernandes for giving us access to her confocal microscopy equipment. We thank Dr. Caroline Gilbert and Audrey Hubert for giving us access to the Zetasizer Nano S.

3.9. References

- 1 Buzas, E. I., Gyorgy, B., Nagy, G., Falus, A. & Gay, S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 356-364, doi:10.1038/nrrheum.2014.19 (2014).
- 2 Gyorgy, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2667-2688, doi:10.1007/s00018-011-0689-3 (2011).
- 3 Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature reviews. Immunology* **14**, 195-208, doi:10.1038/nri3622 (2014).
- 4 Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology* **9**, 581-593, doi:10.1038/nri2567 (2009).
- 5 Italiano, J. E., Jr., Mairuhu, A. T. & Flaumenhaft, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Current opinion in hematology* **17**, 578-584, doi:10.1097/MOH.0b013e32833e77ee (2010).
- 6 Akbiyik, F. *et al.* Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* **104**, 1361-1368, doi:10.1182/blood-2004-03-0926 (2004).
- 7 Spinelli, S. L. *et al.* Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**, 591-598, doi:10.1161/ATVBAHA.109.197343 (2010).
- 8 Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379-391, doi:10.1016/j.cell.2005.06.015 (2005).
- 9 Roth, G. J., Hickey, M. J., Chung, D. W. & Hickstein, D. D. Circulating human blood platelets retain appreciable amounts of poly (A)+ RNA. *Biochemical and biophysical research communications* **160**, 705-710 (1989).
- 10 Landry, P. *et al.* Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature structural & molecular biology* **16**, 961-966, doi:10.1038/nsmb.1651 (2009).
- 11 Boudreau, L. H. *et al.* Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* **124**, 2173-2183, doi:10.1182/blood-2014-05-573543 (2014).

- 12 Falati, S. *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1585-1598, doi:10.1084/jem.20021868 (2003).
- 13 Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **12**, 614-627, doi:10.1111/jth.12554 (2014).
- 14 Dasgupta, S. K. *et al.* Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* **113**, 1332-1339, doi:10.1182/blood-2008-07-167148 (2009).
- 15 Dasgupta, S. K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R. E. & Thiagarajan, P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* **125**, 1664-1672, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.068833 (2012).
- 16 Laffont, B. *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* **122**, 253-261, doi:10.1182/blood-2013-03-492801 (2013).
- 17 Boilard, E., Blanco, P. & Nigrovic, P. A. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature reviews. Rheumatology* **8**, 534-542, doi:10.1038/nrrheum.2012.118 (2012).
- 18 Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M. & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759-2767, doi:10.1182/blood-2013-11-462432 (2014).
- 19 Herter, J. M., Rossaint, J. & Zarbock, A. Platelets in inflammation and immunity. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, doi:10.1111/jth.12730 (2014).
- 20 Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* **11**, 264-274, doi:nri2956 [pii] 10.1038/nri2956 (2011).
- 21 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:327/5965/580 [pii] 10.1126/science.1181928 (2010).

- 22 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 23 Scapini, P. & Cassatella, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* **124**, 710-719, doi:10.1182/blood-2014-03-453217 (2014).
- 24 Wright, H. L., Moots, R. J. & Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 593-601, doi:10.1038/nrrheum.2014.80 (2014).
- 25 Ottonello, L. *et al.* Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 1249-1260 (2002).
- 26 Chen, M. *et al.* Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 837-842, doi:jem.20052371 [pii] 10.1084/jem.20052371 (2006).
- 27 Lambeau, G. & Gelb, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry* **77**, 495-520, doi:10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007 (2008).
- 28 Boilard, E. *et al.* A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol Med* **2**, 172-187, doi:10.1002/emmm.201000072 (2010).
- 29 Fourcade, O. *et al.* Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**, 919-927 (1995).
- 30 Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. A. & FitzGerald, G. A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2118-2127, doi:10.1172/JCI119385 (1997).
- 31 Cloutier, N. *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* **5**, 235-249, doi:10.1002/emmm.201201846 (2013).

- 32 Gyorgy, B. *et al.* Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PloS one* **7**, e49726, doi:10.1371/journal.pone.0049726 (2012).
- 33 Rousseau, M. *et al.* Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. *PloS one* **10**, e0116812, doi:10.1371/journal.pone.0116812 (2015).
- 34 Lotvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* **3**, 26913, doi:10.3402/jev.v3.26913 (2014).
- 35 Boilard, E., Bourgoin, S. G., Bernatchez, C., Poubelle, P. E. & Surette, M. E. Interaction of low molecular weight group IIA phospholipase A2 with apoptotic human T cells: role of heparan sulfate proteoglycans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1068-1080, doi:10.1096/fj.02-0938com 17/9/1068 [pii] (2003).
- 36 Boilard, E., Bourgoin, S. G., Bernatchez, C. & Surette, M. E. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. *Blood* **102**, 2901-2909, doi:10.1182/blood-2002-12-3702 2002-12-3702 [pii] (2003).
- 37 Birts, C. N., Barton, C. H. & Wilton, D. C. A catalytically independent physiological function for human acute phase protein group IIA phospholipase A2: cellular uptake facilitates cell debris removal. *The Journal of biological chemistry* **283**, 5034-5045, doi:M708844200 [pii] 10.1074/jbc.M708844200 (2008).
- 38 FitzGerald, G. A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature reviews. Drug discovery* **2**, 879-890, doi:10.1038/nrd1225 nrd1225 [pii] (2003).
- 39 Wang, D. & Dubois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 181-193, doi:nrc2809 [pii] 10.1038/nrc2809 (2010).

- 40 O'Donnell, V. B., Murphy, R. C. & Watson, S. P. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circulation research* **114**, 1185-1203, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301597 (2014).
- 41 Ruf, A. *et al.* Characterization of the thromboxane synthase pathway product 12-oxoheptadeca-5(Z)-8(E)-10(E)-trienoic acid as a thromboxane A2 receptor antagonist with minimal intrinsic activity. *British journal of haematology* **101**, 59-65 (1998).
- 42 Tager, A. M. & Luster, A. D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **69**, 123-134 (2003).
- 43 Yoshimoto, T. & Takahashi, Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators* **68-69**, 245-262 (2002).
- 44 Grass, D. S. *et al.* Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2233-2241, doi:10.1172/JCI118664 (1996).
- 45 Wingender, E., Schoeps, T. & Donitz, J. TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic acids research* **41**, D165-170, doi:10.1093/nar/gks1123 (2013).
- 46 Zhou, C. *et al.* The nuclear orphan receptor COUP-TFI is required for differentiation of subplate neurons and guidance of thalamocortical axons. *Neuron* **24**, 847-859 (1999).
- 47 Risitano, A., Beaulieu, L. M., Vitseva, O. & Freedman, J. E. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* **119**, 6288-6295, doi:10.1182/blood-2011-12-396440 (2012).
- 48 Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. & Hannon, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**, 584-589, doi:10.1038/nature09092 (2010).
- 49 Rosenberger, C. M. *et al.* miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *J Immunol* **189**, 5965-5975, doi:10.4049/jimmunol.1201437 (2012).

- 50 Laine, V. J., Rajamaki, A., Grass, D. S. & Nevalainen, T. J. Neutrophil response of transgenic mice expressing human group IIA phospholipase A2 in bacterial infections. *Scandinavian journal of immunology* **52**, 362-368 (2000).
- 51 Record, M., Carayon, K., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta* **1841**, 108-120, doi:10.1016/j.bbaliip.2013.10.004 (2014).
- 52 Tang, K. *et al.* Microparticles mediate enzyme transfer from platelets to mast cells: a new pathway for lipoxin A4 biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications* **400**, 432-436, doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.095 (2010).
- 53 Boilard, E. *et al.* Platelets participate in synovitis via Cox-1-dependent synthesis of prostacyclin independently of microparticle generation. *J Immunol* **186**, 4361-4366, doi:10.4049/jimmunol.1002857 (2011).
- 54 Chen, M. *et al.* Predominance of cyclooxygenase 1 over cyclooxygenase 2 in the generation of proinflammatory prostaglandins in autoantibody-driven K/BxN serum-transfer arthritis. *Arthritis and rheumatism* **58**, 1354-1365, doi:10.1002/art.23453 (2008).
- 55 Kim, N. D., Chou, R. C., Seung, E., Tager, A. M. & Luster, A. D. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 829-835, doi:10.1084/jem.20052349 (2006).
- 56 Mathis, S. P., Jala, V. R., Lee, D. M. & Haribabu, B. Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *J Immunol* **185**, 3049-3056, doi:10.4049/jimmunol.1001031 (2010).
- 57 Coffey, M. J. *et al.* Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circulation research* **94**, 1598-1605, doi:10.1161/01.RES.0000132281.78948.65 (2004).
- 58 Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E. & Cavalca, V. Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-

- lipoxygenase product. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **964**, 26-40, doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.015 (2014).
- 59 Tang, D. G. *et al.* The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Experimental cell research* **207**, 361-375, doi:10.1006/excr.1993.1203 (1993).
- 60 Gonzalez-Nunez, D., Claria, J., Rivera, F. & Poch, E. Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension. *Hypertension* **37**, 334-338 (2001).
- 61 Connolly, J. M. & Rose, D. P. Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer letters* **132**, 107-112 (1998).
- 62 Hoyer, F. F., Albrecht, L., Nickenig, G. & Muller, C. Selective inhibition of leukotriene receptor BLT-2 reduces vascular oxidative stress and improves endothelial function in ApoE^{-/-} mice. *Molecular and cellular biochemistry* **359**, 25-31, doi:10.1007/s11010-011-0995-y (2012).
- 63 Sanchez-Galan, E. *et al.* Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. *Cardiovascular research* **81**, 216-225, doi:10.1093/cvr/cvn277 (2009).
- 64 Cho, N. K., Joo, Y. C., Wei, J. D., Park, J. I. & Kim, J. H. BLT2 is a pro-tumorigenic mediator during cancer progression and a therapeutic target for anti-cancer drug development. *American journal of cancer research* **3**, 347-355 (2013).
- 65 Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T. & Shimizu, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *The Journal of experimental medicine* **192**, 421-432 (2000).
- 66 Lundeen, K. A., Sun, B., Karlsson, L. & Fourie, A. M. Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J Immunol* **177**, 3439-3447 (2006).
- 67 Qiu, H. *et al.* Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6913-6918, doi:10.1073/pnas.0602208103 (2006).
- 68 Hussain, H. *et al.* Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis. *The American journal of physiology* **266**, C243-253 (1994).
- 69 Liagre, B., Vergne, P., Rigaud, M. & Beneytout, J. L. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS letters* **414**, 159-164 (1997).
- 70 Giera, M. *et al.* Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochimica et biophysica acta* **1821**, 1415-1424, doi:10.1016/j.bbaliip.2012.07.011 (2012).
- 71 Johnson, E. N., Brass, L. F. & Funk, C. D. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3100-3105 (1998).
- 72 Flamand, N., Lefebvre, J., Surette, M. E., Picard, S. & Borgeat, P. Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **281**, 129-136, doi:M506513200 [pii] 10.1074/jbc.M506513200 (2006).
- 73 Singer, A. G. *et al.* Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* **277**, 48535-48549, doi:10.1074/jbc.M205855200 (2002).
- 74 Bollinger, J. G., Ii, H., Sadilek, M. & Gelb, M. H. Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of lipid research* **51**, 440-447, doi:10.1194/jlr.D000885 (2010).
- 75 Bollinger, J. G. *et al.* Improved sensitivity mass spectrometric detection of eicosanoids by charge reversal derivatization. *Analytical chemistry* **82**, 6790-6796, doi:10.1021/ac100720p (2010).

3.10. Figures

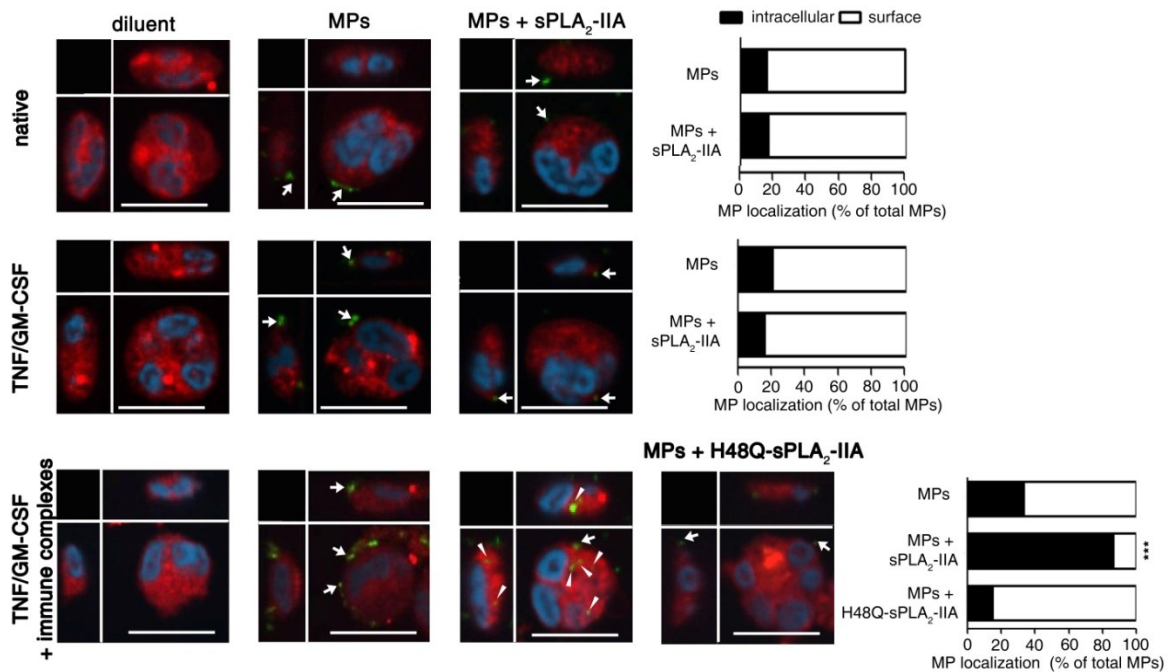


Figure 3-1. Internalization of platelet MPs in neutrophils.

(Left panels) Representative confocal microscopy analyses of neutrophil cytoplasm (red) and nuclei (cyan) upon incubation with MPs (green) for 2h at 37°C in absence or presence of recombinant human sPLA₂-IIA, or its catalytically inactive mutant H48Q-sPLA₂-IIA. Neutrophils were native (without stimulation), primed (TNF/GM-CSF) or activated (TNF/GM-CSF and immune complexes) before MP incubation. MPs are found at the surface (white arrows) and are internalized (arrow heads). Scale bars represent 10µm.

(Right panels) Graph bars indicate the relative localization (surface vs intracellular) of the MPs, depending on the neutrophil and MP treatments. Data were obtained from 100 neutrophils per condition repeated at least 3 times with cells from different donors ($n>3$, Mann-Whitney test compared to MPs condition *** $p<0.0001$).

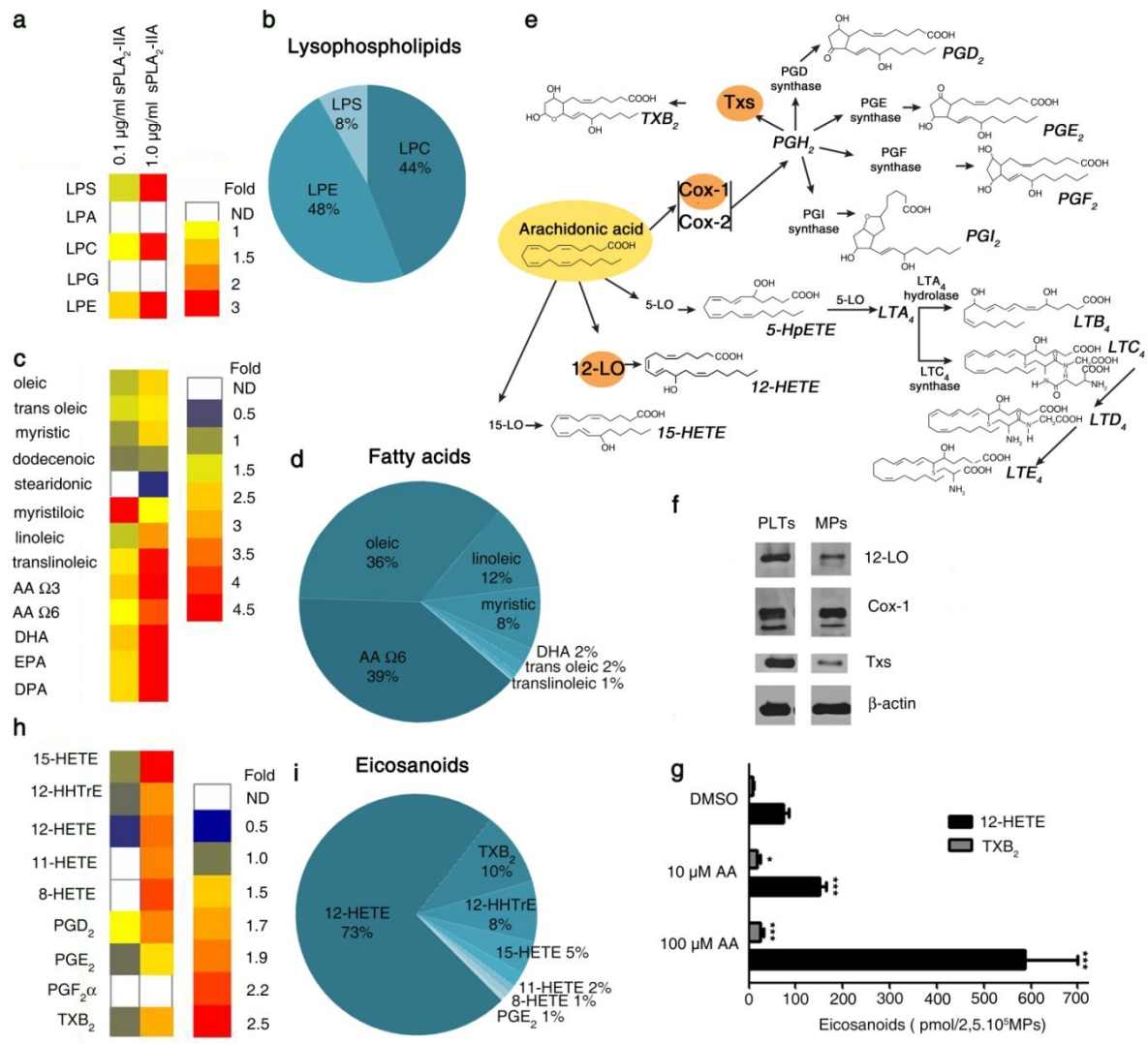


Figure 3-2. sPLA₂-IIA promotes the release of multiple lipid mediators from MPs.

Mass spectrometric measurements of the indicated lysophospholipids (**a, b**), fatty acids (**c, d**) and eicosanoids (**h, i**) released and metabolized after sPLA₂-IIA activity on MPs. (**a,c,h**) The heat maps present a fold change of each molecule produced in response to a 6h incubation of MPs with the indicated concentration of human recombinant sPLA₂-IIA. The concentrations of lysophospholipids (**a**), fatty acids (**c**) or eicosanoids (**h**) measured in MPs incubated with diluent (no sPLA₂-IIA) were used to determine the relative fold changes. Lysophosphatidylserine (LPS), lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidylcholine (LPC), lysophosphatidylglycerol (LPG) and lysophosphatidylethanolamine (LPE), arachidonic acid (AA) ; docosahexaenoic acid (DHA) ; eicosapentaenoic acid (EPA) ; docosapentaenoic acid (DPA), thromboxane B₂ (TXB₂), 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (12-HHTrE), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (11-HETE), 8-hydroxyeicosatetraenoic acid (8-HETE), prostaglandine E₂ (PGE₂), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12HETE). (**b,d,i**) Pie chart representation of lysophospholipids, fatty acids and eicosanoids present in MPs treated with sPLA₂-IIA for 6h. The data presented are based on the mass composition (molar expression) of each lysophospholipids, fatty acids and eicosanoids detected by mass spectrometry (*n*=2 different blood donors). (**e**) Graphic representation of the metabolism of AA into eicosanoids. (**f**) Immunoblot of 12-lipoxygenase (12-LO), thromboxane synthase (TxS), cyclooxygenase 1 (COX-1) and β-actin in platelets (PLTs) and MPs. Data are representative of 3 independent experiments performed using platelets and MPs from 3 blood donors. (**g**) Indicated amounts of exogenous AA were added to platelet MPs and 12-HETE and TxB₂ were measured using HPLC (*n*=3, *t* test, comparing to respective DMSO control * *p*<0.05, *** *p*<0.0001).

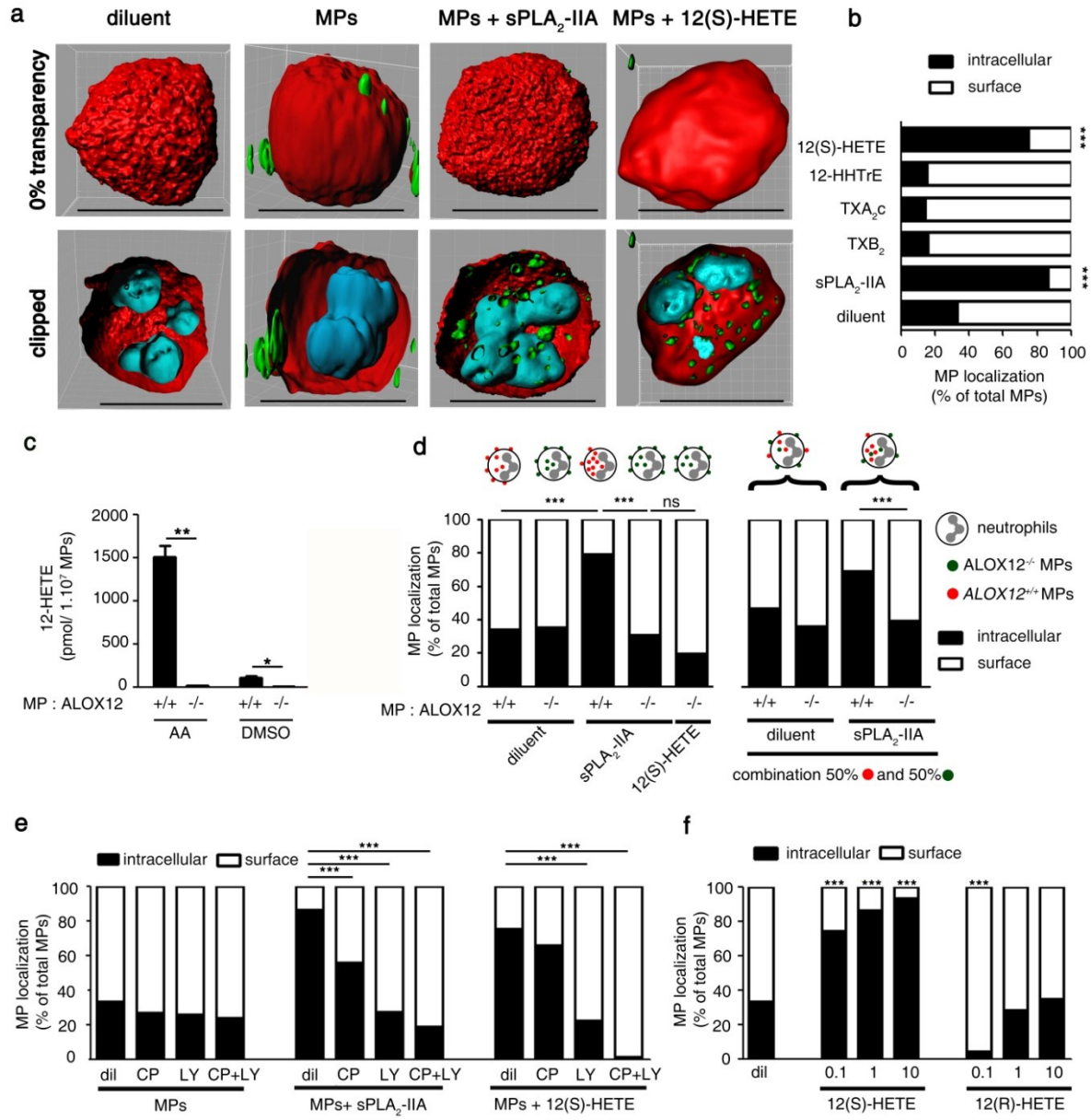


Figure 3-3. The 12-LO product, 12(S)-HETE, is the trigger of MP internalization.

(a) Representative confocal microscopy 3D reconstruction of activated neutrophils (cytoplasm is red and nuclei is cyan), interacting with platelet MPs (green) in presence of human recombinant sPLA₂-IIA or 12(S)-HETE (1μM). **(b, d-f)** Bar graphs indicate the relative localization (surface versus intracellular) of the MPs incubated with activated neutrophils during 2h at 37°C, in the indicated conditions. Data were obtained by confocal microscopy from 100 neutrophils per condition ($n=3$ for each panel, Mann-Whitney test comparing to diluents or indicated conditions, *** $p<0.0001$). Thromboxane A₂ (TXA_{2c}), 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (12-HHTrE). **(c)** MPs were generated using platelets from wild type (red ALOX12^{+/+} MPs) mice and mice lacking the expression of 12-LO (green ALOX12^{-/-} MPs). Detection of 12-HETE was determined by HPLC after 30min at 37°C of incubation of AA (100μM) or diluent DMSO with ALOX12^{+/+} MPs or ALOX12^{-/-} MPs ($n=3$, Mann-Whitney test on indicated conditions * $p<0.05$ ** $p<0.001$). **(d)** Activated neutrophils were incubated 2h at 37°C in presence of combinations of ALOX12^{+/+} MPs and ALOX12^{-/-} MPs (50:50) or single groups of MPs (ALOX12^{+/+} MPs or ALOX12^{-/-} MPs) and treated with/out recombinant sPLA₂-IIA or with/out 12(S)-HETE (1μM). **(e)** Activated neutrophils were treated 10min, at 37°C with the antagonists of BLT₁ (CP105696 : CP, 10nM) and BLT₂ (LY255283 : LY, 100nM) receptor alone and in combination before the addition of platelet MPs and sPLA₂-IIA. **(f)** Activated neutrophils incubated with MPs were treated with exogenous 12(S)-HETE (0.1 to 10μM) or 12(R)-HETE (0.1 to 10μM).

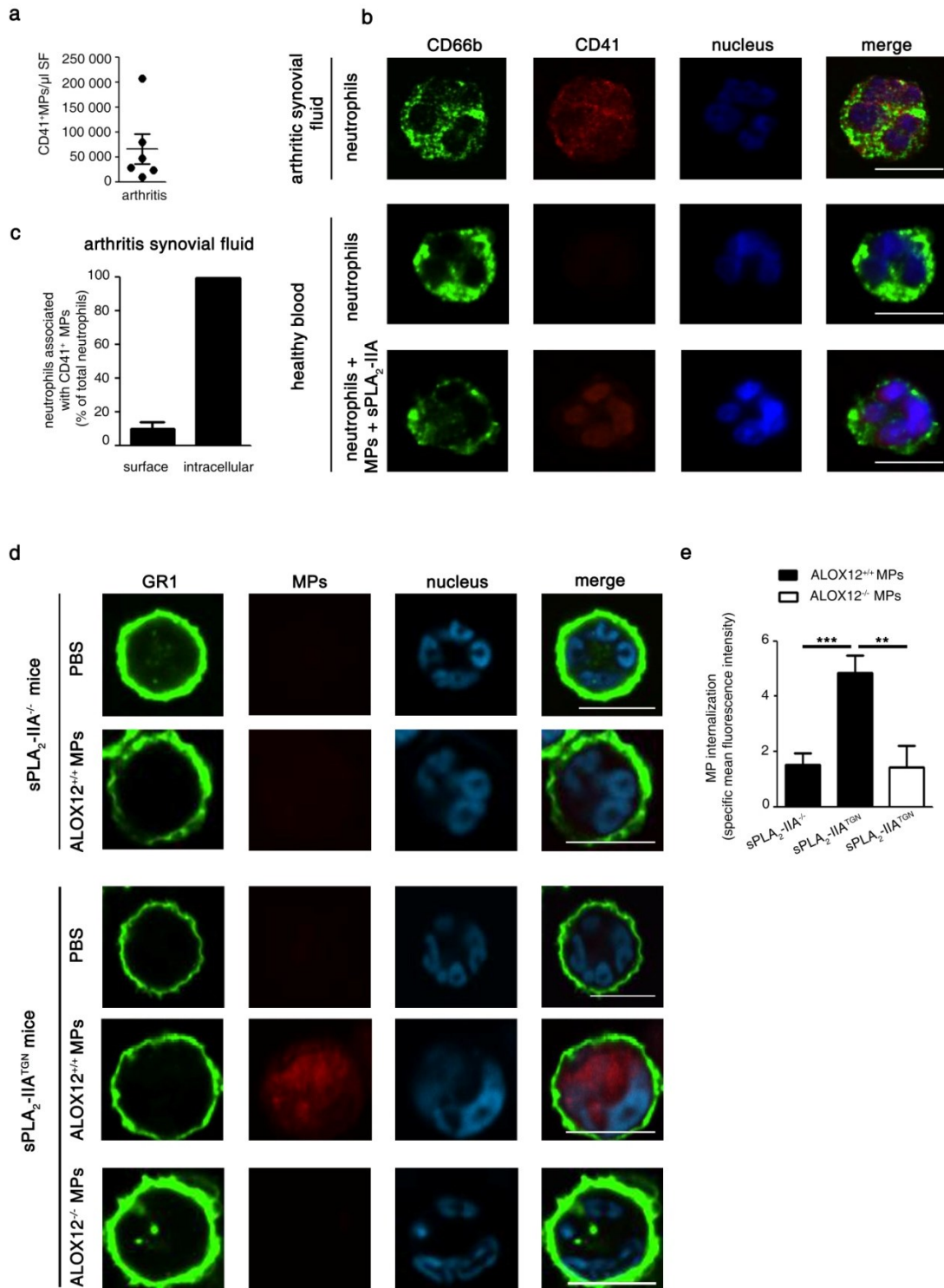
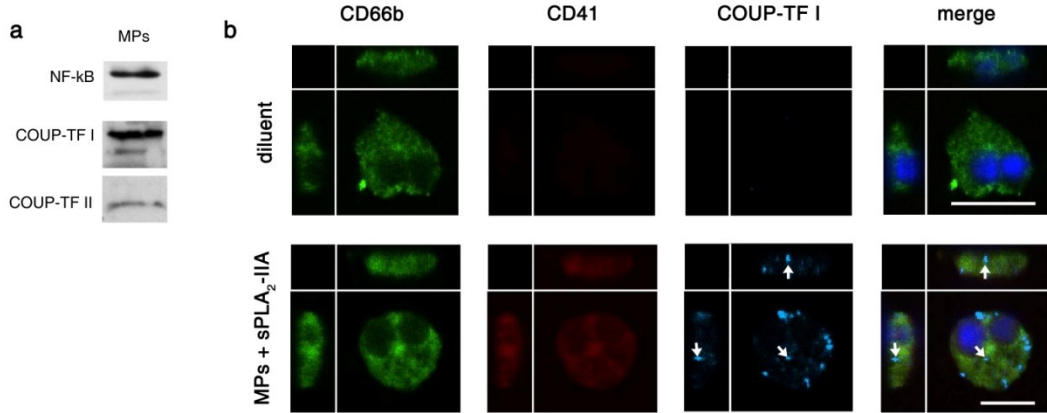


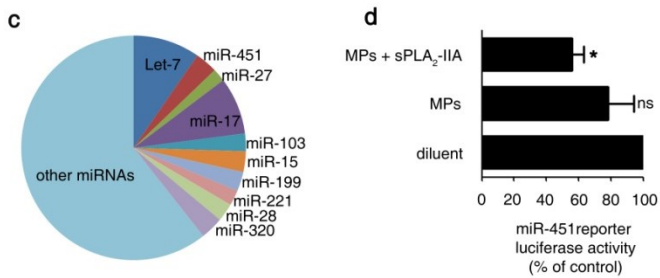
Figure 3-4. The concerted action of sPLA₂-IIA and 12-LO in MP internalization.

(a) Platelet MPs in synovial fluid of RA patients were quantified by high sensitivity flow cytometry using an antibody directed against CD41 epitope ($n=6$ RA patients). **(b)** Representative confocal microscopy picture of purified CD66b⁺ neutrophils (detected using a FITC-conjugated anti-CD66b antibody) isolated from the synovial fluid (SF) of patients suffering of RA ($n=6$). For comparison, circulating neutrophils isolated from healthy blood donors ($n=6$) were activated and incubated with MPs and sPLA₂-IIA. Platelet MPs were detected using a phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD41 antibody (red) and nucleus was labeled with Hoechst (blue). Scale bars represent 10 μ m. **(c)** Bar graph indicates the relative localization (surface vs intracellular) of the CD41⁺ MPs, in neutrophils isolated from arthritic patients. The quantification was performed on 100 neutrophils per donor using confocal microscopy ($n=6$). **(d,e)** Equivalent arthritis scores (clinical index of 10 at day 5, see experimental design for details) were induced in sPLA₂-IIA deficient (sPLA₂-IIA^{-/-}) and sufficient (sPLA₂-IIA^{TGN}) mice to assess MP internalization by neutrophils in arthritic ankles. Fluorescently labeled MPs (ALOX12^{+/+} or ALOX12^{-/-}) were intravenously injected in the mouse tail vein and the neutrophils retrieved in the arthritic joints were collected for confocal microscopy analyses. **(d)** Representative confocal microscopy images of neutrophils identified using FITC-conjugated anti-GR1 and the presence of neutrophil distinctive polymorphonuclei (cyan). The presence of MPs was determined as red fluorescence. **(e)** Mean fluorescence intensity (MFI) of the red fluorescence signals present intracellularly was measured on 100 neutrophils per mice. Bar graph presents specific MFI (MFI of MP injected mice minus PBS injected mice) ($n=6$, Mann-Whitney test, ** $p<0.005$ and *** $p<0.0001$).

transcription factors



nucleic acids



organelles

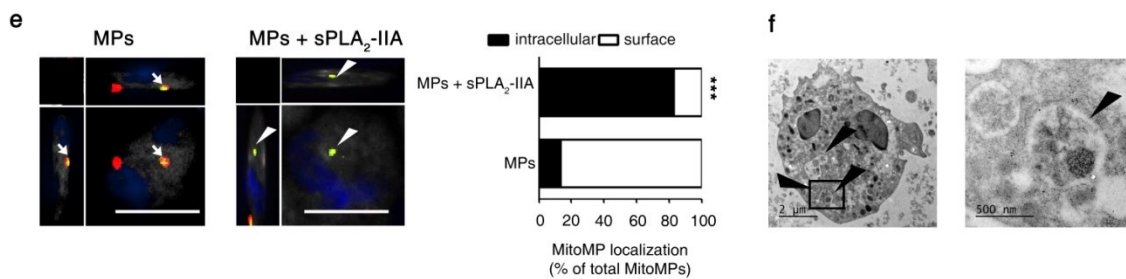


Figure 3-5. Platelet MPs can transfer complexes cargo such as transcription factors, nucleic acids and organelles inside neutrophils.

(a) Representative immunoblots of COUP-TF I, COUP-TF II and NF- κ B in platelet MPs ($n=3$). (b) Representative confocal microscopy images of activated neutrophils after incubations with/out MPs and sPLA₂-IIA. COUP-TF I (cyan) is pointed by white arrows in CD66b (green) neutrophils with blue nuclei. Platelet MPs were detected using an anti-CD41 antibody (red). Scale bars represent 10 μ m. (c) Pie chart representation of the top 10 families of miRNA found in MPs based on intensity expression in miRNA arrays ($n=3$). (d) Luciferase reporter assay of miR-451 activity was measured in the PLB-985 differentiated neutrophil like cell-line incubated 48h at 37°C in presence of MPs (treated with or without human recombinant sPLA₂-IIA) ($n=3$, t test, * $p<0.05$ compared to diluent). (e) Representative confocal microscopy images of activated neutrophils incubated with MPs in presence or absence of sPLA₂-IIA. These MPs were labelled with CMFDA (green) and MitoTracker (red). Green and red MPs are MitoMPs and pointed with white arrows on neutrophils surface or with white arrow heads inside neutrophils. Scale bars represent 10 μ m. Graph bars indicate the relative localization (surface vs intracellular) of the MitoMPs, depending on the neutrophil and MitoMP treatments. Data were obtained from 100 neutrophils per condition repeated at least 3 times with cells from different donors ($n=3$, Mann-Whitney test compared to MPs condition *** $p<0.0001$). (f) Representative TEM of activated neutrophils incubated with MPs in presence of sPLA₂-IIA. Each arrow head point MitoMPs internalized in neutrophils.

