



La circulation lymphatique véhicule des vésicules extracellulaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde

Thèse

Nicolas Tessandier

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

Québec, Canada

La circulation lymphatique véhicule des vésicules extracellulaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde

Thèse

Nicolas Tessandier

Sous la direction de:

Dr. Eric Boilard, directeur de recherche

Résumé

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie chronique portant un lourd fardeau sur la société. Sa prévalence en Europe du nord et Amérique du nord est comprise en 0.5% et 1.1%. Elle affecte en particulier les articulations et se caractérise par une infiltration leucocytaire, l'épaississement de la membrane synoviale et la destruction progressive du cartilage et de l'os. Toutefois, la polyarthrite rhumatoïde est une maladie systémique et peut aussi présenter des manifestations extra-articulaires, les plus fréquentes affectant le système cardiovasculaire. Parmi les acteurs de la pathogenèse articulaire, les plaquettes ont été incriminées comme capables de participer à cette inflammation, notamment par leur libération de vésicules extra-cellulaires (VEs). Les VEs peuvent s'infiltrer dans les articulations et amplifient l'inflammation, en interagissant avec les synoviocytes et neutrophiles.

En condition saine, la perméabilité vasculaire résiduelle de la circulation sanguine cause la fuite constante de petites quantités de liquide hors des vaisseaux sanguins. Ce liquide exfiltré de la circulation sanguine s'accumule temporairement dans l'espace interstitiel et forme le liquide interstitiel. La circulation lymphatique draine, de façon unidirectionnelle, ce liquide interstitiel lui permettant de regagner la circulation sanguine. En condition inflammatoire, dont articulaire, la perméabilité vasculaire est augmentée, formant un œdème, qui est également drainé par la circulation lymphatique, participant ainsi à sa résorption.

Au sein du laboratoire, nous avons contribué à mettre en évidence que la perméabilité vasculaire accrue pendant l'inflammation permettait la sortie de petites particules de la circulation sanguine et leur accumulation dans le tissu interstitiel adjacent. Ainsi, au cours de ces travaux, nous avons posé l'hypothèse que les vésicules pourraient emprunter cette perméabilité vasculaire, s'exfiltrant de la circulation sanguine et s'accumuler dans le liquide interstitiel où elles pourraient être drainées par la circulation lymphatique.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle murin d'athérosclérose, bien connu pour être associé à des dysfonctions de la circulation lymphatique. Dans ce contexte, nous avons établi les conditions nécessaires à la quantification de vésicules dans la lymphe. Cette étude nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la présence de vésicules extra-cellulaires dérivées de plaquettes et d'érythrocytes en circulation lymphatique, et ce même en condition saine. Toutefois, leurs concentrations augmentèrent durant l'inflammation

causée par l'athérosclérose.

Par la suite, nous avons travaillé avec un modèle murin d'arthrite inflammatoire. Dans ce contexte, l'inflammation localisée aux extrémités nous a permis d'étudier plus précisément les mécanismes permettant le passage des VEs de la circulation sanguine vers la lymphe. Nous avons pu, dans ce modèle également, décrire une augmentation de la concentration lymphatique de VEs, spécifiquement celles dérivées de plaquettes, au cours de la maladie. En contraste avec les VEs de plaquettes sanguines, la caractérisation des VEs de plaquette lymphatiques a révélé qu'elles ne semblaient pas contenir de mitochondries et ne contribuaient pas à la coagulation. Nos résultats suggèrent que l'influx lymphatique de VEs dérivées de plaquettes requiert l'expression transgénique du $Fc\gamma RIIA$, un récepteur aux complexes immuns de type IgG, présent sur les plaquettes humaines, mais normalement absent des plaquettes murines, ainsi que le récepteur au fibrinogène $\alpha IIb\beta_3$. De plus, en absence de sérotonine plaquettaire, la perméabilité vasculaire induite par l'inflammation est fortement réduite, et le transit subséquent de particules synthétiques vers le système lymphatique est atténué. Aussi, en absence de sérotonine plaquettaire, la concentration de VEs plaquettaires lymphatiques est diminuée.

Ainsi, nos résultats illustrent la contribution plaquettaire, via leur dégranulation de la sérotonine, comme étant capables, en contexte inflammatoire arthritique, de propager leur vésicules vers un espace qui leur est inaccessible, la circulation lymphatique.

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic disease having a major impact on our society. Its prevalence in northern Europe and northern America is between 0.5 to 1.1%. It primarily affects the joints, with characteristic leukocyte infiltration, synovial membrane thickening, cartilage and bone destruction. However, rheumatoid arthritis is a systemic disease with extra-articular manifestations, the most common affecting the cardiovascular system. Among actors contributing to articular pathogenesis, platelets have been identified as participating to inflammation, namely by their liberation of extracellular vesicles (EVs). EVs can infiltrate joints, where they amplify inflammation, through their interactions with synoviocytes and neutrophils.

Under healthy conditions, blood residual vascular permeability causes constant leakage of small quantities of liquid out of the blood vessels. This exfiltrated fluid accumulates temporarily in interstitial space and forms the interstitial liquid. Lymphatic circulation drains unidirectionally this interstitial liquid, enabling it to rejoin blood circulation. During inflammatory conditions, including articular inflammation, vascular permeability is increased, leading to edema. Lymphatic circulation drains the formed edema, contributing to its resorption.

We contributed to reveal that increased vascular permeability during inflammation could cause leakage of small particles, out of the blood circulation and their subsequent accumulation in the adjacent interstitial space. Thus, in this study, we formulated the hypothesis that vesicles could traffic through this permeable vasculature out of the blood vessels and accumulate in the interstitial space where they could be drained by the lymphatic circulation.

For a first step, we used a murine model of atherosclerosis well known to be associated with lymphatic circulation dysfunctions. In this context, we established conditions required for lymph extracellular vesicle quantification. This study revealed, for the first time, the presence of extracellular vesicles, originating from platelets and erythrocytes, in lymphatic circulation, even under healthy conditions. Nonetheless, their concentrations increased during inflammation related to atherosclerosis.

Then, we worked with a murine model of inflammatory arthritis. This context of localized inflammation at the paws enabled us to study more precisely the mechanisms leading to EVs transit from blood to lymph. In this model, we also reported a concentration increase of

vesicles, this time specifically of platelet-derived EVs. In contrast with blood platelet EVs, characterization of lymph platelet EVs revealed that they may lack mitochondria, and did not contribute to coagulation. Our results suggest that platelet lymphatic EVs influx required the transgenic expression of Fc γ RIIA, a receptor for immune complexes, present on human platelets, but normally absent from murine platelets, and the fibrinogen receptor α IIb β ₃. Furthermore, in mice lacking peripheral serotonin, inflammation-induced vascular permeability is greatly decreased, and the subsequent transit of synthetic particles to the lymphatic system is diminished. Also, in the absence of platelet-derived serotonin, platelet-derived EVs concentration in lymph is reduced.

Our results illustrate, in an arthritic inflammatory context, the platelet capacity to propagate their vesicles to the lymphatic circulation, a space usually inaccessible to them. This mechanism requires the secretion of serotonin by platelets.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Remerciements	xvii
Avant-propos	xviii
Introduction	1
0.1 La polyarthrite rhumatoïde	1
0.1.1 Épidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde	1
0.1.2 Facteurs de risque associés à la polyarthrite rhumatoïde	2
Facteurs génétiques	2
Facteurs épigénétiques	3
Facteurs environnementaux	4
Tabagisme	4
Pollution	5
Microbiote	5
0.1.3 Comorbidités	6
Définition	6
Maladies cardiovasculaires	6
Autres comorbidités	7
0.1.4 Anticorps caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde	8
Facteur rhumatoïde	8
Anticorps anti-peptides citrullinés	9
0.1.5 Récepteurs FC	10
FcγRIIA	12
FcγR dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde	12
0.1.6 Pathologie articulaire	13
La membrane synoviale	13
0.1.7 Cytokines clefs de la polyarthrite rhumatoïde	14
TNF	14

	IL-6	15
	Autres cytokines	15
0.1.8	Modèles murins de polyarthrite rhumatoïde	17
	Le modèle de transfert de sérum K/BxN	19
	Initiation de l'arthrite inflammatoire dans le modèle de transfert de sérum K/BxN	19
0.1.9	Contribution des plaquettes à la polyarthrite rhumatoïde	21
	Les plaquettes	21
	Signes d'activation plaquettaire chez les patients arthritiques	24
	Contribution des plaquettes aux dommages articulaires	25
	La sérotonine	25
	Plaquette et sérotonine dans la polyarthrite rhumatoïde	26
0.2	Les vésicules extra-cellulaires	27
0.2.1	Les vésicules extracellulaires et les mécanismes aboutissant à leur libération	27
0.2.2	Diversité des VEP	28
0.2.3	Contenu des vésicules extra-cellulaires de plaquettes	29
0.2.4	Demi-vie et clairance des VEP en circulation sanguine physiologique	31
0.2.5	Rôles physiologiques et pathologiques des VEP	32
	Rôle dans l'hémostase et la thrombose	32
	Rôle dans les maladies cardiovasculaires	34
	Rôle dans le cancer et l'angiogenèse	34
	Rôle dans l'immunité et l'auto-immunité	35
	Rôle dans la polyarthrite rhumatoïde	35
0.2.6	Figure récapitulative des contributions des VEP à diverses pathologies	37
0.3	La circulation lymphatique	39
0.3.1	Structure des vaisseaux lymphatiques	40
0.3.2	Progression de la lymphe dans les vaisseaux lymphatiques	41
0.3.3	Rôles physiologiques de la circulation lymphatique	42
	Canal thoracique : fonctions et variations anatomiques	42
	Composition cellulaire de la circulation lymphatique	43
0.3.4	La circulation lymphatique dans l'inflammation	43
0.3.5	La circulation lymphatique et la progression des cancers	45
0.3.6	La circulation lymphatique dans l'athérosclérose	46
	Développement des plaques d'athérome	46
	Présence de vaisseau lymphatiques drainant les plaques d'athérome	46
	La circulation participe à la résorption de l'œdème des lésions d'athérome	47
	La circulation lymphatique contribue au drainage du cholestérol et des lipoprotéines de haute densité	48
	La circulation lymphatique permet la sortie des cellules immunitaires hors des lésions d'athérome	48
0.3.7	La circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde	49
	Perturbations du système lymphatique chez les patients arthritiques	49
	Composition en médiateurs inflammatoires de la lymphe arthritique	50
	Altérations de la circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde	51
	Impact de la circulation lymphatique sur l'inflammation articulaire	52

0.4	Hypothèse	53
	Entrée des microvésicules de plaquettes dans l'articulation arthritique	53
	La circulation lymphatique draine l'articulation	53
Chapitre 1 : Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis		55
1.1	Résumé	56
1.2	Abstract	57
1.3	Introduction	58
1.4	Methods	59
	1.4.1 Animals	59
	1.4.2 Thoracic duct cannulation	59
	1.4.3 Cryo-transmission electron microscopy of lymph samples	60
	1.4.4 Extracellular vesicle labelling	60
	1.4.5 Flow cytometer sample analysis	61
	1.4.6 Statistics	61
1.5	Results and discussion	62
	1.5.1 Heterogeneous populations of EVs are present in lymph	62
	1.5.2 EV levels are modulated in lymph during atherosclerosis	63
1.6	Discussion	65
1.7	Acknowledgements	66
1.8	Conflict of interest and funding	66
1.9	Figures	67
Chapitre 2 : Platelets disseminate extracellular vesicles in lymph in rheumatoid arthritis		72
2.1	Résumé	73
2.2	Abstract	74
2.3	Introduction	75
2.4	Materials and methods	77
	2.4.1 Mice	77
	2.4.2 EV quantification	77
	2.4.3 Statistical analysis	78
2.5	Results	79
	2.5.1 PEV circulate in lymph in autoimmune inflammatory arthritis	79
	2.5.2 PEV are a predominant EV population in Fc γ RIIA K/BxN lymph	79
	2.5.3 Characterization of EV in lymph	80
	2.5.4 PEV do not contribute to lymph coagulation	81
	2.5.5 Role of Fc γ RIIA signaling through α IIb β ₃ in joint vasculature leakage	81
	2.5.6 Blood vessel permeability induced by platelet-derived serotonin supports PEV egress to the lymphatic system	82
2.6	Discussion	84
2.7	Acknowledgments	87
2.8	Sources of Funding	87
2.9	Disclosures	87
2.10	Figures	88
2.11	Supplementary Figures	97
2.12	Supplementary methods	110

2.12.1 Inflammatory arthritis induction in mice	110
2.12.2 Lymph collection	110
2.12.3 Western blot	110
2.12.4 MicroRNA analysis	111
2.12.5 Cell screening	112
2.12.6 Coagulation assay	112
2.12.7 Blood vessel permeability	112
2.12.8 Ankle lymphatic vessel quantification	113
2.12.9 PEV generation	113
2.12.10 PEV and lymphatic endothelial cell co-incubation	113
2.12.11 Data sharing statement	114
2.13 Supplementary material	115
Discussion et perspectives	117
Quantification des vésicules dans la lymphe	117
Impact de l'inflammation articulaire sur la composition de la lymphe thoracique	118
Fonctions des VEP lymphatiques	118
Passage des vésicules vers la circulation sanguine	119
Mécanisme de propagation des vésicules vers la lymphe, sous le contrôle des plaquettes?	120
Est-ce que la circulation lymphatique pourrait influencer le développement de maladies cardiovasculaires?	122
Perspectives	123
VEPs et ganglions lymphatiques	123
VEPs et vaisseaux lymphatiques	124
Conclusion	125
Bibliographie	126

Liste des tableaux

0.1	Distribution cellulaire des FcR	11
0.2	Modèles murin de polyarthrite rhumatoïde	18
2.1	Animals (in vivo studies)	115
2.2	Animal breeding	115
2.3	Antibodies	116
2.4	Cultured Cells	116