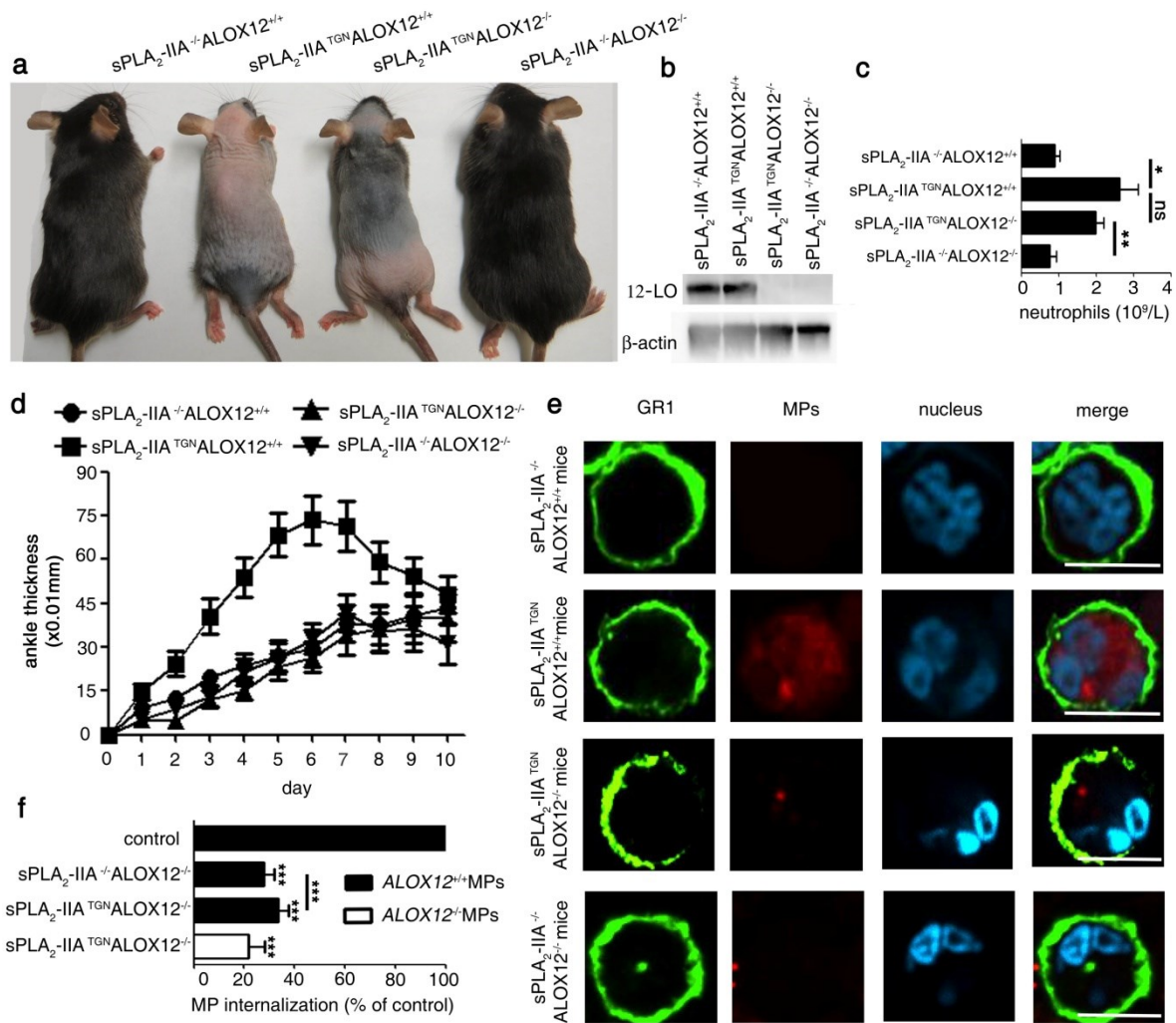


Figure 3-6. sPLA₂-IIA and 12-LO concerted activities promote inflammation.

(a) Phenotypical observations of the indicated groups of mice. sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} and sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} exhibit alopecia and hyperkeratosis with features reminiscent of psoriasis (without leukocyte infiltration), absent in control animals. (b) Immunoblot of 12-LO and β -actin on platelet lysates from indicated group of mice. Data are representative of 3 independent experiments. (c) Bar graph indicates neutrophil number in blood in indicated mice ($n=6$ mice/group). (d) Arthritis severity was evaluated after administration of K/BxN serum in sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{+/+}; sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+}; sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-}; sPLA₂-IIA^{-/-}ALOX12^{-/-} mice ($n=15$ mice for each group). (e) Equivalent arthritis scores (see experimental design in method section) were induced in the 4 groups of mice to assess MP internalization by neutrophils from arthritic ankles. Fluorescent MPs (ALOX12^{+/+}) were intravenously injected in the mouse tail vein and neutrophils were visualized by confocal microscopy analyses. Representative confocal microscopy images of neutrophils identified using FITC-conjugated anti-GR1 and the presence of neutrophil distinctive polymorphonuclei (cyan). The presence of MPs was determined by red fluorescence. (f) ALOX12^{-/-} and ALOX12^{+/+} MPs were intravenously injected in sPLA₂^{-/-}ALOX12^{-/-} and sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice afflicted with equivalent arthritis scores. The presence of MPs was determined by red fluorescence. Red fluorescent MPs present intracellularly were quantified as specific mean of fluorescence intensity (MFI) in 100 neutrophils per mice (repeated with 6 mice) after subtracting the background fluorescence displayed by neutrophils from mice injected with diluent. Graph bar presents the percentage of specific MP internalization in each condition relative to specific MP internalization by neutrophils from sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} arthritic mice (used as positive control mice) ($n=6$, Mann-Whitney test, comparing to sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+}, *** $p<0.0001$).

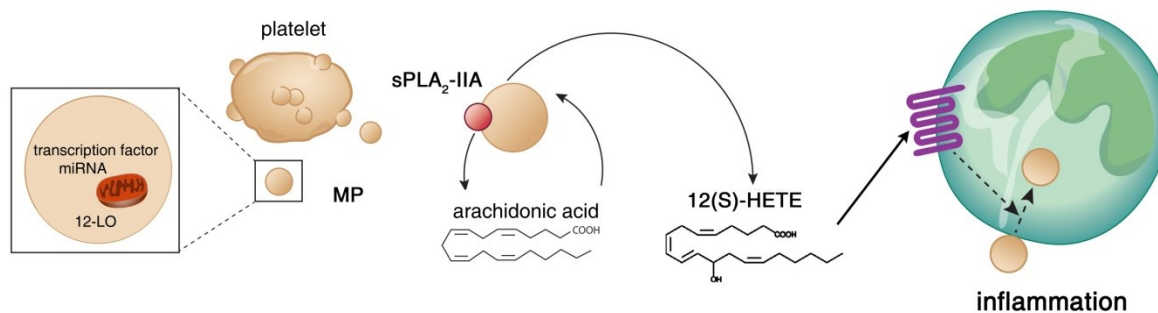


Figure 3-7. Model

Schematic representation of the mechanism underlying platelet MP internalization in activated neutrophils. Platelet MPs express 12-LO, and upon membrane hydrolysis by sPLA₂-IIA, generate 12(S)-HETE. 12(S)-HETE triggers MP internalization in neutrophils through BLT₂ activation, thereby promoting platelet MP cargo transfer to neutrophils. The concerted action of sPLA₂-IIA and 12-LO enhances inflammation.

3.11. SI appendix

3.11.1. Supplementary methods

3.11.1.1. Characterization of MPs

3.11.1.1.1. Stimulation of platelets

Platelets ($100 \cdot 10^6$ platelets/ml) were stimulated with collagen (0.5 μ g/ml, 18h) or (in Fig. S3b) with thrombin (Sigma, 0.1U/ml 1h), or XL-CRP (generous gift from Richard W. Farndale, UK, 400ng/ml, 2h).

3.11.1.1.2. Density gradient

Density gradient was used to further characterize MPs taking in consideration the heterogeneity of MPs. Iodixanol (Optiprep, Sigma, stock 60%) was diluted in PBS 1X (filtered on 0.2 μ m) to obtain 5%, 10%, 20%, 40% of iodixanol. The discontinuous gradient was formed with a 3ml layer of the 40% solution overlaid with 3ml of the 20%, 10% and 5% solutions, successively. Concentrated MPs (100 μ l in Tyrode buffer corresponding to an average of $8 \cdot 10^8$ MPs or 87 μ g of protein) were put on top of the gradient. Gradients were centrifuged at 100 000g, 18h, 4°C. Each fraction (1ml) was carefully collected. Fraction 1 corresponds to the bottom of the gradient, and fraction 12 corresponds to the top of the gradient. Each fraction was divided for size analysis (10%) and EV content analysis (90%). For EV content analysis, proteins were precipitated with 15% (final concentration) of trichloroacetic acid (TCA, Sigma) during 30 min on ice. Precipitates were centrifuged at 13000g, 15 min at 4°C, then washed twice with acetone (Fisher). Pellets were resuspended in 100 μ l PBS1X. Twenty microliters were solubilized in Laemmli's sample buffer and analyzed by SDS-PAGE.

3.11.1.1.3. Size analysis

Concentrated MPs and fractions (3 to 7) of gradients were diluted at 1/1000 in PBS1X (filtered with 0.2 μ m) and analyzed on Zetasizer Nano S (Malvern instrument, Ltd., Malvern, UK).

3.11.1.2. MP localization

To visualize organelles, neutrophils were pre-labeled with 1 μ M of ER-trackerTM (Invitrogen), Golgi-IDTM (1X, Enzo Life Science), 100nM MitoTracker[®] Deep (Invitrogen) and 100nM of LysoTracker[®] Red(Invitrogen) during 30min 37°C, prior to incubation with compatible fluorescently labeled MPs.

3.11.1.3. Genotyping

PCR was used to confirm the genotype of sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice. Tail tips were collected and processed with direct PCR lysis Reagent (Viagen biotech inc) and proteinase K (1/50 Wisent). Primers (Integrated DNA technologies IDT) used for specific amplification of ALOX12 were (5' CCT CAG TGC AGG AAC CTG TG 3'), (5' CTG CTA CCC ATG GCT ATC CAG 3') and (5' TAC TTC CAT TTG TCA CGT CCT G 3'). The PCR cycling condition consisted of an initial step at 95°C for 15min, followed by a three-step amplification at 94°C for 45s and 58°C for 60s and 72°C for 60s (35 cycles) then 72°C for 10min on PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ research).

3.11.1.4. Generation of recombinant sPLA₂-IIA

Human recombinant sPLA₂-IIA and human recombinant mutant H48Q sPLA₂-IIA were produced as described(1).

3.11.1.5. Analysis of TXB₂ and 12-HETE by HPLC

MPs (2.5.10⁵) were incubated with 10 μ M or 100 μ M of AA (Cayman) for 15min at 37°C. Reaction was stopped by denaturation with 10 volumes of a cold stop solution [(methanol/acetonitrile, Fisher) (1/1, v/v)] containing 12.5ng of each of prostaglandin B₂ (PGB₂) and 19-OH-PGB₂ as internal standards. The denatured samples were centrifuged (600g, 20min at 4°C) and the supernatants were then evaporated to 1ml using a stream of nitrogen (in a water bath at 22°C) and analyzed by HPLC as described previously (2). Quantification of the various metabolites was achieved by using the internal standards. For calibration, 12-HETE and 12-HHTrE were used.

3.11.1.6. Reagents for confocal microscopy

Cells were mounted with Prolong gold anti-fade reagent (Invitrogen). Cells were analyzed by spinning disc confocal microscope using 63x objective (Quorum Spinning Disc Wave FX, Quorum technologies, Guelph, Canada) and Velocity software version 5.4.0. For 3D imaging, cells were analyzed using an IX81-ZDC confocal microscope equipped with a FV1000 scanning head and an Olympus 60X OSC NA 1.4 objective lens. Acquisition and exportation of z-stacks were performed with Fluoview imaging software ASW3.1a (Olympus America Inc). Maximum intensity projections and volume rendering were calculated using Surpass module in Bitplane Imaris 7.5.1.

3.11.1.7. Electronic microscopy

For scanning electronic microscopy, samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% PFA for at least 24h, then the samples were fixed with osmium tetroxide (1% in sodium cacodylate buffer), dehydrated, air-dried and finally metalized with gold palladium. Cells were observed with a JEOL 6360LV scanning electron microscope (Tokyo, Japan).

For transmission electronic microscopy, samples were fixed in PFA 2% 24h before deshydrated, embedded in LR white. Samples were stained with uranyl acetate 3%, 5minutes and analyzed on a FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope at 80kV.

3.11.1.8. Immunoblotting analyses

Platelet and MPs were lysed in lysis buffer (20mM Tris HCl pH7.8, 1.25mM EDTA, 0.5% triton, 0.5% NP-40, 120mM NaCl, 2mM PMSF, Sigma). Protein content of lysates was determined using the Pierce BCA protein assay kit (Fisher). Proteins (10 μ g or 91.10⁶MP \pm 20.10⁶) were separated in SDS-PAGE (10%), transferred to a PVDF membrane and the candidate proteins were detected using antibodies against 12-LO (Santa Cruz, used at 1 μ g/ml), TxS (Cayman, used at 1 μ g/ml), Cox-1 (Cayman, used at 5 μ g/ml), β -actin (Sigma, clone AC-15 used at 1/15000) both forms of COUP-TF (COUP-TF I/NR2F1 and COUP-TF II/ NR2F2) (R&D Systems, used at 1 μ g/ μ l), NF κ B (Cell signaling, used at 1/1000), TSG101 (abcam, clone 4A10 used at 0.1mg/ml) and VDAC (Cell signaling used at

11.6µg/ml). The membranes were incubated with peroxidase-conjugated antibodies recognizing primary antibodies (Jackson ImmunoResearch, used at 0.08µg/ml).

3.11.1.9. Detection of transcription factors

Lysates of platelets and MPs (15µg equivalent to $1.36 \cdot 10^8$ MP \pm $30 \cdot 10^6$) were analyzed using TF Activation Profiling Plate arrays II (Signosis) according to manufacturers protocol and quantification was determined using relative luminescence unit (RLU) for each condition.

3.11.1.10. DNA precipitation assay

COUP TF-I binding assay was performed as described elsewhere (3). Briefly, streptavidin magnetic beads (30µl, Promega) were washed twice with 1X B&W buffer (5 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) then 100 ng of a biotinylated binding sequence of COUP-TF I (5' Biotin TGC TCT TGC TAG GTC ATA GGT CAT CTT GCT 3') and (5' AGC AAG ATG ACC TAT GAC CTA GCA AGA GCA 3') (IDT) were bound to the beads in 1X B&W buffer for 1 h at RT. Beads were washed twice in 1X B&W buffer, once with 1X binding buffer (5% glycerol, 20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.15% Triton X-100, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) and blocked with 1% BSA for 1 h at 4°C. Bound biotinylated oligonucleotides were then mixed with 10 µg of poly (dI-dC) and 50µg of MP lysates (equivalent to $4.5 \cdot 10^8$ MPs) in a total volume of 500µL of 1X binding buffer containing protease inhibitors, and incubated for 2 h at 4°C with rotation. Samples were washed five times in 1X binding buffer. Bound proteins were solubilized in Laemmli 1X buffer and analyzed by Western blot.

3.11.1.11. RNA detection in platelet MPs and neutrophils

Affymetrix arrays were performed at the CHU de Québec Research Center Core Facility (Quebec, Canada). Briefly, 100ng of total RNA and 130ng of miRNA ($(8.75 \cdot 10^8$ MPs \pm $2.6 \cdot 10^4$) were labeled using flashTag Biotin HSR (Genisphere, Hatfield, PA) and hybridized on Gene Chip 2.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA) and Gene Chip miRNA 3.0 Array, respectively. Arrays were scanned on a GeneChip scanner 3000 G7 (Affymetrix), and CEL files were analyzed with the Partek software version 6.6 (Partek Incorporated).

Microarrays from total RNA were subjected to background subtraction by using robust multi-array analysis (RMA) and logarithmic transformation. A threshold was applied to normalized data and excluded mRNAs and miRNAs with intensity values lower than the median of data set expression matrix, which is 5 and 1.3 for RNAs and miRNAs respectively. RNA profiles of neutrophils incubated with sPLA₂-IIA versus neutrophils incubated with a combination of MPs and sPLA₂-IIA were compared by ANOVA in Partek software. RNA changes between neutrophils and neutrophils incubated with a combination of MPs and sPLA₂-IIA were selected based on this criterion: 1.5 fold change in expression in either direction was required.

3.11.1.12. Quantitative RT PCR

Quantitative PCR was used to confirm the RNA modulations identified in Arrays. RNA from 15x10⁶ neutrophils in indicated conditions was isolated using Trizol (Invitrogen) and following the procedure of the manufacturer. RNA (1µg) was subjected to reverse transcription using MLV-RT (Invitrogen). Primers and probes (IDT) were used for specific amplification of CCL5 (5' TGC CCA CAT CAA GGA GTA TT 3', forward; 5' GTA CTC CCG AAC CCA TTT CT 3', reverse), PPBP (5' TGA TAC CAC CCC TTC CTG TA 3', forward; 5' GCG GAG TTC AGC ATA CAA GT 3', reverse), NCF-1 (5' ACA CCT TCA TCC GTC ACA TC 3', forward; 5' TAG ACC ACC TTC TCC GAC AG 3', reverse), GAPDH (5' CAA CGG ATT TGG TCG TAT TGG 3', forward; 5' GCA ACA ATA TCC ACT TTA CCA GAG TTA A 3' reverse). The qPCR cycling condition consisted of an initial step at 50°C for 2min, 95°C for 10min followed by a three-step amplification at 95°C for 15s and 56°C or 58°C for 30s and 72°C for 30s (40 cycles) on Rotor Gene-3000 (QIAGEN). Relative expression of interest gene was performed by using the following formula: $2^{-\Delta Ct}$, ΔCt corresponds to Ct mean (interest gene) - Ct mean (GAPDH).

3.11.1.13. MicroRNA functional assays

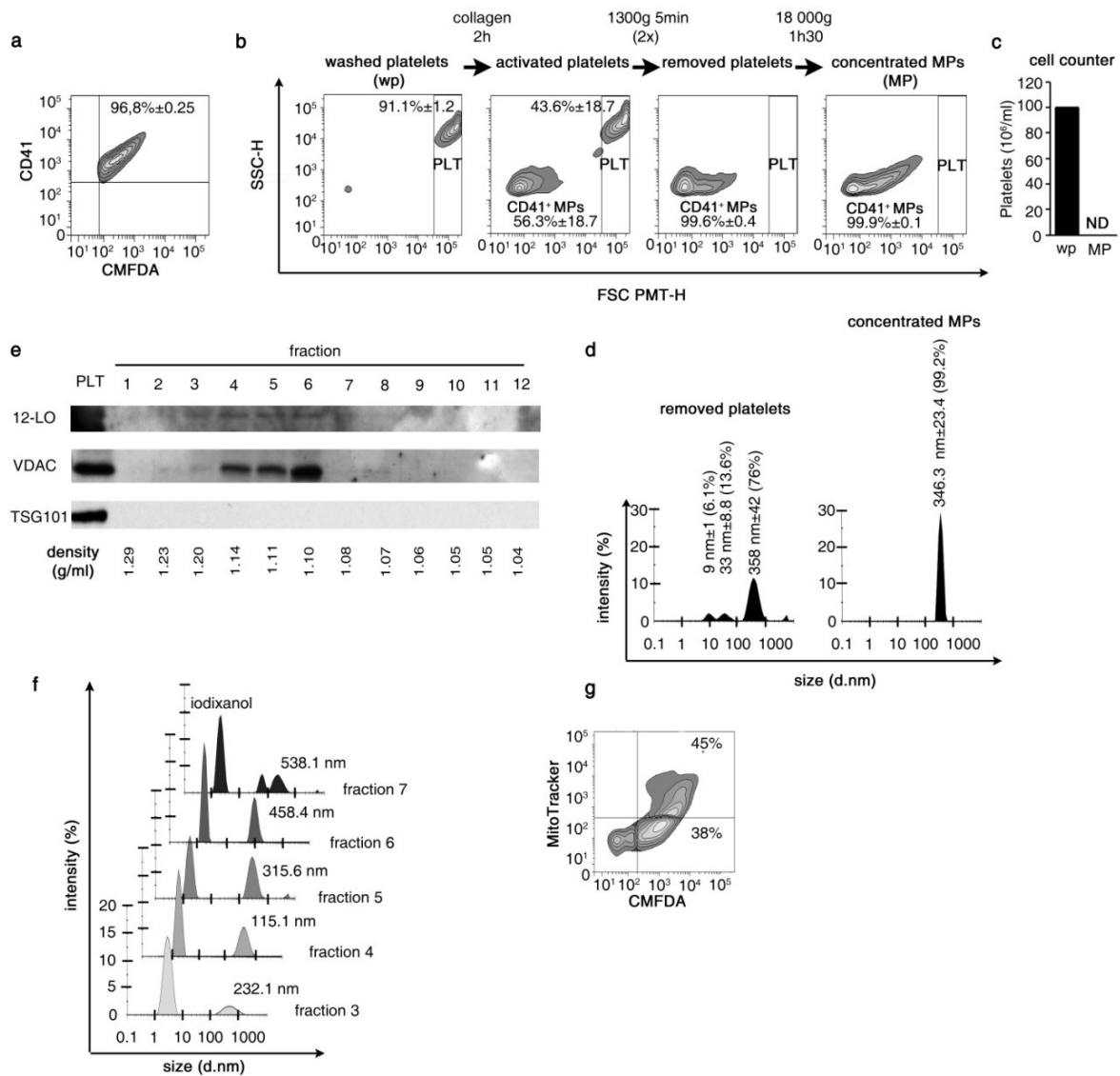
The miR-451 reporter constructs were created by inserting a sequence complementary to hsa-miR-451 in the Xho1/Not1 sites of psiCHECK-2 vector (Promega), downstream of the Renilla luciferase reporter gene. All the constructs were verified by DNA sequencing. db-AMPC differentiated PLB-985 were transfected by nucleofector system from Amaxa (2x10⁶

cells in suspension in 100µl of nucleofection buffer containing 1.5µg of vector (miR-451-psiCHECK-2), electrical setting U-002. Transfected cells were immediately transferred to pre-warmed complete medium containing 0.3mM dbcAMP. 24h after transfection, cells were incubated with MPs or a combination of MPs and sPLA₂-IIA during 24h at 37°C. db-AMPc differentiated PLB-985 (5.10⁶cells/ml) were incubated with MPs (350 000MP/µl) or a combination of MPs and sPLA₂-IIA (0.1µg/µl) during 24h at 37°C. (70 MPs/PLB). Renilla luciferase and Firefly luciferase activities were measured with Dual Glo luciferase reagents (Promega) using a luminometer (Dynex Technologies).

References

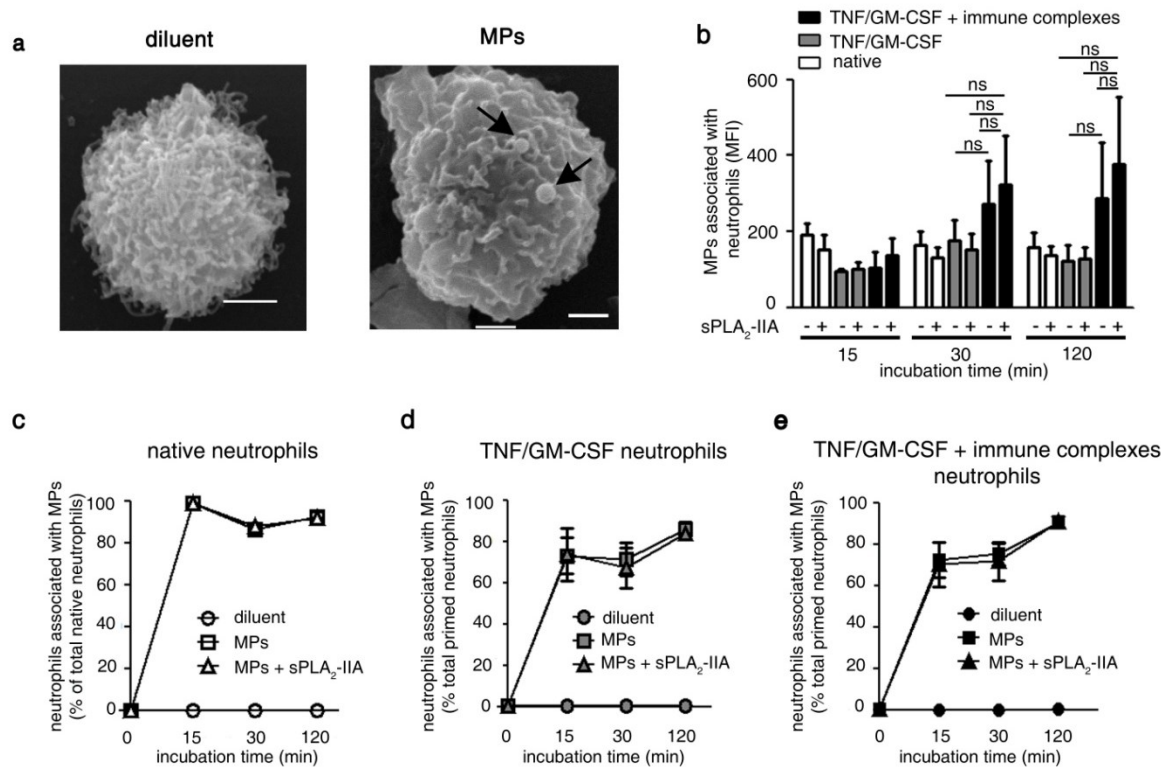
1. Singer AG, *et al.* (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* 277(50):48535-48549.
2. Flamand N, Lefebvre J, Surette ME, Picard S, & Borgeat P (2006) Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 281(1):129-136.
3. Mendoza-Villarreal RE, *et al.* (2014) The INSL3 gene is a direct target for the orphan nuclear receptor, COUP-TFII, in Leydig cells. *Journal of molecular endocrinology* 53(1):43-55.

3.12.2. Supplementary figures



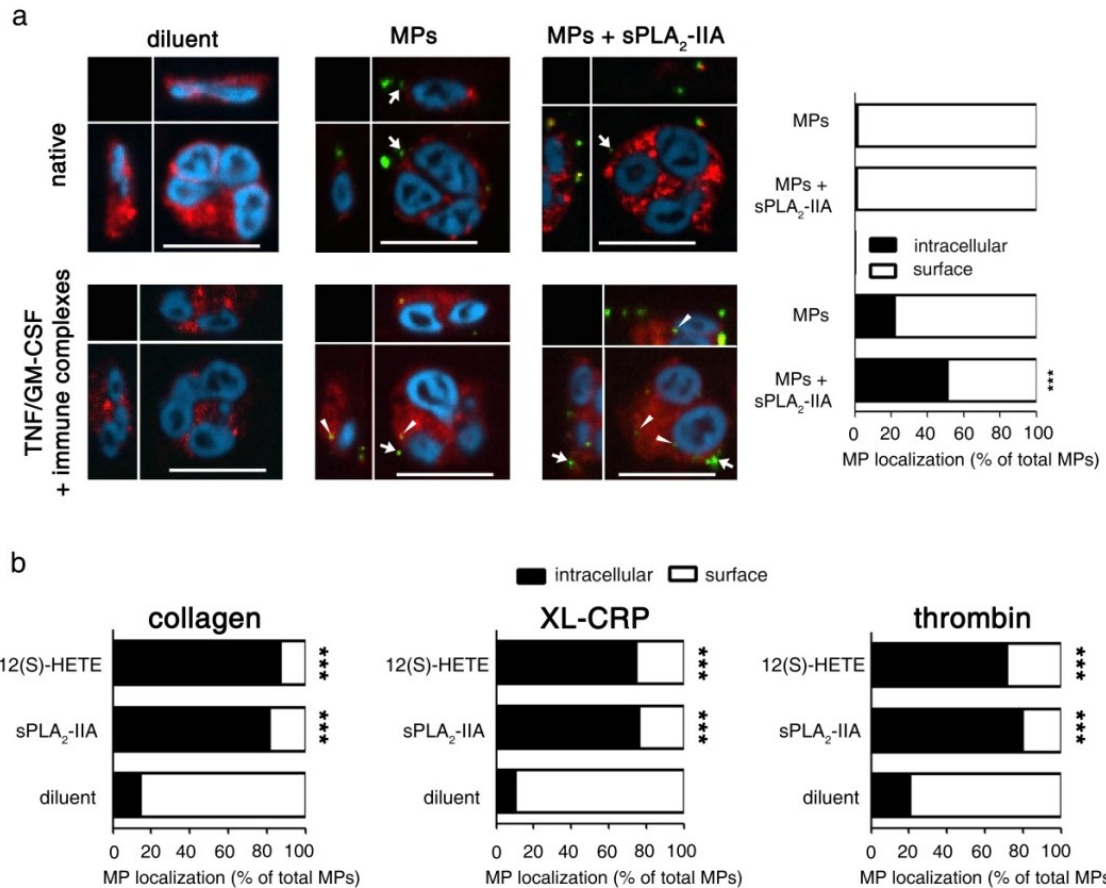
Supplementary Figure 3-1. Platelet MP characterization

(a) Flow cytometry analyses of platelet MPs. Platelets were labelled with CMFDA and stimulated with collagen. MPs were concentrated and labelled using fluorochrome conjugated anti-CD41 antibody ($n=5$). The great majority of platelet MPs express CD41 and the fluorescent dye. **(b)** Flow cytometry analysis of platelet microparticle generation process ($n=3$). **(c)** Washed platelet (wp) and remnant platelets in MP concentrates (MP) were counted by cell counter ($n=3$). **(d)** Platelet microparticle size analysis using Zetasizer nano S ($n=3$, d.nm corresponds to diameter size in nanometer). **(e)** Density gradient analysis of concentrated platelet microparticles analyzed by western blot. Representative blot of 3 different donors. Each density fraction was measured and reported down of each fraction. **(f)** Size analysis detected by Zetasizer nano S of vesicles in fractions 3 to 7 of the gradient. **(g)** Flow cytometry analyses of platelet MitoMPs. Platelets were labeled with CMFDA and mitochondria dye (Mitotracker) and stimulated with collagen. MPs were concentrated and analysed by flow cytometer ($n=5$). Half of CMFDA platelet MPs express Mitotracker dye.



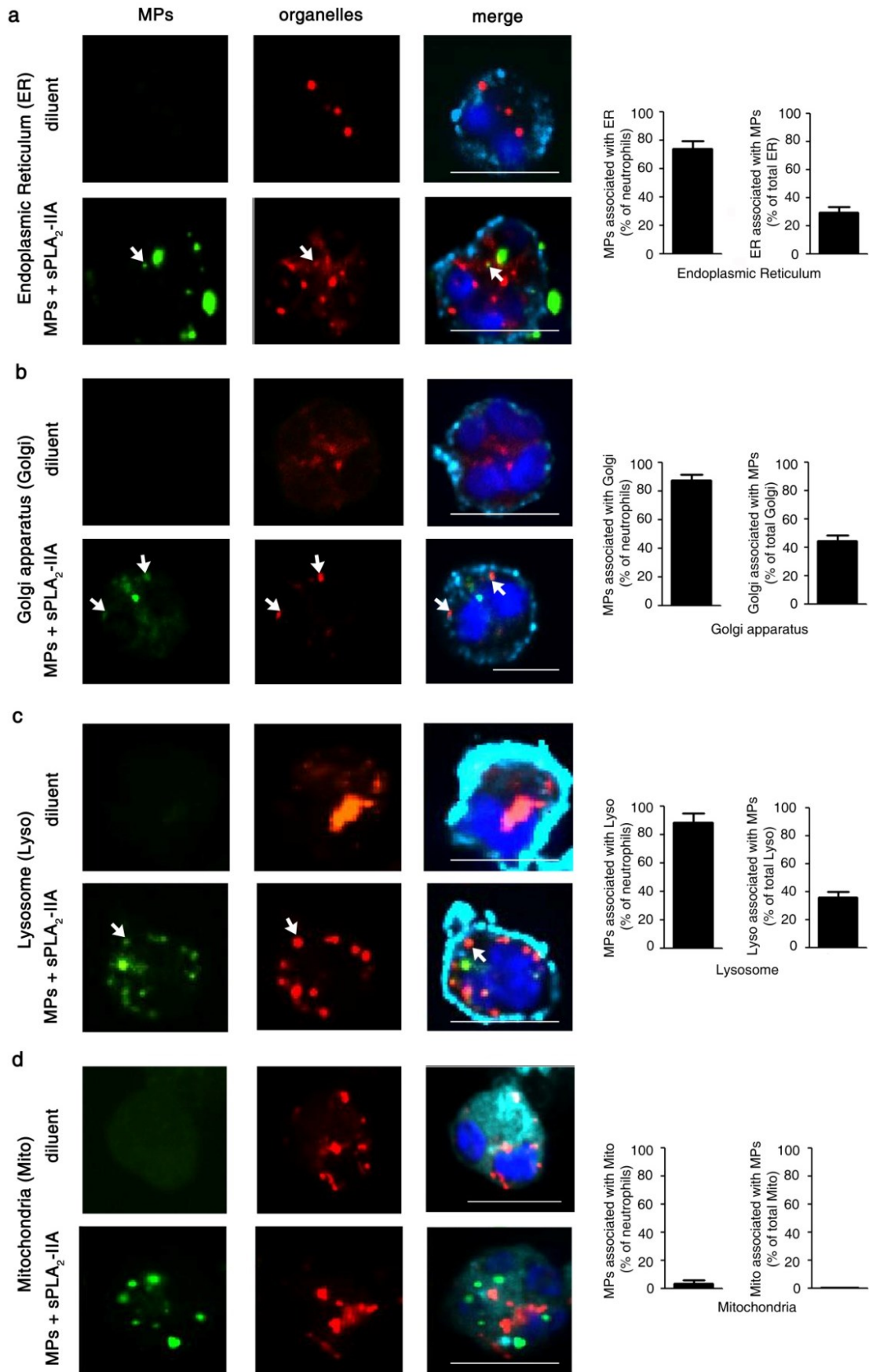
Supplementary Figure 3-2. Platelet MPs bind neutrophils.

(a) Representative scanning electronic microscopy (SEM) visualization of an activated neutrophil (TNF/GM-CSF and immune complexes) coated with or without platelet MPs (indicated by black arrows). Scale bar represents 1 μ m. **(b)** Mean of fluorescence intensity (MFI) indicating MP signals was determined by flow cytometry after coincubation of neutrophils with red fluorescent MPs during 15, 30 or 120 minutes ($n=5$, Mann-Whitney test, non significant difference between all data). **(c-e)** Flow cytometric kinetic assessment of the association of **(c)** native, **(d)** primed (TNF/GM-CSF) and **(e)** activated (TNF/GM-CSF + immune complexes) neutrophils with MPs in presence or absence of human recombinant sPLA₂-IIA ($n=5$ Mann-Whitney test, non significant difference between neutrophils incubated with MPs with/without sPLA₂-IIA for different incubation durations).



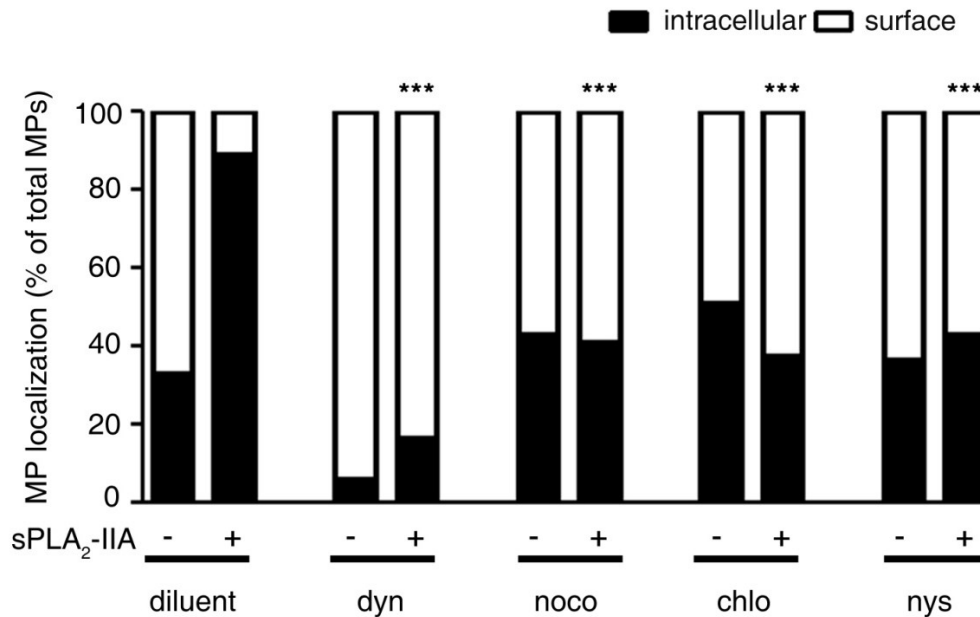
Supplementary Figure 3-3. Platelet MPs obtained by various agonists are internalized by neutrophils.

(a) (Left panels) Representative confocal microscopy images of native and activated neutrophils (cytoplasm and nuclei shown in red and cyan, respectively) in presence of MPs (green) and recombinant sPLA₂-IIA for 30min at 37°C. Surface (white arrows) and internalized MPs (white arrowheads) are presented. Scale bars represent 10µm. **(Right panels)** Graph bars present the localization of MPs after 30min of co-incubation with neutrophils, depending on the stimuli. Data were obtained from 100 neutrophils per condition (repeated 3 times) and are presented as percentage ($n>3$, Mann-Whitney test comparing to MP condition*** $p<0.0001$). **(b)** Graph bars present the localization of MPs after 2h of co-incubation with activated neutrophils. Platelet MPs were obtained after stimulation of platelet with collagen, or cross-linked collagen related peptide (XL-CRP), or thrombin. Data were obtained from 100 neutrophils per condition (repeated 3 times) and are presented as percentage ($n=3$, Mann-Whitney test comparing to MP condition*** $p<0.0001$).