Liste des figures

0.1	Contenu des VEP	30
0.2	Contribution des VEP à divers processus physiologiques et pathologiques . . .	37
0.3	Le système lymphatique	39
0.4	Structure d'un ganglion	40
0.5	Structure des vaisseaux lymphatiques	40
0.6	Jonction des vaisseaux lymphatiques à la circulation sanguine	42
1.1	Assessment of lymph purity following collection and processing	67
1.2	Representative cryo-electron microscopy images of lymph extracellular vesicles (EVs)	68
1.3	Detection of EVs in lymph using flow cytometry	69
1.4	Dynamic light scattering size characterization of particles present in lymph of wild-type (WT) and LDLR ^{-/-} mice	70
1.5	Characterization of EVs in lymph of atherosclerotic mice	71
2.1	Lymph collection and lymph PEV quantification	88
2.2	PEV circulate in lymph in autoimmune inflammatory arthritis	89
2.3	PEV are a predominant EV population in Fc γ RIIA ^{TGN} K/BxN lymph	90
2.4	Characterization of EV in lymph	91
2.5	PEV do not contribute to lymph coagulation but interact with lymphatic endothelial cells	93
2.6	Role of Fc γ RIIA and its signaling through β_3 in joint vasculature leakage . . .	94
2.7	Blood vascular permeability induced by platelet-derived serotonin increases PEV content in the lymphatic system	96
2.8	Modèle proposé, illustrant la libération de vésicules, jusqu'à leur transit de la circulation sanguine vers la lymphe.	121

Liste des abbréviations

- 12-LO** 12-lipoxygénase
- ACPA** anticorps anti-peptides citrullinés (anti-citrullinated protein antibodies)
- ADN** acide désoxyribonucléique
- ADP** adénosine diphosphate
- ARN** acide ribonucléique
- ATP** adénosine triphosphate
- bFGF** facteur de croissance fibroblastique basique (basic fibroblast growth factor)
- CCL** chimiokine CC ligand
- CCR** chimiokine CC recepteur
- CD** cluster de différenciation
- CI** complexes immuns
- CLEC-2** lectine de type C, de domaine appartenant à la famille 1, membre B
- CMH** complexe majeur d'histocompatibilité
- CTLA-4** antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
- Del-1** locus de développement endothélial-1 (developmental endothelial locus-1)
- EBV** virus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus)
- EDTA** Éthylènediaminetétraacétique
- EGF** facteur de croissance endothéliale (endothelial growth factor)
- EMCV** virus de l'encéphalomyocardite (encephalomyocarditis virus)
- FLIPR** protrusions induites par le flux (FLow-Induced PRotrusions)
- FLS** synoviocytes fibroblastiques (fibroblast-like synoviocytes)
- fMLF** N-Formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF)
- G6PI** glucose-6-phosphate isomérase
- GALT** plaques de Peyer (gut-associated lymphoid tissue)
- Gas6** protéine spécifique de l'arrêt de la croissance 6 (growth arrest specific 6)

GM-CSF facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GPVI glycoprotéine VI

GTP guanosine triphosphate

HDL lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins)

HEVs veinules à endothélium épais (high endothelial venules)

HLA antigène des leucocytes humains (human leukocyte antigen)

HUVECs cellules endothéliales dérivées de veine ombilicale humaine (human umbilical vein endothelial cells)

ICAM molécule d'adhésion intercellulaire 1 (intercellular adhesion molecule 1)

IFN interféron

IgG immunoglobulines de type G

IL interleukine

iNOS synthase de NO inductible (inducible nitric oxide synthase)

ITAM motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

ITP purpura thrombopénique immunologique (immune thrombocytopenic purpura)

LAMP-1 protéine 1 associée au lysosome (lysosomal-associated membrane protein 1)

LDL lipoprotéines de basse densité (low density lipoproteins)

LDLR récepteur aux lipoprotéines de basse densité (low-density lipoprotein receptor)

LEC cellules endothéliales lymphatiques (lymphatic endothelial cells)

LED lupus érythémateux disséminé

M-CSF facteur stimulant les colonies de macrophages (macrophage colony-stimulating factor)

MK mégacaryocyte

MMP métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinases)

MPV volume plaquettaire moyen (mean platelet volume)

NO oxyde nitrique (nitric oxide)

NOD diabétiques et non-obèses (non-obese diabetic)

OCS système canaliculaire ouvert (open canalicular system)

OR rapport des chances (odds ratio)

ox-LDL lipoprotéines de basse densité oxydées (oxidized low density lipoproteins)

PDGF facteur de croissance des plaquettes (platelet-derived growth factor)

PF4 facteur plaquettaire 4 (platelet factor 4)

PLN ganglion poplitéal (popliteal lymph node)

PPACK D-Phénylalaninyl-L-prolyl-L-arginine chlorométhyl k tone

PS phosphatidylsérine

PSGL-1 glycoprotéine liant la P-sélectine-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)

RANKL le ligand au récepteur activateur du facteur nucléaire $\kappa\beta$ (receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand)

RF facteur rhumato ide (rheumatoid factor)

SERT transporteur de la sérotonine (serotonin transporter)

SNP polymorphismes nucléotidiques (single-nucleotide polymorphism)

sPLA₂-IIA phospholipase sécrétée A₂-IIA

sVEGFR-2 forme soluble du récepteur 2 au facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor soluble receptor 2)

TF facteur tissulaire (tissue factor)

TLR récepteurs de type Toll (Toll-like receptors)

TMEM protéine transmembranaire (transmembrane proteine)

TNF facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor)

TPH tryptophane hydroxylase

TRAP phosphatase acide résistante au tartrate (tartrate-resistant acid phosphatase)

UV rayons ultraviolets B

VCAM molécule d'adhésion vasculaire (vascular adhesion molecule 1)

VEGF facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor)

VEGF-C facteur de croissance endothéliale vasculaire C (vascular endothelial growth factor C)

VEGF-D facteur de croissance endothéliale vasculaire D (vascular endothelial growth factor D)

VEGFR-2 récepteur 2 au facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor soluble receptor 2)

VEGFR-3 récepteur 3 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor receptor 3)

VEP vésicules extra-cellulaires dérivées de plaquettes

VIH virus de l'immunodéficiency humaine

VWF facteur de von Willebrand (von Willebrand factor)

*À toutes les personnes souffrant
de maladie mentale,
diagnostiquée ou non.*

Quand la curiosité est absente, et effacée peut-être jusqu'au souvenir des temps reculés où elle était encore vivante en nous - que faire pour lui redonner vie ?
Ceci est notre première, notre principale question, celle qui doit précéder toute autre.

Alexandre Grothendieck

Remerciements

Ce projet de doctorat a impliqué de nombreuses personnes, et je souhaite les remercier.

Je souhaite avant tout remercier mon jury de thèse, les Dr. Martin Olivier, Dr. Paul H. Naccache et Dr. David Marsolais d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je souhaite particulièrement remercier le Dr. Éric Boilard, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de m'avoir conseillé et encadré tout au long de ces cinq années de doctorat.

J'adresse des remerciements à tous les membres, présents et passés, de mon équipe, Nathalie, Emmanuelle, Isabelle, Tania, Geneviève, Yann, Audrey, Étienne, Sara, Anne, Florian, Flora, Priscilla, et Andréa pour leur compagnie, soutien et leur aide lorsque j'en avais le plus besoin.

Certains membres de l'étage sont aussi devenus des amis, et m'ont permis de passer de précieux bons moments. Je pense en particulier à Marine, Sofiane, Amna et Annabelle.

Enfin, je souhaite également remercier Anne-Laure, Imène et Sébastien pour leur soutien continu, y compris dans les périodes les plus difficiles.

Et je ne peux finir ces remerciements sans une pensée toute spéciale pour mes parents, qui m'ont toujours soutenu.

Avant-propos

La polyarthrite rhumatoïde est maladie chronique inflammatoire, affectant principalement les articulations. Notre équipe a contribué à décrire la participation des plaquettes à la pathogenèse de cette maladie. En 2010, le Dr. Éric Boilard publie un article dans le journal *Science*, détaillant que les vésicules extra-cellulaires dérivées de plaquettes pouvaient être détectées dans les liquides synoviaux de patients arthritiques, et qu'elles participaient à l'inflammation. Depuis, d'autres études menées par le laboratoire ont permis d'affirmer le caractère pro-inflammatoire de ces vésicules, dans la polyarthrite rhumatoïde. Elles peuvent être recouvertes de complexes immuns, et sont internalisées par les neutrophiles, deux mécanismes participant activement à l'inflammation articulaire.

Une autre étude de notre équipe, publiée dans le journal *Blood*, en 2012, décrit que les plaquettes pouvaient induire de la perméabilité vasculaire dans l'articulation arthritique. Les plaquettes activées libèrent de la sérotonine, permettant à des particules de petit diamètre, synthétiques dans cet article, de s'exfiltrer de la circulation sanguine et s'accumuler dans le tissu interstitiel de l'articulation enflammée. Cet article suggère ainsi un mécanisme possible d'entrée des vésicules dans l'articulation. Toutefois, jusqu'à ce jour, une voie permettant la sortie des vésicules de l'articulation n'est pas connue.

La circulation lymphatique est connue comme drainant le liquide interstitiel, et participant à la résorption de l'œdème, y compris au niveau des articulations enflammées. Ainsi, l'hypothèse que la circulation lymphatique pourrait constituer une voie d'échappatoire des vésicules accumulées dans les articulations enflammées fut le point de départ de ce projet. La difficulté technique de collecter de la lymphe murine fut un premier obstacle. Grâce à la collaboration avec la Dre Martel de l'université de Montréal, nous avons pu apprendre cette chirurgie, permettant de récolter de la lymphe murine, au niveau du canal thoracique. Dans un premier temps, nous avons étudié la circulation lymphatique dans un modèle murin d'athérosclérose. Cette première étape nous a permis d'établir les bases techniques de la quantification de vésicules dans la circulation lymphatique. Nous avons également pu décrire pour la première fois la présence de vésicules en circulation dans la lymphe, et ce même en condition saine. Dans ce modèle, leur concentration était modulée par la maladie.

Cette étude donna lieu à une première publication :

Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis.

Andreea Milasan[#], **Nicolas Tessandier**[#], Sisareuth Tan, Alain R. Brisson, Éric Boilard[✉]
et Catherine Martel[✉]

[#] : Co-premiers auteurs

Journal of Extracellular Vesicles, Volume 5, 2016 - Issue 1

PMID: 27664155

Dans un second temps, nous avons étudié la circulation lymphatique durant l'arthrite inflammatoire. Dans ce contexte, nous avons pu décrire la présence de vésicules dans la lymphe de souris saines, et arthritiques, et avons reporté une augmentation de leur concentration au cours de cette maladie. La suite de cette étude s'est intéressée à leur caractérisation, à leur éventuelle fonction, et aux mécanismes permettant leur transit, de la sortie de la circulation sanguine, jusqu'à leur détection dans la circulation lymphatique. Notre étude rapporte les plaquettes comme étant impliquées dans la propagation de leur vésicules, vers la lymphe.

Ce projet donna lieu à un second manuscrit :

Platelets Disseminate Extracellular Vesicles in Lymph in Rheumatoid Arthritis.

Nicolas Tessandier, Imene Melki, Nathalie Cloutier, Isabelle Allaëys, Adam Miszta, Sisareuth Tan, Andreea Milasan, Sara Michel, Abderrahim Benmoussa, Tania Lévesque, Francine Côté, Steven E. McKenzie, Caroline Gilbert, Patrick Provost, Alain R. Brisson, Alisa S. Wolberg, Paul R. Fortin, Catherine Martel et Éric Boilard[✉]

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 26 Feb 2020, 40(4) :929-942

PMID: 32102567

Introduction

0.1 La polyarthrite rhumatoïde

0.1.1 Épidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie chronique portant un lourd fardeau sur la société[1]. En particulier, la polyarthrite rhumatoïde se classe 42^{ème} maladie en terme de mesure d'invalidité à l'échelle mondiale, juste derrière la malaria[1]. Son incidence varie en fonction des populations. En Europe du nord, et aux États-Unis, elle est estimée entre 20 et 50 cas pour 100 000 personnes, tandis qu'elle serait plus faible en Europe du sud, avec une incidence située entre 9 et 24 cas pour 100 000 personnes[2]. De nombreuses études ont rapporté une prévalence pour la polyarthrite rhumatoïde en Europe du nord et Amérique du nord comprise en 0.5% et 1.1%. En Europe du sud, la prévalence serait plus faible, entre 0.3% et 0.7%[2, 3].

Des prévalences particulièrement élevées ont pu être décrites, atteignant 5 à 6% pour certaines populations autochtones comme les Ojibwés, les Pikunis ou les Pimas[4]. Une étude longitudinale menée sur les populations autochtones du Manitoba a rapporté, qu'en comparaison aux patients non-autochtones, elles développent la polyarthrite rhumatoïde de façon plus précoce et présentent une maladie articulaire plus sévère, bien que recevant des traitements plus agressifs[5].

La polyarthrite rhumatoïde affecte environ deux à trois fois plus de femmes que d'hommes[3, 6]. Ainsi, le risque cumulé de développer la polyarthrite rhumatoïde pour les adultes américains était de 3.6% pour les femmes, et d'1.7% pour les hommes[6]. Le risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde pour les femmes est en partie attribué au rôle des œstrogènes sur l'inflammation[7]. Par exemple, les femmes ménopausées ont un risque plus élevé de développer la polyarthrite rhumatoïde (ratio de risque proportionnel de 2.1), tandis que les femmes ayant une ménopause précoce avaient elles un risque encore plus élevé de développer une polyarthrite rhumatoïde séronégative¹

1. Une polyarthrite rhumatoïde séronégative est définie comme étant négative pour le facteur rhumatoïde, et les anticorps anti-protéines citrullinées (voir sections 0.1.2 ou 0.1.4 pour plus de détails)

(ratio de risque proportionnel de 2.4)[8]. Bien que la prévalence de la polyarthrite rhumatoïde chez les hommes soit plus faible, ils développent la maladie plus tardivement et souffrent plus fréquemment d'une arthrite séropositive[9, 10].