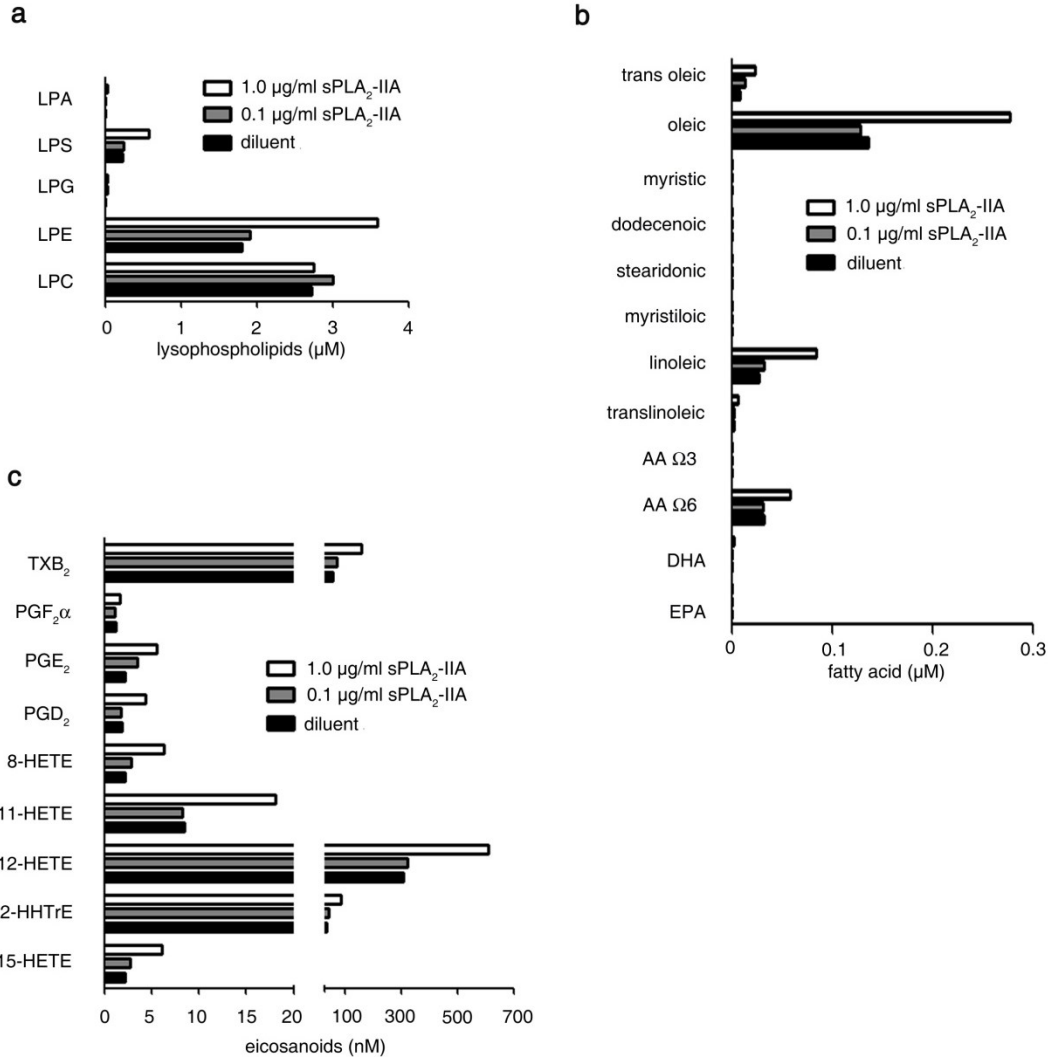
Supplementary Figure 3-4. Platelet MPs localize at the endomembrane system in neutrophils.

(Left panels) Representative confocal microscopy images of neutrophil endoplasmic reticulum (ER) **(a)**, Golgi apparatus (Golgi) **(b)**, lysosome (Lyso) **(c)**, mitochondria (Mito) **(d)** visualized using false color (red) and green platelet MPs. The neutrophil plasma membrane was identified using anti-CD66b (cyan) (for ER, Golgi and lysosome labeling). Cytoplasm was shown in cyan (for mitochondria labeling). Nuclei of neutrophils were labeled in blue. Co-localizations are indicated with white arrows ($n=3$). Scale bars represent 10 μ m. **(Right panels)** Graph bars show the percentage of neutrophils in which MPs localize with specific organelles and the percentage of organelles that co-localize with intracellular MPs. Data were obtained by confocal microscopy on 100 neutrophils per condition ($n=3$).



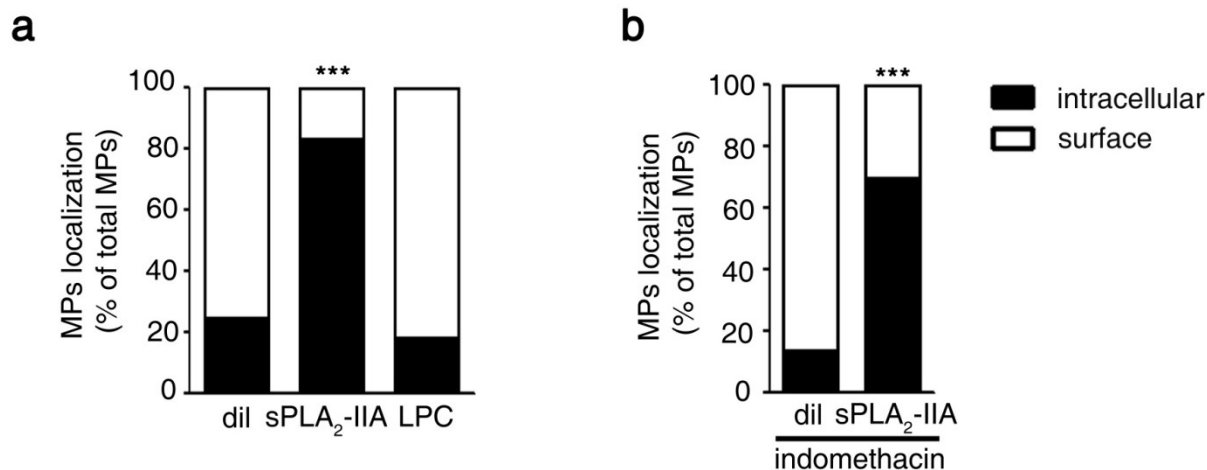
Supplementary Figure 3-5. MP internalization is dependant of endocytic pathway.

Graph bars indicate the relative localization (surface vs intracellular) of the MPs, depending on the neutrophil treatment. Activated neutrophils were treated with dynasore (dynamin inhibitor, dyn, 50 μ M), nocodazole (microtubule polymerization inhibitor, noco, 10 μ M), chlorpromazine (clathrine dependant endocytosis inhibitor, chlo, 40 μ M) and nystatin (clathrine independant endocytosis inhibitor, nys, 1 μ g/ml) before MP incubation. MPs were pre-incubated with/out sPLA₂-IIA. Data were obtained from 100 neutrophils per condition repeated at least 3 times with cells from different donors ($n=3$, Mann-Whitney test compared to diluent *** $p<0.0001$).



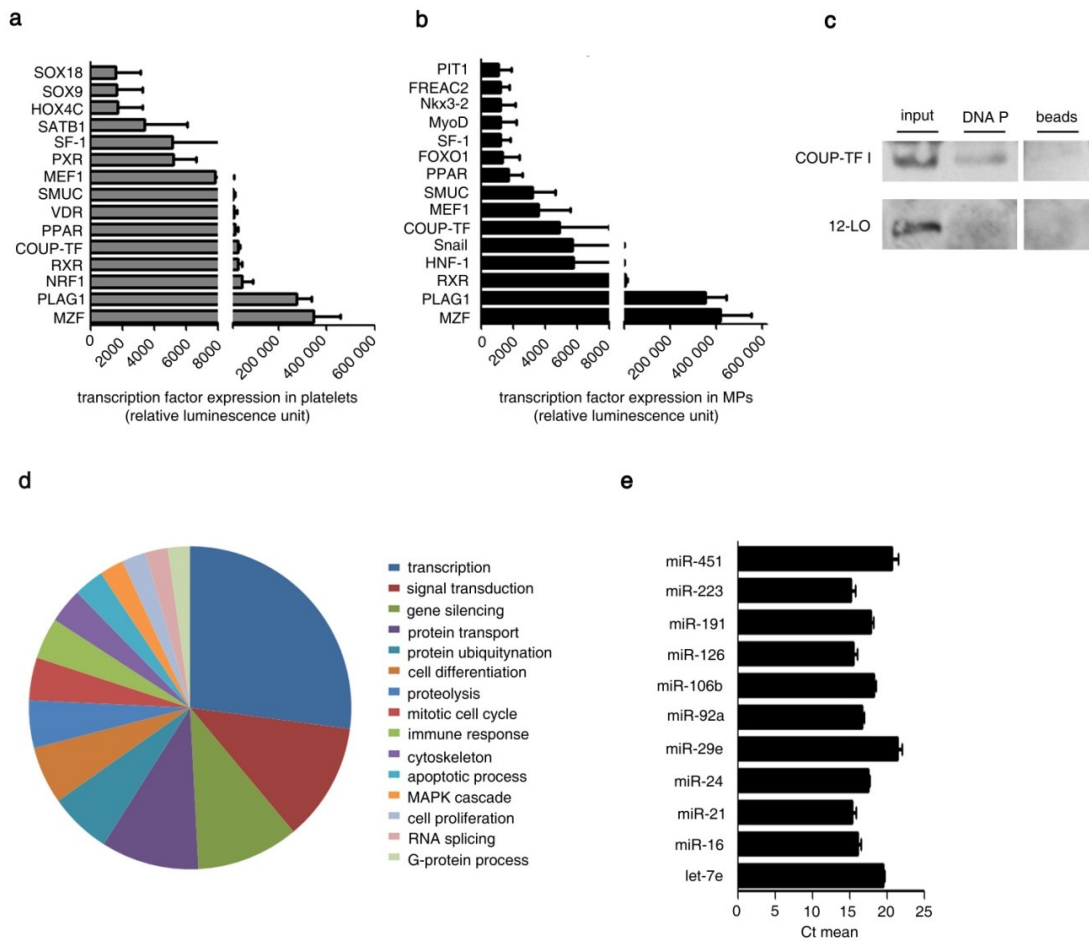
Supplementary Figure 3-6. Quantification of the lipids released by sPLA₂-IIA from MPs.

Platelet MPs were incubated with sPLA₂-IIA for 30 min at 37°C. **(a)** The indicated lysophospholipids were quantified by mass spectrometry (*n*=2). **(b)** Mass spectrometric measurements of the indicated fatty acids released by sPLA₂-IIA from platelet MPs (*n*=2). **(c)** Mass spectrometry measurements reveal that AA liberated by sPLA₂-IIA from MPs is metabolized in eicosanoids within 30min (*n*=2).



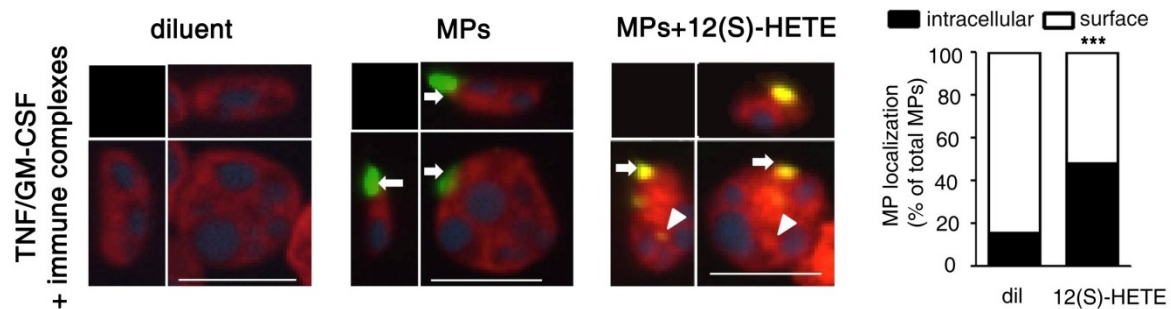
Supplementary Figure 3-7. MP internalization occurs independently of lysophospholipids and cyclooxygenase activity.

(a) LPC (10 μ M) was exogenously added to activated neutrophils in presence of MPs and the internalization was determined using confocal microscopy. Data were obtained from 100 neutrophils per condition ($n=3$, Mann Whitney test, compared to diluent, *** $p<0.0001$). **(b)** MPs were treated with cyclooxygenase inhibitor indomethacin (20 μ M, 10min, 22 $^{\circ}$ C) and added to activated neutrophils 2h at 37 $^{\circ}$ C. The quantification of internalization was assessed using confocal microscopy on 100 neutrophils per condition ($n=3$, Mann Whitney test comparing to diluent, *** $p<0.0001$).



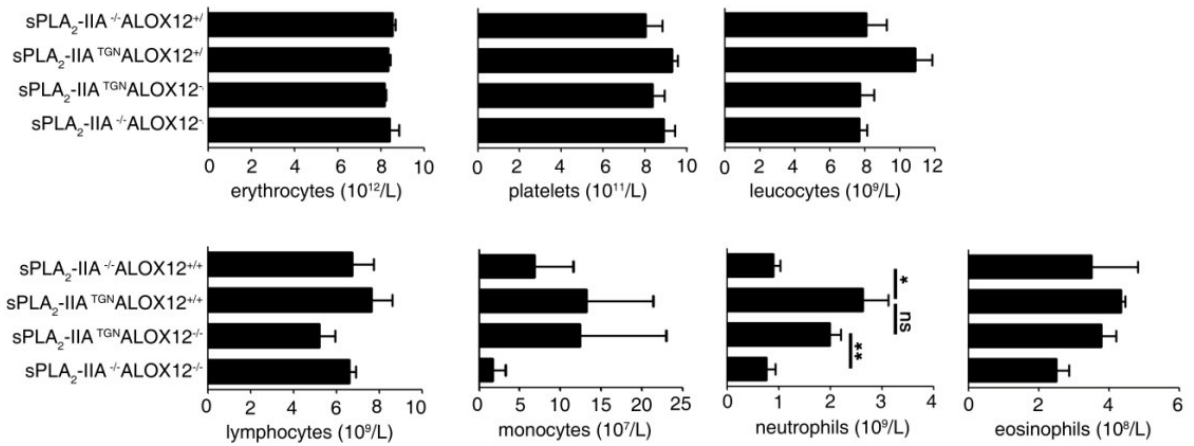
Supplementary Figure 3-8. Molecular content of MPs.

Graphs presenting the 15 most abundant transcription factors expressed in platelets **(a)** and platelet MPs **(b)** determined by arrays Transcription Factor Activation Profiling Plate ($n=2$). **(c)** Platelet MP lysate (input) was incubated with biotinylated DNA sequence recognized by COUP TF I and precipitated with streptavidin beads (DNA P) (see also supplementary methods). Presence of functional COUP-TF I was then revealed with an antibody directed against COUP-TF I. As negative controls, no COUP-TF I is detected if the DNA sequence was omitted (streptavidin beads alone), and 12-LO is not precipitated by COUP-TF I DNA sequence and streptavidin beads. Data are representative of 3 independent experiments. **(d)** Representation of the 15 major biological processes, according to an *in silico* analysis in which the mRNA expressed in MPs are involved ($n=3$). **(e)** Level of selected miRNAs present in MPs ($n=3$ blood donors) assessed by quantitative PCR. Cycle threshold (Ct).



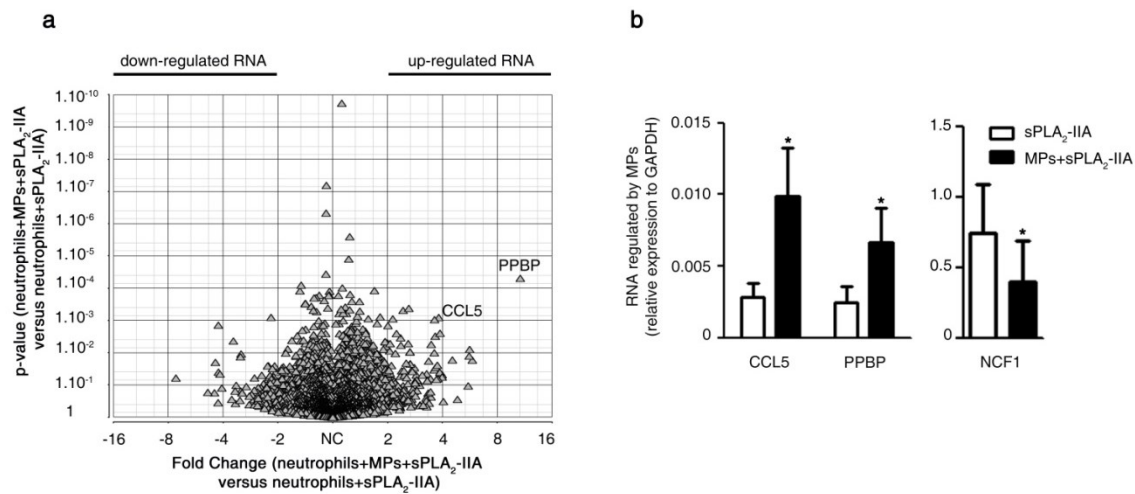
Supplementary Figure 3-9. Platelet MPs are internalized in presence of 12(S)-HETE in a neutrophilic cell line.

(Left panel) Representative confocal microscopy images of activated PLB-985 differentiated in neutrophil. PLB-985 cytoplasm and nuclei were shown in red and cyan, respectively. Cells were incubated with MPs (green) in presence or absence of 12(S)-HETE ($n=3$). Scale bars represent $10\mu\text{m}$. **(Right panel)** Graph bars show the localization of MPs after 2h of incubation at 37°C with PLB-985 differentiated in neutrophil, depending on the treatments. Data were obtained from 100 activated cells per condition ($n=3$, Mann-Whitney test comparing to diluent (dil) *** $p<0.0001$).



Supplementary Figure 3-10. Characterization of sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} mice

Cell blood analysis from indicated mice were determined using an automatic cell counter (Biovet Inc, Québec, Canada) ($n=5$ mice per groups, Mann-Whitney test $**p<0.05$ $***p<0.01$).



Supplementary Figure 3-11. Platelet MPs modulate the transcriptome of neutrophils.

(a) Volcano plot representing the variation of gene expression in activated neutrophils in presence of sPLA₂-IIA compared to activated neutrophils in presence of sPLA₂-IIA incubated with MPs ($n=3$). The graph illustrates p -values and fold changes of gene expression based on ANOVA analysis performed with Partek software. The most significant variations are annotated. **(b)** Quantitative PCR was performed on neutrophils in presence of sPLA₂-IIA and incubated in presence or absence of MPs ($n=6$ different blood donors, Wilcoxon test comparison between MPs and sPLA₂-IIA and sPLA₂-IIA alone, * $p<0.05$). Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), pro-platelet basic protein PPBP and neutrophil cytosolic factor 1 (NCF-1)

Datasets :

Dataset 1. Diversity of the transcription factors expressed by platelets and platelet MPs

Dataset 2. RNAs detected by microarray in platelet MPs

Dataset 3. microRNAs detected by microarray in platelet MPs

Dataset 4. Analysis of variance of microarray data from neutrophils incubated with sPLA₂-IIA in presence or absence of MPs.

They are available at this address :

<http://www.pnas.org/content/early/2015/06/23/1507905112/suppl/DCSupplemental>

Movies :

Movie 1. Platelet MPs are internalized by neutrophils in presence of sPLA₂-IIA. Confocal microscopy and 3D reconstruction of activated neutrophils (red cytoplasm and blue nuclei) incubated with MPs (green) and human recombinant sPLA₂-IIA.

Movie 2. Platelet MPs are internalized by neutrophils in presence of 12(S)-HETE. Confocal microscopy and 3D reconstruction of activated neutrophils (red cytoplasm and blue nuclei) incubated with MPs (green) and 12(S)-HETE.

They are available at this address :

<http://www.pnas.org/content/early/2015/06/23/1507905112/suppl/DCSupplemental>

Chapitre 4. Les microparticules de plaquettes en présence de sPLA₂-IIA modulent le transcriptome et des fonctions du neutrophile

4.1. Avant propos.

Le Dr. Éric Boilard a conçu et dirigé le projet de recherche. Il a participé à l'analyse des données.

Le Dr. Emmanuelle Rollet-Labelle et Tania Lévesque, ont participé à la réalisation des expériences.

J'ai conçu et réalisé les expériences, analysé, interprété les données et réalisé les analyses statistiques.

4.2. Résumé

La communication entre les cellules peut être médiée par les vésicules extracellulaires, dont les microparticules de plaquette (MPs). Récemment, notre équipe a montré que les MPs sont internalisées par les neutrophiles via la sPLA₂-IIA et transfèrent leur contenu riche en molécules bioactives aux neutrophiles. Notre étude montre ici que les MPs, en présence de sPLA₂-IIA, modulent le transcriptome et plusieurs voies métaboliques du neutrophile. Les MPs en présence de sPLA₂-IIA induisent une diminution de l'expression de la caspase 3 clivée et une augmentation des capacités de phagocytose et de synthèse de leucotriènes.

4.3. Introduction

Les communications intercellulaires peuvent être médiées par les microparticules (MPs), vésicules de diamètre inférieur à un micron.¹⁻³ Les MPs de plaquettes sont les MPs les plus abondantes en circulation dans le sang et sont souvent associées (liées et internalisées) à plusieurs types de cellules dont les neutrophiles et les cellules endothéliales (ECs).^{5,7-12} Elles sont internalisées par les ECs et les neutrophiles qui reçoivent le contenu riche en molécules bioactives des MPs.^{12,13} Le transcriptome des neutrophiles est modulé par les MPs¹² cependant les fonctions du neutrophile qui sont altérées sont inconnues. En utilisant un modèle où les MPs sont internalisées par les neutrophiles activés (en présence de sPLA₂-IIA), nos résultats révèlent que les MPs modulent plusieurs voies métaboliques des

neutrophiles et des fonctions des neutrophiles telles que la phagocytose et la synthèse de leucotriènes.

4.4. Résultats

4.4.1. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA influencent plusieurs voies métaboliques du neutrophile.

Les MPs en présence de sPLA₂-IIA peuvent transférer une cargaison élaborée de protéines, d'acides nucléiques et d'organelles aux neutrophiles activés.¹² L'internalisation des MPs est notamment régulée par l'activité de la sPLA₂-IIA.¹² Afin de déterminer si le transcriptome et les voies métaboliques du neutrophile sont modulés à la suite de l'internalisation des MPs, des puces à ADN ont été réalisées.¹² Le transcriptome des neutrophiles en présence de sPLA₂-IIA et celui des neutrophiles en présence de sPLA₂-IIA et de MPs ont été comparés.¹² Les analyses bio-informatiques des puces révèlent que la présence des MPs a un impact sur de nombreux processus biologiques des neutrophiles incubés avec de la sPLA₂-IIA (Figure 4-1a). Parmi ceux-ci, la transduction du signal, le métabolisme des ARNs, l'adhésion-migration, la chimiotaxie, l'endocytose et l'apoptose sont des processus affectés (Figure 4-1a,b).

4.4.2. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA induisent une diminution de l'expression de la caspase 3 clivée dans les neutrophiles

Afin de confirmer les résultats bio-informatiques suggérant des modifications dans les processus d'apoptose, l'expression de la caspase 3 clivée dans les neutrophiles activés en présence de MPs et de sPLA₂-IIA a été analysée. Les résultats de cytométrie en flux indiquent une diminution significative de l'expression de la caspase 3 clivée lorsque les neutrophiles activés sont en présence de MPs et de sPLA₂-IIA (Figure 4-2). Ces résultats suggèrent que les MPs pourraient induire une diminution des processus apoptotiques aux neutrophiles activés.

4.4.3. Les microparticules de plaquette en présence de sPLA₂-IIA induisent une augmentation de la fonction phagocytaire du neutrophile

La phagocytose est une des fonctions du neutrophile et pourrait être modulée en présence de MPs et sPLA₂-IIA. Les neutrophiles sont traités avec des MPs et sPLA₂-IIA puis incubés avec des billes de polystyrène. L'analyse en cytométrie en flux révèle que les

neutrophiles s'associent aux billes en polystyrène indépendamment de l'incubation préalable avec les MPs (Figure 4-3a). Cependant, l'analyse des clichés de microscopie confocale dévoile une augmentation significative de l'internalisation de billes par les neutrophiles activés ayant internalisés des MPs en comparaison aux neutrophiles contrôles (Figure 4-3b,c). Ainsi, les MPs en présence de sPLA₂-IIA améliorent les capacités phagocytaires des neutrophiles.

4.4.4. Les microparticules de plaquettes via la sPLA₂-IIA contribuent à la biosynthèse de lipides inflammatoires.

Les MPs sont un substrat de la sPLA₂-IIA¹² qui libère des acides gras dont l'acide arachidonique (AA).¹² Cet AA pourrait être métabolisé en leucotriènes via la 5-LO et la LTA₄ synthase des neutrophiles.¹⁴ L'analyse en HPLC des produits d'incubation des neutrophiles en présence de MPs et sPLA₂-IIA indique que le complexe composé de sPLA₂-IIA et de MPs de plaquette, induit une augmentation de leucotriènes produits par les neutrophiles activés (Figure 4-4). Ainsi, les MPs et la sPLA₂-IIA contribuent à la production de leucotriènes par les neutrophiles.

Les neutrophiles expriment la cPLA₂α qui est impliquée dans les processus de génération d'AA pour la synthèse de LTB₄ par les neutrophiles.¹⁵ Afin de discriminer le rôle de la sPLA₂-IIA de celui de la cPLA₂α dans la synthèse de leucotriènes, les neutrophiles ont été traités avec la pyrrophenone (PP), un inhibiteur de la cPLA₂α. Une diminution de la production de leucotriènes, en accord avec la littérature¹⁵ est observée en HPLC lorsque les neutrophiles sont traités à la pyrrophenone. Toutefois, le complexe MPs et sPLA₂-IIA induit une augmentation significative de la génération de leucotriènes dans les neutrophiles traités à la PP comparé aux neutrophiles contrôles (sans MPs et sans sPLA₂-IIA) (Figure 4-4). Ce résultat suggère que la sPLA₂-IIA libère assez d'AA aux neutrophiles pour la synthèse de leucotriènes. Ainsi, les MPs en présence de sPLA₂-IIA, et indépendamment de la cPLA₂α, sont impliquées dans la génération de leucotriènes par les neutrophiles activés.

4.5. Conclusion-Discussion

Les MPs modulent plusieurs voies métaboliques et fonctions du neutrophile telles que la phagocytose et la synthèse de leucotriènes (Figure 4-1). En présence de MPs et de sPLA₂-IIA, l'expression de la caspase 3 clivée est diminuée (Figure 4-2) suggérant une réduction

des processus apoptotiques. Par ailleurs, dans un contexte inflammatoire les neutrophiles des articulations de patients arthritiques ont des fonctions altérées dont une apoptose réduite.¹⁷⁻²⁰ Les neutrophiles des articulations arthritiques chez l'homme et dans les modèles murins internalisent les MPs.¹² Les MPs ou les produits issus de l'hydrolyse des MPs par la sPLA₂-IIA pourraient être impliqués dans la modulation des processus apoptotiques des neutrophiles en condition inflammatoire. Cependant, nous présentons ici des résultats préliminaires qui méritent d'être approfondis par d'autres méthodes d'études des voies apoptotiques telles que la détection de la fragmentation de l'ADN (essai TUNEL) et des marquages de l'activation des caspases (Apostat). La voie d'apoptose mitochondriale pourrait être aussi analysée avec la dépolarisation des membranes (JC-1) analysable en cytométrie en flux. Par ailleurs, les différents produits d'hydrolyse des MPs par la sPLA₂-IIA, tels que les lysophospholipides, les acides gras et les eicosanoïdes pourraient initier les processus apoptotiques et devraient être étudiés.

Le complexe composé de MPs et de sPLA₂-IIA génère de forts taux d'AA¹² pouvant être métabolisé en divers eicosanoïdes pro ou anti-inflammatoires. Nous observons dans cette étude que les neutrophiles en présence de MPs et sPLA₂-IIA produisent des leucotriènes. Les neutrophiles expriment la cPLA₂ α , laquelle est impliquée dans les processus de génération d'AA pour la synthèse de LTB₄ par les neutrophiles.¹⁵ Nos résultats indiquent que les leucotriènes sont en partie synthétisés indépendamment de la cPLA₂ α , en présence de MPs et de la sPLA₂-IIA (Figure 4-4). Ces résultats sont en accord avec ceux de Barry et al. qui avait montré de manière élégante que l'AA des microparticules de plaquette pouvait être transféré aux cellules endothéliales et aux monocytes pour produire des prostaglandines notamment.⁷ Le LTB₄ est un fort chemoattractant et induit aussi la phagocytose de *Klebsiella pneumoniae*.²¹ Or nos résultats indiquent que la présence de MPs et sPLA₂-IIA augmentent les fonctions de phagocytose des neutrophiles (Figure 4-3). Le LTB₄ généré par les neutrophiles en présence de MPs et sPLA₂-IIA pourrait aussi induire l'internalisation des MPs. Le gain de fonction de phagocytose des neutrophiles grâce aux MPs de plaquette pourrait être bénéfique dans l'élimination des MPs et avoir un impact dans les maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde.

4.5. Matériel et méthodes

4.5.1 Cellules

4.5.1.1. Les plaquettes

Les plaquettes sont obtenues à partir de don de sang de personnes volontaires en santé selon le protocole d'éthique approuvé par le CRCHU de Québec et l'université Laval. Les plaquettes sont isolées et activées au collagène pour obtenir des MPs de plaquette comme décrit.¹²

4.5.1.2. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont isolés à partir de sang périphérique de volontaires en santé et suivant les protocoles d'éthique du CRCHU de Québec et de l'université Laval. Les neutrophiles sont isolés comme décrit dans Flamand et al. et Duchez et al.^{12,14} Ils sont primés activés et incubés avec des MPs de plaquette comme décrits dans le paragraphe 3.7.4.2.

Pour les essais de phagocytose, les neutrophiles activés sont pré-traités avec des MPs de plaquettes fluorescentes puis ils sont incubés 2h à 37°C avec 350 000 billes fluorescentes/ μ L (Peprotech, cyan).

4.5.2. Analyse bio-informatique

Les puces affymetrix ont été utilisées et analysées comme décrit dans le paragraphe 3.11.1.11. Les profils d'ARN des neutrophiles activés, incubés avec de la sPLA₂-IIA versus des neutrophiles incubés avec des MPs et sPLA₂-IIA ont été comparés par ANOVA avec le logiciel Partek. Les modulations des niveaux d'ARN ont été sélectionnées sur la base d'un changement d'expression de 1,5 fois. Les analyses bio-informatiques des résultats de transcriptome ont été réalisées avec les logiciels GSEA et ingenuity (IPA).

4.5.3. Détection de la caspase 3 clivée

La caspase 3 clivée est détectée dans les neutrophiles grâce à un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée et conjugué au FITC (Apoptosis Kit, BD Bioscience) suivant le protocole du manufacturier. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux (BD Canto II).

4.5.4. Microscopie confocale

Les cellules sont analysées avec un microscope confocale spinning disc, utilisant un objectif 63x (Quorum Spinning Disc Wave FX, Quorum technologies, Guelph, Canada) et le logiciel Velocity version 5.4.0. Pour identifier, localiser et quantifier les MPs et les billes de polystyrène en surface ou à l'intérieur des neutrophiles, les images sont processées de manière à visualiser un neutrophile par image dans le mode XYZ. Chaque MP ou bille est analysée pour sa localisation (dans le cytoplasme), comptée et classifiée dans un groupe intracellulaire ou en surface. L'internalisation des MPs est étudiée sur 100 neutrophiles par condition et répétée 3 fois en utilisant des MPs et des neutrophiles de donneurs différents.

4.5.5. HPLC

L'incubation des neutrophiles en présence de MPs et de sPLA₂-IIA est arrêtée avec l'ajout de 10 volumes de la solution d'arrêt froid [(methanol/acetonitrile, Fisher) (1/1, v/v)] contenant 12.5ng de PGB₂ et de 19-OH-PGB₂ comme standards internes. Les échantillons dénaturés sont centrifugés (600g, 20min à 4°C). Les surnageants sont évaporés jusqu'à ce qu'il en reste 1ml en utilisant de l'azote puis analysé par HPLC.¹⁴ La quantification des métabolites (LTB₄, le 6,12-epi LTB₄, le 20-COOH-LTB₄, le 20-OH-LTB₄, le LTC₄ et le 6 epi-LTB₄) est réalisée à partir des standards internes. Les leucotriènes reportés sur les graphiques correspondent à la somme des différents métabolites cités ci-dessus.

4.5.6. Analyse statistique

Le nombre de répliqua (*n*) indique le nombre d'expériences réalisées utilisant les cellules de *n* différents donneurs. Les analyses statistiques (Mann-Whitney) sont réalisées avec le logiciel Prism software (version 5).

4.6. Figures

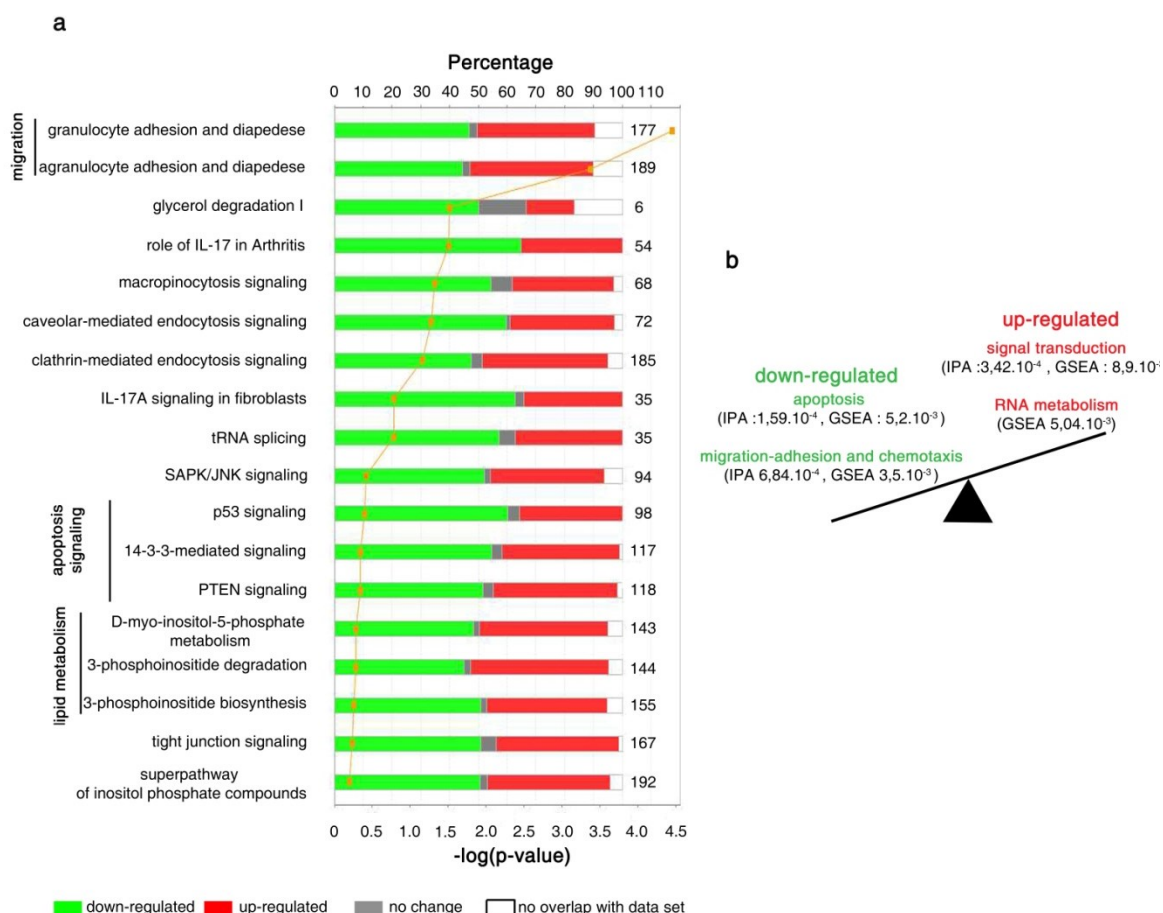


Figure 4-1. Evaluation des voies métaboliques du neutrophile modulées par les MPs de plaquette

(a) Voies métaboliques les plus modulées dans les neutrophiles en présence de MPs et sPLA₂-IIA. Cette analyse ingenuity a été réalisée sur les données ANOVA de l'analyse de transcriptome (chapitre 3). Les ARNs up-régulés et les ARNs down-régulés sont indiqués en rouge et en vert respectivement, ceux qui ne varient pas sont en gris et ceux qui ne correspondent pas aux listes du logiciel sont en blanc. Les carrés oranges indiquent les $-\log(p\text{-value})$ des voies métaboliques notées. Les nombres indiqués à la droite de chaque barre de l'histogramme correspondent au nombre d'ARN appartenant aux voies métaboliques dont l'expression est modulée. (b) Compilation des 5 voies les plus modulées à partir d'analyse bio informatique, réalisée avec GSEA et Ingenuity (IPA). Les fonctions écrites en rouge et en vert représentent les processus up et down régulés respectivement. Les p-values obtenues avec IPA et GSEA sont notées.

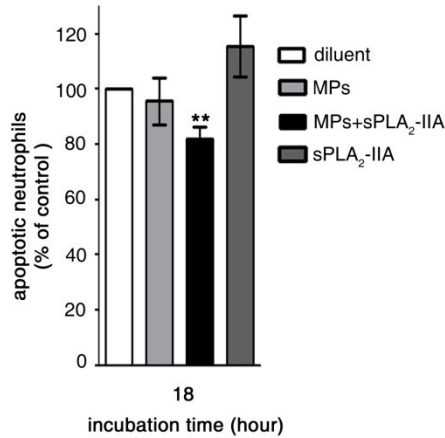


Figure 4-2. Evaluation de l'expression de la caspase 3 clivée des neutrophiles

Evaluation de l'expression de la caspase 3 clivée dans les neutrophiles après 18h d'incubation à 37°C avec des MPs en présence ou absence de sPLA₂-IIA. Les résultats sont obtenus en utilisant un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée, lequel est détecté en cytométrie en flux. Chaque data est normalisée au contrôle ($n=5$, test Mann Whitney test comparé au diluent, ** $p<0.005$).