0.1.2 Facteurs de risque associés à la polyarthrite rhumatoïde

On peut distinguer la polyarthrite rhumatoïde séropositive de la polyarthrite rhumatoïde séronégative. La présence d'anticorps anti-peptides citrullinés (anti-citrullinated protein antibodies, ACPAs) et/ou de facteur rhumatoïde (rheumatoid factor, RF) constitue un marqueur de la polyarthrite rhumatoïde séropositive.

Certaines études rapportent que les patrimoines génétiques de ces deux formes peuvent être distingués[11], et suggèrent même qu'elles pourraient en fait constituer deux maladies distinctes[12].

Dans la suite de ce document, les polyarthrites rhumatoïdes séropositives et séronégatives seront distinguées comme deux sous-ensembles d'une seule maladie. Toutefois, lorsque pertinent, des distinctions seront effectuées entre les deux formes.

Facteurs génétiques

La polyarthrite rhumatoïde comporte une grande composante génétique. En effet, il a été estimé que l'héritabilité de la polyarthrite rhumatoïde séropositive se situe entre 40 et 65%[13].

L'héritabilité de la polyarthrite rhumatoïde séronégative serait quand à elle plus faible, autour de 20%[14]. Toutefois, malgré cette forte composante génétique dans la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde, le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes n'est que de 15%. Il a ainsi été suggéré que bien que la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde soit partiellement déterminée génétiquement, le déclenchement effectif de la maladie dépendrait de composantes non-génétiques, comme épigénétiques, post-transcriptionnelles ou environnementales[15].

L'un des loci fortement associés à la polyarthrite rhumatoïde est l'antigène des leucocytes humains (human leukocyte antigen, HLA), codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)[16]. Certains allèles de ce locus codent en particulier pour une séquence spécifique d'acides aminés, localisée dans la boucle de liaison de la molécule du CMH au peptide, appelée « *l'épitope partagé* » (shared epitope), et sont fortement associés avec la polyarthrite rhumatoïde[16]. En particulier, les loci reliés à

l'antigène D du HLA (HLA-DR) présentent plusieurs allèles associés à la polyarthrite rhumatoïde, comme HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04[16, 17]. De plus, d'autres génotypes du HLA sont également associés à des formes agressives et érosives de polyarthrite rhumatoïde, ayant également un taux de mortalité plus élevé[17]. L'ensemble de ces observations nous indique un rôle crucial de la liaison peptidique par les molécules HLA dans la polyarthrite rhumatoïde.

Des études d'association pangénomiques utilisant des polymorphismes nucléotidiques (single-nucleotide polymorphism, SNP) ont pu caractériser plus d'une centaine de loci associés à un risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde[18, 19]. On y retrouve par exemple des loci impliqués dans les voies de signalisation de stimulation des lymphocytes T (cluster de différenciation (CD)28, CD40), et des régulateurs négatifs de l'activation des lymphocytes T (PTPN22)[20-22].

De façon intéressante, il a été noté que certaines différences génétiques peuvent être observées quant à la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde séropositive comparée à la séronégative. Par exemple, la polyarthrite rhumatoïde séropositive est spécifiquement associée aux loci AFF3 ou CD28, tandis que la polyarthrite rhumatoïde séronégative est elle spécifiquement associée aux loci PRL ou NFIA[23, 24].

Facteurs épigénétiques

La susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde est également influencée par des facteurs épigénétiques. Des études d'épigénome pangénomiques ont permis d'identifier dix positions différenciablement méthylées, plus fréquemment détectées chez les patients, et qui pourraient contribuer au risque génétique de développer la polyarthrite rhumatoïde[25]. Il est à noter que la majorité de ces sites sont localisés dans la région codant pour le CMH, suggérant que les risques associés aux loci du HLA pourraient être en partie dus à des profils de méthylations distincts[25]. Une étude portant sur les jumeaux monozygotiques discordants quant au développement de la polyarthrite rhumatoïde a permis de mettre en évidence un de ces sites, localisé sur le gène EXOSC1[26]. Les méthylations peuvent également affecter des promoteurs, comme celui de l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) (CD152) dans les lymphocytes T régulateurs conduisant à leur fonctionnement défectif[27]. Les synoviocytes fibroblastiques, issus d'articulations arthritiques, présentent des profils de méthylations de l'acide désoxyribonucléique (ADN) altérés, ou des modifications du transcriptome, ce qui affecte leur phénotype, et crée ainsi un micro-environnement unique à chaque articulation[28].

Les micro-ARNs peuvent également constituer des acteurs épigénétiques, capables d'influencer le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Dans des modèles murins

de polyarthrite rhumatoïde, les micro-ARNs 155 et 146a (miR-155, miR-146a) ont été identifiés comme essentiels au développement de la maladie, en participant respectivement à la génération de lymphocytes T et B autoréactifs, et en régulant la destruction de l'os contrôlée par les fibroblastes synoviaux[29, 30]. D'autres micro-ARNs comme les micro-ARNs 124a et 223 ont également été liés à la polyarthrite rhumatoïde, en affectant respectivement les phénotypes des synoviocytes fibroblastiques, ou des lymphocytes T CD4⁺ naïfs[31, 32].

Facteurs environnementaux

En plus des facteurs génétiques et épigénétiques, l'environnement peut influencer le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, certaines études ont suggéré qu'avoir un statut socio-économique bas pourrait négativement influencer le cours de la maladie[33]. La diète semble jouer un rôle dans cette prédisposition. En effet, l'obésité est associée à un risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde, tout comme la consommation de sodas sucrés[34, 35]. Inversement, la consommation modérée d'alcool semble réduire ce risque chez les femmes[36]. À ces facteurs s'ajoute le stress. Ainsi, un trouble de stress post-traumatique a été décrit comme aggravant le risque de développer la polyarthrite rhumatoïde[37].

Dans les parties ci-dessous, nous élaborerons différentes composantes environnementales connues comme influençant la polyarthrite rhumatoïde.

Tabagisme

Le tabagisme est un important facteur de risque associé à la polyarthrite rhumatoïde. Une méta-analyse incluant 16 études s'intéressant au lien entre tabagisme, présent ou passé, et polyarthrite rhumatoïde, a pu déterminer que le tabagisme, quelle que soit sa forme, constitue un facteur de risque important pour le développement de la polyarthrite rhumatoïde. L'étude a particulièrement pu mettre en évidence un risque accru pour les hommes souffrant de polyarthrite rhumatoïde séropositive, ainsi que pour les patients ayant fumé pendant vingt années consécutives ou plus[38]. Le tabagisme semble particulièrement lié à un risque accru de développer une polyarthrite rhumatoïde séropositive (ACPA⁺), et les individus possédant une copie ou deux de l'épitope partagé voient leur risque de développer la polyarthrite rhumatoïde multiplié respectivement par 4 ou 19 (risques relatifs rapprochés de 1.9 (0 copie), 8.7 (1 copie) et 37.6 (2 copies))[39]. En plus d'interférer avec les risques de développer la maladie, le tabagisme a également été décrit comme aggravant sa sévérité, et l'augmentation des concentrations sériques de cytokines pro-inflammatoires[40]. Toutefois, ces résultats restent controversés, une

autre étude n'ayant pas relevé de différence quant à la manifestation clinique de la maladie, entre les patients fumeurs ou ayant fumé dans leur vie, en comparaison aux non-fumeurs[41].

Pollution

La pollution aérienne a également été rapportée comme un facteur de risque pour la polyarthrite rhumatoïde. Les travailleurs exposés au silice ont un risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde[42]. De même, l'exposition à la poussière textile, chez une population de femmes malaisiennes a été rapportée comme augmentant significativement le risque de développer la polyarthrite rhumatoïde (rapport des chances (odds ratio, OR) = 2.8)[43]. Cette association a été décrite tant pour les patients séropositifs pour les ACPA (OR = 2.5) que pour les patients séronégatifs pour les ACPA (OR = 3.5). Une forte combinaison statistique a également pu être observée entre l'exposition à la poussière textile et la présence d'un allèle de l'épitope partagé (OR = 39.1)[43]. Chez les personnes ayant travaillé sur le site des tours du World Trade Center, une exposition aiguë ou chronique à la poussière des bâtiments effondrés leur confère un risque accru de développer des maladies auto-immunes, parmi lesquelles la polyarthrite rhumatoïde est la plus fréquente[44].

Microbiote

Les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde présentent un microbiote intestinal perturbé. Une étude a décrit que la diversité du microbiote intestinal était diminuée chez ces patients[45]. Plus précisément, certains taxons habituellement rares comme *Actinobactère* sont chez ces patients significativement augmentés, au profit d'autres taxons habituellement élevés, comme *Faecalibacterium*[45]. Une autre équipe a rapporté la présence accrue de la bactérie *Prevotella copri*, spécifiquement chez les patients nouvellement identifiés et non traités, en comparaison avec ceux sous traitement, ou les contrôles sains[46]. Des peptides isolés de complexes CMH provenant de patients arthritiques présentaient de forte homologie de séquence avec l'espèce *Prevotella*, suggérant ainsi un lien entre environnement et le déclenchement de la maladie[47].

Les expositions virales, notamment par le virus B19 ont également pu être corrélées avec le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde sont plus fréquemment infectés par le virus B19, et l'ADN libre du virus est plus fréquemment détecté dans le plasma de patients arthritiques que chez les contrôles sains. Les patients arthritiques infectés par le virus B19 présentent une activité de la maladie supérieure, comme indiquée par de plus hauts scores de dommages cliniques[48]. La même équipe a également décrit les patients arthritiques infectés par le

virus B19 comme présentant des concentrations plasmatiques d'interleukine (IL)-4, IL-10, IL-12, IL-2 et de facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor, TNF) élevées[49]. De même, les concentrations sanguines de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ régulateurs étaient augmentées chez les patients arthritiques, suggérant un environnement d'infection persistant lors de l'infection par le virus B19. Toutefois, les mécanismes exacts par lesquels le virus B19 pourrait influencer le polyarthrite rhumatoïde restent encore à déterminer[50]. Le virus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV) est également un pathogène décrit comme étant associé à la polyarthrite rhumatoïde[51]. Notamment, EBV a été étudié pour son rôle supposé dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, l'hypothèse d'un déclencheur viral déclenchant la polyarthrite rhumatoïde, par mimétisme moléculaire, chez les personnes prédisposées génétiquement a été formulée[52]. Les patients arthritiques présentent des niveaux accrus d'anticorps dirigés contre certaines protéines virales d'EBV[53, 54]. Les niveaux d'ADN et d'ARNm provenant d'EBV sont également particulièrement élevés dans les synovies de patients arthritiques, en comparaison aux contrôles sains[55, 56]. De plus, l'infection par le virus EBV, en combinaison avec la présence de l'épitope partagé semble prédisposer fortement à la polyarthrite rhumatoïde[56]. Enfin, l'infection par le virus du chikungunya peut résulter dans le déclenchement de pathologie similaire à la polyarthrite rhumatoïde, même après la fin de l'infection par le virus[57].

0.1.3 Comorbidités

Définition

Une comorbidité est définie comme la présence de deux, ou plusieurs, maladies affectant un même individu. Les multiples maladies doivent être associées l'une à l'autre via des mécanismes pathologiques en commun, et être plus fréquemment présentes que la distribution dans la population générale. La présence de deux maladies simultanément, mais avec une distribution aléatoire est appelée multicomorbidité. Certains auteurs utilisent même les termes hyper-comorbidités, pour distinguer deux maladies plus fréquemment associées que la normale, et hypo-comorbidités pour désigner deux maladies associées à une fréquence plus faible que la normale.

Maladies cardiovasculaires

Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde souffrent d'un risque accru de mort prématurée en comparaison à la population générale[58]. Il est à noter que, pour cette cohorte, l'excès de mortalité est plus marqué chez les femmes que chez les hommes[58]. La principale cause pour cette augmentation de la mortalité est les maladies cardiovascu-

lares. Une méta-analyse regroupant quatorze études et 41 490 patients a pu déterminer que les patients arthritiques avaient un risque de maladie cardiovasculaire (quelque soit le type) accru de 48%. Plus précisément, le risque d'infarctus du myocarde était augmenté de 68%, tandis que le risque d'évènements cérébrovasculaires était lui augmenté de 41%[59]. Il est à noter que les infarctus du myocarde sont majoritairement causés par la rupture d'une plaque d'athérome, obstruant une artère coronaire. Le rythme de progression des lésions d'athérome est accéléré chez les patients arthritiques. De plus, les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde présenteraient un phénotype de plaque d'athérome plus prompt à la rupture[60]. Le risque accru de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires chez les patients arthritiques est fortement lié à l'inflammation. En effet, les maladies cardiovasculaires et la polyarthrite rhumatoïde présentent certains processus pathologiques similaires, et partagent certains facteurs de risques. Ainsi, la présence de ces facteurs de risques pourraient promouvoir les deux maladies simultanément. Parmi les facteurs de risque partagés par les deux maladies, on retrouve des facteurs génétiques. Par exemple, une étude d'association pangénomique a pu relever cinquante-cinq SNP en commun entre les maladies cardiovasculaires et la polyarthrite rhumatoïde[61]. Une autre étude génomique a identifié les loci de NF- κ B comme étant particulièrement affectés par les SNP prédisposant à multiples maladies, dont la polyarthrite rhumatoïde et les infarctus du myocarde[62]. Le gène HLA-DRB1 est connu comme étant associé à un risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde. Similairement, une étude portant sur les infarctus du myocarde a pu décrire une association entre l'haplotype DRB1*01 et cette maladie[63]. Certains facteurs environnementaux, comme le tabagisme prédisposent similairement aux deux maladies[64]. Les ACPA, bien connus comme étant associés à la polyarthrite rhumatoïde, sont également un facteur de risque pour les maladies cardiaques coronaires[65]. Pour ce qui est des processus inflammatoires, de nombreux points communs peuvent être décrits entre la pathogenèse de l'athérosclérose et la polyarthrite rhumatoïde. Par exemple, les deux maladies sont caractérisées par l'infiltration de cellules immunitaires, comme les macrophages ou les lymphocytes Th1, dans un cas dans la membrane synoviale, dans l'autre dans la plaque d'athérome. Cette infiltration est dans les deux cas facilitée par l'activation des cellules endothéliales. On retrouve également de la néo-angiogenèse vasculaire, et la dégradation du collagène de la matrice extra-cellulaire par les métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinases, MMPs)[66].

Autres comorbidités

Bien que les maladies cardiovasculaires aient été décrites comme représentant les plus fréquentes comorbidités chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, d'autres

comorbidités ont également été relevées. Le poumon est un organe particulièrement associé aux manifestations extra-articulaires de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, les patients arthritiques présentent un risque accru de développer une pneumopathie interstitielle[67]. De même, ils sont plus fréquemment affectés par les cancers du poumon que la population générale[68]. Il est à noter cependant que certaines études ont rapporté une fréquence de tabagisme plus importante chez les patients arthritiques, pouvant possiblement expliquer une partie de ces atteintes pulmonaires[69]. Les patients arthritiques présentent également une incidence accrue de lymphomes, quelque soit le type (hodgkiniens ou non), et de dépression[68, 70]. Enfin, l'utilisation de traitements biologiques à forte dose est associée avec un risque important de développer des infections majeures[71]. À l'inverse, les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde semblent présenter des risques diminués de développer des cancers colorectaux, ou la maladie d'Alzheimer[68, 72].

0.1.4 Anticorps caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde

Chez la plupart des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, la pathogenèse est déclenchée plusieurs années avant que des signes cliniques puissent être reconnus[73]. Notamment, plusieurs études prospectives et rétrospectives ont pu montrer que des anticorps caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde pouvaient être détectés plusieurs années avant le diagnostic clinique de la maladie[73].

Facteur rhumatoïde

Le facteur rhumatoïde a été, et est encore, utilisé comme marqueur de diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde. Toutefois, il n'est pas spécifique à cette maladie, et peut être détecté chez des patients atteints d'autres maladies auto-immunes[74]. Ainsi, deux études, menées respectivement sur une cohorte islandaise et finnoise ont pu détecter des taux élevés de RF plusieurs années avant le diagnostic clinique de polyarthrite rhumatoïde[75, 76]. La présence d'anticorps, (RF ou ACPA) est associée à une polyarthrite rhumatoïde plus sévère, des dommages articulaires accrus, et une mortalité précoce[77-79]. Un des mécanismes proposé pour expliquer ces associations est la formation de complexes immuns par la liaison des ACPA aux peptides citrullinés[80], suivie de la liaison par le RF, une immunoglobuline ciblant le fragment Fc d'immunoglobulines de type G (IgG). Ces complexes peuvent ensuite activer la voie du complément[81].

Anticorps anti-peptides citrullinés

La citrulline est un acide aminé atypique, formée par la déimination, également appelée citrullination, de l'acide aminé arginine, en une citrulline. Ainsi, la citrulline n'est pas l'un des acides aminés standards, mais est le résultat d'une modification post-traductionnelle. La citrulline a été impliquée dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. Par exemple, certains isotypes de l'enzyme catalysant la réaction de déimination, la peptidyl-arginine déiminase, sont connus comme étant régulés à la hausse dans les synovies de patients arthritiques[82]. La conversion de l'arginine en citrulline au niveau de la boucle de liaison de la molécule du CMH au peptide, augmenterait l'affinité de l'interaction peptide-CMH, et permettrait l'activation de lymphocytes CD4⁺[83]. Ce mécanisme pourrait constituer une piste permettant d'expliquer comment les allèles codant pour l'épitope partagé pourraient déclencher une réponse immune aux antigènes citrullinés du soi chez les patients arthritiques.

Les ACPA peuvent se lier à de nombreuses protéines du soi citrullinées, incluant la vimentine, l' α -enolase, le fibrinogène et le collagène de type II[84]. Les ACPA circulant peuvent être détectés jusqu'à cinq ans avant le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde[85]. La présence d'ACPA dans le sérum, avant la détection de signes cliniques d'inflammation aux articulations, suggère que la production initiale d'ACPA pourrait se situer à un autre site anatomique que les articulations. Les poumons ont été suggérés comme organe candidat[86]. Le tabagisme, un facteur de risque pour la polyarthrite rhumatoïde ACPA⁺, peut induire la citrullination de protéines dans les poumons, ainsi que l'activation de cellules présentatrices d'antigène locales[87, 88]. Certaines études ont pu décrire un enrichissement en ACPA dans les lavages broncho-alvéolaires, au stade précoce de polyarthrite rhumatoïde ACPA⁺[89]. De même, des centres germinatifs ectopiques ont été repérés dans les poumons, suggérant une production locale d'ACPA[90]. Une hypothèse proposée pour expliquer ce lien entre formation des ACPA aux poumons et réaction inflammatoire aux articulations est l'existence d'épitopes partagés entre ces deux sites anatomiques distincts. En cohérence avec cette hypothèse, plusieurs cibles potentielles des ACPA ont été identifiées dans les membranes synoviales de patients arthritiques[91-95], tandis qu'elles seraient très peu présentes voire absentes chez les donneurs sains[96].

Les ACPA de type IgG peuvent être glycosylés sur leur portion Fc, ce qui leur confère un profil pro-inflammatoire[97]. Chez les patients arthritiques, des lymphocytes B producteurs d'ACPA peuvent être détectés en circulation sanguine, et même dans la synovie[98, 99]. De plus, les ACPA peuvent soutenir la pathogenèse arthritique. Les ACPA peuvent par exemple induire l'ostéoclastogenèse, et participent ainsi à la résorption de l'os[100].

Les ACPA peuvent également induire la NETose[101], activer le complément (par le voie classique ou alternative)[102], ou encore stimuler la production de cytokines par les macrophages et les mastocytes chez les patients arthritiques[103, 104].

0.1.5 Récepteurs FC

Les RF ou ACPA, lorsque liés à leurs antigènes forment ce qu'on l'on nomme un complexe immun. Les récepteurs Fc, liant les fragments Fc des immunoglobulines, peuvent lier ces complexes immuns, participent à l'activation leucocytaire, et sont impliqués dans de nombreux processus immunologiques.

Les récepteurs Fc sont classés en différents sous-types, selon la classe de chaîne lourde d'immunoglobuline qu'ils sont capables de lier. On retrouve ainsi les Fc α , ε , γ et μ , liant respectivement les IgA, IgE, IgG ou IgM. Les récepteurs Fc sont principalement exprimés par les cellules immunes. La distribution des différents récepteurs Fc chez l'humain est récapitulée ci-dessous dans le tableau 0.1)

	Fc μ R	Fc α / μ R	Fc α RI	FcRL4	Fc ϵ RI	Fc ϵ RII	Fc γ RI	Fc γ RII	Fc γ RIIIC	Fc γ RIIIA	
Alias	Toso	CD351	CD89	CD307d		CD23	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A
LB	+	+/-	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-
LT	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mono/MO	-	-	Mono+ MO+/-	-	+/-	[+]	+	+	+/-	+	+
Neutrophile	-	-	+	-	-	-	[+]	+	+/-	+	-
CDs	-	+/-	+/-	-	+/-	[+]	+	+	+	-	-
Basophile	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Mastocyte	-	-	-	-	+	-	[+]	+	-	-	-
Éosinophile	-	-	+	-	+/-	+	-	+	-	-	-
Plaquette	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

Table 0.1 – Distribution cellulaire des Fc récepteurs,

adapté de *Brubns P & Jönsson F, Immunological Review, 2015*[105].

+ : connu comme exprimé,

- : connu comme non-exprimé,

+/- : connu comme exprimé par seulement certaines sous-populations,

[+] : connu comme inductible,

? : inconnu.

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

NK : Natural Killer ;

Mono/MO : Monocyte/Macrophage ;

CDs : Cellules Dendritiques ;

Fc γ RIIA

La distribution cellulaire des récepteurs Fc chez la souris est similaire à celle de l'humain, décrite sur le tableau 0.1. Il existe toutefois quelques différences. Les récepteurs Fc γ RIIA, Fc γ RIIC et Fc γ RIIIB existent chez l'humain, mais sont absents chez la souris[106]. Ainsi, les plaquettes humaines possèdent un seul récepteur de type Fc γ (Fc γ R), le Fc γ RIIA. A contrario, les plaquettes murines quant à elles en sont dépourvues[107]. Fc γ RIIA possède un motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM). En se liant aux FcR, les complexes immuns permettent le pontage de plusieurs FcR, déclenchant une cascade de signalisation menant à l'activation de la cellule. En conséquence, les plaquettes humaines sont capables de s'activer en réponse aux complexes immuns, tandis que les plaquettes murines ne le sont pas[108].

Fc γ R dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde

L'implication des récepteurs Fc γ R au développement de la polyarthrite rhumatoïde a été principalement étudiée dans les modèles murins de polyarthrite rhumatoïde expérimentale². Les souris déficientes pour la chaîne γ , commune à tous les Fc γ R sont ainsi protégées du développement de la maladie, et ce dans plusieurs modèles murins de polyarthrite rhumatoïde[109-112].

Chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, les niveaux d'expression de Fc γ RIIa/b et de Fc γ RIIIa/b³ par les macrophages du tissu synovial ont été rapportés comme élevés et liés à une production accrue de TNF[113]. Similairement, des niveaux élevés d'expression de Fc γ RIIA et de Fc γ RIIIA ont été observés sur les monocytes en circulation sanguine ou dans les liquides synoviaux[114]. Plusieurs SNP, situés sur Fc γ RIIA (H ou R 131), Fc γ RIIA (F ou V 158) et Fc γ RIIIb (NA1 ou NA2), confèrent à ces récepteurs divers potentiels de liaison des sous-types d'IgG, ou capacités à phagocyter les complexes immuns (CI)[115]. Ainsi, le génotype R/R 131 du Fc γ RIIA est associé avec une sévérité accrue de la polyarthrite rhumatoïde[116]. Fc γ RIIIA F/V 158 a également, dans certaines études, été rapporté comme associé à risque accru de développer la polyarthrite rhumatoïde, bien que dans d'autres cohortes, cette association n'ait pu être observée[117-119].

L'ensemble de ces publications nous indique que les Fc γ R seraient impliqués dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde, et participeraient à l'environnement pro-inflammatoire affectant la membrane synoviale arthritique.

2. Une description des différents modèles murins de polyarthrite rhumatoïde sera donnée à la section 0.1.8

3. Cette étude a utilisé des clones d'anticorps ne permettant ni de distinguer entre Fc γ RIIa et Fc γ RIIb (clone 10.1) ni entre Fc γ RIIIa et Fc γ RIIIb (clone KB61)

0.1.6 Pathologie articulaire

La membrane synoviale

Bien que la polyarthrite rhumatoïde soit une maladie systémique, les articulations constituent le lieu principal d'atteinte de la maladie. Au sein de l'articulation, la membrane synoviale est principalement affectée.

La membrane synoviale (également appelée synovium) est un tissu spécialisé, bordant la surface interne de la capsule articulaire. Elle est en contact direct avec le liquide synovial. Au contact du liquide synovial, on trouve principalement des synoviocytes, certains de type A, ou synoviocytes macrophagiques (macrophage-like-synovial cells) et d'autres de type B ou synoviocytes fibroblastiques (fibroblast-like synoviocytes, FLS). En homéostasie, elle joue deux rôles principaux :

- La production de lubrifiant, limitant les frictions au niveau du cartilage
- La nutrition du cartilage, qui n'est pas alimenté par la circulation sanguine

En plus des deux types de synoviocytes (fibroblastiques et macrophagiques), la membrane synoviale est composée de fibroblastes, de vaisseaux sanguins, d'adipocytes et d'une faible quantité de cellules immunitaires. Durant la polyarthrite rhumatoïde, la membrane synoviale s'épaissit, en conséquence de l'activation et la prolifération des synoviocytes fibroblastiques et macrophagiques. Les synoviocytes macrophagiques produisent diverses cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, ou le TNF[120]. Ces cytokines peuvent participer à l'activation des FLS, qui vont à leur tour produire diverses molécules pro-inflammatoires. Les FLS sont principalement connus dans la pathologie articulaire de la polyarthrite rhumatoïde pour la production de MMPs, des enzymes protéolytiques pouvant dégrader la matrice extra-cellulaire, mais sont également capables de produire de l'IL-6[121]. Les FLS sécrètent aussi d'autres molécules pro-inflammatoires comme des chimiokines, des facteurs de croissance, des prostaglandines et des leucotriènes[121, 122]. Les FLS constituent les principaux acteurs responsables de la destruction du cartilage[122-124].

Une des caractéristiques cliniques de la polyarthrite rhumatoïde est sa propagation continue au fil de la maladie. En effet, la polyarthrite rhumatoïde commence généralement par affecter une seule articulation, mais progresse habituellement par la suite, jusqu'à potentiellement affecter la majorité des articulations. Les FLS ont été incriminés comme participant à cette propagation de la polyarthrite rhumatoïde vers des articulation précédemment non-affectées[125].

La membrane synoviale est également le siège de l'infiltration de nombreuses cellules immunitaires, parmi lesquelles on peut retrouver des cellules de l'immunité adaptative

(lymphocytes B, plasmablastes, plasmocytes, lymphocytes Th1 et lymphocytes Th17). L'accumulation de leucocytes résulte principalement d'une migration depuis la circulation sanguine, et non d'une prolifération locale. La migration cellulaire est rendue possible par l'activation des cellules endothéliales, via l'expression de molécules d'adhésion, comme les intégrines, les sélectines, ou des chimiokines. La majorité des cellules infiltrées dans la membrane synoviale est des cellules CD4⁺. Chez certains patients, elles peuvent s'organiser en structures lymphoïdes ectopiques tertiaires, formant un environnement au sein duquel les lymphocytes B matures peuvent proliférer, se différencier, et produire des anticorps[126]. On retrouve ainsi également des plasmablastes ou des plasmocytes dans les membranes synoviales arthritiques, certains d'entre eux produisant des RF ou des ACPA[99]. L'analyse des centres germinatifs suggère que dans certains cas, le processus de maturation de l'affinité des anticorps de type IgM peut se faire *in situ*[127].