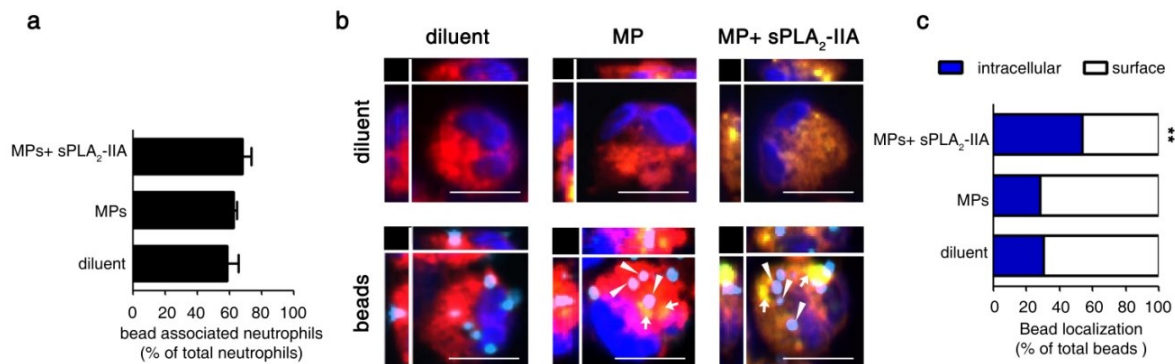


Figure 4-3. Evaluation des capacités de liaison et de phagocytose de billes en polystyrène par les neutrophiles.

Les neutrophiles activés sont incubés dans un premier temps avec des MPs vertes, en présence ou en absence de sPLA₂-IIA durant 2h. Ces neutrophiles sont ensuite incubés 2h avec des billes de polystyrènes fluorescentes. **(a)** Association des neutrophiles préincubés avec des MPs en présence ou absence de sPLA₂-IIA. Le graphique représente le pourcentage de neutrophiles associés avec les billes fluorescentes, détectés par cytométrie en flux. ($n=5$ test Mann-Whitney, il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions). **(b)** Image représentative de microscopie confocale suite à une incubation des neutrophiles en présence de billes en polystyrène (cyan). Le cytoplasme des neutrophiles est en rouge, le noyau en bleu et les MPs en vert. Les flèches pointent les MPs internalisées et les têtes de flèche indiquent les billes internalisées. **(c)** Le graphique représente la localisation des billes après 2h d'incubation avec les neutrophiles pré-incubés avec des MPs \pm sPLA₂-IIA. Les résultats obtenus sont issus d'un compte de 100 neutrophiles par condition et sont représentés en pourcentage de billes totales par neutrophile ($n=3$, test Mann-Whitney comparé au diluent ** $p<0.001$).

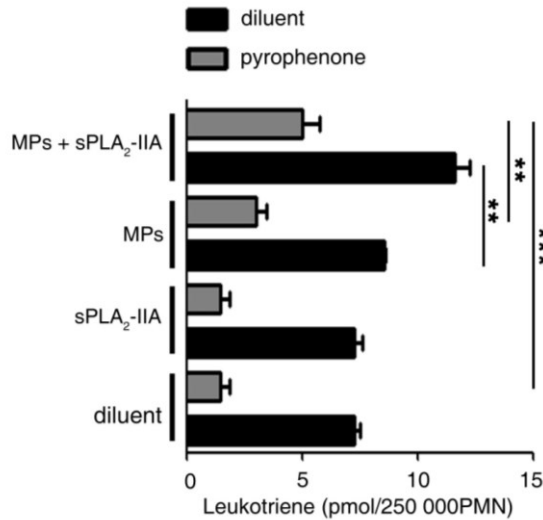


Figure 4-4. Evaluation de la synthèse de leucotriènes par les neutrophiles en présence de MPs de plaquette et de sPLA₂-IIA.

Les neutrophiles activés sont traités 10 min à 37°C avec de pyrophenone (PP, 100nM) pour inhiber la cPLA₂α. Ces neutrophiles sont ensuite incubés avec des MPs et de la sPLA₂-IIA durant 2h à 37°C. Ces lipides sont quantifiés en HPLC. ($n=3$, test Mann-Whitney, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$).

4.7. Références

- 1 Loyer, X., Vion, A. C., Tedgui, A. & Boulanger, C. M. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circulation research* **114**, 345-353, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300858 (2014).
- 2 Mause, S. F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research* **107**, 1047-1057, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226456 (2010).
- 3 Aatonen, M., Gronholm, M. & Siljander, P. R. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **38**, 102-113, doi:10.1055/s-0031-1300956 (2012).
- 4 Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **12**, 614-627, doi:10.1111/jth.12554 (2014).
- 5 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:10.1126/science.1181928 (2010).
- 6 Sellam, J. *et al.* Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* **11**, R156, doi:10.1186/ar2833 (2009).

- 7 Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. A. & FitzGerald, G. A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2118-2127, doi:10.1172/JCI119385 (1997).
- 8 Barry, O. P., Pratico, D., Savani, R. C. & FitzGerald, G. A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* **102**, 136-144, doi:10.1172/JCI2592 (1998).
- 9 Forlow, S. B., McEver, R. P. & Nollert, M. U. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* **95**, 1317-1323 (2000).
- 10 Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* **98**, 3143-3149 (2001).
- 11 Jy, W., Mao, W. W., Horstman, L., Tao, J. & Ahn, Y. S. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood cells, molecules & diseases* **21**, 217-231; discussion 231a, doi:S1079979685700253 [pii] (1995).
- 12 Ducheze, A. C. *et al.* Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:10.1073/pnas.1507905112 (2015).
- 13 Laffont, B. *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* **122**, 253-261, doi:10.1182/blood-2013-03-492801 (2013).
- 14 Flamand, N., Lefebvre, J., Surette, M. E., Picard, S. & Borgeat, P. Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **281**, 129-136, doi:M506513200 [pii] 10.1074/jbc.M506513200 (2006).
- 15 Flamand, N. *et al.* Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A2, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. *British journal of pharmacology* **149**, 385-392, doi:0706879 [pii] 10.1038/sj.bjp.0706879 (2006).
- 16 Kramer, R. M. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *The Journal of biological chemistry* **271**, 27723-27729 (1996).
- 17 Wright, H. L., Moots, R. J. & Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 593-601, doi:10.1038/nrrheum.2014.80 (2014).
- 18 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 19 Ottonello, L. *et al.* Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 1249-1260 (2002).
- 20 Scapini, P. & Cassatella, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* **124**, 710-719, doi:10.1182/blood-2014-03-453217 (2014).
- 21 Mancuso, P., Nana-Sinkam, P. & Peters-Golden, M. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* **69**, 2011-2016, doi:10.1128/IAI.69.4.2011-2016.2001 (2001).

Chapitre 5. Discussion générale

Les plaquettes sont de petits éléments circulants dans le sang et sont connues depuis fort longtemps uniquement pour leur implication dans la coagulation. Elles jouent toutefois un rôle important dans la réponse immunitaire et l'inflammation.³¹⁷ Les plaquettes sont activées par divers ligands de la MEC (collagène, laminine, podoplanine etc...) et divers ligands solubles (thrombine, ADP, thromboxane etc...). Elles bourgeonnent et libèrent des microparticules (MPs), des MPs contenant des mitochondries (MitoMPs) et des mitochondries libres (freeMitos).²⁸⁶ Les MPs sont abondantes dans les fluides corporels humains physiologiques ou pathologiques ainsi que dans les concentrés plaquettaires (CPs) pour les transfusions. Les freeMitos récemment découvertes sont quant-à-elles détectées dans les concentrés plaquettaires pour transfusion (CPs) ainsi que les liquides synoviaux des patients atteints d'AR.²⁸⁶ A l'heure actuelle, peu d'études sont menées sur ces freeMitos. Au cours de mon doctorat, j'ai mis en évidence que les freeMitos et les MPs étaient la cible d'une enzyme abondante dans les liquides synoviaux arthritiques¹⁵² : la sPLA₂-IIA. Cette dernière contribue à la synthèse de médiateurs lipidiques dont les leucotriènes et le 12-HETE à partir des freeMitos et des MPs,^{286,601} à l'internalisation des MPs qui transfèrent leur contenu aux neutrophiles pour moduler leur transcriptome.⁶⁰¹

5.1. Les freeMitos

5.1.1. Les freeMitos et leurs DAMPs

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires dont la fonction principale est de produire de l'énergie à la cellule. Même sortie de la cellule, elles conservent leur capacité de respiration et leur potentiel de membrane est intact.²⁸⁶ Du fait de leur origine bactérienne, les mitochondries héritent de molécules telles que les cardiolipines (CLs) et l'ADN à motifs CpG¹⁹⁷ ; cette dernière est reconnue comme un DAMPs. Un taux anormalement élevé d'ADN mitochondrial riche en motifs CpG est détecté dans les CPs causant des réactions adverses suite à leur transfusion, suggérant une augmentation du nombre de freeMitos dans les CPs.²⁸⁶ En effet, des mitochondries extracellulaires sont

visualisées dans les CPs.²⁸⁶ Dans un contexte inflammatoire tel que l'AR, les freeMitos²⁸⁶ et l'ADN mitochondrial riche en motifs CpG⁵⁹⁹ sont détectés dans les fluides synoviaux de patients arthritiques. Les freeMitos cohabitent donc avec la sPLA₂-IIA, abondante dans les liquides synoviaux arthritiques,¹⁵² qui les hydrolyse et libère de l'ADN mitochondrial riche en motifs CpG.²⁸⁶ L'ADN riche en motifs CpG peut être inflammatoire et activer les cellules notamment via leur TLR9. Des nucléotides riches en motifs CpG similaires à l'ADN mitochondrial injectés directement dans les articulations murines, déclenchent l'arthrite.⁶⁰² Toutefois, les souris TLR9^{-/-} développent une arthrite inflammatoire équivalente aux souris exprimant le TLR9 dans le modèle K/BxN.⁶⁰³ Par ailleurs, les LBs de la MO de patients arthritiques expriment fortement le TLR9 qui une fois activé, induit la sécrétion de cytokines et la prolifération cellulaire.⁶⁰⁴ Le rôle de l'ADN riche en motifs CpG issu des freeMitos devrait être approfondi dans l'AR où plusieurs types cellulaires dont neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les plaquettes expriment le TLR9.³⁷¹ Nous avons montré que l'ADN mitochondrial induit la génération de NETs²⁸⁶ comme le LPS via les TLR2 et 4 sur les neutrophiles.^{236,237,605-607} De futures études pourraient être menées sur l'ADN mitochondrial dans l'activation des leucocytes et notamment le neutrophile. Les paramètres d'étude de l'activation de ces leucocytes pourraient être les médiateurs lipidiques, les cytokines, les ROS ou la NETose. L'inhibition du TLR9 en présence d'ADN mitochondrial pourrait prévenir la relâche de tous ces produits cités. Le rôle de l'ADN mitochondrial sur l'activation des plaquettes pourrait être investigué puisque d'une part, les plaquettes expriment le TLR9³⁷¹ et d'autre part, dans l'AR les plaquettes sont impliquées dans la sévérité de la maladie et relâchent des MPs.⁹⁶ L'ADN mitochondrial retrouvé dans les liquides synoviaux de patients arthritiques pourrait ainsi contribuer à l'activation plaquettaire via le TLR9 et à la relâche des freeMitos, des MPs et des MitoMPs.

Les CLs sont séquestrées dans la membrane interne des mitochondries et ne s'exposent qu'à la suite d'un dommage ou d'une dépolarisation des mitochondries. L'exposition des CLs sert de *stimuli* pro-apoptotiques.^{608,609} Elles contiennent un glycérol et ont donc une structure proche du phosphatidylglycerol (PG) pour lequel la sPLA₂-IIA a peu d'affinité⁵³⁰ cependant cette dernière ne libère pas de lysoCLs.²⁸⁶ Comme les freeMitos

gardent leur potentiel de membrane intact,²⁸⁶ les CLs resteraient dans la membrane interne des freeMitos et seraient donc inaccessibles à la sPLA₂-IIA. Dans l'AR, des anticorps dirigés contre les CLs (ACA) sont en circulation⁶¹⁰ et d'après nos résultats la sPLA₂-IIA ne contribuerait pas à la relâche de lysoCLs ou de CLs libres à l'origine de la formation des ACA. Par ailleurs, les CLs sont exposées à la surface des cellules apoptotiques^{609,611,612} phagocytées par les macrophages qui pourraient les présenter à leur surface. Les CLs lient le CD1d et stimulent les cellules T $\gamma\delta$ ⁶¹³ et pourraient ainsi déclencher une réponse immunitaire. Cependant les freeMitos pourraient aussi être phagocytées puis ses constituants tels que les CLs pourraient être présentées par des cellules présentatrices d'antigène.

5.1.2. La liaison des freeMitos aux neutrophiles

Les neutrophiles humains sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine. Ils sont une des premières lignes de défense de l'immunité innée et agissent rapidement pour enrayer une infection. Les mitochondries comme mentionnées précédemment, présentent des DAMPs relatifs à leurs origines bactériennes. Nous avons observé que les freeMitos se lient aux neutrophiles.²⁸⁶ Cette liaison n'a toutefois pas été caractérisée. Etant donné que les mitochondries contiennent des peptides formylés (fMLP),⁴⁸⁴ et que les neutrophiles ainsi que d'autres leucocytes tels que les DCs et les macrophages expriment des récepteurs au fMLP (FRP1), les freeMitos pourraient se lier via ce récepteur. La surface des freeMitos expose la PS (donnée du laboratoire), qui peut être reconnue par la lactadherine et Del-1. Ces dernières sont exprimées sur différents types cellulaires, dont les ECs. A ma connaissance, l'expression de la lactadherine et de Del-1 n'a pas été investiguée sur les neutrophiles. Leur expression et leur implication dans l'attachement des freeMitos aux neutrophiles seraient à investiguer en cytométrie en flux par exemple. Les freeMitos pourraient aussi se lier aux neutrophiles par l'intermédiaire de la sPLA₂-IIA. En effet, cette dernière se lie aux HSPG, à la vimentine et à certaines intégrines ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{5}\beta\text{1}$) qui peuvent être présents à la surface des neutrophiles.^{555,560-562} En liant d'une part les freeMitos et d'autre part les neutrophiles, la sPLA₂-IIA pourrait être l'intermédiaire entre l'organelle et le leucocyte. Cette interaction

pourrait être caractérisée, en utilisant des héparinases et des anticorps dirigés contre la vimentine et les intégrines, et être analysée en cytométrie en flux. Enfin, nous sommes conscients que les freeMitos pourraient lier d'autres types cellulaires qu'il serait intéressant d'identifier et d'évaluer les conséquences de ces interactions sur l'inflammation notamment.

5.1.3. L'activation des neutrophiles par les freeMitos

L'activation des neutrophiles peut se mesurer par l'augmentation de la sécrétion de leucotriènes, de cytokines, de ROS ainsi que son adhésion aux ECs. Nos résultats montrent que les freeMitos induisent la génération de leucotriènes (LTB₄ notamment) et que la sPLA₂-IIA et la cPLA₂α contribuent à l'amélioration de la production de leucotriènes dépendamment des freeMitos. Dans un contexte inflammatoire le LTB₄ synthétisé par les neutrophiles en présence de freeMitos pourrait attirer d'autres leucocytes, tels que les macrophages ou monocytes, d'autres neutrophiles qui pourraient à leur tour produire des leucotriènes. Par ailleurs, le LTB₄ augmente les capacités de phagocytose de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* par les neutrophiles.⁶¹⁴ Or fait intéressant, nous avons observé que les freeMitos sont internalisées dans les neutrophiles,²⁸⁶ où le LTB₄ pourrait jouer un rôle dans cette internalisation. De plus, elles peuvent entrer en étant associées à la sPLA₂-IIA et pourraient être hydrolysées à l'intérieur des neutrophiles par d'autres PLA₂ telles que la cPLA₂α et les iPLA₂, déjà connues pour hydrolyser les membranes mitochondriales.^{615,616} Ces PLA₂ contribuent à la libération de l'AA métabolisé par la 5-LO et par la LTA₄ synthase en LTB₄. Ce dernier est considéré comme un lipide inflammatoire notamment par son aptitude à induire des NETs,²⁸⁶ à attirer les cellules au foyer inflammé et à les activer. Par ailleurs, les freeMitos induisent l'adhésion des neutrophiles murins aux ECs des vaisseaux sanguins de manière rapide et significative, suggérant l'activation des neutrophiles.²⁸⁶ Le mécanisme mis en place par les neutrophiles pour adhérer aux ECs en présence de mitochondries libres n'a pas été étudié. Toutefois, les freeMitos pourraient induire l'expression de molécules d'adhésion à la fois sur les neutrophiles et les ECs. Leur identification pourrait être menée par une étude en cytométrie en flux.

5.1.4. L'internalisation des freeMitos par les neutrophiles

Les neutrophiles sont des phagocytes professionnels, mais peuvent aussi utiliser les voies d'endocytose pour les petites particules et molécules.²²⁷ Nos résultats montrent que les neutrophiles internalisent de manière active les freeMitos par endocytose dépendamment de la dynamine et la clathrine.²⁸⁶ Les mitochondries contiennent de l'ADN, divers ARNs dont les miARNs et des protéines régulatrices de la voie des miARNs telles qu'Ago-2.⁶¹⁷⁻⁶²⁰ Ainsi, les mitochondries pourraient transporter des miARNs comme les MPs, transférer ces miARNs et ainsi être impliquées dans des processus de communication intercellulaire. Par ailleurs, les mitochondries du neutrophile sont peu nombreuses et ne jouent pas un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique de la cellule, mais maintiennent leur potentiel membranaire pour la signalisation d'apoptose.^{225,621} En endocytant les freeMitos, les neutrophiles augmentent alors le nombre de mitochondries. Toutefois, les mitochondries des plaquettes n'ont pas le même profil bioénergétique que les mitochondries de neutrophile. Les premières peuvent consommer l'oxygène et faire de la glycolyse alors que les deuxièmes se limitent à la glycolyse.⁶²²⁻⁶²⁴ Le profil énergétique des neutrophiles ayant internalisé des freeMitos pourrait être modifié. Cette modulation pourrait être analysée grâce au SeaHorse, appareil permettant de mesurer les paramètres de respiration et de glycolyse. Enfin, les freeMitos pourraient être internalisées par d'autres cellules du système immunitaire et par les ECs et influencer ainsi leurs fonctions.

5.2. Les microparticules de plaquettes

Les MPs de plaquettes sont les MPs les plus abondantes en circulation. Elles peuvent être produites suite à la stimulation des plaquettes, entre autres, avec de la thrombine, de l'ADP, du collagène ou des complexes immuns.^{98,286,431,452} Dans notre étude (chapitre 3), nous avons utilisé des MPs de plaquettes stimulées au collagène puisque le récepteur au collagène GPVI joue un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrite, où les souris GPVI^{-/-} développent une arthrite modérée dans le modèle K/BxN.⁹⁶ Selon un article publié par la société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV) une caractérisation

complète des MPs doit être fournie dans chaque publication en utilisant trois techniques différentes au minimum.⁶²⁵ Nos MPs de plaquettes ont été quantifiées avec un cytomètre en flux couplé à un photomultiplicateur permettant de visualiser les vésicules jusqu'à 100nm.^{98,433} Cependant, l'estimation de la taille des MPs a été évaluée en utilisant un nanosizer (*Dynamic Light Scattering (DLS)*) et aurait aussi pu être mesurée avec le *Nanoparticle tracking analysis (NTA)*. En revanche, ces méthodes excepté le NTA ne peuvent pas déterminer l'origine des MPs. La cryo-TEM⁴³² et la cytométrie en flux en utilisant des anticorps spécifiques couplés à des billes d'or ou fluorochromes, permettent de déterminer l'origine des MPs, leur taille et même leur concentration.^{432,433} Afin de définir les vésicules extracellulaires, l'ISEV propose l'identification de protéines contenues dans les différentes catégories de vésicules (exosome, MPs et corps apoptotiques). Les plaquettes peuvent libérer des exosomes et des MPs^{431,626} qui contiennent des protéines telles que Hsp70 (exosome et MPs), CD41 (MPs), TSG101 (exosome)⁴³¹ et qui expriment les tétraspanines CD63 et CD9 souvent utilisées pour définir les exosomes. Ainsi, il apparaît complexe de différencier les exosomes des MPs, cependant, il a été mis en évidence récemment que les MPs de plaquette contiennent des mitochondries²⁸⁶ trop volumineuses à priori pour être enfermées dans les exosomes. Les protéines mitochondriales telles que VDAC deviennent alors un bon marqueur de MPs.

5.2.1. Hydrolyse des MPs par la sPLA₂-IIA

Les MPs de plaquettes sont abondantes en circulation et sont impliquées dans plusieurs pathologies dont l'AR.^{95,96,409,627} La composition lipidique des MPs de plaquettes est peu étudiée,^{436,628,629} toutefois leurs membranes contiennent divers acides gras et phospholipides lesquels sont la cible des sPLA₂ telles que la sPLA₂-IIA.^{433,533,601} Nos résultats révèlent le lipidome des MPs de plaquette en lysophospholipides et acides gras libérés par la sPLA₂-IIA. L'AA est l'acide gras majoritairement libéré et peut être métabolisé en prostaglandines et en leucotriènes (discuté plus bas). Cependant, les autres acides gras libérés des MPs par la sPLA₂-IIA sont aussi métabolisables. En effet, l'acide oléique est un acide gras insaturé composant majoritairement les phospholipides membranaires. Il forme 17% des acides gras totaux couplés à la phosphatidylcholine qui est

le principal phospholipide dans les plaquettes.⁶³⁰ Ce lipide peut inhiber l'agrégation des plaquettes stimulées au collagène, inhiber l'agrégation ainsi que la dégranulation des neutrophiles traités au fMLP^{630,631} et induire une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire suggérant une activation des cellules.⁶³² L'acide linoléique quant à lui peut être métabolisé par la 15-LO en 13-HODE. La 12-LO de plaquette métabolise l'acide linoléique en 9-HODE (hydroxyoctadecadienoic acid).^{633,634} Ces eicosanoïdes 9-HODE et 13-HODE sont retrouvés dans les LDLs des patients arthritiques ainsi que dans les articulations murines dans le modèle *Lyme arthritis*.^{635,636} Ils induiraient notamment la production d'IL-1 β et la résorption de l'os.⁶³⁶ Enfin, le DHA peut être métabolisé par les 12- et 15-LO des macrophages en résolvine et en maresine.⁶³⁷ Par ailleurs, la maresine-1 est synthétisée lorsque les neutrophiles interagissent avec les plaquettes.³⁹⁹

Les MPs de plaquettes contiennent la machinerie nécessaire à la production d'eicosanoïdes, telle que la 12-LO,⁴⁴³ la thromboxane synthase et la COX-1. Elles sont actives et elles génèrent leurs produits respectifs soit le 12-HETE et le TXA₂. Par ailleurs, les produits de prostaglandines synthases et de la 15-LO sont détectés dans les produits d'incubation des MPs et de la sPLA₂-IIA,⁶⁰¹ suggérant la présence de ces enzymes dans les MPs. Les enzymes 15-LO, PGE₂ et PGF₂ synthase sont aussi exprimées dans les plaquettes,^{395,638} elles pourraient alors être transférées aux MPs. Leur expression dans les MPs pourrait être analysée en immunobuvardage et en spectrométrie de masse.

Les acides gras libérés des MPs par la sPLA₂-IIA peuvent être métabolisés via un mécanisme transcellulaire comme l'avait décrit Barry et al. dans le cas d'un transfert d'AA des plaquettes vers les ECs.⁴⁴² Des résultats préliminaires indiquent que les neutrophiles en présence de sPLA₂-IIA et MPs produisent des leucotriènes, suggérant que l'AA libéré des MPs par la sPLA₂-IIA est métabolisé via un mécanisme transcellulaire par les enzymes du neutrophile en leucotriènes. De plus, l'AA libéré des MPs par la sPLA₂-IIA est aussi métabolisé par la 12-LO en 12-HETE qui pourrait être utilisé pour former du 5,12(S)-diHETE ou des lipoxines. Ces lipides sont présents dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite et dans les articulations de souris arthritiques.^{139,635,639} Il serait intéressant de mesurer et quantifier en HPLC le 5,12(S)-diHETE et en spectrométrie de masse la

lipoxine LXA₄ produits par les neutrophiles activés en présence de MPs et sPLA₂-IIA. Par ailleurs, les souris sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} développent une arthrite sévère alors que les souris déficientes pour l'une ou l'autre des enzymes ont une arthrite modérée. De plus les neutrophiles des articulations arthritiques de ces souris sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{+/+} internalisent les MPs contrairement aux souris n'exprimant pas l'une ou l'autre des enzymes. Ces souris seraient un bon modèle d'étude du 5,12(S)-diHETE et des lipoxines produites au cours de l'arthrite, ainsi que de leur implication dans la pathologie et dans l'internalisation des MPs.

Les souris déficientes en 12-LO leucocytaire développent une arthrite plus sévère que les souris exprimant cette enzyme, dans le modèle K/BxN suggérant un rôle protecteur de la 12-LO de leucocyte.¹⁸³ En effet, les tissus synoviaux de ces souris déficientes ont moins de lipoxine ou de 13-HODE lesquels sont des eicosanoïdes anti-inflammatoires.¹⁸³ Or, les souris ALOX12^{-/-} (déficiente en 12-LO plaquettaire) développent faiblement l'arthrite dans un modèle K/BxN suggérant ici que la 12-LO plaquettaire serait pro-inflammatoire. Le lipidome des articulations arthritiques dans le modèle K/BxN des souris sPLA₂-IIA^{TGN}ALOX12^{-/-} pourrait renseigner sur les lipides produits dans l'initiation et la résolution de la maladie. La majorité des acides gras libérés des MPs par la sPLA₂-IIA, peut aussi être métabolisée en divers eicosanoïdes pro-inflammatoires comme le LTB₄ ou des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires. Les eicosanoïdes peuvent aussi activer diverses cellules dans les tissus et liquides synoviaux, telles que les FLS, les macrophages, les mastocytes. Ils pourraient ainsi induire la production d'eicosanoïdes, de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance induisant notamment l'angiogenèse.

5.2.2. Mécanismes d'internalisation des MPs par les neutrophiles

Différents mécanismes de liaison et de mode d'internalisation des MPs de plaquettes ont été mis en évidence notamment dans les ECs et les macrophages. Mais aucune étude n'a été faite sur l'internalisation des MPs de plaquettes par les neutrophiles. Les résultats du Chapitre 3 établissent que les MPs de plaquette sont internalisées par les neutrophiles activés en présence de sPLA₂-IIA via un mécanisme finement régulé.⁶⁰¹ Il

existe certainement plusieurs voies d'internalisation des MPs via la sPLA₂-IIA. Je discuterai dans un premier temps la voie d'internalisation que nous avons mise en évidence, puis les voies d'internalisation indépendante de l'activité catalytique de la sPLA₂-IIA et les voies d'internalisation des MPs sans la sPLA₂-IIA.

L'activité catalytique de la sPLA₂-IIA est nécessaire à l'internalisation des MPs.⁶⁰¹ En effet, l'utilisation d'un mutant inactif de la sPLA₂-IIA induit une diminution significative de l'internalisation des MPs par les neutrophiles. Comme discuté précédemment, la sPLA₂-IIA relâche des acides gras comme l'AA à partir des MPs. Cet AA est métabolisé en différents eicosanoïdes dont le majoritaire est le 12-HETE grâce à la 12-LO exprimée par les MPs. Le 12-HETE est un lipide chiral possédant deux énantiomères nommés 12(S)-HETE et 12(R)-HETE. La 12-LO plaquettaire produit seulement du 12(S)-HETE alors que la 12-LO leucocytaire ou épidermale produisent du 12(R)-HETE. Dans notre étude, l'énantiomère 12(S)-HETE est impliqué dans l'internalisation des MPs par les neutrophiles contrairement au 12(R)-HETE. Par ailleurs, les MPs de plaquettes déficientes en 12-LO en présence de sPLA₂-IIA ne sont pas internalisées. Ces résultats suggèrent que les MPs de cellules n'exprimant pas de 12-LO capable de produire du 12(S)-HETE, ne seront pas internalisées par le mécanisme mis en évidence dans le chapitre 3. En effet, en présence de sPLA₂ libérant de l'AA à partir des MPs de diverses cellules telles que les ECs, les neutrophiles et les macrophages, qui n'expriment pas de 12-LO pourraient être internalisées, mais indépendamment du mécanisme impliquant le 12(S)-HETE. Ce dernier est le ligand de plusieurs récepteurs tels que le récepteur BLT₁, le récepteur BLT₂, le récepteur du thromboxane A₂/PGH₂ et le GPR31.^{284,356,640} Plusieurs autres molécules partagent le même récepteur BLT₂ comme le 12-HHTrE, le 12(R)-HETE, le 15(S)-HETE, le 12(S)-HpETE ainsi que le LTB₄.^{641,642} Le 12-HHTrE et le 12(S)-HETE sont les ligands de BLT₂ avec la plus forte affinité.^{602,603} Nos résultats indiquent que l'internalisation des MPs via le 12(S)-HETE, est médiée par le récepteur BLT₂. Toutefois, le 12-HHTrE et le 12(R)-HETE n'induisent pas l'internalisation des MPs. Cette observation soulève plusieurs questions. Le 12(S)-HETE pourrait i) lier le récepteur BLT₂ et compétitionner avec les autres eicosanoïdes, ii) être métabolisé en un autre lipide tel que le 5,12(S)-diHETE ou les lipoxines. Ce 5,12(S)-diHETE pourrait

promouvoir l'internalisation des MPs et tout comme les lipoxines, il est présent dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite.^{139,639} Le 5,12(S)-diHETE et la LXA₄ sont issus de la collaboration des plaquettes et des neutrophiles utilisant leurs lipoxygénases respectives. L'activité concertée de la 5-LO et 12-LO notamment permet la production du 5,12(S)-diHETE alors que l'activité des 5-LO et 15-LO, mais aussi de 5-LO et 12-LO génèrent des lipoxines. Enfin, pour répondre à ces diverses questions, l'ajout de 5,12(S)-diHETE exogène et l'utilisation de MPs issues de cellules déficientes en 12-LO plaquettaire (neutrophiles, ECs ou lymphocytes) pourraient permettre une meilleure compréhension de l'internalisation des MPs via le 5,12 (S)-diHETE.

La signalisation du récepteur BLT₁ est très bien décrite contrairement à celle du BLT₂. Il est toutefois connu que le 12-HETE induit la réorganisation du cytosquelette d'actine, la phosphorylation de la vimentine, l'activation de la PKC, de la tyrosine kinase Src, et de l'axe PKC/ERK1/2.^{360,643-646} Ces observations ne sont pas reliées à la signalisation d'un des récepteurs du 12-HETE. Il serait très intéressant d'étudier la signalisation de ce récepteur BLT₂ chez les neutrophiles par exemple. Nous observons aussi que l'utilisation simultanée d'antagoniste de BLT₁ et BLT₂ sur les neutrophiles activés diminue partiellement l'internalisation des MPs. Ceci suggère qu'il existe d'autres mécanismes d'internalisation des MPs, potentiellement par un autre récepteur comme le GPR31, indépendant de BLT₁ et de BLT₂.

Indépendamment de son activité catalytique, la sPLA₂-IIA peut participer à l'internalisation de corps apoptotiques par les macrophages par l'intermédiaire des HSPGs.⁵⁶³ En effet, la sPLA₂-IIA peut lier les HSPGs⁵⁵⁵ qui permettent son endocytose dans les mastocytes et les ECs.^{548,555,563,565} Par ailleurs, la sPLA₂-IIA peut aussi lier les récepteurs M-type, les intégrines $\alpha\beta 3$ (CD61 ou GPIIIa), $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 ou CD49d/CD29) et $\alpha 5\beta 1$ (CD49e/CD29)^{560,561} lesquels peuvent être exprimés sur les neutrophiles et la vimentine⁵⁵⁵ qui peut être à la surface des MPs de plaquette.⁶⁰⁰ Dans notre modèle, nous ne pouvons pas exclure que la vimentine exprimée sur les MPs de plaquette⁶⁰⁰ permettrait de lier la sPLA₂-IIA qui pourrait aussi interagir avec les HSPGs du neutrophile menant à l'endocytose de la sPLA₂-IIA et des MPs lui étant liées. Il serait intéressant d'investiguer

cette internalisation en utilisant notamment des héparinases. En somme, la sPLA₂-IIA peut lier à la fois les MPs et les neutrophiles et ainsi permettre un pont entre les deux.

Les MPs de plaquettes peuvent être internalisées par divers types cellulaires dont les ECs⁴⁵² et quelques mécanismes d'entrée ont été mis en évidence dont la phagocytose, l'endocytose et la fusion membranaire.^{452,463,464} Nos résultats montrent que les MPs sont internalisées par les neutrophiles activés. L'activation des neutrophiles est obtenue suite à une incubation avec un cocktail de cytokines (TNF et GM-CSF) pour « primer » le neutrophile et avec des ICs. Ces derniers activent les neutrophiles sur leur récepteurs Fc. Il est fort probable que les ICs reconnaissent des antigènes à la surface des MPs et puissent s'y lier (indépendamment des FcγRIIA) en formant ainsi des mpICs comme Cloutier et al l'ont précédemment montré.⁹⁸ Ces mpICs pourraient se lier aux récepteurs Fc des neutrophiles et pourraient induire une endocytose des MPs via les récepteurs Fc.

Les MPs de plaquettes peuvent être endocytées de manière dépendante de la clathrine, mais aussi phagocytées ou macropinocytées de manière dépendante des filaments d'actine par les ECs.^{462,463} La différence entre phagocytose et endocytose est souvent mince et mal définie dans la littérature. La phagocytose serait réservée aux gros objets de taille supérieure à 1µm. Les objets inférieurs à 200nm seraient endocytés en employant les clathrines alors que les objets supérieurs à 500nm seraient endocytés via la caveoline.²¹⁸ Dans notre étude les MPs de plaquette dont la taille varie entre 200 et 800nm, sont internalisées dépendamment de la dynamine, de la clathrine et de la caveoline par les neutrophiles. Ces résultats suggèrent des mécanismes d'endocytose des MPs par les neutrophiles. Cependant, il est difficile d'affirmer qu'il s'agit d'une endocytose, même si cette voie est unique dans l'utilisation de la clathrine et des cavéolines. Les MPs de plaquette peuvent fusionner avec les membranes plasmiques des ECs.⁴⁶⁴ Cependant cette observation est controversée. En effet, Mause et al. suggèrent que les MPs fusionnent avec les ECs alors que Faille et al. montrent le contraire.^{463,464} Des études supplémentaires devront être réalisées pour déterminer si les MPs de plaquette fusionnent avec les neutrophiles.

5.2.3. Modulation des fonctions du neutrophile par les MPs

La localisation des MPs internalisées dans les cellules cibles est un aspect important dans la compréhension de la communication intercellulaire. En effet, les MPs sont des transporteurs de molécules bioactives et organelles,^{96,286,430,466,601,647} leur devenir est donc crucial pour la livraison de leur contenu. Nos investigations révèlent que les MPs sont internalisées proche du noyau et sont localisées aussi dans le cytoplasme notamment dans le Reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le lysosome. Les MPs localisées au Reticulum endoplasmique et au noyau pourraient délivrer des miARNs et des FTs qui pourraient avoir un impact sur la traduction protéique. En effet, la voie des miARNs est active au Reticulum endoplasmique rugueux,⁶⁴⁸ au noyau,⁶⁴⁹ mais aussi au niveau de la voie endosomale.⁶⁵⁰ Compte tenu de la diversité notable d'ARN contenu dans les MPs, tel que des ARNs ribosomiaux, des ARNs de transfert, des ARNs messagers et de petits ARNs non codants tels que les miARNs et de la diversité de facteurs de transcription,⁶⁰¹ nous avons choisi d'étudier le transfert aux neutrophiles d'un miARN soit miR-451 et le transfert d'un facteur de transcription (FT) soit COUP TF-I, tous les deux sont fortement exprimés dans les MPs et faiblement exprimés dans les neutrophiles.⁶⁰¹ MiR-451 est transféré des MPs et est fonctionnel dans les neutrophiles.⁶⁰¹ Le transfert et l'enrichissement de ce miARN aurait pu être confirmé par des techniques de qPCR en présence ou absence d'actinomycine D qui est un inhibiteur de la transcription afin d'exclure les hypothèses de transcription de novo de miR-451 par les neutrophiles. De même l'utilisation d'éponge à miR-451 qui permet de séquestrer le miR-451 endogène des neutrophiles et d'inhiber son activité, pourrait aussi renforcer nos résultats de transfert de miR-451 des MPs vers les neutrophiles. Dans les MPs, le FT COUP TF-I garde sa fonction de liaison à sa séquence et il est transféré dans le cytoplasme des neutrophiles. *In vitro*, COUP-TF-I n'est pas transloqué au noyau,⁶⁰¹ suggérant qu'il manque un signal de translocation. D'autres FTs, tels que PPAR γ et RXR contenus dans les MPs de plaquettes sont transférés à des cellules THP-1 et induisent une diminution de l'activation cellulaire.⁶⁵¹ Il serait intéressant d'étudier l'impact de la transmission des FTs des MPs aux neutrophiles, cependant, les MPs sont riches en molécules bioactives⁴³⁰ dont l'IL-1⁹⁶ et miR-223.⁴⁵² Dans notre étude, il nous paraît complexe de déterminer que, seule une entité comme les miARNs ou les facteurs de transcription jouent un rôle dans la modulation des fonctions du neutrophile. En

effet, plusieurs lipides tels que le 12-HETE, les HpETE et le 15-HETE peuvent induire une augmentation du calcium intra-mitochondrial et la génération de *nitric oxide* (NO).⁶⁵²⁻⁶⁵⁶ Etant donné que les MPs peuvent se localiser proches des mitochondries du neutrophile et que les eicosanoïdes (12-HETE, les HpETE et le 15-HETE) contenus dans les MPs peuvent agir sur les mitochondries, ces lipides des MPs pourraient donc activer les mitochondries du neutrophile. Plusieurs molécules présentes dans les MPs peuvent ainsi moduler le transcriptome des neutrophiles, et ce, très rapidement. Il serait intéressant de pousser plus loin la cinétique et d'évaluer le transcriptome des neutrophiles à différents temps d'exposition aux MPs et à leur internalisation. Nos analyses de transcriptome *in silico* mettent en évidence que plusieurs voies métaboliques sont altérées dont l'apoptose, l'adhésion, la migration, la chimiotaxie et le métabolisme des ARNs. Or les processus de migration et d'apoptose sont réduits dans les neutrophiles arthritiques.^{190,250,266,657} *In vitro*, nos résultats confirment que l'internalisation ou la présence des MPs et de la sPLA₂-IIA permet une diminution de l'expression de caspase 3 clivée suggérant une diminution de l'apoptose. Pour renforcer cette observation, d'autre méthode d'étude de l'apoptose comme les essais *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling* (TUNEL) et Apostat devraient être utilisées. Les MPs de plaquettes sont aussi capables de stimuler la prolifération et la chimiotaxie des cellules telles les HL-60 et les Jurkat.⁶⁵⁸ Des études supplémentaires seront menées sur la migration, la chimiotaxie des neutrophiles ayant internalisé des MPs. Par ailleurs, la littérature récente sur la migration des neutrophiles aux ganglions lymphatiques pourrait être liée à l'internalisation des MPs et sera développée dans le paragraphe suivant.