0.1.7 Cytokines clefs de la polyarthrite rhumatoïde

La production de cytokines par les différentes cellules présentes dans la membrane synoviale est cruciale à la pathogenèse articulaire de la polyarthrite rhumatoïde. Les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde précoce présentent une signature cytokinique caractérisée par des cytokines dérivées de lymphocytes T, macrophages et cellules stromales (IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-1, IL-15, le facteur de croissance fibroblastique basique (basic fibroblast growth factor, bFGF) et le facteur de croissance endothéliale (endothelial growth factor, EGF). Cette signature particulière n'est pas détectée dans d'autres arthrites précoces, et n'est que transitoire, puisqu'absente chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde durablement établie[128].

TNF

Le TNF est une cytokine clef de la polyarthrite rhumatoïde. La contribution du TNF à la pathogenèse articulaire a notamment été étayée suite aux thérapies ciblant le TNF, utilisées chez les patients arthritiques[129]. Le TNF est en particulier connu pour son rôle dans l'activation des leucocytes, leur migration dans le tissu synovial, la production de MMPs, l'angiogenèse, la suppression de lymphocytes T régulateurs, et l'amplification de la douleur[130-135]. Il est à noter qu'il existe plusieurs traitements anti-TNF, dont l'adalimumab, le certilozumab pegol, l'étanercept, le golimumab et l'infliximab, présentement utilisés dans le cadre de traitements efficaces contre la polyarthrite rhumatoïde.

IL-6

L'IL-6 est une autre cytokine majeure de la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. Elle est détectée en forte concentration dans les liquides synoviaux arthritiques, et sa présence corrèle avec les caractéristiques histologiques de la synovite chronique[136]. Elle participe à la prolifération des lymphocytes T, et promeut, en combinaison avec l'IL-1 β et l'IL-23 leur différenciation en lymphocytes Th-17, les cellules productrices d'IL-17[137]. L'IL-6 serait capable de favoriser la liaison des neutrophiles à l'endothélium synovial, une étape clef de la migration des neutrophiles au sein de l'articulation[138]. De même, l'IL-6 est impliquée dans le recrutement de monocytes[139]. L'IL-6 est également connue comme participant au développement de la réponse adaptative. En effet, l'IL-6 stimule la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmatiques, et induit la production d'anticorps[140, 141]. Il existe également un traitement lié à l'IL-6 (anti-IL-6R) utilisé dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde.

Autres cytokines

Le rôle critique du TNF et de l'IL-6 dans la pathogenèse arthritique a été montré sans équivoque par l'efficacité des traitements ciblant ces cytokines dans les thérapies biologiques. Toutefois, d'autres cytokines sont également importantes dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde, et attirent présentement un intérêt, en particulier dans le cadre de patients réfractaires aux traitement anti-TNF. Les deux cytokines « alternatives » principales sont l'IL-17 et le GM-CSF.

L'IL-17 est une cytokine caractéristique d'une population de lymphocytes T-helper du même nom, Th17. Dans les modèles murins, L'IL-17A (communément dénommée IL-17) est impliquée à plusieurs étapes de l'arthrite inflammatoire, notamment en contribuant à l'inflammation synoviale, et participant à la destruction du tissu[142, 143]. Les souris déficientes en IL-17 sont protégées de l'arthrite induite par injection de collagène[144]. L'IL-17 induit la production de plusieurs médiateurs inflammatoires dans la membrane synoviale, comme le TNF, l'IL-6, l'IL-1 β ou certaines chimiokines comme l'IL-18. En synergie avec d'autres facteurs de croissance, elle participe à la survie prolongée des FLS, mais également à celle des lymphocytes T et B, contribuant à leur organisation en centre germinatif[145].

Le GM-CSF agit sur les macrophages, les neutrophiles, et les cellules dendritiques, induisant leur différenciation, et les polarisant vers un phénotype pro-inflammatoire[146]. Un essai clinique de phase II, utilisant le mavrilimumab, un inhibiteur du récepteur α du GM-CSF suggère une capacité rapide et efficace de ce traitement à diminuer les symptômes arthritiques[147].

Les dommages articulaires, à l'os et au cartilage, constituent un point central de la polyarthrite rhumatoïde. Les cellules immunes comme les macrophages, les neutrophiles ou les mastocytes participent aux dommages articulaires via la libération de médiateurs pro-inflammatoires, comme des cytokines ou des MMPs. Toutefois, les FLS sont considérés comme le type cellulaire jouant un rôle majeur dans la destruction du cartilage. Plus particulièrement, les FLS positifs pour la cadhérine 11 ont été incriminés[148]. En effet, ces FLS possèdent un potentiel invasif accru[149]. La destruction du cartilage par les FLS est une séquence de plusieurs étapes, incluant l'attachement au cartilage, et la synthèse d'enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire. Les FLS expriment des molécules d'adhésion, comme les intégrines $\alpha 5/\beta 1$, qui facilitent l'attachement des FLS arthritiques à la matrice extra-cellulaire du cartilage[121]. Les protéases libérées par les FLS, les MMPs et les cathépsines, jouent un rôle particulièrement important dans la destruction du cartilage. Parmi les MMPs sécrétées par les FLS arthritiques, on retrouve des collagénases (MMP-1 et MMP-13), ainsi que des stromélysines (MMP-3), qui participent activement à la destruction du cartilage dans la polyarthrite rhumatoïde[121]. L'importance de la contribution des FLS à la destruction du cartilage a été mise en lumière par des transplantations de FLS isolés de patients arthritiques, vers des souris immunodéficientes. Ces FLS transplantés sont capables d'envahir le cartilage murin[124]. Un des mécanismes proposé pour expliquer cette capacité persistante réside dans des profils de méthylation de l'ADN. En effet, ces profils de méthylation peuvent être différenciés entre des FLS dérivés de synoviums arthritiques, de ceux provenant de synoviums ostéoarthritiques, par exemple pour certains gènes codant pour les voies de signalisation de l'IL-6 (via JAK-STAT). Une seconde hypothèse s'intéresse aux mutations ciblant la protéine p53, un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire. En effet, des mutations affectant p53 ont été rapportées dans des FLS provenant de patients arthritiques[150]. De plus, l'inhibition de p53 dans les FLS augmente leur capacité invasive dans le cartilage, et perturbe leur entrée en apoptose[151, 152].

Le remodelage osseux est le produit d'un équilibre entre l'action des cellules responsables de la résorption du tissu osseux, les ostéoclastes, et les cellules synthétisant la partie non-minérale des os, les ostéoblastes. Quand cet équilibre est perturbé, comme cela peut être le cas lors de la polyarthrite rhumatoïde, l'érosion de l'os peut survenir. Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'environnement pro-inflammatoire induit la différenciation des ostéoclastes. Cette maturation se produit au sein du tissu synovial, en réponse à deux médiateurs, le facteur stimulant les colonies de macrophages (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) et le ligand au récepteur activateur du facteur nucléaire

κ/β (receptor activator of nuclear factor κ/β ligand, RANKL)[153-155]. Les ostéoclastes matures peuvent dégrader la matrice osseuse grâce à la production de protéases, incluant la cathépsine K, la MMP-9 et la phosphatase acide résistante au tartrate (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)[156]. Durant leur différenciation, les ostéoclastes peuvent également citrulliner la vimentine[100]. Ainsi, les ACPA peuvent se lier à la surface des ostéoclastes, induisant leur maturation (ostéoclastogenèse), et la résorption subséquente de l'os[100].

En parallèle à la stimulation de l'ostéoclastogenèse, les cytokines pro-inflammatoires inhibent la différenciation des ostéoblastes. En culture, des cytokines présentes dans l'articulation, comme le TNF et l'IL-1 β inhibent la différenciation des ostéoblastes[157, 158]. L'impact de l'inflammation locale sur la maturation des ostéoblastes a été étudié *in vivo* dans le modèle murin d'arthrite inflammatoire de transfert de sérum K/BxN. Dans ce modèle, les ostéoblastes présents dans les articulations de souris arthritiques sont dépourvus de marqueurs de maturation[159]. L'hypothèse proposée pour expliquer ce manque de maturation des ostéoblastes concerne la modulation à la baisse de la voie de signalisation Wnt[159].

0.1.8 Modèles murins de polyarthrite rhumatoïde

Les modèles murins récapitulant certains aspects de la pathogenèse humaine constituent des outils importants pour étudier les mécanismes sous-jacents. On peut distinguer deux grandes familles de modèles murins d'arthrites :

- les modèles inductibles
- les modèles spontanés génétiques

Un récapitulatif des modèles murins de polyarthrite rhumatoïde est donné ci-dessous dans le tableau 0.2.

Modèle animal	Abréviation	Espèce	Caractéristique	IC	LT
Modèles inductibles					
Stimuli immuns non-spécifique					
Arthrite induite par un adjuvant	AA	Rat Lewis	Auto-immunité	-	+
Arthrite induite par l'huile	OIA	Rat DA	Auto-immunité	-	+
Arthrite induite par le pristane	PIA	Rat DA	Auto-immunité	-	+
Auto-immunité dirigée contre le cartilage					
Arthrite induite par le collagène	CIA	Souris DBA	Antigène collagène de type II	+	+
Arthrite induite par les protéoglycans	PGIA	Souris Balb/c	Antigène protéoglycans	+	+
Agents infectieux ou exogènes					
Arthrite induite par paroi de streptocoques	SCW-A	Rat Lewis	Antigène persistant de bactérie	-	+
Flare	SCW-F	Souris	Th17	-	+
Arthrite induite par antigène	AIA	Souris, Lapin	Antigène persistant	+	+
Flare	AIA-F	Souris	Th17	-	+
Modèles spontanés transgéniques					
Arthrite induite par HTLV	HTLV	Souris	Antigène viral tax	-	+
Arthrite KRN	KRN	Souris K/BxN	Antigène GPI	+	+
Arthrite SKG	SKG	Souris	Déficiance de ZAP-70 (LT)	-	+
Arthrite GP130	GP130	Souris	Déficiance de STAT3 (LT)	-	+
Arthrite transgénique pour TNF	TNF ^{tg}	Souris	Sur-expression de TNF	-	-
Arthrite transgénique pour IL-1ra	IL-1ra ^{-/-}	Souris	Lymphocytes T auto-immuns	±	+
Arthrite transgénique pour IL-1	IL-1tg	Souris	Sur-expression d'IL-1	-	-
Modèles à complexes immuns					
Collagène de type II	CAIA	Souris DBA	Anticorps anti-CII murin	+	-
Sérum KRN	GPI	Souris Balb/c	Anticorps anti-GPI murin	+	-
Poly-L-Lysine-lysozyme	PLL-L	Souris DBA	Antigène cationique	+	-

Table 0.2 – Récapitulatif des modèles murins de polyarthrite rhumatoïde, d'après van den Berg[160]

Le modèle de transfert de sérum K/BxN

Ce projet de doctorat a utilisé le modèle de transfert de sérum K/BxN pour ces expérimentations relatives à la polyarthrite rhumatoïde.

Le modèle d'arthrite K/BxN a été rapporté la première fois en 1996, depuis le laboratoire de Mathis et Benoist[161]. Ce modèle a été découvert par un croisement entre les souris KRN et les souris diabétiques et non-obèses (non-obese diabetic, NOD). Les souris KRN possèdent un TCR transgénique, reconnaissant une ribonucléase bovine (RNase 43-56), présenté par le CMH-II de type I-Ak. La première génération issue de ce croisement, appelée K/BxN, développa une arthrite inflammatoire sévère, dès leur quatrième semaine[161]. Une étude subséquente a pu déterminer que le peptide reconnu par le TCR des souris K/BxN est la protéine ubiquitaire glucose-6-phosphate isomérase[162]. Il a par la suite été montré que le simple transfert de sérum de souris K/BxN pouvait suffire à déclencher une arthrite reproductible, dans des souris non-transgéniques, de fond C57BL/6 ou DBA/1[163]. Les souris déficientes en lymphocytes B ou lymphocytes T matures, sont sensibles à cette arthrite[163]. L'arthrite induite par ce transfert de sérum est temporaire, et s'estompe après 15 jours. Toutefois, elle peut être maintenue si l'on ré-injecte du sérum périodiquement[163].

Une question clef du modèle K/BxN réside dans le fait qu'une arthrite inflammatoire, spécifique des articulations, puisse se développer suite à la reconnaissance d'une enzyme ubiquitaire. Bien que la G6PI soit une protéine soluble, elle pouvait aussi être détectée à la surface des articulations, et que celle-ci était reconnue par des anticorps, aboutissant à la formation de complexes immuns, recrutant le complément[164]. Bien que de la G6PI ait pu également être observée sur d'autres organes, comme les glomérules de reins, dans cet organe, la formation de complexes immuns anti-G6PI n'aboutissait pas au recrutement du complément, suggérant ainsi que le déclenchement de la cascade immunitaire est spécifique de l'articulation[164].

Initiation de l'arthrite inflammatoire dans le modèle de transfert de sérum K/BxN

Le transfert de sérum K/BxN induit la formation de complexes immuns solubles, formés entre les anticorps anti-G6PI et la G6PI en circulation sanguine. Ces complexes immuns se lient et activent les neutrophiles via Fc γ RIII[165]. Ces neutrophiles activés libèrent différents médiateurs solubles, probablement vasoactifs, augmentant localement la perméabilité vasculaire[166]. Cette perméabilité vasculaire permet aux complexes immuns, via Fc γ RIII de se lier aux mastocytes, disposés à la péri-vasculature[167]. Une fois engagés, les mastocytes dégranulent, et libèrent du TNF et de l'histamine, causant

une perméabilité vasculaire rapide et plus généralisée[166]. Ceci déclenche une boucle d'amplification, aggravant la perméabilité vasculaire, et finit par rendre accessible l'articulation aux anticorps anti-G6PI. Toutefois, cette perméabilité n'est que temporaire (« flare »), et revient à la normale vingt à trente minutes après l'injection de sérum.