Les patients atteints d'AR (50 à 75%) présentent une lymphadénopathie qui est une atteinte des ganglions lymphatiques lesquels peuvent augmenter de volume.⁶⁵⁹ Les modèles murins d'arthrite présentent aussi des ganglions péri-articulaires plus gros.⁶⁶⁰ De plus, 5 à 20% des patients arthritiques sont atteints de splénomégalie.⁶⁵⁹ Les organes lymphoïdes sont donc affectés et contiennent plus de leucocytes que chez les personnes ou modèle murin en santé.^{659,660} Les ganglions lymphatiques sont connectés au réseau lymphatique qui draine tout le corps à l'exception du cerveau. Les cellules migrent dans ces organes lymphoïdes secondaires via un gradient chimioattractif de molécules telles que l'IL-19 et

IL-21 constitutivement sécrétées par les cellules stromales, les DCs et les ECs lymphatiques. Ces deux cytokines sont les ligands du récepteur CCR7 exprimé à la surface des DCs matures, les cellules T naïves et les cellules T mémoires. Le CCR7 est impliqué dans la migration des leucocytes dans la zone des cellules T des ganglions.⁶⁶¹ Les neutrophiles humains exposent très peu de CCR7 à leur surface toutefois, ils le séquestrent dans leurs vésicules cytoplasmiques.²⁴⁶ Les MPs internalisées pourraient moduler l'expression de CCR7 à la surface des neutrophiles or nos résultats de transcriptomique n'indiquent pas une augmentation des ARNs générant le CCR7, ni du récepteur à l'IL-21. Suite à une stimulation ou à une incubation avec des MPs et de la sPLA₂-IIA, les neutrophiles pourraient exposer le CCR7 que nous pourrions détecter en cytométrie en flux. Ce récepteur CCR7 permet aux neutrophiles de migrer dans la zone marginale de la rate (dans la zone des cellules B) ou aux ganglions lymphatiques.^{246,256,662} Dans ces structures lymphoïdes, les neutrophiles présentent des antigènes aux cellules B pour la production d'anticorps. Ils relâchent au niveau de la zone marginale des NETs, lesquels entrent en contact avec les cellules B.^{256,663} Ces NETs présentent des protéines citrullinées et des PADs.^{68,70} Or dans l'arthrite, de fortes quantités d'anticorps dirigés contre des protéines citrullinées sont produites. Ainsi il se pourrait que cette production soit aggravée par les NETs de neutrophiles ayant migré dans les ganglions lymphatiques.

En résumé, nos études ont dévoilé que les plaquettes activées libèrent différentes vésicules et organelles qui peuvent influencer les sécrétions et les fonctions du neutrophile, résumés dans la Figure 5.1.

5.3. Pertinence de notre modèle à d'autres contextes cellulaires

Le modèle d'internalisation des MPs via l'activité concertée de la sPLA₂-IIA et la 12-LO pourrait s'appliquer à d'autres cellules récipientes et à d'autres contextes biologiques inflammatoires (sepsis, athérosclérose...).

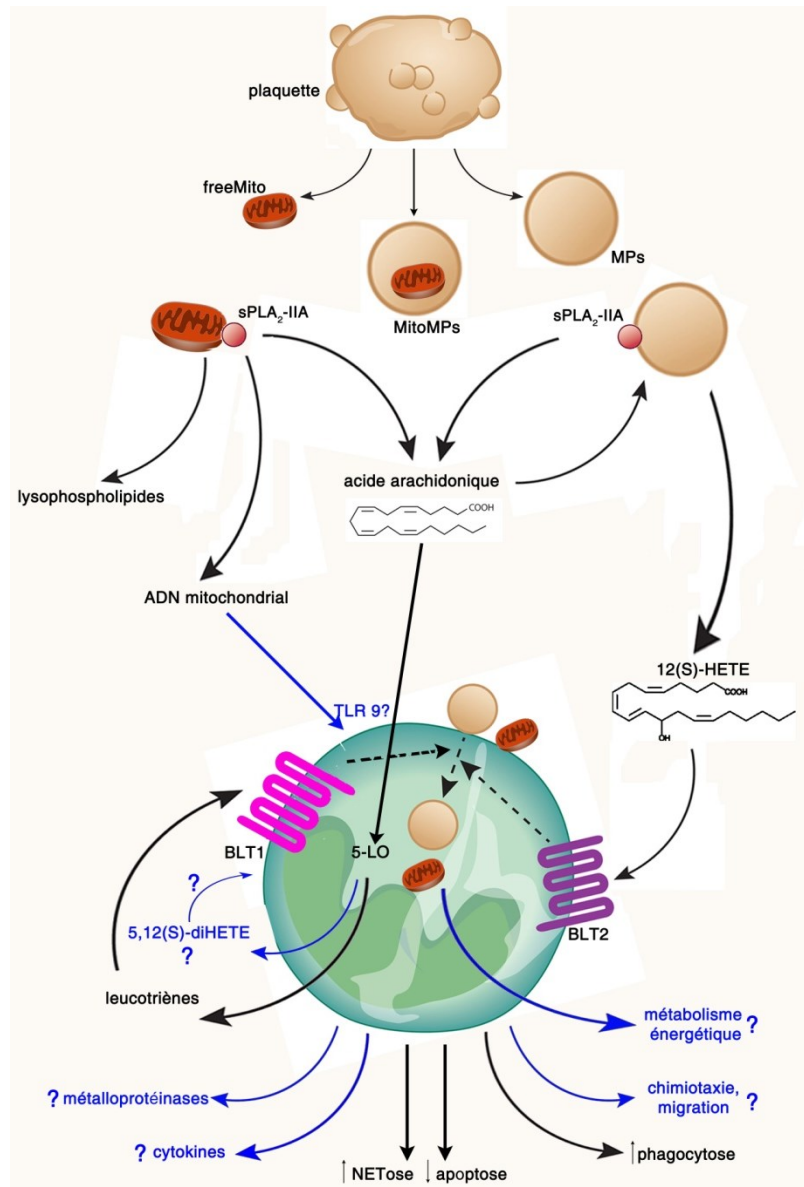


Figure 5.1. Rôle de la sPLA₂-IIA sur les MPs et les freeMitos avec le neutrophile, en condition inflammatoire. Les plaquettes stimulées au collagène libèrent des mitochondries libres (freeMitos), des microparticules contenant des mitochondries (MitoMPs) et des microparticules sans mitochondrie (MPs). La sPLA₂-IIA hydrolyse les freeMitos et libère des lysophospholipides, de l'ADN mitochondrial et de l'AA. La sPLA₂-IIA hydrolyse les MPs et libère de l'AA qui est en retour métabolisé en 12(S)-HETE. Les freeMitos sont internalisées par les neutrophiles, et induisent une production de leucotriènes, de cytokines, de NETs. Les freeMitos internalisées pourraient modifier le métabolisme énergétique des neutrophiles. L'ADN mitochondrial pourrait activer les TLR9 des neutrophiles. Les MPs de plaquettes sont internalisées et induisent une diminution de l'expression de molécules pro-apoptiques, augmente la phagocytose. Les MPs pourraient moduler l'expression des cytokines, des métalloprotéinases, la chimiotaxie et la migration des neutrophiles. Le 12-HETE des MPs pourraient permettre la génération de 5,12(S)-diHETE lequel pourrait avoir une activité sur le neutrophile. Les molécules et fonctions demeurant à déterminer sont écrites en bleu.

Plusieurs fluides biologiques sains ou inflammatoires dont les liquides synoviaux, le sang, la salive et le sperme contiennent des sPLA₂ (IIA, V et X) et des MPs^{96,152,433,508,510} où ces dernières pourraient être un substrat des sPLA₂. Ainsi, dans un contexte où plusieurs sPLA₂ sont présentes, les MPs de plaquette pourraient être internalisées par des cellules exprimant le récepteur BLT₂, telles que les mastocytes, les monocytes, les macrophages, les ECs des vaisseaux sanguins, les ostéoclastes, les lymphocytes et les DCs. Ces cellules sont présentes dans les articulations des patients arthritiques. La majorité d'entre elles (excepté les macrophages, les ostéoclastes et les mastocytes) sont dans la circulation sanguine et pourraient internaliser les MPs de plaquette selon notre modèle dans un contexte inflammatoire. La littérature ne référence pas à l'heure actuelle l'expression de BLT₂ à la surface des FLS. Il est toutefois connu que la sPLA₂-IIA peut se lier aux FLS et être internalisée pour colocaliser avec la vimentine.⁶⁶⁴ La sPLA₂-IIA pourrait alors faire le lien entre les MPs et les FLS puis induire son endocytose (Figure 5-2). Les FLS dans l'AR sécrètent des facteurs de croissance tels que les VEGF notamment qui induisent l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.^{665,666} Le VEGF augmente l'expression de BLT₂ sur les ECs.⁶⁶⁷ D'autres voies d'internalisation des MPs de plaquette par des ECs et les macrophages ont été précédemment découvertes notamment avec Del-1, la lactadhérine et la PS. Les ECs des vaisseaux lymphatiques expriment la podoplanine contrairement aux autres ECs.⁶⁶⁸ La podoplanine est un ligand de CLEC-2 qui est exprimé sur les MPs de plaquettes et qui est aussi impliqué dans les processus de phagocytose.^{435,669} Ainsi les MPs de plaquette pourraient être internalisées par la voie CLEC-2/podoplanine par les ECs des vaisseaux lymphatiques. De manière générale les interactions et internalisations des MPs de plaquette par ces différentes cellules pourraient induire un phénotype pro- ou anti-inflammatoire, via la sécrétion de cytokines, d'eicosanoïdes, de facteurs de croissance et des métalloprotéinases (Figure 5-2).

En somme, mes travaux de thèse ont mis en évidence deux cibles de la sPLA₂-IIA dans les liquides synoviaux arthritiques soit les MPs de plaquettes et freeMitos qui peuvent être internalisées par les neutrophiles. Les freeMitos et les produits issus de leur hydrolyse par la sPLA₂-IIA induisent la sécrétion de LTB₄ et la génération de NETs. Les MPs et leur contenu varié sont internalisés par les neutrophiles via un mécanisme finement régulé

faisant intervenir notamment la sPLA₂-IIA. Considérant que plusieurs types cellulaires pourraient internaliser les MPs de plaquette via le mécanisme mis en évidence dans mes travaux, ces communications intercellulaires pourraient donner lieu au développement de thérapies utilisant les MPs comme des vecteurs de médicaments.

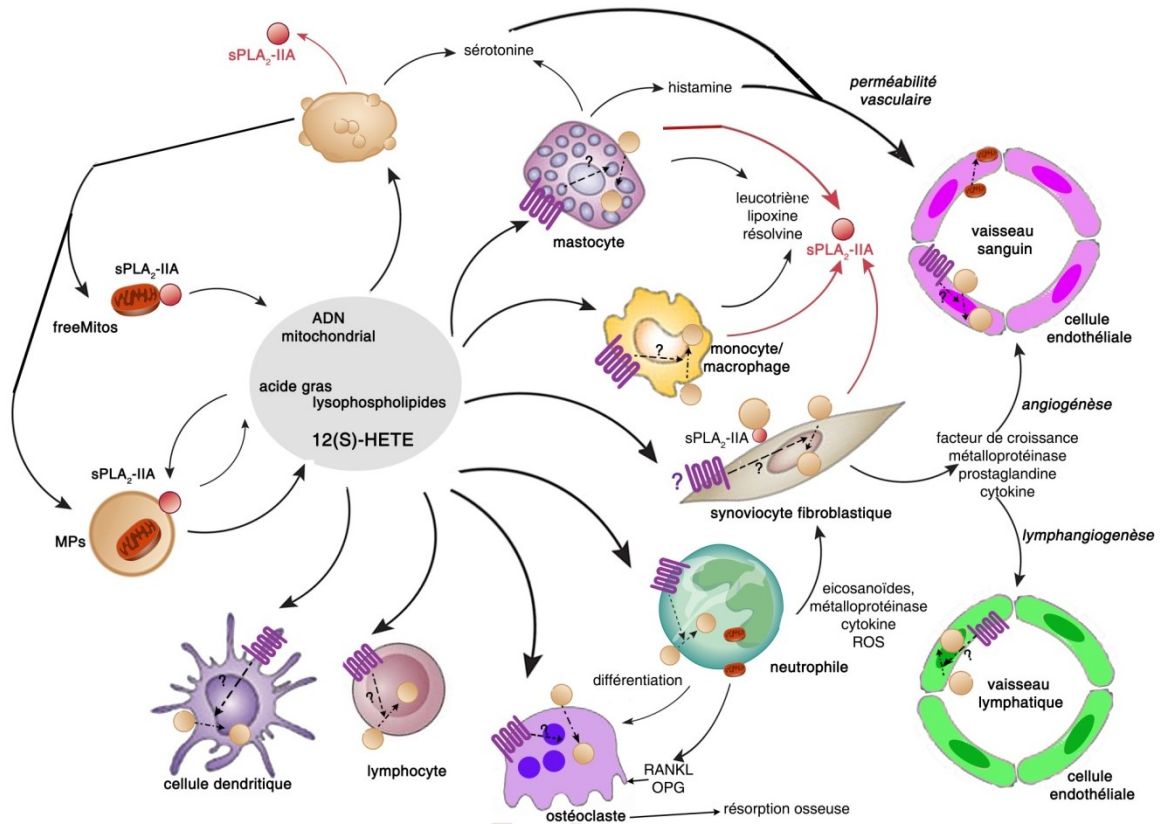


Figure 5.2. Perspectives à long terme sur l’internalisation des MPs via le 12-HETE sur plusieurs types cellulaires. Les plaquettes et les mastocytes peuvent libérer de la sPLA₂-IIA (flèche rose). Les plaquettes activées relâchent des freeMitos et des MPs hydrolysées par la sPLA₂-IIA qui libère notamment de l’ADN mitochondrial et des acides gras qui peuvent être métabolisés en 12-HETE. Les cellules dendritiques, les lymphocytes, les ostéoclastes, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les cellules endothéliales expriment le récepteur BLT₂ (violet) et sont potentiellement sensibles au 12-HETE. Ces cellules pourraient internaliser les MPs de plaquettes en présence de 12-HETE. La littérature ne référence pas d’expression de BLT₂ sur les FLS mais les MPs pourraient être internalisées via la sPLA₂-IIA et l’expression de la vimentine à la surface des FLS arthritiques. D’autre part, toutes ces cellules peuvent être activées par les freeMitos et les MPs, induisant la relâche de molécules bioactives telles que des médiateurs lipidiques, des cytokines et des facteurs de croissance pouvant activer les processus angiogéniques, lymphangiogéniques et de résorption osseuse, connus dans l’arthrite rhumatoïde.

Annexe 1: The diversity of platelet microparticles

Avant-propos

Le Dr Eric Boilard et Dr Alain Brisson ont écrit la revue sur l'hétérogénéité des microparticules de plaquettes et sur les méthodes de détection actuelle des MPs respectivement.

J'ai réalisé la revue de littérature, participé à l'écriture, réalisé la sélection des articles et la création de la figure 1.

Cette revue a été publiée dans le journal Current Opinion in Hematology le 22 septembre 2015.

Abstract

Purpose of review

Platelet microparticles are small extracellular vesicles abundant in blood. The present review will introduce the mechanisms underlying the generation of microparticles, and will describe the diverse microparticle subtypes identified to date. The most appropriate methodologies used to distinguish microparticle subtypes will be also presented.

Recent findings

Both the megakaryocytes and platelets can generate microparticles. Circulating microparticles originating from megakaryocytes are distinguished from those derived from activated platelets by the presence of CD62P, LAMP-1, and immunoreceptor-based activation motif receptors. Close examination of platelet activation has shed light on a novel mechanism leading to microparticle production. Under physiologic flow, microparticles bud off from long membrane strands formed by activated platelets. Furthermore, mounting evidence supports the notion of microparticle heterogeneity. Platelet microparticles are commonly characterized by the expression of surface platelet antigens and phosphatidylserine. In fact, only a fraction of platelet microparticles harbor phosphatidylserine, and a distinct subset contains respiratory-competent mitochondria. During disease, the microparticle surface may undergo posttranslational modifications such as citrullination, further supporting the concept of microparticle diversity.

Summary

An appreciation of the microparticle heterogeneity will support their development as potential biomarkers and may reveal functions unique to each microparticle subtype in health and disease.

Keywords

extracellular vesicles, microparticles, platelets

Introduction

The small vesicles liberated by cells into the extracellular milieu are collectively known as extracellular vesicles. Extracellular vesicles stored in multivesicular bodies (or a-granules in platelets) and released by exocytosis have dimensions ranging between 50 and 150nm and are called exosomes. Extracellular vesicles produced by plasma membrane budding and shedding appear larger (100– 1000 nm) and are called microvesicles. Apoptotic cells also release extracellular vesicles, which are heterogeneous in size (100 nm to 5mm) and are called apoptotic bodies or apoptotic vesicles [1*,2].

The release of extracellular vesicles is a process conserved through evolution, supporting their essential physiological role. Hence, prokaryotic, plant, and eukaryotic cells all produce extracellular vesicles. Extracellular vesicles participate in coagulation, affect vascular function, can play roles in cellular proliferation, and differentiation are involved in inflammation and mediate cell–cell communication [1*]. Microvesicles originating from platelets, erythrocytes, endothelial cells, and leukocytes are present in the blood circulation with those from platelets being the most abundant followed by extracellular vesicles derived from erythrocytes [3**]. Upon activation, platelets are extremely potent at producing microvesicles, which are historically known as microparticles. For this reason, platelet-derived microvesicles are commonly referred to as ‘microparticles,’ and this terminology will be used throughout this review.

Herein, the recent advances in the study of microparticles will be discussed, with emphasis on the diversity of platelet-derived microparticles in health and disease.

Activated platelets as a source of microparticles

The activation of platelets by physiological agonists such as collagen, thrombin, the complement membrane attack complex C5b-9, lipopolysaccharide, immune complexes and viruses, triggers the release of microparticles [4–6]. Platelet storage, cryopreservation, shear stress, and apoptosis were also demonstrated to induce the generation of microparticles [7,8,9**,10]. Using scanning electron microscopy to directly assess platelet activation, Yano et al. observed that microparticle formation principally occurred in the vicinity of the pseudopod terminal of adherent platelets. Loss of cytoskeleton–plasma membrane adhesion and profound cytoskeleton rearrangements are implicated in this process, as the inhibition of actin polymerization impairs formation of pseudopods and the production of microparticles [9**,11]. Recent work also evidenced the contribution of the proteasome in the shedding of platelet microparticles [12*].

Loss of membrane phospholipid asymmetry coincides with microparticle formation [13]. In unactivated platelets, phosphatidylserine is absent from the outer leaflet and is almost uniquely comprised in the inner leaflet of the plasma membrane. Upon activation, a rise in cytosolic calcium via nonselective ion channels and the mitochondrial permeability transition pore, and enzymes such as floppases and scramblase, are involved in the promotion of phosphatidylserine exposure [14–16]. Patients with Scott syndrome are characterized by bleeding disorders because of reduced floppase activity. In these patients, cells show defects in phosphatidylserine exposure and a consistent decrease in microparticle release [16,17]. Although these observations suggest that phosphatidylserine exposure might be necessary for the liberation of microparticles, it does not necessarily preclude the release of phosphatidylserine-negative microparticles. In fact, approximately half of the circulating microparticles do not harbor surface phosphatidylserine [3**].

Recent study of platelets under physiologic flow revealed that activated platelets could form very long membrane strands (up to 250 μ m in length) emerging downstream of the site of platelet adherence [18**]. Mitochondrial calcium efflux, the protease calpain, and disassembly of F-actin and microtubule cytoskeletal proteins are necessary for the formation of these impressive structures built from membranes of the open canalicular system. As these strands harbor surface phosphatidylserine and disintegrate into microparticles, the formation of platelet strands, called flow-induced protrusion, is

suggested to participate in the generation of phosphatidylserine-positive microparticles under physiologic flow [18**].

Platelet activation is a prerequisite in the aforementioned mechanisms leading to microparticle production. Hence, higher concentrations of platelet microparticles have been documented in diseases in which platelets play a role, such as heparin-induced thrombocytopenia, thrombosis, idiopathic thrombocytopenic purpura, sickle cell disease, uremia, cancer, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, antiphospholipid syndrome, and systemic lupus erythematosus [19–31]. Nonetheless, approximately 10^4 platelet microparticles per ml, identified by the presence of CD41 molecules, circulate throughout the blood of healthy individuals [3**]. As CD41+ microparticles are the most abundant in the blood of healthy individuals, this points to constitutive generation of platelet microparticles in vivo, potentially contributing to the maintenance of hemostasis.

Megakaryocytes as a source of microparticles

The mechanisms underlying platelet formation by megakaryocytes have been studied in detail [32]. During platelet formation, cytoplasmic extensions, called proplatelet processes, spread from the megakaryocyte and protrude into the interior of vascular sinusoids. Proplatelets are subsequently released into the blood as either globular proplatelets or as barbell-shaped proplatelets. Close examination of mouse megakaryocytes further revealed that, concomitant with the production of proplatelets, microparticles were generated from micropodia and the cytoplasmic membrane of megakaryocytes [33]. Shear could enhance the production of megakaryocyte-derived microparticles, which were shown to promote hematopoietic stem cell differentiation into megakaryocytes [34*]. Organelles were excluded from these megakaryocyte-derived microparticles, and studies confirmed that they fulfilled the definition of microparticles as their size was limited to less than 1 μ m (0.2–0.5 μ m in diameter), and they expressed canonical ‘platelet’ surface markers CD41, CD42b, glycoprotein VI (GPVI), and phosphatidylserine [33]. These observations suggested that circulating microparticles, originally thought to originate from platelets, might in fact emanate from megakaryocytes.

Platelet-derived versus megakaryocyte-derived microparticles

The demonstration that megakaryocytes could produce copious levels of microparticles sharing important features with those from activated platelets prompted the quest for distinguishing markers. Although microparticles released from activated mouse platelets (using collagen and thrombin as stimuli) maintained CD62P and lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1) expression, these two markers were absent in megakaryocytederived microparticles. Of note was that the majority of the CD41+ microparticles circulating in the blood of healthy mice also lacked expression of CD62P and LAMP-1, suggesting that most circulating microparticles actually originate from megakaryocytes [33]. However, it is currently unknown whether unactivated platelets constitutively shed microparticles into the blood circulation, and if so, whether these microparticles share similarities with microparticles from unactivated megakaryocytes or with those from activated platelets.

Platelet microparticle levels in blood are increased in diseases such as rheumatoid arthritis [28–30]. Thus, a recent study determined whether this increase was because of enhanced production of microparticles from platelets or from megakaryocytes. Platelets express three receptors that signal through immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) [35]: Fc receptor γ IIA (a low affinity receptor for IgG immune complexes); Fc receptor γ chain, which is noncovalently associated with GPVI and is necessary for GPVI function; and the C-type lectin 2 (CLEC2), a receptor for podoplanin. Activation of ITAM receptors induces shedding of GPVI and proteolysis of the ITAM domain of Fc receptor γ IIA, whereas CLEC-2 remains on the cell surface [36**]. Consequently, microparticles induced by platelet activation express CLEC-2 as the unique ITAM receptor. Conversely, megakaryocyte-derived microparticles express both GPVI and CLEC-2. It was found that in rheumatoid arthritis, circulating CD41 β microparticles express CLEC-2, but not GPVI, suggesting that these microparticles were indeed generated from activated platelets during disease [36**]. As platelet microparticles in rheumatoid arthritis were found to express the inflammatory cytokine interleukin-1 β [37], this suggests that circulating platelet microparticles could amplify inflammation systemically.

Phosphatidylserine-expressing and phosphatidylserine non expressing microparticles

Platelet microparticles were originally identified with functional assays, as they could support the coagulation cascade even in the absence of platelets [38]. This procoagulant function of platelets is mediated through the exposure of anionic phosphatidylserine [39]. It has long been assumed that all platelet-derived microparticles expressed surface phosphatidylserine. Although earlier flow cytometric analyses suggested that only a fraction of microparticles expressed phosphatidylserine [13], the recent examination of platelet microparticles present in the plasma of healthy volunteers and in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients convincingly clarified that both microparticle subpopulations exist [39,40]. Using electron microscopy and annexin-V conjugated gold nanobeads (a probe used to recognize phosphatidylserine-expressing microparticles) to directly visualize microparticles, it was found that approximately 50% of the microparticles do not harbor phosphatidylserine [39]. As surface phosphatidylserine-positive microparticles participate in the coagulation process, this suggests that the remaining subpopulation, negative for phosphatidylserine, might play distinct roles, other than the maintenance of primary hemostasis. Furthermore, phosphatidylserine-positive microparticles are rapidly eliminated from the circulation, mainly through binding to the developmental endothelial locus-1 expressed by endothelial cells [41]. Thus, a subset of microparticles may transmit their contents (e.g., microRNA) [42] to endothelial cells through phosphatidylserine recognition, whereas the phosphatidylserine-negative microparticles may circulate in stealth for a longer period of time after their release.

Mitochondria-containing microparticles

As microparticles encapsulate cytoplasm during vesiculation, they represent a means of cellular communication upon internalization by recipient cells. Indeed, the microparticle cargo is vast and is reported to contain cytokines, functional enzymes, messenger RNA, and noncoding RNA originating from platelets [43].

The organelle in charge of oxidative phosphorylation, and the source of energy for the cell, is the mitochondrion. This organelle is implicated in cell death and in the formation of the inflammasome. Platelets contain an average of four mitochondria in the cytoplasm, making them the most important mitochondrial reservoir in the blood stream [99]. Thus, it was hypothesized that activated platelets could release their mitochondria

encapsulated in microparticles. Accordingly, proteomic studies of platelet microparticles, separated on the basis of size using gel filtration chromatography, showed that the larger microparticles contained mitochondrial proteins whereas the smaller microparticles did not [44]. It was recently confirmed that in addition to mitochondria-deficient microparticles, platelets could release mitochondria-containing microparticles. Of particular note is that extracellular mitochondria were shown to be respiratory competent, as they could mediate oxidative phosphorylation [9**]. These observations suggest that upon cellular internalization, mitochondria-containing microparticles might impact the cellular bioenergetics of the recipients. Furthermore, as mitochondria are not present in microparticles shed from megakaryocytes, these findings might provide another means of discriminating between platelet-derived versus megakaryocyte-derived microparticles.

Damaged cells, activated mast cells, neutrophils, and lymphocytes were shown to release free mitochondria (i.e., not encapsulated in microparticles), possibly because of inadequate mitophagy that occurs under activation conditions and potentially in certain diseases [44–47]. This phenomenon appears conserved through cellular lineages, as activated platelets also release free mitochondria [9**]. According to the theory of evolution, mitochondria are thought to be descendants of the primitive Alphaproteobacteria [48]. Thus, the presence of extracellular mitochondria is an important source of damage associated molecular pattern, capable of initiating potent innate immune responses. The identification of extracellular mitochondria in inflammatory synovial fluid and murine lungs in a model of transfusion-induced acute lung injury [9**,49] suggested that platelets could release diverse types of microparticles (including mitochondria) under these conditions, thereby contributing to inflammation. In addition, several studies determined that extracellular mitochondria were abundant in platelet concentrates prepared for transfusion [9**,50,51]. Of clinical relevance is that extracellular mitochondria were present at higher levels in platelet concentrates that had triggered adverse inflammatory reactions in human recipients [9**]. This points to extracellular mitochondria as potent inflammatory mediators, and suggests that they might be used as a biomarker to assess the quality of blood transfusion products.

Surface-modified microparticles

The peptidylarginine deiminase enzyme mediates the modification of arginine into citrulline, a process that occurs during inflammation and notably during NETosis [52]. Citrullination is highly active in rheumatoid arthritis and generates the neo-epitopes for the autoantibodies characteristic of this autoimmune disease. It was found that the majority of the immune complexes present in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients comprised platelet microparticles [40,53]. Platelet microparticles were also present in the synovial fluid of psoriatic arthritis patients, a disease in which limited citrullination occurs, but were not associated with antibodies, pointing to citrullination as a process implicated in the formation of microparticle-containing immune complexes [37,40]. Hence, platelet microparticles were found to be susceptible to citrullination, and surface citrullinated fibrinogen appeared as a relevant factor contributing to the formation of microparticle and autoantibody scaffolds. Of importance was the demonstration that microparticles, once coated with autoantibodies, were highly potent at activating immune cells, possibly through Fc receptors [40]. As NETosis and citrullination processes are highly active in the arthritic joint [52], these suggest that microparticles might undergo citrullination upon accumulation in the diseased tissue. How platelet microparticles egress the blood circulation is unclear, but it was proposed that it might occur through the more permeable vasculature that characterizes the arthritic joint during arthritis [54]. The diverse subtypes of platelet microparticles that have been discussed herein are summarized in Fig. 1.

Electron microscopy to study the diversity of microparticles

The various roles attributed to platelet-derived microparticles (and microparticles from other sources) account for the efforts devoted to the development of efficient and reliable methods allowing their detection, phenotyping, and quantification. The characterization of microparticles is notoriously difficult because of their small size, heterogeneity in size, cell origin, and composition. Microparticles are commonly described as vesicular objects limited by a lipid bilayer ranging in diameter from 50nm to 1µm. However, the structural description of microparticles has recently been revisited by cryo-electron microscopy, an approach that best preserves the native structure of complex objects. Arraud et al. [3**] determined the size distribution of microparticles in plasma, confirming that spherical microparticles ranging in diameter from 50 to 500nm comprised the major population, and

that plasma also contains tubular microparticles and membrane fragments of several micrometers in size. As mentioned above, it was this strategy that demonstrated microparticle heterogeneity with respect to phosphatidylserine exposure; approximately, half of the microparticles were labeled with annexin-V gold nanobeads (Fig. 2). Furthermore, microparticles were shown to present important morphological changes in response to standard isolation and storage procedures, such as microparticle ultracentrifugation and freezing at -80°C [55]. Cryo-electron microscopy provides a unique means of revealing the existence and diversity of individual objects in native biological fluids at nm-resolution, such as nm-sized immune complexes associated with microparticles in synovial fluid in arthritis [40].

Flow cytometry to assess the diversity of microparticles

For more than two decades, flow cytometry has been the primary method used for microparticle characterization. However, it has long been recognized that a lack of standardized methods hampered the comparison of results between studies. Recent important progress has been made in the case of blood-derived microparticles with the identification of the major causes of variability during preanalytical procedures [56], and the development of standardized protocols for microparticle quantification [57]. It is also clear that polystyrene beads were inappropriate size calibration standards for microparticles, predominantly because of differences in refractive index between polystyrene and membrane vesicles [57,58]. This raised the question of the minimal microparticle size that can be detected by conventional flow cytometry based on light scattering. Although most current generation flow cytometers can detect 200-nm polystyrene beads, conclusions from independent studies indicated that the size detection limit for microparticles was approximately 500nm [57,59]. Consequently, as most microparticles are smaller than 400nm [3**], only a minority are detected by conventional flow cytometers. The development of custom-based flow cytometers with improved performances [59,60,61*] is expected to enable the detection of smaller microparticles.

Recent studies presented an alternative approach of flow cytometry, in which microparticles are detected on the basis of a fluorescence signal instead of a light scattering signal [37,40,59,60,62*,63]. The detection of microparticles by fluorescence triggering was introduced almost 30 years ago [4], although it is unclear why this approach fell into disuse.

Microparticles equivalent to 100-nm polymer beads were detected by combining this approach with an original labeling strategy in which a lipophilic fluorophore is incorporated into microparticle membranes [59]. In another study, Arraud et al. quantified the predominant microparticle populations present in plasma, namely those of erythrocyte or platelet origin and microparticles containing phosphatidylserine and showed that approximately 50 times more microparticles are detected by fluorescence-triggering as compared to conventional flow cytometry [62*].

Several studies discussed the possible contribution of coincidence phenomena to microparticle detection [58,60]. Coincidence occurs when several particles that are individually undetectable are simultaneously present in the detection volume, producing false positive results. Coincidence phenomena may occur for microparticle concentrations of the order of $10^{10}/\text{ml}$. The advantage of imaging flow cytometry, a novel technology combining flow cytometry with imaging, was recently demonstrated [64,65]. Using this approach, comigrating entities that would be misinterpreted as double-positive events by flow cytometry can be efficiently discerned. Rousseau et al. [63] demonstrated the possible influence of phospholipidhydrolyzing enzymes, particularly secreted phospholipase A2 found in plasma, in the quantification of microparticles. With regard to other plasma components, for example protein aggregates [66], these enzymes can significantly interfere in the accurate evaluation of microparticles. In summary, significant improvements to the methodologies permitting the detection and characterization of microparticles have been achieved during recent years. When combined with novel technologies like nanoparticle tracking analyses or resistive pulse sensing aimed at investigating smaller microparticles such as exosomes, we anticipate an exponential improvement in the definition of microparticle structure and functions in the near future.

Conclusion

An understanding of microparticle genesis will permit the elucidation of the conditions underlying their generation. Furthermore, an appreciation of microparticle diversity, through detection refinement can shed light on the specific roles played by each subtype in health and disease. Thus, platelet microparticle subtypes are useful diagnostic biomarkers, and with the confirmation of their actual contribution to disease development, they appear to be promising therapeutic targets.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

E.B. is recipient of an award from the Canadian Institutes of Health Research. ACD is recipient of a fellowship from the Canadian Arthritis Network.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

Figures

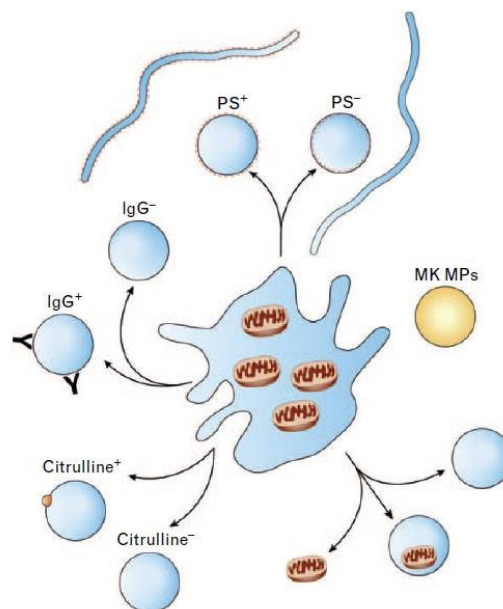


Figure 1. Platelet microparticle subtypes.

On activation, platelets release diverse subtypes of microparticles. Phosphatidylserine (PS) negative (PS-) and PS positive (PS+) microparticles with a spherical structure can be shed from microparticles. Long (micrometer in size) PS+ tubular platelet microparticles have also been identified in blood. Megakaryocytes (MK) efficiently release microparticles sharing similarities with those shed from platelets. MK microparticles (MK MPs) are negative for CD62P and LAMP-1, but present GPVI and CLEC-2, whereas microparticles released from activated platelets express surface CD62P, LAMP-1, and CLEC-2, but do not express GPVI. Platelet mitochondria, which are present into the cytosol, are transferred in microparticles during cytoplasmic membrane budding and shedding, forming a subset of microparticles containing respiratory-competent mitochondria. Another subset of platelet microparticles, not containing any mitochondria, are also shed from activated platelets. Free mitochondria (i.e., not wrapped in microparticles) are also released by activated platelets.

The surface of platelet microparticles can be citrullinated. If antibodies recognizing citrullinated antigens are present, anticitrullinated autoantibodies associate with citrullinated microparticles, forming microparticle-associated immune complexes. Spherical platelet microparticles are also heterogenous in size and vary from 50 nm to 1 μm (size heterogeneity not presented in the scheme). Phosphatidylserine (dashed line); citrullinated proteins (brown).