Une fois entrés, les anticorps anti-G6PI peuvent se lier à la G6PI située sur les articulations, et peuvent ainsi activer les cellules du système immunitaire inné. Cette étape implique l'activation du complément, des neutrophiles, des natural killers, des mastocytes, et des macrophages, à travers leur activation via les FcRs. L'activation de ces cellules résulte en la sécrétion de nombreux médiateurs inflammatoires, parmi lesquels on peut citer l'IL-1[166, 168]. Ainsi, l'arthrite induite par le transfert de sérum K/BxN est dépendante des neutrophiles, des macrophages, des mastocytes, des Fc γ Rs, de l'IL-1, de la voie alternative du complément et implique les natural killers[110, 167-172].

La pathologie déclenchée par le transfert de sérum K/BxN résulte en un phénotype similaire à celui observé chez l'humain. En effet, les manifestations cliniques de ce modèle incluent l'infiltration leucocytaire, l'épaississement de la membrane synoviale, la synovite, la destruction du cartilage et l'érosion de l'os[163, 173]. Toutefois, des différences existent entre ces deux pathologies. Notamment, ce modèle murin dépend de façon critique de la formation d'auto-anticorps, tandis qu'ils ne sont pas détectés chez une partie des patients arthritiques. De plus, la pathologie humaine implique les lymphocytes T CD4⁺, et les lymphocytes B. Bien que les lymphocytes T et B soient responsables de la production d'auto-anticorps, puisque ceux-ci sont directement injectés lors du transfert de sérum K/BxN ; les lymphocytes T et B sont dispensables dans ce modèle. Enfin, une autre différence notable est l'absence totale de développement d'arthrite dans le modèle de transfert de sérum K/BxN chez les souris déficientes en IL-1, tandis que les thérapies visant cette cytokine chez les patients arthritiques n'ont eu que des résultats mitigés[174].

Néanmoins, le modèle de transfert de sérum K/BxN reste un modèle pertinent pour mener des études portant sur l'arthrite inflammatoire. En effet, il possède l'avantage d'être rapide, avec les premiers signes cliniques apparaissant vingt-quatre à quarante-huit heures après la première injection. L'incidence est proche de 100%, et l'injection de sérum permet d'induire l'arthrite de façon synchronisée. Un grand avantage de ce modèle, est qu'il permet d'induire l'arthrite dans des souches de très nombreuses souris transgéniques ou invalidées pour un gène (souris knock-out, KO), ce qui permet de délimiter les différents acteurs contribuant au phénotype arthritique.

0.1.9 Contribution des plaquettes à la polyarthrite rhumatoïde

Les plaquettes

Les plaquettes sont des petites entités anucléées, abondantes en circulation sanguine. Leur identification comme des éléments à part entière fut établie parallèlement par trois scientifiques, W. Osler, G. Hayem et J. Bizzozero[175-177]. Bizzozero fut le premier à nommer les plaquettes "petites plaques" (« *piastriue* »), et à observer leur contribution à la formation de thrombus. Il identifia également les cellules précurseurs des plaquettes, les mégacaryocytes.

Les plaquettes sont de petits éléments du sang, avec un diamètre variant de 2 à 5 μm . Leur membrane plasmique est caractérisée par de nombreuses invaginations, appelées système canaliculaire ouvert (open canalicular system, OCS). Ces invaginations peuvent être « retournées », formant ainsi des dendrites, causant une augmentation de la surface de la plaquette[178]. Le cytoplasme plaquettaire contient différentes granules :

- Granules α ,
- Granules denses ou δ
- Granules λ

Les granules α contiennent majoritairement des protéines membranaires et des molécules solubles. On y retrouve par exemple des facteurs de croissance (facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor, VEGF), facteur de croissance des plaquettes (platelet-derived growth factor, PDGF), EGF), des facteurs de coagulation (facteur V, IX, plasminogène), des molécules d'adhésion (P-sélectine, $\alpha\text{IIb}\beta_3$) et des chimiokines (facteur plaquettaire 4 (platelet factor 4, PF4). Elles sont les plus abondantes dans les plaquettes, environ 10 fois plus nombreuses que les granules δ [179]. Les granules denses quant à elles contiennent principalement des nucléotides (adénosine diphosphate (ADP), adénosine triphosphate (ATP), guanosine triphosphate (GTP)) et des ions, tels que Ca^{2+} et PO_3^- . Elles contiennent également des amines, incluant l'histamine et la sérotonine. Enfin, les granules λ ou lysosomales renferment des protéases, hydrolases et glycosidases, impliquées dans la dégradation des thrombi.

Les plaquettes sont dépourvues d'ADN génomique, et de capacité de transcription. Toutefois, elles contiennent des ARN, dont des ARNm, des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert, ou des microARNs[180, 181]. Ces ARN sont transmis par les mégacaryocytes, en plus d'autres éléments essentiels à leur traduction[182]. Ainsi, les plaquettes traduisent des protéines membranaires, telles que les glycoprotéines Ib, IIb et IIIa de façon constitutive[183, 184]. Elles sont également capables de traduire certaines protéines,

comme le PF4 en réponse à l'activation plaquettaire[185, 186].

Les plaquettes sont des actrices critiques du maintien de l'intégrité des vaisseaux. Elles participent aux processus de thrombose et d'occlusion vasculaire[187]. Pour ce faire, elles adhèrent aux parois vasculaires endommagées. Elles possèdent de nombreux récepteurs leur permettant de lier des constituants de la matrice extra-cellulaire parmi lesquels on peut citer la glycoprotéine VI (GPVI) ou $\alpha\text{II}\beta_1$ liant le collagène, $\alpha_5\beta_1$ liant la fibronectine, et $\alpha_6\beta_1$ liant la laminine[188, 189]. Ainsi, lorsque l'endothélium est endommagé, les plaquettes peuvent se lier aux constituants de la matrice extra-cellulaire exposés, comme le collagène, via $\alpha\text{II}\beta_1$. Le facteur de von Willebrand (von Willebrand factor, VWF) est majoritairement libéré par les cellules endothéliales endommagées, mais les plaquettes peuvent également en produire[190]. Le VWF peut supporter la formation de thrombus, d'une part en renforçant l'adhésion plaquettaire au site endommagé, mais également en favorisant l'agrégation entre plaquettes. En effet, seule la première ligne de plaquettes est exposée à la matrice extra-cellulaire, les lignes suivantes dépendent des interactions plaquettes-plaquettes pour former le thrombus[191]. L'agrégation plaquettaire a lieu lorsque le fibrinogène et le VWF multimérique lient plusieurs plaquettes adjacentes, via les récepteurs $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activés. La liaison du fibrinogène induit une séquence de phosphorylations, déclenchée par la sous unité β , aboutissant à des ré-arrangements du cytosquelette, formant de longs filopodes[192].

Toutefois, l'interaction entre $\alpha\text{II}\beta_1$ et le collagène n'est pas suffisante pour aboutir à l'activation plaquettaire. En effet, la protéine GPVI est requise pour l'agrégation et l'activation plaquettaire suite à la liaison du collagène[193]. La protéine GPVI est en complexe avec $\text{FcR}\gamma$, une sous-unité possédant une portion ITAM[194]. Ainsi, la liaison du collagène, ou des peptides semblables au collagène, à GPVI, induit la phosphorylation des tyrosines du $\text{FcR}\gamma$ par une kinase de la famille des SRC, la phosphorylation subséquente de Syk, LAT et SLP-76, puis de la phospholipase $\text{C}\gamma_2$ [195-198]. Cette réaction s'ensuit d'une augmentation rapide de la concentration de calcium cytosolique, puis aboutit à la sécrétion de thromboxane A_2 , l'activation de la 12-lipoxygénase, et la libération des granules α et δ [199, 200]. L'augmentation du calcium cytosolique provoque également des changements morphologiques des plaquettes, notamment la formation de lamelipodes et le bourgeonnement de vésicules extra-cellulaires dérivées de plaquettes (VEPs)[201]. Il est à noter que l'activation de $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ par les complexes immuns, possédant lui aussi une portion ITAM, induit une signalisation similaire à celle de GPVI[202, 203].

Au delà de leur participation cruciale à l'hémostase sanguine, les plaquettes sont également connues comme des actrices de la réponse immune, et en conséquence ont été

décrites comme participant à de nombreux processus inflammatoires.

Les plaquettes migrent aux sites inflammatoires, par exemple en réponse aux protéines du complément. En effet, la P-sélectine est capable de lier à la protéine C3b, ce qui induit l'activation du système du complément, jusqu'à la formation de C5b-9. Les plaquettes expriment le récepteur au N-Formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF), et ont été décrites comme capables de migrer en réponse à un gradient de peptides formylés *in vitro*[204]. Les plaquettes expriment de nombreux récepteurs aux motifs de dangers, parmi lesquels on peut citer les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors, TLRs) 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 9[205]. Par exemple, l'infection par le virus de l'encéphalomyocardite (encephalomyocarditis virus, EMCV) induit une chute du compte plaquettaire, via le TLR-7[206]. Les plaquettes sont aussi connues comme pouvant internaliser le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1, sous l'action combinée de leurs récepteurs membranaires CLEC-2 et DC-SIGN[207, 208]. Un autre exemple de la contribution plaquettaire à la réponse aux pathogènes peut être donné à travers l'expression de FcR par les plaquettes. En effet, les plaquettes humaines expriment le Fc γ RIIA, ce qui leur permet de s'activer en réponse à des complexes immuns comportant par exemple le virus de l'influenza H1N1[209]. Des complexes immuns de types IgE ont également été décrits comme capables d'activer les plaquettes en réponse à des antigènes d'acariens domestiques[210]. Les plaquettes peuvent activement participer à l'élimination de pathogènes, par exemple avec la libération de chimiokine microbicide (appelée kinocidin en anglais)[211].

Les plaquettes possèdent de multiples récepteurs leur permettant d'interagir avec d'autres cellules immunitaires. Certains de ces récepteurs sont exprimés de façon constitutive, comme GP1b α , qui peut lier l'intégrine β 2 Mac-1 présente sur certains leucocytes, majoritairement neutrophiles[212]. L'arrêt des neutrophiles sur un vaisseau endommagé implique plusieurs étapes. La première, d'attachement et roulement des neutrophiles à l'endothélium implique la glycoprotéine liant la P-sélectine-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1), via sa liaison à la P-sélectine, exprimée par l'endothélium ou les plaquettes activées[213]. La protéine plaquettaire ICAM-2 permet également l'adhésion initiale entre plaquettes et leucocytes, via LFA-1[214]. La seconde phase, l'activation du neutrophile permet, suite à la liaison entre la P-sélectine et PSGL-1, l'activation du neutrophile, induisant un changement de conformation de Mac-1, vers une forme activée[215]. Ceci permet la transition en troisième phase, l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium impliquant Mac-1, lié à GP1b α ou α Iib β ₃ activée[214].

Mac-1 peut aussi être présent sur les cellules dendritiques, et permet aux plaquettes de les recruter aux sites de lésion endothéliale, via la protéine plaquettaire JAM-C, stimulant leur maturation[216]. Les plaquettes peuvent également influencer la différen-

ciation de monocytes en cellules dendritiques, en induisant l'expression de CD80/86, et de HLA-DR à leur surface.[217].

Les plaquettes constituent une source importante de CD40L contenu dans leurs granules α [218]. Une fois activées, les plaquettes expriment CD40L à leur membrane, induisant la sécrétion de molécules d'adhésion et de chimiokines par les cellules endothéliales[219]. En effet, le CD40L plaquettaire peut se lier au CD40 des cellules endothéliales, induisant l'expression d'E-sélectine, de la molécule d'adhésion vasculaire (vascular adhesion molecule 1, VCAM)-1 et d'ICAM-1 à leur surface, ainsi que la sécrétion d'IL-8 et MCP-1[219]. Aussi, le CD40L plaquettaire participe au développement de plaques d'athérome, notamment en favorisant les interactions leucocytes-endothélium, et en induisant une réduction du compte de lymphocytes T régulateurs en circulation sanguine[220]. L'interaction CD40L, aussi présent sur les lymphocytes T, et le CD40 des lymphocytes B a été décrite comme une étape clef de la formation de centres germinatifs et la production d'anticorps[221]. En utilisant un modèle de transfusion de plaquettes CD40L^{+/+} dans des souris CD40L^{-/-}, il a été montré que le CD40L plaquettaire pouvait être suffisant à induire la commutation isotypique et permettre l'activation des lymphocytes T CD8⁺ dans un modèle d'immunisation virale[222]. Il est à noter que les VEP ont également été décrites comme capables d'acheminer du CD40L aux ganglions, et de stimuler la production d'IgG et la formation de centres germinatifs[223]. De plus, les plaquettes contiennent les cytokines PF4 et RANTES qui peuvent influencer la différenciation des lymphocytes CD4⁺ en cellules Th1[224].

Signes d'activation plaquettaire chez les patients arthritiques

Chez les patients arthritiques, plusieurs indices cliniques concernant les plaquettes ont été rapportés comme altérés[225]. Par exemple, certaines études ont décrit que leur volume plaquettaire moyen (mean platelet volume, MPV) était diminué[226, 227]. Ces données nous suggèrent qu'au cours de la polyarthrite rhumatoïde, les plaquettes sont plus petites, possiblement suite à une maturation accélérée et une durée de vie raccourcie. De même, il a été rapporté que le compte plaquettaire est élevé chez certains patients arthritiques, et corrèle avec des marqueurs inflammatoires cliniques[228, 229]. Une hyperactivité plaquettaire a été détectée chez les patients arthritiques[230] et il a été suggéré qu'elle serait spécifique à la voie de signalisation de l'ADP[231]. La concentration de P-sélectine soluble dans le plasma reflète l'activation plaquettaire. De plus, la concentration de P-sélectine soluble est augmentée, tout comme d'autres sélectines sous formes solubles (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et L-sélectine), mais seule la P-sélectine soluble corrèle significativement avec l'activité de la maladie[232]. L'ensemble de ces données nous renseigne sur le fait que les plaquettes en circulation sanguine des patients arthritiques

sont perturbées.

Contribution des plaquettes aux dommages articulaires

Des études se sont penchées sur la contribution des plaquettes aux dommages articulaires. Les plaquettes ont été identifiées comme présentes dans les liquides synoviaux de patients arthritiques dès 1978, par Yaron, M. et Djaldetti, M.[233]. Leur découverte fut corroborée par Endresen GK, en 1981[234]. À la même époque, le PF4 a été détecté, et sa concentration augmentée dans les liquides synoviaux de patients arthritiques[235]. Farr et collaborateurs ont corroboré la présence de plaquettes dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Leur concentration corrélait avec divers marqueurs inflammatoires, dont le compte de leucocytes et la concentration d'immunoglobulines de type M[228].

Chez les patients arthritiques, la micro-vasculature de la membrane synoviale est altérée, laissant apparaître des interstices normalement absents, entre les cellules endothéliales[236, 237]. Ces interstices révèlent des constituants de la matrice extra-cellulaire, comme le collagène, et y permettent l'adhésion de plaquettes, induisant la formation de thrombi[238]. Ces interstices sont causés par la libération d'amines vasoactives, comme l'histamine ou la sérotonine[239]. Parmi les cellules capables de libérer ces amines, les mastocytes ont été proposés comme potentiellement participant à la perméabilité vasculaire articulaire de la polyarthrite rhumatoïde[240].

La sérotonine

Les plaquettes contiennent une amine vasoconstrictrice, la sérotonine⁴. La sérotonine est produite par les cellules entérochromaffines qui la libèrent dans le milieu extra-cellulaire, y compris au niveau de la lumière des vaisseaux sanguins de l'intestin. La sérotonine est ensuite capturée par les plaquettes circulantes par le biais du transporteur de la sérotonine (serotonin transporter, SERT), ce qui leur permet de se charger en sérotonine au niveau de l'intestin[241].

Il est à noter que la production de sérotonine, y compris par les cellules entérochromaffines, nécessite l'hydroxylation du tryptophane en 5-hydroxytryptophane, le précurseur immédiat de la sérotonine. Cette hydroxylation nécessite la tryptophane hydroxylase (TPH), existant en deux isoformes. L'isoforme TPH1 est exprimée en périphérie, y compris dans les cellules entérochromaffines, et au système nerveux central. L'isoforme TPH2 est exclusivement exprimée dans certaines cellules neuronales. Il existe un modèle murin,

4. La sérotonine est également un neurotransmetteur dans le système nerveux central, fonction qui ne sera pas discutée dans ce document.

tph1^{-/-} déficient en sérotonine périphérique. Dans ce contexte, les plaquettes ne peuvent plus se charger en sérotonine au niveau de l'intestin, et en sont donc dépourvues[242].

Plaquette et sérotonine dans la polyarthrite rhumatoïde

Il a été montré que le contenu des plaquettes en cette amine était diminué chez les patients arthritiques, suggérant une possible libération dans cette maladie[243]. Notre équipe a contribué à révéler que les plaquettes, au delà de leur rôle connu dans la prévention des saignements, pouvaient en contexte inflammatoire, libérer de la sérotonine et induire la perméabilité vasculaire caractéristique de la polyarthrite rhumatoïde[244]. Une étude subséquente a permis de décrire la libération de sérotonine par les plaquettes, en réponse à des complexes immuns[108]. Ce mécanisme nécessite la présence du Fc γ RIIA sur les plaquettes. En effet, il s'agit de l'unique Fc γ R présent sur les plaquettes humaines, leur permettant d'intégrer la signalisation induite par les complexes immuns, résultant en une activation rapide, une libération de VEP, et une dégranulation de divers facteurs plaquettaires, comme la sérotonine[108, 209]. La signalisation plaquettaire du Fc γ RIIA nécessite la liaison du fibrinogène à son récepteur, α Ib β ₃[245]. Ainsi, la dégranulation de sérotonine par les plaquettes, en réponse aux complexes immuns implique également α Ib β ₃[108]. Il est à noter que, comme mentionné dans la section 0.1.5, les plaquettes murines n'expriment pas le Fc γ RIIA, et sont donc dépourvues de Fc γ R. Au sein du laboratoire, nous utilisons un modèle de souris transgénique, exprimant le Fc γ RIIA humain sur toutes les cellules myéloïdes, incluant les plaquettes[246]. Ce modèle, générant des souris Fc γ RIIA^{TGN}, confère la capacité aux plaquettes murines de répondre aux complexes immuns de type IgG, des acteurs majeurs de la pathogenèse articulaire de la polyarthrite rhumatoïde ou du modèle de transfert de sérum K/BxN.

La contribution des plaquettes à la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde a été particulièrement décrite en rapport avec leur libération de vésicules extra-cellulaires. Plusieurs études ont rapporté la présence de vésicules extra-cellulaires dans les articulations arthritiques, et leurs contributions au processus inflammatoire. Cette thématique sera détaillée plus tard, dans la section 0.2.5. La section suivante (0.2) présente les vésicules extra-cellulaires, et leur contribution aux processus physiologiques et pathologiques.

0.2 Les vésicules extra-cellulaires

Le texte qui suit est une adaptation d'une revue publiée dans le journal *Platelets*, en 2017, intitulée "*Platelet extracellular vesicles in health and disease*" (Melki I. & Tessandier N., *Platelets*, 2017)[247]

0.2.1 Les vésicules extracellulaires et les mécanismes aboutissant à leur libération

Les vésicules extra-cellulaires sont des particules dont la taille est inférieure à celle des plaquettes. Leur première découverte a été faite par le scientifique Peter Wolf, qui a également mis en évidence leur rôle dans la coagulation sanguine[248]. Ces particules, plus tard nommées « *vésicules extra-cellulaires* », sont produites par les plaquettes, en réponse à des stimuli d'activation[248, 249]. Il a été montré que les vésicules extra-cellulaires ne forment pas une population homogène. La classification selon la taille et le mécanisme aboutissant à leur libération a permis d'identifier les exosomes (40 - 100 nm de diamètre), libérés par exocytose des corps multi-vésiculaires et des granules denses ; et les microvésicules (100 - 1000 nm de diamètre), libérées par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique[250, 251].

Les vésicules extra-cellulaires de plaquettes sont générées par des perturbations de la membrane plasmique. En effet, la membrane plasmique des plaquettes est asymétrique, puisque composée d'une bi-couche lipidique dont le feuillet extérieur est enrichi en phosphatidylcholine et sphingomyéline, tandis que le feuillet interne est quant à lui composé notamment de phospholipides anioniques, comme la phosphatidylsérine (PS)[252]. Cette asymétrie membranaire est finement régulée par un mécanisme appelé *flip-flop*, contrôlé par les transporteurs phospholipidiques. Les flippases (translocase aminophospholipidique) et les floppases assurent le trafic interne (*flip*) et externe (*flop*) des phospholipides de la bi-couche lipidique[252]. L'activation des plaquettes par des agonistes tels que la thrombine, le collagène ou l'ADP induit une augmentation de calcium intra-cellulaire, menant à l'activation de scramblases, des transporteurs de phospholipides bidirectionnels. Ceci induit l'exposition rapide du PS, chargé négativement, à la surface de la plaquette[253] et résulte en la libération de VEP[201]⁵.

La protéine transmembranaire (transmembrane proteine, TMEM) 16 (TMEM16) a pu être déterminée comme essentielle au processus de remodelage des phospholipides membranaires et l'exposition de PS[254, 255]. En effet, des études sur la déficience en TMEM16F, l'unique protéine de la famille TMEM16 exprimée à la surface des

5. Les processus pouvant aboutir à la formation de VEP n'exposant pas le PS seront discutés à la section 0.2.2

plaquettes murines, dans des modèles murins, abroge la libération de VEP par les plaquettes[254, 255]. Une autre étude a permis de mettre en évidence la contribution du protéasome à la libération des VEP, puisque le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, réduit la libération de VEP par les plaquettes en réponse à la thrombine, l'ADP ou les lipopolysaccharides[256].

Des observations effectuées sur l'activation plaquettaire en condition de flux ont permis de révéler un autre mécanisme contribuant à la libération de VEP. En effet, les plaquettes adhérentes, lorsqu'exposées à un flux, sont capables de générer de longs filaments membranaires pouvant atteindre 250 μm . Ces protrusions induites par le flux (FLow-Induced PROtrusions, FLIPR) peuvent ensuite être fragmentées en VEP PS⁺, quelques secondes après leur génération[257].

0.2.2 Diversité des VEP

Les VEP sont hétérogènes de la part la diversité des marqueurs de surface qu'elles peuvent exposer, mais également par la variabilité de leur taille et de leur contenu[258-261]. Un premier point permettant de distinguer certaines VEP relève de leur exposition de la PS. En effet, le remodelage de la membrane plasmique et l'exposition de la PS semblent essentiels à la libération de VEP⁶, bien qu'une large proportion des VEP détectées dans le sang, la lymphe et le liquide synovial n'exposent pas la PS en surface, (nommées VEP PS⁻)[262-264]. Les mécanismes moléculaires permettant la formation de VEP PS⁻ ne sont pas à ce jour connus. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer leur présence. En effet, la production de VEP PS⁻ pourrait impliquer des phospholipases spécifiques[265] ou la présence d'enzymes participant à l'asymétrie membranaire dans les VEP. Une autre hypothèse avancée par Latham et collaborateurs concernerait le fait que toutes les VEP exposeraient la PS, mais que certains facteurs, comme une faible présence de PS ou une courbature de la membrane pourraient compliquer leur détection par les sondes liant la PS[266].

Les VEP exposent à leur surface de nombreuses protéines provenant de la membrane plaquettaire. Ainsi, on retrouve par exemple des marqueurs d'activation plaquettaire, comme la P-sélectine (CD62P) mais également certaines glycoprotéines plaquettaires, comme GPIIb/IIIa (CD41/CD61)[267, 268]. Ces protéines sont fréquemment utilisées pour déterminer l'origine plaquettaire d'une VEP. Toutefois, une étude menée par Flaumenhaft et collaborateurs a suggéré que la majorité des vésicules CD41⁺ détectées en circulation sanguine proviendrait de mégacaryocytes (MK)[269]. En effet, ces cellules précurseurs des plaquettes expriment elles aussi CD41, et peuvent en conséquence

6. Voir section 0.2.1

produire des vésicules CD41⁺. D'après Flaumenhaft et collaborateurs, il serait possible de différencier les vésicules CD41⁺ provenant de plaquettes ou de MKs par le fait que seules les vésicules dérivées de VEP exposeraient à leur surface la combinaison de CD62P et de la protéine 1 associée au lysosome (lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1). Une autre étude réalisée par Gitz et collaborateurs a pu corroborer ces résultats, et a de plus révélé que les vésicules dérivées de MK exposeraient à leur surface la lectine de type C, de domaine appartenant à la famille 1, membre B (CLEC-2) et GPVI, tandis que les VEP n'exposeraient elles que CLEC-2[270]. L'ensemble de ces résultats laisse penser qu'une partie des observations physiologiques attribuées aux VEP pourraient en réalité être imputables aux vésicules dérivées de MKs.

0.2.3 Contenu des vésicules extra-cellulaires de plaquettes

Au delà de leurs marqueurs de surface, les VEP peuvent également englober une grande variété de facteurs de coagulation, de médiateurs de l'inflammation, d'enzymes actives, comme la cyclooxygénase-1 ou la 12-lipoxygénase[267, 271]. Le contenu des VEP est schématisé sur la Figure 0.1.