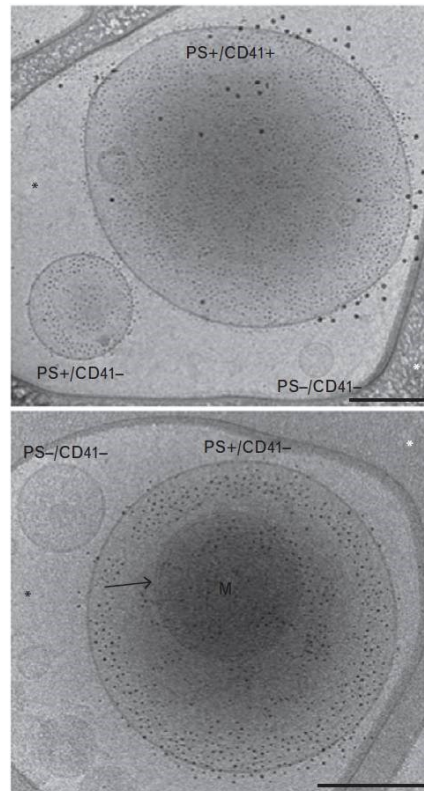


Figure 2. Cryo-electron microscopy (EM) for the assessment of platelet microparticle diversity.

Cryo-EM images of microparticles from thrombin receptor activating peptide-activated platelets. Microparticles exposing the CD41 subunit of αIIbβ3 integrin are labeled with 10-nm gold particles conjugated to anti-CD41A-monoclonal antibody and microparticles exposing PS are labeled with 4-nm gold particles conjugated to annexin-V (Anx5). (Top) Three microparticles (MP) are distinguished, namely PS[±]/CD41[±] MP (labeled with both 4- and 10-nm gold particles), PS[±]/CD41⁻ (labeled only with 4-nm Anx5 gold particles), and PS⁻/CD41⁻ (not labeled). (Bottom) Two MPs are observed. The PS[±]/CD41⁻ MP contains a mitochondrion, clearly identified by its double membrane (arrow) and consistent expected size, close to 200 nm. MPs were embedded in a thin film of frozen plasma (black asterisks) suspended on a carbon film net (white asterisks). Scale bars: 200 nm.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

* of special interest

** of outstanding interest

1.* Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10:356–364.

This important review presents key demonstrations of microparticle involvement in inflammatory diseases.

2. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94:3791–3799.

3.**Arraud N, Linares R, Tan S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 2014; 12:614–627.

This cryo-electron microscopy study reveals the morphological diversity of microparticles in plasma and demonstrates that a large amount of microparticles do not expose phosphatidylserine.

4. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988; 263:18205–18212.

5. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. *J Immunol* 2011; 186:5489–5496.

6. Boilard E, Pare G, Rousseau M, et al. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcgammaRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* 2014; 123:2854–2863.

7. Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, et al. Mechanism of platelet adhesion to vonWillebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107:3537–3545.

8. Johnson L, Reade MC, Hyland RA, et al. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications. *Transfusion* 2014. [Epub ahead of print]

9.** Boudreau LH, Duchez AC, Cloutier N, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* 2014; 124:2173–2183.

This study demonstrates that mitochondria are released from activated platelets. The authors show that the extracellular mitochondria are functional (i.e. respiratory competent) and contain damage-associated molecular patterns. A role for platelet-derived extracellular mitochondria in sterile inflammation and transfusion-induced reaction is proposed.

10. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, et al. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* 2014; 28:155–166.

11. Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, et al. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J* 1994; 299 (Pt 1):303–308.

12.* Gupta N, Li W, Willard B, et al. Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:160–168.

The authors demonstrate for the first time that the inhibition of the proteasome activity is required for efficient platelet activation and microparticle release. Accordingly, proteasome inhibition reduced thrombosis in vivo.

13. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:15–26.

14. Choo HJ, Saafir TB, Mkumba L, et al. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2946–2955.

15. Mattheij NJ, Gilio K, van Kruchten R, et al. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem* 2013; 288:13325–13336.

16. Bettache N, Gaffet P, Allegre N, et al. Impaired redistribution of aminophospholipids with distinctive cell shape change during Ca^{2+} -induced activation of platelets from a patient with Scott syndrome. *Br J Haematol* 1998; 101:50–58.

17. Toti F, Satta N, Fressinaud E, et al. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 1996; 87:1409–1415.

18.** Tersteeg C, Heijnen HF, Eckly A, et al. FFlow-induced PRotrusions (FLIPRs): a platelet-derived platform for the retrieval of microparticles by monocytes and neutrophils. *Circ Res* 2014; 114:780–791.

This elegant study shed light on a novel mechanism leading to the genesis of plateletmicroparticles. The authors observed long membrane strands forming from activated platelets under physiologic flow conditions, that they called flow-induced protrusions (FLIPR). They found that phosphatidylserine positive microparticles emanated from FLIPRs.

19. Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, et al. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96:188–194.

20. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104:2649–2652.

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

22. Connor DE, Ma DD, Joseph JE. Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb Res* 2013; 132:572–577.

23. Nebor D, Bowers A, Connes P, et al. Plasma concentration of platelet-derived microparticles is related to painful vaso-occlusive phenotype severity in sickle cell anemia. *PLoS One* 2014; 9:e87243.

24. Kasar M, Boga C, Yeral M, et al. Clinical significance of circulating blood and endothelial cell microparticles in sickle-cell disease. *J Thromb Thrombolysis* 2014; 38:167–175.

25. Ando M, Iwata A, Ozeki Y, et al. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int* 2002; 62:1757–1763.

26. Varon D, Hayon Y, Dashevsky O, Shai E. Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration. *Thromb Res* 2012; 130 (Suppl 1):S98–S99.

27. Sheremata WA, Jy W, Horstman LL, et al. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2008; 5:27.
 28. Sellam J, Proulle V, Jungel A, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:R156.
 29. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1498–1503.
 30. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:534–542.
 31. Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, et al. Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations. *Thromb Res* 2015; 135:102–108.
 32. Hartwig J, Italiano J Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1580–1586.
 33. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009; 113:1112–1121.
 - 34.* Jiang J, Woulfe DS, Papoutsakis ET. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood* 2014; 124:2094–2103.
- In this study, the authors demonstrate that shear stress enhances formation of megakaryocyte-derived microparticles (mkMP). Of importance, these mkMPs could stimulate differentiation of stem cells into megakaryocytes, independently of thrombopoietin. This study further confirms that megakaryocytes shed microparticles, and identifies a function for them.
35. Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res* 2014; 114:1174–1184.
 - 36.** Gitz E, Pollitt AY, Gitz-Francois JJ, et al. CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood* 2014; 124:2262–2270.

This study contains very interesting data on ITAM expression on platelet-derived versus megakaryocyte-derived microparticles. It shows for the first time that most circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients originate from platelets, not from megakaryocytes.

37. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327:580–583.

38. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13:269–288.

39. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011; 108:1284–1297.

7. Bibliographie

- 1 McGavin, D. D. *et al.* Episcleritis and scleritis. A study of their clinical manifestations and association with rheumatoid arthritis. *The British journal of ophthalmology* **60**, 192-226 (1976).
- 2 Scott, D. G., Bacon, P. A. & Tribe, C. R. Systemic rheumatoid vasculitis: a clinical and laboratory study of 50 cases. *Medicine* **60**, 288-297 (1981).
- 3 Sokoloff, L. & Bunim, J. J. Vascular lesions in rheumatoid arthritis. *Journal of chronic diseases* **5**, 668-687 (1957).
- 4 Turesson, C. & Jacobsson, L. T. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **33**, 65-72 (2004).
- 5 Turesson, C. & Matteson, E. L. Management of extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* **16**, 206-211 (2004).
- 6 Isomaki, H. A., Hakulinen, T. & Joutsenlahti, U. Excess risk of lymphomas, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of chronic diseases* **31**, 691-696 (1978).
- 7 Herrinton, L. J., Liu, L., Shoor, S. & Mines, D. Risk of lymphoproliferative cancer among patients with severe rheumatoid arthritis, 1996-2002. *Annals of the rheumatic diseases* **67**, 574-575, doi:10.1136/ard.2007.075986 (2008).
- 8 Gabriel, S. E. & Crowson, C. S. Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* **24**, 171-176, doi:10.1097/BOR.0b013e32834ff2fd (2012).
- 9 Strand, V., Kimberly, R. & Isaacs, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 75-92, doi:10.1038/nrd2196 (2007).
- 10 Bowes, J. & Barton, A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 399-402, doi:10.1093/rheumatology/ken005 (2008).
- 11 Strietholt, S., Maurer, B., Peters, M. A., Pap, T. & Gay, S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**, 219, doi:10.1186/ar2500 (2008).
- 12 Cutolo, M. *et al.* Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **966**, 131-142 (2002).
- 13 Edwards, C. J. & Cooper, C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **143**, 1-5, doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02940.x (2006).
- 14 Kobayashi, S., Momohara, S., Kamatani, N. & Okamoto, H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *The FEBS journal* **275**, 4456-4462, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06581.x (2008).
- 15 Ahmed, S. A. *et al.* Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environmental health perspectives* **107 Suppl 5**, 681-686 (1999).
- 16 Herrera, B. M. *et al.* Multiple sclerosis susceptibility and the X chromosome. *Mult Scler* **13**, 856-864, doi:10.1177/1352458507076961 (2007).
- 17 Libert, C., Dejager, L. & Pinheiro, I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature reviews. Immunology* **10**, 594-604, doi:10.1038/nri2815 (2010).
- 18 Silman, A. J. *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *British journal of rheumatology* **32**, 903-907 (1993).

- 19 Gebe, J. A. *et al.* T cell selection and differential activation on structurally related HLA-DR4 ligands. *J Immunol* **167**, 3250-3256 (2001).
- 20 Walser-Kuntz, D. R., Weyand, C. M., Weaver, A. J., O'Fallon, W. M. & Goronzy, J. J. Mechanisms underlying the formation of the T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Immunity* **2**, 597-605 (1995).
- 21 Zanelli, E., Breedveld, F. C. & de Vries, R. R. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology (Oxford)* **39**, 1060-1066 (2000).
- 22 Roudier, J., Petersen, J., Rhodes, G. H., Luka, J. & Carson, D. A. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5104-5108 (1989).
- 23 Kochi, Y. *et al.* A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature genetics* **37**, 478-485, doi:10.1038/ng1540 (2005).
- 24 Plenge, R. M. *et al.* Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *American journal of human genetics* **77**, 1044-1060, doi:10.1086/498651 (2005).
- 25 Suzuki, A. *et al.* Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nature genetics* **40**, 1224-1229, doi:10.1038/ng.205 (2008).
- 26 Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376-381, doi:10.1038/nature12873 (2014).
- 27 Hart, J. E. *et al.* Ambient air pollution exposures and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis care & research* **65**, 1190-1196, doi:10.1002/acr.21975 (2013).
- 28 Hart, J. E., Laden, F., Puett, R. C., Costenbader, K. H. & Karlson, E. W. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environmental health perspectives* **117**, 1065-1069, doi:10.1289/ehp.0800503 (2009).
- 29 Hazes, J. M., Dijkmans, B. A., Vandenbroucke, J. P., de Vries, R. R. & Cats, A. Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption. *Annals of the rheumatic diseases* **49**, 980-982 (1990).
- 30 Mikuls, T. R. *et al.* Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis and rheumatism* **46**, 83-91, doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<83::AID-ART10042>3.0.CO;2-D (2002).
- 31 Stolt, P. *et al.* Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 1072-1076, doi:10.1136/ard.2009.114694 (2010).
- 32 Linos, A. *et al.* Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *The American journal of clinical nutrition* **70**, 1077-1082 (1999).
- 33 Shapiro, J. A. *et al.* Diet and rheumatoid arthritis in women: a possible protective effect of fish consumption. *Epidemiology* **7**, 256-263 (1996).
- 34 Scher, J. U. & Abramson, S. B. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **7**, 569-578, doi:10.1038/nrrheum.2011.121 (2011).
- 35 Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 313-323, doi:10.1038/nri2515 (2009).
- 36 Chervonsky, A. V. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nature immunology* **11**, 28-35, doi:10.1038/ni.1801 (2010).

- 37 Scher, J. U. *et al.* Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **64**, 3083-3094, doi:10.1002/art.34539 (2012).
- 38 Scher, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife* **2**, e01202, doi:10.7554/eLife.01202 (2013).
- 39 Wu, H. J. *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **32**, 815-827, doi:10.1016/j.immuni.2010.06.001 (2010).
- 40 Gomez, A. *et al.* Loss of sex and age driven differences in the gut microbiome characterize arthritis-susceptible 0401 mice but not arthritis-resistant 0402 mice. *PLoS one* **7**, e36095, doi:10.1371/journal.pone.0036095 (2012).
- 41 Arvikar, S. L. *et al.* Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **15**, R109, doi:10.1186/ar4289 (2013).
- 42 Costenbader, K. H. & Karlson, E. W. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res Ther* **8**, 204, doi:10.1186/ar1893 (2006).
- 43 Newkirk, M. M., Watanabe Duffy, K. N., Leclerc, J., Lambert, N. & Shiroky, J. B. Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus-6 in patients with rheumatoid arthritis with or without Sjogren's syndrome. *British journal of rheumatology* **33**, 317-322 (1994).
- 44 Kerr, J. R. Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Annals of the rheumatic diseases* **59**, 672-683 (2000).
- 45 Zhang, L. *et al.* Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **36**, 1080-1086 (1993).
- 46 Isaacs, J. D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nature reviews. Immunology* **10**, 605-611, doi:10.1038/nri2804 (2010).
- 47 Klareskog, L., Catrina, A. I. & Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **373**, 659-672, doi:10.1016/S0140-6736(09)60008-8 (2009).
- 48 Rangel-Moreno, J. *et al.* Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* **116**, 3183-3194, doi:10.1172/JCI28756 (2006).
- 49 de Pablo, P., Chapple, I. L., Buckley, C. D. & Dietrich, T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology* **5**, 218-224, doi:10.1038/nrrheum.2009.28 (2009).
- 50 Ospelt, C. *et al.* Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis and rheumatism* **58**, 3684-3692, doi:10.1002/art.24140 (2008).
- 51 Roelofs, M. F. *et al.* The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2313-2322, doi:10.1002/art.21278 (2005).
- 52 Sacre, S. M. *et al.* The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology* **170**, 518-525, doi:10.2353/ajpath.2007.060657 (2007).
- 53 Arend, W. P. & Firestein, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nature reviews. Rheumatology* **8**, 573-586, doi:10.1038/nrrheum.2012.134 (2012).
- 54 Vossenaar, E. R. *et al.* Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 2489-2500, doi:10.1002/art.11229 (2003).
- 55 Darrah, E., Rosen, A., Giles, J. T. & Andrade, F. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in

- rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **71**, 92-98, doi:10.1136/ard.2011.151712 (2012).
- 56 Chang, X. *et al.* Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 40-50, doi:10.1093/rheumatology/keh414 (2005).
- 57 Foulquier, C. *et al.* Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis and rheumatism* **56**, 3541-3553, doi:10.1002/art.22983 (2007).
- 58 Nakashima, K., Hagiwara, T. & Yamada, M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49562-49568, doi:10.1074/jbc.M208795200 (2002).
- 59 Kinloch, A. *et al.* Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **7**, R1421-1429, doi:10.1186/ar1845 (2005).
- 60 Girbal-Neuhauser, E. *et al.* The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* **162**, 585-594 (1999).
- 61 Chang, X. *et al.* Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 1374-1382, doi:10.1093/rheumatology/kei023 (2005).
- 62 Harlow, L. *et al.* Identification of citrullinated hsp90 isoforms as novel autoantigens in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Arthritis and rheumatism* **65**, 869-879, doi:10.1002/art.37881 (2013).
- 63 Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* **6**, R142-150, doi:10.1186/ar1149 (2004).
- 64 Suzuki, A. *et al.* Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications* **333**, 418-426, doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.137 (2005).
- 65 Burkhardt, H. *et al.* Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *European journal of immunology* **35**, 1643-1652, doi:10.1002/eji.200526000 (2005).
- 66 Masson-Bessiere, C. *et al.* The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* **166**, 4177-4184 (2001).
- 67 Pratesi, F. *et al.* Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Annals of the rheumatic diseases* **73**, 1414-1422, doi:10.1136/annrheumdis-2012-202765 (2014).
- 68 Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1853-1862, doi:10.1084/jem.20100239 (2010).
- 69 Reynisdottir, G. *et al.* Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* **66**, 31-39, doi:10.1002/art.38201 (2014).
- 70 Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine* **5**, 178ra140, doi:10.1126/scitranslmed.3005580 (2013).
- 71 von Kockritz-Blickwede, M. *et al.* Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* **111**, 3070-3080, doi:10.1182/blood-2007-07-104018 (2008).

- 72 Blass, S. *et al.* The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **44**, 761-771, doi:10.1002/1529-0131(200104)44:4<761::AID-ANR132>3.0.CO;2-S (2001).
- 73 Burkhardt, H. *et al.* Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis and rheumatism* **46**, 2339-2348, doi:10.1002/art.10472 (2002).
- 74 Matsumoto, I. *et al.* Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis and rheumatism* **48**, 944-954, doi:10.1002/art.10898 (2003).
- 75 Rantapaa-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 2741-2749, doi:10.1002/art.11223 (2003).
- 76 Verpoort, K. N. *et al.* Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis and rheumatism* **54**, 3799-3808, doi:10.1002/art.22279 (2006).
- 77 Nielen, M. M. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism* **50**, 380-386, doi:10.1002/art.20018 (2004).
- 78 Gillis, C., Gouel-Cheron, A., Jonsson, F. & Bruhns, P. Contribution of Human FcγR3s to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Frontiers in immunology* **5**, 254, doi:10.3389/fimmu.2014.00254 (2014).
- 79 Nieto, A. *et al.* Involvement of FcγR3A genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **43**, 735-739, doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<735::AID-ANR3>3.0.CO;2-Q (2000).
- 80 Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* **8**, 34-47, doi:10.1038/nri2206 (2008).
- 81 Takai, T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 580-592, doi:10.1038/nri856 (2002).
- 82 Schumacher, H. R., Jr. Synovial membrane and fluid morphologic alterations in early rheumatoid arthritis: microvascular injury and virus-like particles. *Annals of the New York Academy of Sciences* **256**, 39-64 (1975).
- 83 Schumacher, H. R. The microvasculature of the synovial membrane of the monkey: ultrastructural studies. *Arthritis and rheumatism* **12**, 387-404 (1969).
- 84 Simkin, P. A. & Bassett, J. E. Pathways of microvascular permeability in the synovium of normal and diseased human knees. *The Journal of rheumatology* **38**, 2635-2642, doi:10.3899/jrheum.110785 (2011).
- 85 Binstadt, B. A. *et al.* Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nature immunology* **7**, 284-292, doi:10.1038/ni1306 (2006).
- 86 Kushner, I. & Somerville, J. A. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. *Arthritis and rheumatism* **14**, 560-570 (1971).
- 87 Nigrovic, P. A. *et al.* C5a receptor enables participation of mast cells in immune complex arthritis independently of Fcγ receptor modulation. *Arthritis and rheumatism* **62**, 3322-3333, doi:10.1002/art.27659 (2010).
- 88 Cole, Z. A., Clough, G. F. & Church, M. K. Inhibition by glucocorticoids of the mast cell-dependent weal and flare response in human skin in vivo. *British journal of pharmacology* **132**, 286-292, doi:10.1038/sj.bjp.0703789 (2001).

- 89 Cloutier, N. *et al.* Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* **120**, 1334-1343, doi:10.1182/blood-2012-02-413047 (2012).
- 90 Braun, M. & Schror, K. Prostaglandin D2 relaxes bovine coronary arteries by endothelium-dependent nitric oxide-mediated cGMP formation. *Circulation research* **71**, 1305-1313 (1992).
- 91 Zarbock, A. *et al.* Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). *J Immunol* **183**, 4715-4722, doi:10.4049/jimmunol.0802592 (2009).
- 92 Thureson-Klein, A., Hedqvist, P. & Lindbom, L. Leukocyte diapedesis and plasma extravasation after leukotriene B4: lack of structural injury to the endothelium. *Tissue & cell* **18**, 1-12 (1986).
- 93 Terano, T., Salmon, J. A. & Moncada, S. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B5. *Prostaglandins* **27**, 217-232 (1984).
- 94 Chan, C. C. & Ford-Hutchinson, A. Effects of synthetic leukotrienes on local blood flow and vascular permeability in porcine skin. *The Journal of investigative dermatology* **84**, 154-157 (1985).
- 95 Boilard, E., Blanco, P. & Nigrovic, P. A. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature reviews. Rheumatology* **8**, 534-542, doi:10.1038/nrrheum.2012.118 (2012).
- 96 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:327/5965/580 [pii] 10.1126/science.1181928 (2010).
- 97 Beyer, C. & Pisetsky, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology* **6**, 21-29, doi:10.1038/nrrheum.2009.229 (2010).
- 98 Cloutier, N. *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* **5**, 235-249, doi:10.1002/emmm.201201846 (2013).
- 99 Snir, O. *et al.* Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism* **62**, 44-52, doi:10.1002/art.25036 (2010).
- 100 Okroj, M., Heinegard, D., Holmdahl, R. & Blom, A. M. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of medicine* **39**, 517-530, doi:10.1080/07853890701477546 (2007).
- 101 Trouw, L. A. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis and rheumatism* **60**, 1923-1931, doi:10.1002/art.24622 (2009).
- 102 Banda, N. K., Takahashi, K., Wood, A. K., Holers, V. M. & Arend, W. P. Pathogenic complement activation in collagen antibody-induced arthritis in mice requires amplification by the alternative pathway. *J Immunol* **179**, 4101-4109 (2007).
- 103 Morgan, B. P., Daniels, R. H. & Williams, B. D. Measurement of terminal complement complexes in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **73**, 473-478 (1988).
- 104 Swaak, A. J. *et al.* An analysis of the levels of complement components in the synovial fluid in rheumatic diseases. *Clinical rheumatology* **6**, 350-357 (1987).
- 105 Brodeur, J. P., Ruddy, S., Schwartz, L. B. & Moxley, G. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **34**, 1531-1537 (1991).

- 106 Hogasen, K. *et al.* Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in
rheumatoid arthritis synovial fluid. *The Journal of rheumatology* **22**, 24-28 (1995).
- 107 Hunder, G. G., McDuffie, F. C. & Mullen, B. J. Activation of complement components C3 and
factor B in synovial fluids. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **89**, 160-171
(1977).
- 108 Neumann, E. *et al.* Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis
synovium. *Arthritis and rheumatism* **46**, 934-945 (2002).
- 109 Berckmans, R. J. *et al.* Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine
and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther* **7**, R536-544, doi:ar1706 [pii]
10.1186/ar1706 (2005).
- 110 McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature*
reviews. Immunology **7**, 429-442, doi:nri2094 [pii] 10.1038/nri2094 (2007).
- 111 Burmester, G. R., Feist, E. & Dorer, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid
arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 77-88, doi:10.1038/nrrheum.2013.168 (2014).
- 112 Koch, A. E. *et al.* Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J*
Immunol **147**, 2187-2195 (1991).
- 113 Tan, P. L., Familoe, S., Yeoman, S. & Watson, J. D. Expression of the interleukin 6 gene in
rheumatoid synovial fibroblasts. *The Journal of rheumatology* **17**, 1608-1612 (1990).
- 114 Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid
arthritis. *Immunological reviews* **233**, 233-255, doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
(2010).
- 115 Lund-Olesen, K. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis and rheumatism* **13**, 769-776
(1970).
- 116 Giatromanolaki, A. *et al.* Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in
rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **5**, R193-201, doi:10.1186/ar756
(2003).
- 117 Hollander, A. P., Corke, K. P., Freemont, A. J. & Lewis, C. E. Expression of hypoxia-
inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for
targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1540-1544,
doi:10.1002/1529-0131(200107)44:7<1540::AID-ART277>3.0.CO;2-7 (2001).
- 118 Brouwer, E. *et al.* Hypoxia inducible factor-1-alpha (HIF-1alpha) is related to both
angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental*
rheumatology **27**, 945-951 (2009).
- 119 Inoue, H. *et al.* An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by
interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and
rheumatoid arthritis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine*
Research Society ... [et al.] **50**, 65-72 (2001).
- 120 Kumkumian, G. K. *et al.* Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid
arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase
transcription. *J Immunol* **143**, 833-837 (1989).
- 121 Ahn, J. K. *et al.* Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-
8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* **47**,
834-839, doi:10.1093/rheumatology/ken086 (2008).

- 122 Hitchon, C. *et al.* Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* **46**, 2587-2597, doi:10.1002/art.10520 (2002).
- 123 Lee, Y. A. *et al.* Synovial proliferation differentially affects hypoxia in the joint cavities of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clinical rheumatology* **26**, 2023-2029, doi:10.1007/s10067-007-0605-2 (2007).
- 124 Polzer, K. *et al.* Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Annals of the rheumatic diseases* **67**, 1610-1616, doi:10.1136/ard.2007.083394 (2008).
- 125 Sholley, M. M., Ferguson, G. P., Seibel, H. R., Montour, J. L. & Wilson, J. D. Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **51**, 624-634 (1984).
- 126 Nagashima, M., Yoshino, S., Ishiwata, T. & Asano, G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **22**, 1624-1630 (1995).
- 127 Nagy, J. A. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* **196**, 1497-1506 (2002).
- 128 Lotz, M. & Guerne, P. A. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *The Journal of biological chemistry* **266**, 2017-2020 (1991).
- 129 Chakravarti, A., Raquil, M. A., Tessier, P. & Poubelle, P. E. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* **114**, 1633-1644, doi:10.1182/blood-2008-09-178301 (2009).
- 130 Poubelle, P. E., Chakravarti, A., Fernandes, M. J., Doiron, K. & Marceau, A. A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther* **9**, R25, doi:10.1186/ar2137 (2007).
- 131 Shigeyama, Y. *et al.* Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **43**, 2523-2530, doi:10.1002/1529-0131(200011)43:11<2523::AID-ANR20>3.0.CO;2-Z (2000).
- 132 Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics* **4**, 638-649, doi:10.1038/nrg1122 (2003).
- 133 Borgeat, P. & Samuelsson, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3213-3217 (1979).
- 134 Krump, E., Pouliot, M., Naccache, P. H. & Borgeat, P. Leukotriene synthesis in calcium-depleted human neutrophils: arachidonic acid release correlates with calcium influx. *The Biochemical journal* **310** (Pt 2), 681-688 (1995).
- 135 Nah, S. S. *et al.* Epidermal growth factor increases prostaglandin E2 production via ERK1/2 MAPK and NF-kappaB pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* **30**, 443-449, doi:10.1007/s00296-009-0976-6 (2010).
- 136 Reilly, I. A., Doran, J. B., Smith, B. & FitzGerald, G. A. Increased thromboxane biosynthesis in a human preparation of platelet activation: biochemical and functional consequences of selective inhibition of thromboxane synthase. *Circulation* **73**, 1300-1309 (1986).

- 137 St-Onge, M. *et al.* Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, 1235-1245, doi:S1388-1981(07)00146-1 [pii] 10.1016/j.bbaliip.2007.06.002 (2007).
- 138 Romano, M. *et al.* Lipoxin synthase activity of human platelet 12-lipoxygenase. *The Biochemical journal* **296 (Pt 1)**, 127-133 (1993).
- 139 Giera, M. *et al.* Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochimica et biophysica acta* **1821**, 1415-1424, doi:10.1016/j.bbaliip.2012.07.011 (2012).
- 140 Lee, Y. H. *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in rheumatoid arthritis synovium. *Journal of Korean medical science* **15**, 88-92 (2000).
- 141 Gheorghe, K. R. *et al.* Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids. *Arthritis Res Ther* **11**, R83, doi:10.1186/ar2717 (2009).
- 142 Sturge, R. A. *et al.* Prostaglandin production in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **37**, 315-320 (1978).
- 143 Bombardieri, S. *et al.* The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *British journal of pharmacology* **73**, 893-901 (1981).
- 144 Klickstein, L. B., Shapleigh, C. & Goetzi, E. J. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *The Journal of clinical investigation* **66**, 1166-1170, doi:10.1172/JCI109947 (1980).
- 145 Davidson, E. M., Rae, S. A. & Smith, M. J. Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **42**, 677-679 (1983).
- 146 Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* **8**, 349-361, doi:10.1038/nri2294 (2008).
- 147 Lerner, R., Heimburger, M. & Palmblad, J. Lipoxin A4 induces hyperadhesiveness in human endothelial cells for neutrophils. *Blood* **82**, 948-953 (1993).
- 148 Lee, T. H., Lympny, P., Crea, A. E. & Spur, B. W. Inhibition of leukotriene B4-induced neutrophil migration by lipoxin A4: structure-function relationships. *Biochemical and biophysical research communications* **180**, 1416-1421 (1991).
- 149 Hasturk, H. *et al.* RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 401-403, doi:10.1096/fj.05-4724fje (2006).
- 150 Haas-Stapleton, E. J. *et al.* *Candida albicans* modulates host defense by biosynthesizing the pro-resolving mediator resolvin E1. *PloS one* **2**, e1316, doi:10.1371/journal.pone.0001316 (2007).
- 151 Serhan, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology* **177**, 1576-1591, doi:10.2353/ajpath.2010.100322 (2010).
- 152 Boilard, E. *et al.* A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol Med* **2**, 172-187, doi:10.1002/emmm.201000072 (2010).

- 153 Jamal, O. S. *et al.* Increased expression of human type IIa secretory phospholipase A2 antigen in arthritic synovium. *Annals of the rheumatic diseases* **57**, 550-558 (1998).
- 154 Masuda, S. *et al.* Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells. *The FEBS journal* **272**, 655-672, doi:EJB4489 [pii] 10.1111/j.1742-4658.2004.04489.x (2005).
- 155 Seilhamer, J. J. *et al.* Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *The Journal of biological chemistry* **264**, 5335-5338 (1989).
- 156 Pruzanski, W. *et al.* Enzymatic activity and immunoreactivity of extracellular phospholipase A2 in inflammatory synovial fluids. *Inflammation* **16**, 451-457 (1992).
- 157 Pruzanski, W., Vadas, P., Stefanski, E. & Urowitz, M. B. Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *The Journal of rheumatology* **12**, 211-216 (1985).
- 158 Kosinska, M. K. *et al.* A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis and rheumatism* **65**, 2323-2333, doi:10.1002/art.38053 (2013).
- 159 O'Connor, J. P., Manigrasso, M. B., Kim, B. D. & Subramanian, S. Fracture healing and lipid mediators. *BoneKEy reports* **3**, 517, doi:10.1038/bonekey.2014.12 (2014).
- 160 Korganow, A. S. *et al.* From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**, 451-461, doi:S1074-7613(00)80045-X [pii] (1999).
- 161 Kouskoff, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811-822, doi:S0092-8674(00)81989-3 [pii] (1996).
- 162 van den Berg, W. B. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther* **11**, 250, doi:10.1186/ar2803 (2009).
- 163 Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. & Mathis, D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**, 1732-1735 (1999).
- 164 Mangialaio, S. *et al.* The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis. *Arthritis and rheumatism* **42**, 2517-2523, doi:10.1002/1529-0131(199912)42:12<2517::AID-ANR3>3.0.CO;2-W (1999).
- 165 Ditzel, H. J. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends in molecular medicine* **10**, 40-45 (2004).
- 166 Maccioni, M. *et al.* Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1071-1077 (2002).
- 167 Wipke, B. T. & Allen, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* **167**, 1601-1608 (2001).
- 168 Lee, D. M. *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* **297**, 1689-1692, doi:10.1126/science.1073176 (2002).
- 169 Lee, D. M. *et al.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* **315**, 1006-1010, doi:10.1126/science.1137306 (2007).
- 170 Chang, S. K. *et al.* Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8402-8407, doi:10.1073/pnas.1019437108 (2011).
- 171 Boilard, E. *et al.* Platelets participate in synovitis via Cox-1-dependent synthesis of prostacyclin independently of microparticle generation. *J Immunol* **186**, 4361-4366, doi:10.4049/jimmunol.1002857 (2011).

- 172 Ji, H. *et al.* Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced
arthritis. *The Journal of experimental medicine* **196**, 77-85 (2002).
- 173 Iwanami, K. *et al.* Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction
of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis and rheumatism* **58**, 754-763,
doi:10.1002/art.23222 (2008).
- 174 Abdollahi-Roodsaz, S. *et al.* Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in
autoimmune destructive arthritis. *Arthritis and rheumatism* **56**, 2957-2967,
doi:10.1002/art.22848 (2007).
- 175 Alzabin, S. *et al.* Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-
induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance. *Arthritis Res Ther*
14, R142, doi:10.1186/ar3875 (2012).
- 176 Choe, J. Y., Crain, B., Wu, S. R. & Corr, M. Interleukin 1 receptor dependence of serum
transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *The Journal of
experimental medicine* **197**, 537-542 (2003).
- 177 Ji, H. *et al.* Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**, 157-
168 (2002).
- 178 Sacre, S. M. *et al.* Inhibitors of TLR8 reduce TNF production from human rheumatoid
synovial membrane cultures. *J Immunol* **181**, 8002-8009 (2008).
- 179 Tamaki, Y. *et al.* Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid
synovitis. *The Journal of rheumatology* **38**, 810-820, doi:10.3899/jrheum.100732 (2011).
- 180 Solomon, S. *et al.* Transmission of antibody-induced arthritis is independent of complement
component 4 (C4) and the complement receptors 1 and 2 (CD21/35). *European journal of
immunology* **32**, 644-651, doi:10.1002/1521-4141(200203)32:3<644::AID-
IMMU644>3.0.CO;2-5 (2002).
- 181 Chen, M. *et al.* Predominance of cyclooxygenase 1 over cyclooxygenase 2 in the generation
of proinflammatory prostaglandins in autoantibody-driven K/BxN serum-transfer arthritis.
Arthritis and rheumatism **58**, 1354-1365, doi:10.1002/art.23453 (2008).
- 182 Chen, M. *et al.* Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *The
Journal of experimental medicine* **203**, 837-842, doi:jem.20052371 [pii]
10.1084/jem.20052371 (2006).
- 183 Kronke, G. *et al.* 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis.
J Immunol **183**, 3383-3389, doi:10.4049/jimmunol.0900327 (2009).
- 184 Mathis, S. P., Jala, V. R., Lee, D. M. & Haribabu, B. Nonredundant roles for leukotriene B4
receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *J Immunol* **185**, 3049-3056,
doi:10.4049/jimmunol.1001031 (2010).
- 185 Kim, N. D., Chou, R. C., Seung, E., Tager, A. M. & Luster, A. D. A unique requirement for the
leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *The Journal
of experimental medicine* **203**, 829-835, doi:10.1084/jem.20052349 (2006).
- 186 Hegen, M. *et al.* Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-
induced arthritis. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1297-1302,
doi:10.1084/jem.20030016 (2003).
- 187 Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A. & Finch, C. A. Neutrophil kinetics in man.
The Journal of clinical investigation **58**, 705-715, doi:10.1172/JCI108517 (1976).
- 188 Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days.
Blood **116**, 625-627, doi:10.1182/blood-2010-01-259028 (2010).

- 189 Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* **7**, 678-689, doi:10.1038/nri2156 (2007).
- 190 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 191 McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* **330**, 362-366, doi:10.1126/science.1195491 (2010).
- 192 Nagata, S., Glovsky, M. M. & Kunkel, S. L. Anaphylatoxin-induced neutrophil chemotaxis and aggregation. Limited aggregation and specific desensitization induced by human C3a and synthetic C3a octapeptides. *International archives of allergy and applied immunology* **82**, 4-9 (1987).
- 193 Ehrenguber, M. U., Geiser, T. & Deranleau, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS letters* **346**, 181-184 (1994).
- 194 Goetzl, E. J. & Pickett, W. C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* **125**, 1789-1791 (1980).
- 195 Malmsten, C. L. *et al.* Leukotriene B4: a highly potent and stereospecific factor stimulating migration of polymorphonuclear leukocytes. *Acta physiologica Scandinavica* **110**, 449-451, doi:10.1111/j.1748-1716.1980.tb06696.x (1980).
- 196 Gambero, A. *et al.* Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A2. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **44**, 473-481, doi:10.1016/j.toxicon.2004.06.004 (2004).
- 197 Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104-107, doi:10.1038/nature08780 (2010).
- 198 Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. & Tessier, P. A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* **170**, 3233-3242 (2003).
- 199 Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660-2669, doi:10.1182/blood-2003-04-1078 (2003).
- 200 Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K. & Dower, S. K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* **168**, 4701-4710 (2002).
- 201 Remer, K. A., Brcic, M. & Jungi, T. W. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunology letters* **85**, 75-80 (2003).
- 202 Kurt-Jones, E. A. *et al.* Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* **100**, 1860-1868 (2002).
- 203 Fan, J. & Malik, A. B. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nature medicine* **9**, 315-321, doi:10.1038/nm832 (2003).
- 204 Colonna, M., Samaridis, J. & Angman, L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *European journal of immunology* **30**, 697-704, doi:10.1002/1521-4141(200002)30:2<697::AID-IMMU697>3.0.CO;2-M (2000).
- 205 Thomas, C. J. & Schroder, K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in immunology* **34**, 317-328, doi:10.1016/j.it.2013.02.008 (2013).

- 206 Gagne, V. *et al.* Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. *Arthritis Res Ther* **15**, R73, doi:10.1186/ar4250 (2013).
- 207 Marshall, A. S. *et al.* Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 14792-14802, doi:10.1074/jbc.M313127200 (2004).
- 208 Ekman, A. K. & Cardell, L. O. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* **130**, 55-63, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x (2010).
- 209 Cho, J. S. *et al.* Neutrophil-derived IL-1beta is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS pathogens* **8**, e1003047, doi:10.1371/journal.ppat.1003047 (2012).
- 210 Vladimer, G. I. *et al.* The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* **37**, 96-107, doi:10.1016/j.immuni.2012.07.006 (2012).
- 211 Sengelov, H. Complement receptors in neutrophils. *Critical reviews in immunology* **15**, 107-131 (1995).
- 212 Meknache, N., Jonsson, F., Laurent, J., Guinépain, M. T. & Daeron, M. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcgammaRIIB (CD16B). *J Immunol* **182**, 2542-2550, doi:10.4049/jimmunol.0801665 (2009).
- 213 Perussia, B., Dayton, E. T., Lazarus, R., Fanning, V. & Trinchieri, G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *The Journal of experimental medicine* **158**, 1092-1113 (1983).
- 214 van der Heijden, J. *et al.* Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J Immunol* **188**, 1318-1324, doi:10.4049/jimmunol.1003945 (2012).
- 215 Veri, M. C. *et al.* Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcgamma-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcgamma-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* **121**, 392-404, doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02588.x (2007).
- 216 Marois, L., Pare, G., Vaillancourt, M., Rollet-Labelle, E. & Naccache, P. H. Fc gammaRIIb triggers raft-dependent calcium influx in IgG-mediated responses in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **286**, 3509-3519, doi:M110.169516 [pii] 10.1074/jbc.M110.169516 (2011).
- 217 Marois, L. *et al.* CIN85 modulates the down-regulation of Fc gammaRIIa expression and function by c-Cbl in a PKC-dependent manner in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **286**, 15073-15084, doi:10.1074/jbc.M110.213660 (2011).
- 218 Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal* **377**, 159-169, doi:10.1042/BJ20031253 (2004).
- 219 Scribner, D. J. & Fahrney, D. Neutrophil receptors for IgG and complement: their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *J Immunol* **116**, 892-897 (1976).
- 220 Shibuya, A. *et al.* Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature immunology* **1**, 441-446, doi:10.1038/80886 (2000).
- 221 Vicente-Manzanares, M. & Sanchez-Madrid, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature reviews. Immunology* **4**, 110-122, doi:10.1038/nri1268 (2004).
- 222 Nunes, P. & Demarex, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *Journal of leukocyte biology* **88**, 57-68, doi:10.1189/jlb.0110028 (2010).

- 223 Roos, D., van Bruggen, R. & Meischl, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **5**, 1307-1315 (2003).
- 224 Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. & Sobey, C. G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 453-471, doi:10.1038/nrd3403 (2011).
- 225 Fossati, G. *et al.* The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol* **170**, 1964-1972 (2003).
- 226 Kumari, S., Mg, S. & Mayor, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell research* **20**, 256-275, doi:10.1038/cr.2010.19 (2010).
- 227 Uriarte, S. M. *et al.* Counterregulation of clathrin-mediated endocytosis by the actin and microtubular cytoskeleton in human neutrophils. *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C857-867, doi:10.1152/ajpcell.00454.2008 (2009).
- 228 Tse, S. M. *et al.* Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 3331-3338, doi:10.1074/jbc.M207966200 (2003).
- 229 van Kessel, K. P., Bestebroer, J. & van Strijp, J. A. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in immunology* **5**, 467, doi:10.3389/fimmu.2014.00467 (2014).
- 230 Sengelov, H., Voldstedlund, M., Vinten, J. & Borregaard, N. Human neutrophils are devoid of the integral membrane protein caveolin. *Journal of leukocyte biology* **63**, 563-566 (1998).
- 231 Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535, doi:10.1126/science.1092385 (2004).
- 232 Farrera, C. & Fadeel, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol* **191**, 2647-2656, doi:10.4049/jimmunol.1300436 (2013).
- 233 Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **176**, 231-241, doi:10.1083/jcb.200606027 (2007).
- 234 Keshari, R. S. *et al.* Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One* **7**, e48111, doi:10.1371/journal.pone.0048111 PONE-D-12-11539 [pii] (2012).
- 235 Chen, K. *et al.* Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcgammaRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcgammaRIIA in vivo. *Blood* **120**, 4421-4431, doi:10.1182/blood-2011-12-401133 (2012).
- 236 Caudrillier, A. *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2661-2671, doi:10.1172/JCI61303 (2012).
- 237 Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* **13**, 463-469, doi:10.1038/nm1565 (2007).
- 238 Gasser, O. *et al.* Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental cell research* **285**, 243-257 (2003).
- 239 Timar, C. I. *et al.* Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood* **121**, 510-518, doi:10.1182/blood-2012-05-431114 (2013).
- 240 Dalli, J. *et al.* Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* **112**, 2512-2519, doi:10.1182/blood-2008-02-140533 (2008).

- 241 Gasser, O. & Schifferli, J. A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* **104**, 2543-2548, doi:10.1182/blood-2004-01-0361 (2004).
- 242 Chakravarti, A., Rusu, D., Flamand, N., Borgeat, P. & Poubelle, P. E. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **89**, 1084-1099, doi:10.1038/labinvest.2009.74 (2009).
- 243 Cross, A., Bucknall, R. C., Cassatella, M. A., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 2796-2806, doi:10.1002/art.11253 (2003).
- 244 Sandilands, G. P., McCrae, J., Hill, K., Perry, M. & Baxter, D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* **119**, 562-571, doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02471.x (2006).
- 245 Matsushima, H. *et al.* Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* **121**, 1677-1689, doi:10.1182/blood-2012-07-445189 (2013).
- 246 Beauvillain, C. *et al.* CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* **117**, 1196-1204, doi:10.1182/blood-2009-11-254490 (2011).
- 247 van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1281-1292, doi:10.1084/jem.20041276 (2005).
- 248 Megiovanni, A. M. *et al.* Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* **79**, 977-988, doi:10.1189/jlb.0905526 (2006).
- 249 van Gisbergen, K. P., Ludwig, I. S., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS letters* **579**, 6159-6168, doi:10.1016/j.febslet.2005.09.089 (2005).
- 250 Scapini, P. & Cassatella, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* **124**, 710-719, doi:10.1182/blood-2014-03-453217 (2014).
- 251 Maffia, P. C. *et al.* Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *The American journal of pathology* **171**, 928-937, doi:10.2353/ajpath.2007.061043 (2007).
- 252 Eken, C. *et al.* Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **180**, 817-824 (2008).
- 253 Scapini, P., Bazzoni, F. & Cassatella, M. A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunology letters* **116**, 1-6, doi:10.1016/j.imlet.2007.11.009 (2008).
- 254 Scapini, P. *et al.* Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* **105**, 830-837, doi:10.1182/blood-2004-02-0564 (2005).
- 255 Scapini, P. *et al.* G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *The Journal of experimental medicine* **197**, 297-302 (2003).
- 256 Puga, I. *et al.* B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology* **13**, 170-180, doi:10.1038/ni.2194 (2012).

- 257 Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* **31**, 761-771, doi:10.1016/j.immuni.2009.09.016 (2009).
- 258 Duffy, D. *et al.* Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity* **37**, 917-929, doi:10.1016/j.immuni.2012.07.015 (2012).
- 259 Beauvillain, C. *et al.* Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* **110**, 2965-2973, doi:10.1182/blood-2006-12-063826 (2007).
- 260 Abi Abdallah, D. S., Egan, C. E., Butcher, B. A. & Denkers, E. Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International immunology* **23**, 317-326, doi:10.1093/intimm/dxr007 (2011).
- 261 Pelletier, M. *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* **115**, 335-343, doi:10.1182/blood-2009-04-216085 (2010).
- 262 Geering, B. & Simon, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell death and differentiation* **18**, 1457-1469, doi:10.1038/cdd.2011.75 (2011).
- 263 Murphy, B. M., O'Neill, A. J., Adrain, C., Watson, R. W. & Martin, S. J. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *The Journal of experimental medicine* **197**, 625-632 (2003).
- 264 Conus, S. *et al.* Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *The Journal of experimental medicine* **205**, 685-698, doi:10.1084/jem.20072152 (2008).
- 265 Blomgran, R., Zheng, L. & Stendahl, O. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1213-1223, doi:10.1189/jlb.0506359 (2007).
- 266 Ottonello, L. *et al.* Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 1249-1260 (2002).
- 267 Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R. & Simon, H. U. Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nature medicine* **8**, 61-67, doi:10.1038/nm0102-61 (2002).
- 268 Allaey, I., Gymnina, I., Canet-Jourdan, C. & Poubelle, P. E. IL-32gamma delays spontaneous apoptosis of human neutrophils through MCL-1, regulated primarily by the p38 MAPK pathway. *PloS one* **9**, e109256, doi:10.1371/journal.pone.0109256 (2014).
- 269 Gasmi, L., McLennan, A. G. & Edwards, S. W. The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation. *Blood* **87**, 3442-3449 (1996).
- 270 Lee, E. *et al.* Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *American journal of respiratory and critical care medicine* **160**, 2079-2085, doi:10.1164/ajrccm.160.6.9903136 (1999).
- 271 Cross, A., Barnes, T., Bucknall, R. C., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *Journal of leukocyte biology* **80**, 521-528, doi:10.1189/jlb.0306178 (2006).
- 272 Walmsley, S. R. *et al.* Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *The Journal of experimental medicine* **201**, 105-115, doi:10.1084/jem.20040624 (2005).

- 273 Kemp, A. S., Roberts-Thomson, P., Neoh, S. H. & Brown, S. Inhibition of neutrophil migration by sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **36**, 423-429 (1979).
- 274 Kemp, A., Roberts-Thomson, P. & Brown, S. Inhibition of human neutrophil migration by aggregated gammaglobulin. *Clinical and experimental immunology* **36**, 334-341 (1979).
- 275 Bostan, M. *et al.* Study of chemotactic activity developed by neutrophils from rheumatoid arthritis patients. *Roumanian archives of microbiology and immunology* **61**, 243-258 (2002).
- 276 Baillet, A. *et al.* Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 671-682, doi:10.1093/rheumatology/kep452 (2010).
- 277 Sunahori, K. *et al.* The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **8**, R69, doi:10.1186/ar1939 (2006).
- 278 Elford, P. R. & Cooper, P. H. Induction of neutrophil-mediated cartilage degradation by interleukin-8. *Arthritis and rheumatism* **34**, 325-332 (1991).
- 279 Recklies, A. D. & Golds, E. E. Induction of synthesis and release of interleukin-8 from human articular chondrocytes and cartilage explants. *Arthritis and rheumatism* **35**, 1510-1519 (1992).
- 280 Van den Steen, P. E. *et al.* Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 379-389, doi:10.1096/fj.01-0688com (2002).
- 281 Baici, A., Salgam, P., Cohen, G., Fehr, K. & Boni, A. Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. *Rheumatology international* **2**, 11-16 (1982).
- 282 Pease, D. C. An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* **11**, 501-526 (1956).
- 283 Hartwig, J. & Italiano, J., Jr. The birth of the platelet. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **1**, 1580-1586 (2003).
- 284 Hawker, R. J., Hawker, L. M. & Wilkinson, A. R. Indium (111In)-labelled human platelets: optimal method. *Clin Sci (Lond)* **58**, 243-248 (1980).
- 285 Lu, W., Xu, D., Tu, R. & Hu, Z. Morphology of platelet Golgi apparatus and their significance after acute cerebral infarction. *Neural regeneration research* **8**, 2134-2143, doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.23.003 (2013).
- 286 Boudreau, L. H. *et al.* Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* **124**, 2173-2183, doi:10.1182/blood-2014-05-573543 (2014).
- 287 Ciferri, S. *et al.* Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thromb Haemost* **83**, 157-164 (2000).
- 288 Gnatenko, D. V. *et al.* Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* **101**, 2285-2293, doi:10.1182/blood-2002-09-2797 (2003).
- 289 Akbiyik, F. *et al.* Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* **104**, 1361-1368, doi:10.1182/blood-2004-03-0926 (2004).

- 290 Spinelli, S. L. *et al.* Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**, 591-598, doi:10.1161/ATVBAHA.109.197343 (2010).
- 291 Landry, P. *et al.* Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature structural & molecular biology* **16**, 961-966, doi:10.1038/nsmb.1651 (2009).
- 292 Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379-391, doi:10.1016/j.cell.2005.06.015 (2005).
- 293 Roth, G. J., Hickey, M. J., Chung, D. W. & Hickstein, D. D. Circulating human blood platelets retain appreciable amounts of poly (A)⁺ RNA. *Biochemical and biophysical research communications* **160**, 705-710 (1989).
- 294 Lindemann, S. *et al.* Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control. *The Journal of biological chemistry* **276**, 33947-33951, doi:10.1074/jbc.M104281200 (2001).
- 295 Rosenwald, I. B. *et al.* Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost* **85**, 142-151 (2001).
- 296 Weyrich, A. S. *et al.* Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **30**, 491-498, doi:10.1055/s-2004-833484 (2004).
- 297 Corduan, A. *et al.* Dissociation of SERPINE1 mRNA from the translational repressor proteins Ago2 and TIA-1 upon platelet activation. *Thromb Haemost* **113**, doi:10.1160/TH14-07-0622 (2015).
- 298 Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of cell biology* **154**, 485-490, doi:10.1083/jcb.200105058 (2001).
- 299 Booyse, F. M. & Rafelson, M. E., Jr. Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochimica et biophysica acta* **166**, 689-697 (1968).
- 300 Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J. P., Vainchenker, W. & Breton-Gorius, J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European journal of biochemistry / FEBS* **164**, 189-195 (1987).
- 301 Handagama, P. J., George, J. N., Shuman, M. A., McEver, R. P. & Bainton, D. F. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 861-865 (1987).
- 302 Handagama, P., Scarborough, R. M., Shuman, M. A. & Bainton, D. F. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* **82**, 135-138 (1993).
- 303 Garcia, A. *et al.* A global proteomics approach identifies novel phosphorylated signaling proteins in GPVI-activated platelets: involvement of G6f, a novel platelet Grb2-binding membrane adapter. *Proteomics* **6**, 5332-5343, doi:10.1002/pmic.200600299 (2006).
- 304 Dowal, L., Yang, W., Freeman, M. R., Steen, H. & Flaumenhaft, R. Proteomic analysis of palmitoylated platelet proteins. *Blood* **118**, e62-73, doi:10.1182/blood-2011-05-353078 (2011).
- 305 Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051-4060, doi:10.1038/sj.emboj.7600385 (2004).
- 306 Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 509-524, doi:10.1038/nrm3838 (2014).

- 307 Ple, H. *et al.* The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PloS one* **7**, e50746,
doi:10.1371/journal.pone.0050746 (2012).
- 308 Yoda, M. *et al.* Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-
cleaved precursor microRNAs. *Cell reports* **5**, 715-726, doi:10.1016/j.celrep.2013.09.029
(2013).
- 309 Yukawa, M. *et al.* Proteasome and its novel endogenous activator in human platelets.
Biochemical and biophysical research communications **178**, 256-262 (1991).
- 310 Gupta, N., Li, W., Willard, B., Silverstein, R. L. & McIntyre, T. M. Proteasome proteolysis
supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and
vascular biology* **34**, 160-168, doi:10.1161/ATVBAHA.113.302116 (2014).
- 311 Dangelmaier, C. A. *et al.* Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in platelets.
Blood **105**, 3918-3924, doi:10.1182/blood-2004-09-3689 (2005).
- 312 Nayak, M. K., Dash, A., Singh, N. & Dash, D. Aspirin delimits platelet life span by
proteasomal inhibition. *PloS one* **9**, e105049, doi:10.1371/journal.pone.0105049 (2014).
- 313 Nayak, M. K., Kulkarni, P. P. & Dash, D. Regulatory role of proteasome in determination of
platelet life span. *The Journal of biological chemistry* **288**, 6826-6834,
doi:10.1074/jbc.M112.403154 (2013).
- 314 Brown, C. S. & Dean, W. L. Regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human
platelets by calpain. *Platelets* **18**, 207-211, doi:10.1080/09537100600954037 (2007).
- 315 Serrano, K. & Devine, D. V. Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95
kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. *Cell motility and the
cytoskeleton* **58**, 242-252, doi:10.1002/cm.20011 (2004).
- 316 Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B. & Ginsberg, M. H. Calpain cleavage promotes talin
binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* **276**,
28164-28170, doi:10.1074/jbc.M104161200 (2001).
- 317 Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum.
Nature reviews. Immunology **11**, 264-274, doi:nri2956 [pii] 10.1038/nri2956 (2011).
- 318 Lannan, K. L. *et al.* Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and
platelet-derived microparticles. *Frontiers in immunology* **6**, 48,
doi:10.3389/fimmu.2015.00048 (2015).
- 319 Wei, A. H., Schoenwaelder, S. M., Andrews, R. K. & Jackson, S. P. New insights into the
haemostatic function of platelets. *British journal of haematology* **147**, 415-430,
doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07819.x (2009).
- 320 Schafer, A. I. & Handin, R. I. The role of platelets in thrombotic and vascular disease.
Progress in cardiovascular diseases **22**, 31-52 (1979).
- 321 Kasirer-Friede, A. *et al.* Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3
independently of other receptors. *Blood* **103**, 3403-3411, doi:10.1182/blood-2003-10-3664
(2004).
- 322 Varga-Szabo, D., Pleines, I. & Nieswandt, B. Cell adhesion mechanisms in platelets.
Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **28**, 403-412,
doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474 (2008).
- 323 Nieswandt, B. & Watson, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?
Blood **102**, 449-461, doi:10.1182/blood-2002-12-3882 (2003).
- 324 Schulte, V. *et al.* Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine
platelets. *The Journal of biological chemistry* **276**, 364-368, doi:10.1074/jbc.M007536200
(2001).

- 325 Phillips, D. R. & Agin, P. P. Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochemical and biophysical research communications* **75**, 940-947 (1977).
- 326 Asselin, J. *et al.* A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood* **89**, 1235-1242 (1997).
- 327 Knight, C. G. *et al.* Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovascular research* **41**, 450-457 (1999).
- 328 Berlanga, O. *et al.* Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 1026-1033, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02449.x (2007).
- 329 Ozaki, Y., Suzuki-Inoue, K. & Inoue, O. Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **7 Suppl 1**, 191-194, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03372.x (2009).
- 330 Inoue, O. *et al.* Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* **107**, 1405-1412, doi:10.1182/blood-2005-06-2406 (2006).
- 331 Polgar, J. *et al.* Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13576-13583 (1997).
- 332 Jandrot-Perrus, M., Lagrue, A. H., Okuma, M. & Bon, C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* **272**, 27035-27041 (1997).
- 333 Du, X. Y. *et al.* Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *The Journal of biological chemistry* **277**, 35124-35132, doi:10.1074/jbc.M204372200 (2002).
- 334 Andrews, R. K. *et al.* A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28092-28097, doi:10.1074/jbc.M011352200 (2001).
- 335 Ichinohe, T. *et al.* Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *The Journal of biological chemistry* **272**, 63-68 (1997).
- 336 Gibbins, J. *et al.* Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *The Journal of biological chemistry* **271**, 18095-18099 (1996).
- 337 Poole, A. *et al.* The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *The EMBO journal* **16**, 2333-2341, doi:10.1093/emboj/16.9.2333 (1997).
- 338 Gross, B. S. *et al.* Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. *The Journal of biological chemistry* **274**, 5963-5971 (1999).
- 339 Pasquet, J. M. *et al.* LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Molecular and cellular biology* **19**, 8326-8334 (1999).
- 340 Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., Frampton, J. & Watson, S. P. Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2-/- platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase. *Blood* **102**, 1367-1373, doi:10.1182/blood-2003-01-0029 (2003).

- 341 Brass, L. F. & Joseph, S. K. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization
and granule secretion in platelets. *The Journal of biological chemistry* **260**, 15172-15179
(1985).
- 342 Garcia, A., Quinton, T. M., Dorsam, R. T. & Kunapuli, S. P. Src family kinase-mediated and
Erk-mediated thromboxane A₂ generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen
receptor activation in human platelets. *Blood* **106**, 3410-3414, doi:10.1182/blood-2005-05-
1933 (2005).
- 343 Rink, T. J., Smith, S. W. & Tsien, R. Y. Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺
thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS letters* **148**,
21-26 (1982).
- 344 Moroi, M. & Jung, S. M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thrombosis
research* **114**, 221-233, doi:10.1016/j.thromres.2004.06.046 (2004).
- 345 Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**,
1310-1312 (1964).
- 346 Yoshimoto, T. & Takahashi, Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins & other lipid
mediators* **68-69**, 245-262 (2002).
- 347 Coffey, M. J. *et al.* Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of
multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circulation research* **94**,
1598-1605, doi:10.1161/01.RES.0000132281.78948.65 (2004).
- 348 Coffey, M. J. *et al.* Interactions of 12-lipoxygenase with phospholipase A₂ isoforms following
platelet activation through the glycoprotein VI collagen receptor. *FEBS letters* **576**, 165-168,
doi:10.1016/j.febslet.2004.09.007 (2004).
- 349 Ikei, K. N. *et al.* Investigations of human platelet-type 12-lipoxygenase: role of lipoxygenase
products in platelet activation. *Journal of lipid research* **53**, 2546-2559,
doi:10.1194/jlr.M026385 (2012).
- 350 Sekiya, F. *et al.* Feedback regulation of platelet function by 12S-hydroxyeicosatetraenoic
acid: inhibition of arachidonic acid liberation from phospholipids. *Biochimica et biophysica
acta* **1044**, 165-168 (1990).
- 351 Sekiya, F. *et al.* 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid plays a central role in the regulation of
platelet activation. *Biochemical and biophysical research communications* **179**, 345-351
(1991).
- 352 Nyby, M. D. *et al.* Platelet lipoxygenase inhibitors attenuate thrombin- and thromboxane
mimetic-induced intracellular calcium mobilization and platelet aggregation. *J Pharmacol Exp
Ther* **278**, 503-509 (1996).
- 353 Svensson Holm, A. C., Grenegard, M., Ollinger, K. & Lindstrom, E. G. Inhibition of 12-
lipoxygenase reduces platelet activation and prevents their mitogenic function. *Platelets*,
doi:10.3109/09537104.2013.783688 (2013).
- 354 Fonlupt, P., Croset, M. & Lagarde, M. 12-HETE inhibits the binding of PGH₂/TXA₂ receptor
ligands in human platelets. *Thrombosis research* **63**, 239-248 (1991).
- 355 Johnson, E. N., Brass, L. F. & Funk, C. D. Increased platelet sensitivity to ADP in mice
lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America* **95**, 3100-3105 (1998).
- 356 Guo, Y. *et al.* Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for
12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *The Journal of biological chemistry* **286**, 33832-33840,
doi:10.1074/jbc.M110.216564 (2011).

- 357 Nakao, J., Ito, H., Koshihara, Y. & Murota, S. Age-related increase in the migration of aortic smooth muscle cells induced by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *Atherosclerosis* **51**, 179-187 (1984).
- 358 Rice, R. L., Tang, D. G., Haddad, M., Honn, K. V. & Taylor, J. D. 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid increases the actin microfilament content in B16a melanoma cells: a protein kinase-dependent process. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **77**, 271-278 (1998).
- 359 Tang, D. G. *et al.* The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Experimental cell research* **207**, 361-375, doi:10.1006/excr.1993.1203 (1993).
- 360 Timar, J., Silletti, S., Bazaz, R., Raz, A. & Honn, K. V. Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxygenase metabolite 12-(S)-HETE. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **55**, 1003-1010 (1993).
- 361 Honn, K. V., Grossi, I. M., Diglio, C. A., Wojtukiewicz, M. & Taylor, J. D. Enhanced tumor cell adhesion to the subendothelial matrix resulting from 12(S)-HETE-induced endothelial cell retraction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **3**, 2285-2293 (1989).
- 362 Kragballe, K. & Fallon, J. D. Increased aggregation and arachidonic acid transformation by psoriatic platelets: evidence that platelet-derived 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid increases keratinocyte DNA synthesis in vitro. *Archives of dermatological research* **278**, 449-453 (1986).
- 363 Hammarstrom, S. *et al.* Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 5130-5134 (1975).
- 364 Quintana, L. F., Guzman, B., Collado, S., Claria, J. & Poch, E. A coding polymorphism in the 12-lipoxygenase gene is associated to essential hypertension and urinary 12(S)-HETE. *Kidney international* **69**, 526-530, doi:10.1038/sj.ki.5000147 (2006).
- 365 Valone, F. H., Austen, K. F. & Goetzl, E. J. Modulation of the random migration of human platelets. *The Journal of clinical investigation* **54**, 1100-1106, doi:10.1172/JCI107854 (1974).
- 366 Yeaman, M. R. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature reviews. Microbiology* **12**, 426-437, doi:10.1038/nrmicro3269 (2014).
- 367 Czapiga, M., Gao, J. L., Kirk, A. & Lekstrom-Himes, J. Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors. *Experimental hematology* **33**, 73-84, doi:10.1016/j.exphem.2004.09.010 (2005).
- 368 Shiraki, R. *et al.* Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis research* **113**, 379-385, doi:10.1016/j.thromres.2004.03.023 (2004).
- 369 Koupenova, M. *et al.* Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* **124**, 791-802, doi:10.1182/blood-2013-11-536003 (2014).
- 370 Anabel, A. S. *et al.* Human platelets express Toll-like receptor 3 and respond to poly I:C. *Human immunology* **75**, 1244-1251, doi:10.1016/j.humimm.2014.09.013 (2014).
- 371 Cognasse, F. *et al.* Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology* **83**, 196-198, doi:ICB1314 [pii] 10.1111/j.1440-1711.2005.01314.x (2005).
- 372 Chaipan, C. *et al.* DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *Journal of virology* **80**, 8951-8960, doi:10.1128/JVI.00136-06 (2006).

- 373 Rogala, B., Gumprecht, J., Gawlik, R. & Strojek, K. Platelet aggregation in IgE-mediated allergy with elevated soluble Fc epsilon RIII/CD23 level. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* **5**, 161-165 (1995).
- 374 Qian, K. *et al.* Functional expression of IgA receptor FcalphaRI on human platelets. *Journal of leukocyte biology* **84**, 1492-1500, doi:10.1189/jlb.0508327 (2008).
- 375 Boillard, E. *et al.* Influenza virus H1N1 activates platelets through FcgammaRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* **123**, 2854-2863, doi:10.1182/blood-2013-07-515536 (2014).
- 376 Del Conde, I., Cruz, M. A., Zhang, H., Lopez, J. A. & Afshar-Kharghan, V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *The Journal of experimental medicine* **201**, 871-879, doi:10.1084/jem.20041497 (2005).
- 377 Trier, D. A. *et al.* Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infection and immunity* **76**, 5706-5713, doi:10.1128/IAI.00935-08 (2008).
- 378 Youssefian, T., Drouin, A., Masse, J. M., Guichard, J. & Cramer, E. M. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* **99**, 4021-4029, doi:10.1182/blood-2001-12-0191 (2002).
- 379 Langer, H. F. *et al.* Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1463-1470, doi:10.1161/ATVBAHA.107.141515 (2007).
- 380 Nguyen, X. D. *et al.* Differentiation of monocyte-derived dendritic cells under the influence of platelets. *Cytotherapy* **10**, 720-729, doi:10.1080/14653240802378912 (2008).
- 381 Henn, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591-594, doi:10.1038/35393 (1998).
- 382 Henn, V., Steinbach, S., Buchner, K., Presek, P. & Kroczeck, R. A. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* **98**, 1047-1054 (2001).
- 383 Connor, D. E., Exner, T., Ma, D. D. & Joseph, J. E. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* **103**, 1044-1052, doi:09-09-0644 [pii] 10.1160/TH09-09-0644 (2010).
- 384 Wadhwa, M. *et al.* Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *British journal of haematology* **93**, 225-234 (1996).
- 385 Gerdes, N. *et al.* Platelets regulate CD4(+) T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb Haemost* **106**, 353-362, doi:10.1160/TH11-01-0020 (2011).
- 386 de Bruijne-Admiraal, L. G., Modderman, P. W., Von dem Borne, A. E. & Sonnenberg, A. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* **80**, 134-142 (1992).
- 387 Palabrica, T. *et al.* Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**, 848-851, doi:10.1038/359848a0 (1992).
- 388 Sreeramkumar, V. *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* **346**, 1234-1238, doi:10.1126/science.1256478 (2014).
- 389 Aigner, S. *et al.* CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* **89**, 3385-3395 (1997).
- 390 Simon, D. I. *et al.* Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine* **192**, 193-204 (2000).

- 391 Diacovo, T. G., Roth, S. J., Buccola, J. M., Bainton, D. F. & Springer, T. A. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* **88**, 146-157 (1996).
- 392 Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., von Landenberg, P., Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029-1035, doi:10.1182/blood-2007-01-069195 (2007).
- 393 Maugeri, N. *et al.* Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and {beta}2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood* **113**, 5254-5265, doi:10.1182/blood-2008-09-180794 (2009).
- 394 Jy, W., Mao, W. W., Horstman, L., Tao, J. & Ahn, Y. S. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood cells, molecules & diseases* **21**, 217-231; discussion 231a, doi:S1079979685700253 [pii] (1995).
- 395 Wong, P. Y. *et al.* 15-Lipoxygenase in human platelets. *The Journal of biological chemistry* **260**, 9162-9165 (1985).
- 396 Maclouf, J., de Lacombe, B. F. & Borgeat, P. Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 6042-6046 (1982).
- 397 Serhan, C. N. & Sheppard, K. A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *The Journal of clinical investigation* **85**, 772-780, doi:10.1172/JCI114503 (1990).
- 398 Papayianni, A., Serhan, C. N., Phillips, M. L., Rennke, H. G. & Brady, H. R. Transcellular biosynthesis of lipoxin A4 during adhesion of platelets and neutrophils in experimental immune complex glomerulonephritis. *Kidney international* **47**, 1295-1302 (1995).
- 399 Abdunour, R. E. *et al.* Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16526-16531, doi:10.1073/pnas.1407123111 (2014).
- 400 Yaron, M. & Djaldetti, M. Platelets in synovial fluid. *Arthritis and rheumatism* **21**, 607-608 (1978).
- 401 Endresen, G. K. Investigation of blood platelets in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **10**, 204-208 (1981).
- 402 Ginsberg, M. H., Breth, G. & Skosey, J. L. Platelets in the synovial space. *Arthritis and rheumatism* **21**, 994-995 (1978).
- 403 Kulka, J. P., Bocking, D., Ropes, M. W. & Bauer, W. Early joint lesions of rheumatoid arthritis; report of eight cases, with knee biopsies of lesions of less than one year's duration. *A.M.A. archives of pathology* **59**, 129-150 (1955).
- 404 Zeller, J., Weissbarth, E., Baruth, B., Mielke, H. & Deicher, H. Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity. *Arthritis and rheumatism* **26**, 532-540 (1983).
- 405 Joseph, J. E., Harrison, P., Mackie, I. J., Isenberg, D. A. & Machin, S. J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *British journal of haematology* **115**, 451-459 (2001).
- 406 Bunescu, A., Seidman, P., Lenkei, R., Levin, K. & Egberg, N. Enhanced Fc gamma receptor I, alpha M beta 2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *The Journal of rheumatology* **31**, 2347-2355 (2004).

- 407 Knijff-Dutmer, E. A., Koerts, J., Nieuwland, R., Kalsbeek-Batenburg, E. M. & van de Laar, M. A. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **46**, 1498-1503, doi:10.1002/art.10312 (2002).
- 408 Goules, A. *et al.* Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* **26**, 165-171, doi:10.1016/j.jaut.2006.02.002 (2006).
- 409 Sellam, J. *et al.* Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* **11**, R156, doi:ar2833 [pii] 10.1186/ar2833 (2009).
- 410 Rong, M. Y. *et al.* Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **16**, 478, doi:10.1186/s13075-014-0478-0 (2014).
- 411 Gyorgy, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2667-2688, doi:10.1007/s00018-011-0689-3 (2011).
- 412 Sullivan, R. & Saez, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* **146**, R21-35, doi:10.1530/REP-13-0058 (2013).
- 413 Liu, S. *et al.* Procoagulant activity and cellular origin of microparticles in human amniotic fluid. *Thrombosis research* **133**, 645-651, doi:10.1016/j.thromres.2013.12.043 (2014).
- 414 Smalley, D. M., Sheman, N. E., Nelson, K. & Theodorescu, D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *Journal of proteome research* **7**, 2088-2096, doi:10.1021/pr700775x (2008).
- 415 Irmak, M. K., Oztas, Y. & Oztas, E. Integration of maternal genome into the neonate genome through breast milk mRNA transcripts and reverse transcriptase. *Theoretical biology & medical modelling* **9**, 20, doi:10.1186/1742-4682-9-20 (2012).
- 416 Seigneuret, M. & Devaux, P. F. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 3751-3755 (1984).
- 417 Zwaal, R. F. & Schroit, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-1132 (1997).
- 418 Kamp, D., Sieberg, T. & Haest, C. W. Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry* **40**, 9438-9446 (2001).
- 419 Bevers, E. M. *et al.* Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood* **79**, 380-388 (1992).
- 420 Fox, J. E., Austin, C. D., Boyles, J. K. & Steffen, P. K. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *The Journal of cell biology* **111**, 483-493 (1990).
- 421 O'Connell, D. J., Rozenvayn, N. & Flaumenhaft, R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation. *Biochemistry* **44**, 6361-6370, doi:10.1021/bi047344c (2005).
- 422 Basse, F., Gaffet, P. & Bienvenue, A. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochimica et biophysica acta* **1190**, 217-224 (1994).

- 423 Sebbagh, M. *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology* **3**, 346-352, doi:10.1038/35070019 (2001).
- 424 Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology* **3**, 339-345, doi:10.1038/35070009 (2001).
- 425 Muralidharan-Chari, V. *et al.* ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current biology : CB* **19**, 1875-1885, doi:10.1016/j.cub.2009.09.059 (2009).
- 426 Yano, Y. *et al.* The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *The Biochemical journal* **299** (Pt 1), 303-308 (1994).
- 427 Pasquet, J. M., Dachary-Prigent, J. & Nurden, A. T. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *The Biochemical journal* **333** (Pt 3), 591-599 (1998).
- 428 Tersteeg, C. *et al.* FLOW-induced PROtrusions (FLIPRs): a platelet-derived platform for the retrieval of microparticles by monocytes and neutrophils. *Circulation research* **114**, 780-791, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302361 (2014).
- 429 Alaarg, A., Schiffelers, R. M., van Solinge, W. W. & van Wijk, R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Frontiers in physiology* **4**, 365, doi:10.3389/fphys.2013.00365 (2013).
- 430 Aatonen, M., Gronholm, M. & Siljander, P. R. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **38**, 102-113, doi:10.1055/s-0031-1300956 (2012).
- 431 Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* **3**, doi:10.3402/jev.v3.24692 (2014).
- 432 Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **12**, 614-627, doi:10.1111/jth.12554 (2014).
- 433 Rousseau, M. *et al.* Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. *PloS one* **10**, e0116812, doi:10.1371/journal.pone.0116812 (2015).
- 434 Flaumenhaft, R. *et al.* Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* **113**, 1112-1121, doi:10.1182/blood-2008-06-163832 (2009).
- 435 Gitz, E. *et al.* CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood* **124**, 2262-2270, doi:10.1182/blood-2014-05-572818 (2014).
- 436 Pienimaeki-Roemer, A. *et al.* Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion*, doi:10.1111/trf.12874 (2014).
- 437 Dalli, J. *et al.* Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 2205-2219, doi:10.1074/mcp.M113.028589 (2013).
- 438 Little, K. M., Smalley, D. M., Harthun, N. L. & Ley, K. The plasma microparticle proteome. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **36**, 845-856, doi:10.1055/s-0030-1267038 (2010).

- 439 Weerheim, A. M., Kolb, A. M., Sturk, A. & Nieuwland, R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical biochemistry* **302**, 191-198, doi:10.1006/abio.2001.5552 (2002).
- 440 Biro, E. *et al.* The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **3**, 2754-2763, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01646.x (2005).
- 441 Abid Hussein, M. N. *et al.* Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thrombosis research* **121**, 865-871, doi:10.1016/j.thromres.2007.08.005 (2008).
- 442 Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. A. & FitzGerald, G. A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2118-2127, doi:10.1172/JCI119385 (1997).
- 443 Tang, K. *et al.* Microparticles mediate enzyme transfer from platelets to mast cells: a new pathway for lipoxin A4 biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications* **400**, 432-436, doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.095 (2010).
- 444 Barry, O. P., Pratico, D., Savani, R. C. & FitzGerald, G. A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* **102**, 136-144, doi:10.1172/JCI2592 (1998).
- 445 Dalli, J. & Serhan, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60-72, doi:10.1182/blood-2012-04-423525 (2012).
- 446 Reich, C. F., 3rd & Pisetsky, D. S. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Experimental cell research* **315**, 760-768, doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.014 (2009).
- 447 Crescentelli, R. *et al.* Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles* **2**, doi:10.3402/jev.v2i0.20677 (2013).
- 448 Spencer, D. M., Gauley, J. & Pisetsky, D. S. The properties of microparticles from RAW 264.7 macrophage cells undergoing in vitro activation or apoptosis. *Innate immunity* **20**, 239-248, doi:10.1177/1753425913492552 (2014).
- 449 Risitano, A., Beaulieu, L. M., Vitseva, O. & Freedman, J. E. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* **119**, 6288-6295, doi:10.1182/blood-2011-12-396440 (2012).
- 450 Belleannee, C., Legare, C., Calvo, E., Thimon, V. & Sullivan, R. microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. *Hum Reprod* **28**, 1455-1467, doi:10.1093/humrep/det088 (2013).
- 451 Chen, T. S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic acids research* **38**, 215-224, doi:10.1093/nar/gkp857 (2010).
- 452 Laffont, B. *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* **122**, 253-261, doi:10.1182/blood-2013-03-492801 (2013).
- 453 Dean, W. L., Lee, M. J., Cummins, T. D., Schultz, D. J. & Powell, D. W. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thrombosis and haemostasis* **102**, 711-718, doi:10.1160/TH09-04-243 (2009).
- 454 Mack, M. *et al.* Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature medicine* **6**, 769-775, doi:10.1038/77498 (2000).

- 455 Rozmyslowicz, T. *et al.* Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* **17**, 33-42, doi:10.1097/01.aids.0000042948.95433.3d (2003).
- 456 Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* **98**, 3143-3149 (2001).
- 457 Salanova, B. *et al.* Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **282**, 27960-27969, doi:10.1074/jbc.M704039200 (2007).
- 458 Sadallah, S., Eken, C., Martin, P. J. & Schifferli, J. A. Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *J Immunol* **186**, 6543-6552, doi:10.4049/jimmunol.1002788 (2011).
- 459 Sadallah, S., Amicarella, F., Eken, C., Iezzi, G. & Schifferli, J. A. Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4+T cells into T regulatory cells. *Thromb Haemost* **112**, 1219-1229, doi:10.1160/TH14-03-0281 (2014).
- 460 Yin, W., Ghebrehwet, B. & Peerschke, E. I. Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. *Platelets* **19**, 225-233, doi:10.1080/09537100701777311 (2008).
- 461 Peerschke, E. I., Yin, W., Grigg, S. E. & Ghebrehwet, B. Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **4**, 2035-2042, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02065.x (2006).
- 462 Dasgupta, S. K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R. E. & Thiagarajan, P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* **125**, 1664-1672, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.068833 (2012).
- 463 Faille, D. *et al.* Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **16**, 1731-1738, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01434.x (2012).
- 464 Mause, S. F. *et al.* Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* **122**, 495-506, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909473 (2010).
- 465 Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles* **3**, doi:10.3402/jev.v3.24641 (2014).
- 466 Mause, S. F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research* **107**, 1047-1057, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226456 (2010).
- 467 Aharon, A. & Brenner, B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best practice & research. Clinical haematology* **22**, 61-69, doi:10.1016/j.beha.2008.11.002 (2009).
- 468 Brill, A., Dashevsky, O., Rivo, J., Gozal, Y. & Varon, D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovascular research* **67**, 30-38, doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.007 (2005).
- 469 Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **113**, 752-760, doi:10.1002/ijc.20657 (2005).
- 470 Berckmans, R. J. *et al.* Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis and rheumatism* **46**, 2857-2866, doi:10.1002/art.10587 (2002).

- 471 Biro, E. *et al.* Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a
tissue factor-dependent manner. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **1**, 2561-2568
(2003).
- 472 Franz, C. *et al.* Procoagulant tissue factor-exposing vesicles in human seminal fluid. *Journal
of reproductive immunology* **98**, 45-51, doi:10.1016/j.jri.2013.02.002 (2013).
- 473 Muller, I. *et al.* Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles
and platelets. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for
Experimental Biology* **17**, 476-478, doi:10.1096/fj.02-0574fje (2003).
- 474 Zwaal, R. F., Comfurius, P. & Bevers, E. M. Lipid-protein interactions in blood coagulation.
Biochimica et biophysica acta **1376**, 433-453 (1998).
- 475 Satta, N., Freyssinet, J. M. & Toti, F. The significance of human monocyte thrombomodulin
during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *British journal of
haematology* **96**, 534-542 (1997).
- 476 Markiewicz, M., Richard, E., Marks, N. & Ludwicka-Bradley, A. Impact of endothelial
microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular
diseases. *Journal of aging research* **2013**, 734509, doi:10.1155/2013/734509 (2013).
- 477 Ernster, L. & Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* **91**,
227s-255s (1981).
- 478 Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. Mitochondria are morphologically
and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO journal* **21**, 1616-1627,
doi:10.1093/emboj/21.7.1616 (2002).
- 479 Palade, G. E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *The journal of
histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **1**, 188-211
(1953).
- 480 Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of
biochemistry* **76**, 723-749, doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409 (2007).
- 481 DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V. & Hirano, M. The clinical maze of mitochondrial
neurology. *Nature reviews. Neurology* **9**, 429-444, doi:10.1038/nrneurol.2013.126 (2013).
- 482 Ow, Y. P., Green, D. R., Hao, Z. & Mak, T. W. Cytochrome c: functions beyond respiration.
Nature reviews. Molecular cell biology **9**, 532-542, doi:10.1038/nrm2434 (2008).
- 483 Collins, L. V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I. M. & Tarkowski, A. Endogenously
oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of
leukocyte biology* **75**, 995-1000, doi:10.1189/jlb.0703328 (2004).
- 484 Rabiet, M. J., Huet, E. & Boulay, F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are
novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived
peptides preferentially activate FPR. *European journal of immunology* **35**, 2486-2495,
doi:10.1002/eji.200526338 (2005).
- 485 Carp, H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *The
Journal of experimental medicine* **155**, 264-275 (1982).
- 486 Iyer, S. S. *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3
inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America* **106**, 20388-20393, doi:10.1073/pnas.0908698106 (2009).
- 487 West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature
reviews. Immunology* **11**, 389-402, doi:10.1038/nri2975 (2011).
- 488 Birts, C. N., Barton, C. H. & Wilton, D. C. Catalytic and non-catalytic functions of human IIA
phospholipase A2. *Trends in biochemical sciences* **35**, 28-35, doi:10.1016/j.tibs.2009.08.003
(2010).

- 489 Yoda, E. *et al.* Group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 γ) regulates platelet activation, hemostasis and thrombosis in mice. *PloS one* **9**, e109409, doi:10.1371/journal.pone.0109409 (2014).
- 490 Sharma, J. *et al.* Activation of group VI phospholipase A2 isoforms in cardiac endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **300**, C872-879, doi:10.1152/ajpcell.00289.2010 (2011).
- 491 Bao, S. *et al.* Group VIB Phospholipase A(2) promotes proliferation of INS-1 insulinoma cells and attenuates lipid peroxidation and apoptosis induced by inflammatory cytokines and oxidant agents. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**, 989372, doi:10.1155/2012/989372 (2012).
- 492 Shimizu, T., Ohto, T. & Kita, Y. Cytosolic phospholipase A2: biochemical properties and physiological roles. *IUBMB life* **58**, 328-333, doi:10.1080/15216540600702289 (2006).
- 493 Bonventre, J. Cytosolic phospholipase A2 α reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends in immunology* **25**, 116-119 (2004).
- 494 Bonventre, J. V. *et al.* Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* **390**, 622-625, doi:10.1038/37635 (1997).
- 495 Tomlinson, I. P., Beck, N. E., Neale, K. & Bodmer, W. F. Variants at the secretory phospholipase A2 (PLA2G2A) locus: analysis of associations with familial adenomatous polyposis and sporadic colorectal tumours. *Annals of human genetics* **60**, 369-376 (1996).
- 496 Praml, C. *et al.* Human homologue of a candidate for the Mom1 locus, the secretory type II phospholipase A2 (PLA2S-II), maps to 1p35-36.1/D1S199. *Cancer research* **55**, 5504-5506 (1995).
- 497 Singer, A. G. *et al.* Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* **277**, 48535-48549, doi:10.1074/jbc.M205855200 (2002).
- 498 Snitko, Y., Han, S. K., Lee, B. I. & Cho, W. Differential interfacial and substrate binding modes of mammalian pancreatic phospholipases A2: a comparison among human, bovine, and porcine enzymes. *Biochemistry* **38**, 7803-7810, doi:10.1021/bi990600e (1999).
- 499 Snitko, Y. *et al.* Mapping the interfacial binding surface of human secretory group IIa phospholipase A2. *Biochemistry* **36**, 14325-14333, doi:10.1021/bi971200z (1997).
- 500 Murakami, M., Taketomi, Y., Sato, H. & Yamamoto, K. Secreted phospholipase A2 revisited. *Journal of biochemistry* **150**, 233-255, doi:10.1093/jb/mvr088 (2011).
- 501 Wery, J. P. *et al.* Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Å resolution. *Nature* **352**, 79-82, doi:10.1038/352079a0 (1991).
- 502 Scott, D. L. *et al.* Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A2 from inflammatory exudate. *Science* **254**, 1007-1010 (1991).
- 503 Edwards, S. H., Thompson, D., Baker, S. F., Wood, S. P. & Wilton, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* **41**, 15468-15476 (2002).
- 504 Kennedy, B. P. *et al.* A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *The Journal of biological chemistry* **270**, 22378-22385 (1995).
- 505 Grass, D. S. *et al.* Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2233-2241, doi:10.1172/JCI118664 (1996).
- 506 Kallajoki, M., Alanen, K. A., Nevalainen, M. & Nevalainen, T. J. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *The Prostate* **35**, 263-272 (1998).

- 507 Masuda, S. *et al.* Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochimica et biophysica acta* **1686**, 61-76, doi:10.1016/j.bbaliip.2004.08.017 (2004).
- 508 Takayama, K., Hara, S., Kudo, I. & Inoue, K. Detection of 14-kDa group II phospholipase A2 in human seminal plasma. *Biochemical and biophysical research communications* **178**, 1505-1511 (1991).
- 509 Kanda, A., Ono, T., Yoshida, N., Tojo, H. & Okamoto, M. The primary structure of a membrane-associated phospholipase A2 from human spleen. *Biochemical and biophysical research communications* **163**, 42-48 (1989).
- 510 Ronkko, S. Immunohistochemical localization of phospholipase A2 in human and bovine male reproductive organs. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **110**, 503-509 (1995).
- 511 Ishizaki, J. *et al.* cDNA cloning and sequence determination of rat membrane-associated phospholipase A2. *Biochemical and biophysical research communications* **162**, 1030-1036 (1989).
- 512 Murakami, M., Kudo, I., Natori, Y. & Inoue, K. Immunochemical detection of 'platelet type' phospholipase A2 in the rat. *Biochimica et biophysica acta* **1043**, 34-42 (1990).
- 513 Nakano, T. & Arita, H. Enhanced expression of group II phospholipase A2 gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid. *FEBS letters* **273**, 23-26 (1990).
- 514 Harwig, S. S. *et al.* Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *The Journal of clinical investigation* **95**, 603-610, doi:10.1172/JCI117704 (1995).
- 515 Nevalainen, T. J., Gronroos, J. M. & Kallajoki, M. Expression of group II phospholipase A2 in the human gastrointestinal tract. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **72**, 201-208 (1995).
- 516 Triggiani, M. *et al.* Lung mast cells are a source of secreted phospholipases A2. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 558-565, 565 e551-553, doi:S0091-6749(09)00694-0 [pii] 10.1016/j.jaci.2009.04.035 (2009).
- 517 Anthonsen, M. W., Stengel, D., Hourton, D., Ninio, E. & Johansen, B. Mildly oxidized LDL induces expression of group IIa secretory phospholipase A(2) in human monocyte-derived macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**, 1276-1282 (2000).
- 518 Ghesquiere, S. A. *et al.* Macrophage-specific overexpression of group IIa sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition. *Journal of lipid research* **46**, 201-210, doi:10.1194/jlr.M400253-JLR200 (2005).
- 519 Kramer, R. M. *et al.* Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* **264**, 5768-5775 (1989).
- 520 Aarsman, A. J. *et al.* Phospholipase A2 activity in platelets. Immuno-purification and localization of the enzyme in rat platelets. *J Lipid Mediat* **1**, 49-61 (1989).
- 521 Li, K., Liu, X., Chen, Z., Huang, Q. & Wu, K. Quantification of tear proteins and sPLA2-IIa alteration in patients with allergic conjunctivitis. *Molecular vision* **16**, 2084-2091 (2010).
- 522 Qu, X. D. & Lehrer, R. I. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infection and immunity* **66**, 2791-2797 (1998).
- 523 Nevalainen, T. J., Aho, H. J. & Peuravuori, H. Secretion of group 2 phospholipase A2 by lacrimal glands. *Investigative ophthalmology & visual science* **35**, 417-421 (1994).

- 524 Aho, H. J., Saari, K. M., Kallajoki, M. & Nevalainen, T. J. Synthesis of group II phospholipase A2 and lysozyme in lacrimal glands. *Investigative ophthalmology & visual science* **37**, 1826-1832 (1996).
- 525 Saari, K. M., Aho, V., Paavilainen, V. & Nevalainen, T. J. Group II PLA(2) content of tears in normal subjects. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 318-320 (2001).
- 526 Nevalainen, T. J. *et al.* Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochimica et biophysica acta* **1733**, 210-223, doi:S1388-1981(04)00228-8 [pii] 10.1016/j.bbali.2004.12.012 (2005).
- 527 Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R. & Stoner, C. R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2647-2651 (1991).
- 528 Trousson, A. *et al.* Cross-talk between oxysterols and glucocorticoids: differential regulation of secreted phospholipase A2 and impact on oligodendrocyte death. *PLoS one* **4**, e8080, doi:10.1371/journal.pone.0008080 (2009).
- 529 Canaan, S., Nielsen, R., Ghomashchi, F., Robinson, B. H. & Gelb, M. H. Unusual mode of binding of human group IIA secreted phospholipase A2 to anionic interfaces as studied by continuous wave and time domain electron paramagnetic resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30984-30990, doi:10.1074/jbc.M203649200 (2002).
- 530 Bezzine, S. *et al.* On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids. *The Journal of biological chemistry* **277**, 48523-48534, doi:10.1074/jbc.M203137200 M203137200 [pii] (2002).
- 531 Scott, D. L., Mandel, A. M., Sigler, P. B. & Honig, B. The electrostatic basis for the interfacial binding of secretory phospholipases A2. *Biophysical journal* **67**, 493-504, doi:10.1016/S0006-3495(94)80546-6 (1994).
- 532 Beers, S. A., Buckland, A. G., Giles, N., Gelb, M. H. & Wilton, D. C. Effect of tryptophan insertions on the properties of the human group IIA phospholipase A2: mutagenesis produces an enzyme with characteristics similar to those of the human group V phospholipase A2. *Biochemistry* **42**, 7326-7338, doi:10.1021/bi0343222 (2003).
- 533 Fourcade, O. *et al.* Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**, 919-927 (1995).
- 534 Koduri, R. S. *et al.* Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *The Journal of biological chemistry* **277**, 5849-5857, doi:10.1074/jbc.M109699200 M109699200 [pii] (2002).
- 535 Gimenez, A. P. *et al.* High bactericidal efficiency of type iia phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J Immunol* **173**, 521-530 (2004).
- 536 Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L. M., Foreman, A. & Weiss, J. The potent anti-*Staphylococcus aureus* activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. *The Journal of clinical investigation* **97**, 250-257, doi:10.1172/JCI118399 (1996).
- 537 Weinrauch, Y., Abad, C., Liang, N. S., Lowry, S. F. & Weiss, J. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *The Journal of clinical investigation* **102**, 633-638, doi:10.1172/JCI3121 (1998).

- 538 Piris-Gimenez, A. *et al.* In vivo protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax. *J Immunol* **175**, 6786-6791, doi:175/10/6786 [pii] (2005).
- 539 Laine, V. J., Grass, D. S. & Nevalainen, T. J. Resistance of transgenic mice expressing human group II phospholipase A2 to Escherichia coli infection. *Infection and immunity* **68**, 87-92 (2000).
- 540 Laine, V. J., Grass, D. S. & Nevalainen, T. J. Protection by group II phospholipase A2 against Staphylococcus aureus. *J Immunol* **162**, 7402-7408 (1999).
- 541 Touqui, L. & Wu, Y. Z. Interaction of secreted phospholipase A2 and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome. *Acta pharmacologica Sinica* **24**, 1292-1296 (2003).
- 542 Pernet, E. *et al.* Pseudomonas aeruginosa eradicates Staphylococcus aureus by manipulating the host immunity. *Nature communications* **5**, 5105, doi:10.1038/ncomms6105 (2014).
- 543 Foreman-Wykert, A. K., Weinrauch, Y., Elsbach, P. & Weiss, J. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. *The Journal of clinical investigation* **103**, 715-721, doi:10.1172/JCI5468 (1999).
- 544 Koprivnjak, T., Peschel, A., Gelb, M. H., Liang, N. S. & Weiss, J. P. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against Staphylococcus aureus. *The Journal of biological chemistry* **277**, 47636-47644, doi:10.1074/jbc.M205104200 (2002).
- 545 Madsen, L. M., Inada, M. & Weiss, J. Determinants of activation by complement of group II phospholipase A2 acting against Escherichia coli. *Infection and immunity* **64**, 2425-2430 (1996).
- 546 Femling, J. K., Nauseef, W. M. & Weiss, J. P. Synergy between extracellular group IIA phospholipase A2 and phagocyte NADPH oxidase in digestion of phospholipids of Staphylococcus aureus ingested by human neutrophils. *J Immunol* **175**, 4653-4661 (2005).
- 547 Weiss, J., Inada, M., Elsbach, P. & Crowl, R. M. Structural determinants of the action against Escherichia coli of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry* **269**, 26331-26337 (1994).
- 548 Silliman, C. C. *et al.* Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *American journal of physiology. Cell physiology* **283**, C1102-1113, doi:10.1152/ajpcell.00608.2001 (2002).
- 549 Granata, F. *et al.* Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* **174**, 464-474 (2005).
- 550 Lambeau, G. & Lazdunski, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends in pharmacological sciences* **20**, 162-170 (1999).
- 551 Triggiani, M. *et al.* Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* **164**, 4908-4915 (2000).
- 552 Fonteh, A. N., Atsumi, G., LaPorte, T. & Chilton, F. H. Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* **165**, 2773-2782 (2000).
- 553 Murakami, M. *et al.* Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29927-29936 (1999).

- 554 Murakami, M. *et al.* Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A2s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **276**, 10083-10096, doi:10.1074/jbc.M007877200 (2001).
- 555 Boilard, E., Bourgoin, S. G., Bernatchez, C., Poubelle, P. E. & Surette, M. E. Interaction of low molecular weight group IIA phospholipase A2 with apoptotic human T cells: role of heparan sulfate proteoglycans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1068-1080, doi:10.1096/fj.02-0938com 17/9/1068 [pii] (2003).
- 556 Koduri, R. S. *et al.* Action of human group IIA secreted phospholipase A2 on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme. *The Journal of biological chemistry* **273**, 32142-32153 (1998).
- 557 Murakami, M. *et al.* Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31435-31444 (1999).
- 558 Sartipy, P., Johansen, B., Gasvik, K. & Hurt-Camejo, E. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A(2) and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circulation research* **86**, 707-714 (2000).
- 559 Sartipy, P. *et al.* Binding of human phospholipase A2 type II to proteoglycans. Differential effect of glycosaminoglycans on enzyme activity. *The Journal of biological chemistry* **271**, 26307-26314 (1996).
- 560 Saegusa, J. *et al.* Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins alphavbeta3 and alpha4beta1 and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **283**, 26107-26115, doi:10.1074/jbc.M804835200 (2008).
- 561 Fujita, M. *et al.* Proinflammatory Secreted Phospholipase A2 Type IIA (sPLA-IIA) Induces Integrin Activation through Direct Binding to a Newly Identified Binding Site (Site 2) in Integrins alphavbeta3, alpha4beta1, and alpha5beta1. *The Journal of biological chemistry* **290**, 259-271, doi:10.1074/jbc.M114.579946 (2015).
- 562 Boilard, E., Bourgoin, S. G., Bernatchez, C. & Surette, M. E. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. *Blood* **102**, 2901-2909, doi:10.1182/blood-2002-12-3702 2002-12-3702 [pii] (2003).
- 563 Birts, C. N., Barton, C. H. & Wilton, D. C. A catalytically independent physiological function for human acute phase protein group IIA phospholipase A2: cellular uptake facilitates cell debris removal. *The Journal of biological chemistry* **283**, 5034-5045, doi:M708844200 [pii] 10.1074/jbc.M708844200 (2008).
- 564 Mounier, C. M. *et al.* Basic residues of human group IIA phospholipase A2 are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A2. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 4960-4969 (2000).

- 565 Polgar, J., Kramer, R. M., Um, S. L., Jakubowski, J. A. & Clemetson, K. J. Human group II 14 kDa phospholipase A2 activates human platelets. *The Biochemical journal* **327** (Pt 1), 259-265 (1997).
- 566 Hernandez, M., Burillo, S. L., Crespo, M. S. & Nieto, M. L. Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1. *The Journal of biological chemistry* **273**, 606-612 (1998).
- 567 Hernandez, M. *et al.* Secretory phospholipase A2 induces phospholipase Cgamma-1 activation and Ca²⁺ mobilization in the human astrocytoma cell line 1321N1 by a mechanism independent of its catalytic activity. *Biochemical and biophysical research communications* **260**, 99-104, doi:10.1006/bbrc.1999.0832 (1999).
- 568 Yamashita, S. *et al.* Elevation of serum group II phospholipase A2 levels in patients with advanced cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **228**, 91-99 (1994).
- 569 Graff, J. R. *et al.* Expression of group IIA secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 3857-3861 (2001).
- 570 Jiang, J. *et al.* Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *The American journal of pathology* **160**, 667-671, doi:10.1016/S0002-9440(10)64886-9 (2002).
- 571 Sved, P. *et al.* Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer. *Cancer research* **64**, 6934-6940, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3018 (2004).
- 572 Mirtti, T. *et al.* Group IIA phospholipase A as a prognostic marker in prostate cancer: relevance to clinicopathological variables and disease-specific mortality. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **117**, 151-161, doi:10.1111/j.1600-0463.2008.00002.x (2009).
- 573 Yamashita, S. *et al.* Increased expression of membrane-associated phospholipase A2 shows malignant potential of human breast cancer cells. *Cancer* **71**, 3058-3064 (1993).
- 574 Wendum, D. *et al.* COX-2, inflammatory secreted PLA2, and cytoplasmic PLA2 protein expression in small bowel adenocarcinomas compared with colorectal adenocarcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **16**, 130-136, doi:10.1097/01.MP.0000052101.58988.1F (2003).
- 575 Mannello, F. *et al.* Nipple aspirate fluids from women with breast cancer contain increased levels of group IIA secretory phospholipase A2. *Breast cancer research and treatment* **111**, 209-218, doi:10.1007/s10549-007-9779-1 (2008).
- 576 Lagorce-Pages, C., Paraf, F., Wendum, D., Martin, A. & Flejou, J. F. Expression of inflammatory secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in premalignant and malignant Barrett's oesophagus. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **444**, 426-435, doi:10.1007/s00428-004-1003-7 (2004).
- 577 Buhmeida, A. *et al.* PLA2 (group IIA phospholipase A2) as a prognostic determinant in stage II colorectal carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**, 1230-1235, doi:10.1093/annonc/mdn783 (2009).
- 578 Leung, S. Y. *et al.* Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16203-16208, doi:10.1073/pnas.212646299 (2002).

- 579 MacPhee, M. *et al.* The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell* **81**, 957-966 (1995).
- 580 Cormier, R. T. *et al.* Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nature genetics* **17**, 88-91, doi:10.1038/ng0997-88 (1997).
- 581 Nimmrich, I. *et al.* Loss of the PLA2G2A gene in a sporadic colorectal tumor of a patient with a PLA2G2A germline mutation and absence of PLA2G2A germline alterations in patients with FAP. *Human genetics* **100**, 345-349 (1997).
- 582 Riggins, G. J., Markowitz, S., Wilson, J. K., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Absence of secretory phospholipase A2 gene alterations in human colorectal cancer. *Cancer research* **55**, 5184-5186 (1995).
- 583 Haluska, F. G. *et al.* Lack of phospholipase A2 mutations in neuroblastoma, melanoma and colon-cancer cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **72**, 337-339 (1997).
- 584 Kennedy, B. P. *et al.* Overexpression of the nonpancreatic secretory group II PLA2 messenger RNA and protein in colorectal adenomas from familial adenomatous polyposis patients. *Cancer research* **58**, 500-503 (1998).
- 585 Morgenbesser, S. D. *et al.* Identification of genes potentially involved in the acquisition of androgen-independent and metastatic tumor growth in an autochthonous genetically engineered mouse prostate cancer model. *The Prostate* **67**, 83-106, doi:10.1002/pros.20505 (2007).
- 586 Bowton, D. L., Seeds, M. C., Fasano, M. B., Goldsmith, B. & Bass, D. A. Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *American journal of respiratory and critical care medicine* **155**, 421-425, doi:10.1164/ajrccm.155.2.9032172 (1997).
- 587 Moses, G. S. *et al.* Secretory PLA2-IIA: a new inflammatory factor for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* **3**, 28, doi:10.1186/1742-2094-3-28 (2006).
- 588 Yagami, T. *et al.* Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis. *Molecular pharmacology* **61**, 114-126 (2002).
- 589 Schiering, A., Menschikowski, M., Mueller, E. & Jaross, W. Analysis of secretory group II phospholipase A2 expression in human aortic tissue in dependence on the degree of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **144**, 73-78 (1999).
- 590 Romano, M., Romano, E., Bjorkerud, S. & Hurt-Camejo, E. Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A2 in atherosclerotic and nonatherosclerotic regions of human arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **18**, 519-525 (1998).
- 591 Porela, P. *et al.* Level of circulating phospholipase A2 in prediction of the prognosis of patients with suspected myocardial infarction. *Basic research in cardiology* **95**, 413-417 (2000).
- 592 Boekholdt, S. M. *et al.* Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 839-846, doi:10.1161/01.ATV.0000157933.19424.b7 (2005).
- 593 Mallat, Z. *et al.* Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology* **46**, 1249-1257, doi:10.1016/j.jacc.2005.06.056 (2005).
- 594 Mallat, Z. *et al.* Circulating secretory phospholipase A2 activity and risk of incident coronary events in healthy men and women: the EPIC-Norfolk study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1177-1183, doi:10.1161/ATVBAHA.107.139352 (2007).

- 595 Hartford, M. *et al.* CRP, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA, and intercellular adhesion molecule-1 during the early phase of acute coronary syndromes and long-term follow-up. *International journal of cardiology* **108**, 55-62, doi:10.1016/j.ijcard.2005.04.004 (2006).
- 596 Bidgood, M. J., Jamal, O. S., Cunningham, A. M., Brooks, P. M. & Scott, K. F. Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. *J Immunol* **165**, 2790-2797, doi:10.1093/ajph/165.5.2790 [pii] (2000).
- 597 Bryant, K. J. *et al.* A bifunctional role for group IIA secreted phospholipase A2 in human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte arachidonic acid metabolism. *The Journal of biological chemistry* **286**, 2492-2503, doi:10.1074/jbc.M110.123927 (2011).
- 598 Barland, P., Novikoff, A. B. & Hamerman, D. Fine Structure and Cytochemistry of the Rheumatoid Synovial Membrane, with Special Reference to Lysosomes. *The American journal of pathology* **44**, 853-866 (1964).
- 599 Hajizadeh, S., DeGroot, J., TeKoppele, J. M., Tarkowski, A. & Collins, L. V. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **5**, R234-240, doi:10.1186/ar787 (2003).
- 600 Podor, T. J. *et al.* Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7529-7539, doi:10.1074/jbc.M109675200 M109675200 [pii] (2002).
- 601 Ducheze, A. C. *et al.* Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:10.1073/pnas.1507905112 (2015).
- 602 Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V. & Tarkowski, A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nature medicine* **5**, 702-705, doi:10.1038/9554 (1999).
- 603 Wu, H. J. *et al.* Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1911-1922, doi:10.1084/jem.20070285 (2007).
- 604 Rudnicka, W. *et al.* Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *European journal of immunology* **39**, 1211-1220, doi:10.1002/eji.200838617 (2009).
- 605 Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine* **18**, 1386-1393, doi:10.1038/nm.2847 (2012).
- 606 Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell host & microbe* **12**, 109-116, doi:10.1016/j.chom.2012.05.015 (2012).
- 607 Jenne, C. N. *et al.* Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell host & microbe* **13**, 169-180, doi:10.1016/j.chom.2013.01.005 (2013).
- 608 Heit, B., Yeung, T. & Grinstein, S. Changes in mitochondrial surface charge mediate recruitment of signaling molecules during apoptosis. *American journal of physiology. Cell physiology* **300**, C33-41, doi:10.1152/ajpcell.00139.2010 (2011).

- 609 Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an
elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature cell biology* **15**, 1197-1205,
doi:10.1038/ncb2837 (2013).
- 610 Keane, A., Woods, R., Dowding, V., Roden, D. & Barry, C. Anticardiolipin antibodies in
rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology* **26**, 346-350 (1987).
- 611 Sorice, M. *et al.* Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for
antiphospholipids antibodies. *Clinical and experimental immunology* **122**, 277-284 (2000).
- 612 Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine* **17**,
1381-1390, doi:10.1038/nm.2514 (2011).
- 613 Dieude, M. *et al.* Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T
cells in the normal murine repertoire. *J Immunol* **186**, 4771-4781,
doi:10.4049/jimmunol.1000921 (2011).
- 614 Mancuso, P., Nana-Sinkam, P. & Peters-Golden, M. Leukotriene B4 augments neutrophil
phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* **69**, 2011-2016,
doi:10.1128/IAI.69.4.2011-2016.2001 (2001).
- 615 Buckland, A. G., Kinkaid, A. R. & Wilton, D. C. Cardiolipin hydrolysis by human
phospholipases A2. The multiple enzymatic activities of human cytosolic phospholipase A2.
Biochimica et biophysica acta **1390**, 65-72 (1998).
- 616 Cable, M. B., Jacobus, J. & Powell, G. L. Cardiolipin: a stereospecifically spin-labeled
analogue and its specific enzymic hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America* **75**, 1227-1231 (1978).
- 617 Bian, Z. *et al.* Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their
potential biological functions. *Cell research* **20**, 1076-1078, doi:10.1038/cr.2010.119 (2010).
- 618 Duarte, F. V., Palmeira, C. M. & Rolo, A. P. The Role of microRNAs in Mitochondria: Small
Players Acting Wide. *Genes* **5**, 865-886, doi:10.3390/genes5040865 (2014).
- 619 Barrey, E. *et al.* Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PloS one* **6**,
e20220, doi:10.1371/journal.pone.0020220 (2011).
- 620 Sripada, L., Tomar, D., Prajapati, P., Singh, R. & Singh, A. K. Systematic analysis of small
RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of
mitochondrial associated miRNA. *PloS one* **7**, e44873, doi:10.1371/journal.pone.0044873
(2012).
- 621 Maianski, N. A. *et al.* Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role
restricted to apoptosis. *Cell death and differentiation* **11**, 143-153,
doi:10.1038/sj.cdd.4401320 (2004).
- 622 Chacko, B. K. *et al.* Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets,
lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood.
Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **93**, 690-700,
doi:10.1038/labinvest.2013.53 (2013).
- 623 Reuter, H. & Gross, R. Platelet metabolism. *Supplementum ... ad Thrombosis and
haemostasis* **63**, 87-95 (1978).
- 624 Pelletier, M., Billingham, L. K., Ramaswamy, M. & Siegel, R. M. Extracellular flux analysis to
monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption. *Methods in enzymology* **542**,
125-149, doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00007-8 (2014).
- 625 Lotvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and
their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.
Journal of extracellular vesicles **3**, 26913, doi:10.3402/jev.v3.26913 (2014).

- 626 Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791-3799 (1999).
- 627 Italiano, J. E., Jr., Mairuhu, A. T. & Flaumenhaft, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Current opinion in hematology* **17**, 578-584, doi:10.1097/MOH.0b013e32833e77ee (2010).
- 628 Marcus, A. J., Ullman, H. L. & Safier, L. B. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *Journal of lipid research* **10**, 108-114 (1969).
- 629 Pienimaeki-Roemer, A. *et al.* Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion* **55**, 507-521, doi:10.1111/trf.12874 (2015).
- 630 Wahle, K. W. & Peacock, L. I. Effects of isomeric cis and trans eighteen carbon monounsaturated fatty acids on porcine platelet function. *Biochimica et biophysica acta* **1301**, 141-149 (1996).
- 631 Naccache, P. H., Molski, T. F., Volpi, M. & Sha'afi, R. I. Modulation of rabbit neutrophil aggregation and degranulation by free fatty acids. *Journal of leukocyte biology* **36**, 333-340 (1984).
- 632 Siafaka-Kapadai, A., Hanahan, D. J. & Javors, M. A. Oleic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human platelets: is oleic acid an intracellular messenger? *Journal of lipid mediators and cell signalling* **15**, 215-232 (1997).
- 633 Simon, T. C., Makheja, A. N. & Bailey, J. M. The induced lipooxygenase in atherosclerotic aorta converts linoleic acid to the platelet chemorepellant factor 13-HODE. *Thrombosis research* **55**, 171-178 (1989).
- 634 Daret, D., Blin, P. & Larrue, J. Synthesis of hydroxy fatty acids from linoleic acid by human blood platelets. *Prostaglandins* **38**, 203-214 (1989).
- 635 Blaho, V. A., Buczynski, M. W., Brown, C. R. & Dennis, E. A. Lipidomic analysis of dynamic eicosanoid responses during the induction and resolution of Lyme arthritis. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21599-21612, doi:10.1074/jbc.M109.003822 (2009).
- 636 Jira, W., Spitteller, G. & Richter, A. Increased levels of lipid oxidation products in low density lipoproteins of patients suffering from rheumatoid arthritis. *Chemistry and physics of lipids* **87**, 81-89 (1997).
- 637 Serhan, C. N. *et al.* Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* **206**, 15-23, doi:10.1084/jem.20081880 (2009).
- 638 Smith, J. B., Ingeman, C., Kocsis, J. J. & Silver, M. J. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *The Journal of clinical investigation* **52**, 965-969, doi:10.1172/JC1107262 (1973).
- 639 Hashimoto, A. *et al.* Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **34**, 2144-2153 (2007).
- 640 Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T. & Shimizu, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *The Journal of experimental medicine* **192**, 421-432 (2000).
- 641 Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T. & Shimizu, T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12454-12459, doi:10.1074/jbc.M011361200 (2001).

- 642 Okuno, T. *et al.* 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for leukotriene B4 receptor 2. *The Journal of experimental medicine* **205**, 759-766, doi:10.1084/jem.20072329 (2008).
- 643 Tang, D. G. & Honn, K. V. Role of protein kinase C and phosphatases in 12(S)-HETE-induced tumor cell cytoskeletal reorganization. *Advances in experimental medicine and biology* **400A**, 349-361 (1997).
- 644 Chopra, H. *et al.* The lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE induces a cytoskeleton-dependent increase in surface expression of integrin alpha IIb beta 3 on melanoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **49**, 774-786 (1991).
- 645 Szekeres, C. K., Tang, K., Trikha, M. & Honn, K. V. Eicosanoid activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human epidermoid carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **275**, 38831-38841, doi:10.1074/jbc.M002673200 (2000).
- 646 Liu, B. *et al.* 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C-alpha in melanoma cells: role of receptor-mediated hydrolysis of inositol phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9323-9327 (1995).
- 647 Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A. & Ratajczak, M. Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **20**, 1487-1495, doi:10.1038/sj.leu.2404296 (2006).
- 648 Stalder, L. *et al.* The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *The EMBO journal* **32**, 1115-1127, doi:10.1038/emboj.2013.52 (2013).
- 649 Gagnon, K. T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. A. & Corey, D. R. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell reports* **6**, 211-221, doi:10.1016/j.celrep.2013.12.013 (2014).
- 650 Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* **11**, 1143-1149, doi:10.1038/ncb1929 (2009).
- 651 Ray, D. M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thromb Haemost* **99**, 86-95, doi:10.1160/TH07-05-0328 (2008).
- 652 Nazarewicz, R. R. *et al.* 12(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) increases mitochondrial nitric oxide by increasing intramitochondrial calcium. *Archives of biochemistry and biophysics* **468**, 114-120, doi:10.1016/j.abb.2007.09.018 (2007).
- 653 Gordon, J. A., Broekemeier, K. M., Spector, A. A. & Pfeiffer, D. R. Mitochondrial metabolism of 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic acids. *Journal of lipid research* **35**, 698-708 (1994).
- 654 Natarajan, R. *et al.* Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of atherosclerosis in a diabetic pig model. *Diabetologia* **45**, 125-133, doi:10.1007/s001250200014 (2002).
- 655 Pratico, D. *et al.* 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *The American journal of pathology* **164**, 1655-1662, doi:10.1016/S0002-9440(10)63724-8 (2004).
- 656 Richter, C., Frei, B. & Cerutti, P. A. Mobilization of mitochondrial Ca²⁺ by hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *Biochemical and biophysical research communications* **143**, 609-616 (1987).
- 657 Wright, H. L., Moots, R. J. & Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 593-601, doi:10.1038/nrrheum.2014.80 (2014).

- 658 Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Experimental hematology* **30**, 450-459 (2002).
- 659 Motulsky, A. G., Weinberg, S., Saphir, O. & Rosenberg, E. Lymph nodes in rheumatoid arthritis. *A.M.A. archives of internal medicine* **90**, 660-676 (1952).
- 660 Baddack, U. *et al.* A chronic model of arthritis supported by a strain-specific periarticular lymph node in BALB/c mice. *Nature communications* **4**, 1644, doi:10.1038/ncomms2625 (2013).
- 661 Forster, R. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33 (1999).
- 662 Chtanova, T. *et al.* Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* **29**, 487-496, doi:10.1016/j.immuni.2008.07.012 (2008).
- 663 Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Activation of B cells by non-canonical helper signals. *EMBO reports* **13**, 798-810, doi:10.1038/embor.2012.111 (2012).
- 664 Lee, L. K. *et al.* Selective inhibition of human group IIA-secreted phospholipase A2 (hGIIA) signaling reveals arachidonic acid metabolism is associated with colocalization of hGIIA to vimentin in rheumatoid synoviocytes. *The Journal of biological chemistry* **288**, 15269-15279, doi:10.1074/jbc.M112.397893 (2013).
- 665 Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature reviews. Rheumatology* **9**, 24-33, doi:10.1038/nrrheum.2012.190 (2013).
- 666 Cha, H. S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces vascular endothelial growth factor-C expression in rheumatoid synoviocytes. *The Journal of rheumatology* **34**, 16-19 (2007).
- 667 Kim, G. Y., Lee, J. W., Cho, S. H., Seo, J. M. & Kim, J. H. Role of the low-affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 915-920, doi:10.1161/ATVBAHA.109.185793 (2009).
- 668 Podgrabinska, S. *et al.* Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16069-16074, doi:10.1073/pnas.242401399 (2002).
- 669 Kerrigan, A. M. *et al.* CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. *J Immunol* **182**, 4150-4157, doi:10.4049/jimmunol.0802808 (2009).