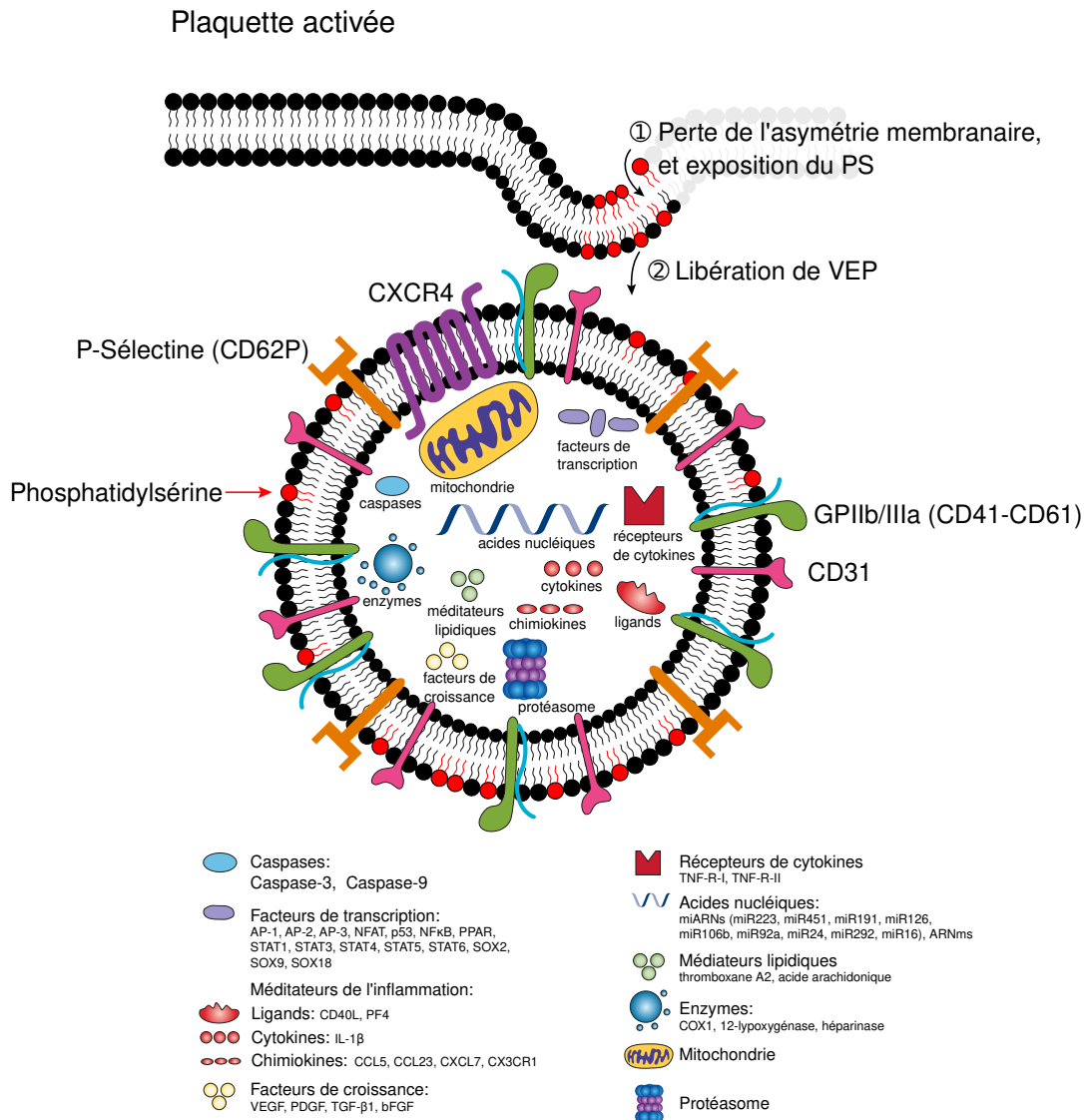


Figure 0.1 – Contenu divers des VEP, mise à jour de Melki, Tessandier *et al.* [247]. Malgré le fait que les VEP dérivent des plaquettes, qui sont anucléées, diverses molécules et organites sont présents à la surface ou à l'intérieur des VEP. Le contenu des VEP inclut des enzymes fonctionnelles, des facteurs de transcription, des cytokines, des acides nucléiques, des médiateurs lipidiques, des mitochondries, et du protéasome. Il est important de noter que différentes voies d'activation plaquettaire, ou conditions expérimentales pourraient influencer le contenu des VEP. Cette liste récapitule ainsi différentes études, et reste malgré tout non-exhaustive.

Certaines VEP peuvent contenir des organelles. En effet, une étude par Boudreau et collaborateurs a montré que les plaquettes, dépendamment du signal d'activation, pouvaient éjecter leurs mitochondries, certaines d'entre elles comprises dans des VEP[272]. Toutefois, le contenu en organelles des VEP pourrait être partiellement influencé par leur taille. Ainsi, une étude protéomique a pu déterminer que les grandes (500 -1000nm) VEP étaient enrichies en protéines mitochondriales, ainsi qu'en médiateurs lipidiques ; tandis les petites (100 - 500nm) VEP seraient elles enrichies en protéines[258]. Plus récemment, une étude par Dieudé et collaborateurs a rapporté que certaines VEP pouvaient également contenir un protéasome fonctionnel[273].

Au delà des organelles, les VEP ont également été décrites comme pouvant contenir certaines cytokines et chimiokines, un large spectre d'acides nucléiques (ARNm, microARNs) et des facteurs de transcription[271, 274, 275]. Une étude par Lindsay et collaborateurs a pu établir une forte corrélation entre les microARNs et les ARNm présents dans les plaquettes, et ceux rapportés dans les VEP[271, 276]. Toutefois, certains microARNs ne corrélaient que pauvrement entre VEP et plaquettes, suggérant un chargement sélectif de certains microARNs dans les VEP[276].

0.2.4 Demi-vie et clairance des VEP en circulation sanguine physiologique

Les VEP sont présentes en circulation sanguine et lymphatique, y compris en condition physiologique[263, 277-279]. Les VEP sont les vésicules les plus abondantes dans le sang d'individus sains, enrichies d'un facteur 2 à 4 par rapport aux vésicules dérivées d'érythrocytes selon la méthode de quantification utilisée[280, 281]. Plusieurs études ont tenté d'estimer la demi-vie des VEP en circulation sanguine et ont rapporté des estimations comprises entre dix minutes et cinq heures après leur transfusion[282, 283]. Une telle variation entre ces résultats pourrait être partiellement expliquée par le fait que l'étude décrivant une demi-vie particulièrement courte a été menée chez des lapins[282], tandis que l'étude proposant une demi-vie plus longue a elle été réalisée chez des patients thrombocytopéniques[283]. Une autre différence majeure entre ces deux études relève du fait les VEP injectées dans les lapins avaient été générées par activation des plaquettes *in vitro*, tandis que celles injectées chez les patients humains avaient été collectées par centrifugation. Rank et collaborateurs formulent l'hypothèse que les VEP générées par activation plaquettaire pourraient exposer des ligands pour des récepteurs impliqués dans l'adhésion et seraient ainsi plus susceptibles d'être rapidement éliminées de la circulation[283].

Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer cette rapide clairance des VEP de la circulation sanguine. L'une d'entre elle, avancée par Dasgutpa et collaborateurs,

propose que la phagocytose contrôlée par les lactadhérines puisse être impliquée dans l'élimination des VEP[284]. Une autre hypothèse, formulée également par Dasgupta et collaborateurs, concerne particulièrement les VEP PS⁺. En effet, les cellules endothéliales, exprimant le locus de développement endothélial-1 (developmental endothelial locus-1, Del-1) pourraient permettre la liaison spécifique des VEP PS⁺, résultant en leur endocytose par les cellules endothéliales[285]. Une troisième hypothèse, proposée pour décrire l'élimination rapide des VEP de la circulation sanguine, concerne la protéine spécifique de l'arrêt de la croissance 6 (growth arrest specific 6, Gas6) et son récepteur à tyrosine Axl. En effet, l'interaction entre Gas6 et Axl a été décrite comme induisant la capture des VEP par l'endothélium[286]. Toutefois, cette même étude a pu déterminer que chez les souris déficientes en Gas6 (Gas6^{-/-}), la concentration sanguine de VEP n'était pas plus élevée que dans les souris contrôles, ce qui suggère que ce mécanisme serait impliqué dans la clairance des VEP, mais seulement à niveau local, par exemple aux sites d'activation plaquettaire[286]. Il serait également possible qu'un mécanisme compensatoire, présentement non-élucidé, puisse exister *in vivo*.

0.2.5 Rôles physiologiques et pathologiques des VEP

Rôle dans l'hémostase et la thrombose

Les plaquettes sont connues comme des contributrices essentielles au processus de coagulation et la formation de thrombus. Une étude par Sinauridze et collaborateurs a rapporté que les VEP auraient un pouvoir procoagulant 50 à 100 fois supérieur à celui des plaquettes activées[287]. La cascade de coagulation est déclenchée par l'exposition de facteur tissulaire (tissue factor, TF), et sa liaison au facteur de coagulation FVII, aboutissant à la formation du complexe extrinsèque (formé par le TF et le facteur FVII), l'assemblage du complexe intrinsèque (formé par la forme active du facteur FVIII et FIX), et par la formation du complexe prothrombinase (formé de la forme activée du facteur FV et FX). La formation des complexes prothrombinase, intrinsèque ou extrinsèque requiert une surface négativement chargée.

Ainsi, plusieurs équipes ont décrit que les VEP PS⁺ pouvaient participer à l'initiation de la cascade de coagulation par le biais de leur membrane riche en PS[279, 288]. Toutefois, une étude menée par Tans et collaborateurs a suggéré qu'il existerait un potentiel de coagulation différent entre les VEP PS⁺ et les VEP PS⁻[289]. En effet, cette étude décrit l'existence de VEP pro-coagulantes, mais également de VEP anti-coagulantes. Ces dernières participeraient à la génération de thrombine à bas niveau, ce qui aboutirait à l'activation de protéines anti-coagulantes[277].

Au delà d'offrir une surface catalytique propice à la coagulation, les VEP exposant à leur surface CD61, (VEP CD61⁺) ont été décrites comme capables de se lier aux fibres de fibrines, participant ainsi à la formation de thrombus de fibrine puis à la génération de thrombine[290]. Une autre contribution des VEP aux processus de coagulation concerne leur éventuelle exposition de TF à leur surface. En effet, l'exposition de TF par les VEP reste encore sujette à débat[291-293]. Toutefois, les plaquettes ont été rapportées comme capables d'internaliser les vésicules extra-cellulaires riches en TF, ce qui constituerait une source potentielle de TF pour les VEP générées par ces plaquettes[294].

En lien avec leurs contributions à l'hémostase et la thrombose en condition saine, les VEP sont également impliquées dans diverses coagulopathies. En effet, les plaquettes des patients souffrant de la maladie de Castaman sont incapables de produire des VEP[295, 296]. Ces mêmes patients présentent une tendance accrue aux saignements, ainsi que des temps de saignements prolongés[295, 296]. Il est intéressant de noter qu'aucune perturbation au niveau des propriétés intrinsèques des VEP, ni au niveau de l'activité prothrombinase n'ont été détectées chez ces patients, ce qui suggère que la présence des VEP en circulation contribuerait à la coagulation. Les patients souffrant du syndrome de Scott quant à eux, présentent une activité de la prothrombinase réduite et un compte normal de VEP[297]. Toutefois, les VEP de ces patients présentent un potentiel de coagulation altéré, conséquence d'une translocation déficiente du PS vers la membrane. Ainsi, les VEP des patients souffrant du syndrome de Scott offrirait une surface pro-coagulante inefficace, ne permettant pas la liaison des facteurs de coagulation[297, 298]. Plus récemment, les patients atteints par le syndrome de Scott ont été identifiés comme possédant une mutation dans la scramblase TMEM16F[255, 299]. Cette mutation a été associée à un défaut d'exposition du PS[254, 255]. Les souris déficientes pour TMEM16F présentent des concentrations réduites de VEP, et leur phénotype ressemble à celui des patients souffrant du syndrome de Scott.

Les VEP ont été associées à d'autres pathologies liées à la coagulation. L'une d'entre elle est la purpura thrombopénique immunologique (immune thrombocytopenic purpura, ITP). En effet, les patients souffrant d'ITP présentent des auto-anticorps, dirigés contre certaines glycoprotéines de surface plaquettaires, pouvant aboutir jusqu'à une thrombocytopénie[300]. Chez les patients souffrant d'ITP mais asymptomatiques, des niveaux élevés de VEP ont été décrits, suggérant un rôle protecteur des VEP dans cette maladie[301]. Cependant, ces patients, bien que possédant de faibles concentrations de plaquettes, présentent un profil pro-coagulant, en partie dû aux niveaux élevés de VEP dans leur sang[302]. Malgré ce rôle potentiellement bénéfique des VEP dans cette maladie, des niveaux élevés de VEP chez certains patients atteints d'ITP ont été

corrélés à des risques accrus d'évènements thrombotiques[300, 301].

Dans le Chapitre 2 : Platelets disseminate extracellular vesicles in lymph in rheumatoid arthritis, nous étudierons les capacités des VEP de la circulation lymphatique à participer à la coagulation de la lymphe

Rôle dans les maladies cardiovasculaires

Les VEP ont été associées à multiples maladies cardiovasculaires. Des concentrations élevées de VEP ont été détectées durant les phase aiguës d'infarctus cérébral de patients athérosclérotiques[303] ; mais ont été également associées à des dommages accrus suite à un infarctus du myocarde[304]. Les patients présentant une athérosclérose carotidienne ont une concentration accrue de grandes VEP dans le sang, en comparaison à des patients sans plaque d'athérome au niveau de la carotide[305]. Au delà leur concentration sanguine élevée, les VEP ont été décrites comme participant à certains mécanismes clefs de l'athérosclérose. Par exemple, les VEP sont capables de moduler le recrutement et l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire, une étape clef initiale de l'athérosclérose[306, 307]. En effet, une étude menée par Mause et collaborateurs a pu déterminer que les VEP pouvaient transférer RANTES (chimiokine CC ligand (CCL) 5) aux monocytes, promouvant leur arrêt sur la paroi endothéliale[308]. De plus, les VEP sont connues comme étant capables de transférer des microARNs à des cellules réceptrices[271, 274, 309]. Gidlof et collaborateurs ont rapporté un autre mécanisme par lequel les VEP pourraient participer au recrutement des leucocytes inflammatoires à la paroi artérielle. En effet, certaines VEP générées par les plaquettes activées en contexte d'infarctus du myocarde sont capables de transférer le microARN 320b aux cellules endothéliales, induisant ainsi l'expression subséquente d'ICAM ; une protéine jouant un rôle crucial dans le recrutement des leucocytes inflammatoires à la paroi endothéliale[310].

Rôle dans le cancer et l'angiogenèse

Des concentrations accrues de VEP ont été rapportées dans divers cancers. Ainsi, les patients souffrant de cancers oraux et colorectaux présentaient des niveaux de VEP augmentés en circulation sanguine[311, 312]. De même, les patients atteints de cancers du sein métastatiques ont des concentrations sanguines plus élevées de vésicules PS⁺, parmi lesquelles les VEP représentent 82%, que chez les patients souffrant de cancer de même type, mais moins sévère. D'autres études ont également soulevé des liens statistiques entre les VEP et certains cancers[311-313]. D'un point de vu fonctionnel, une étude menée par Kim et collaborateurs a décrit que le contenu des VEP en certains facteurs

angiogéniques et lipides pouvait promouvoir la prolifération et la survie des cellules endothéliales dérivées de veine ombilicale humaine (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) *in vitro*[314]. Ces résultats ont été corroborés par des travaux de Brill et collaborateurs indiquant, tant *in vitro* qu'*in vivo*, dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le rat, que les VEP pouvaient induire l'angiogenèse via le VEGF[315].

Rôle dans l'immunité et l'auto-immunité

Plusieurs études ont décrit les VEP comme des actrices importantes de la réponse immunitaire. En effet, les VEP sont connues comme délivrant la protéine plaquettaire CD40L jusqu'aux lymphocytes B présents dans les ganglions. Ainsi, les VEP CD40L⁺ suffisent à stimuler la production d'IgG et moduler la formation de centre germinatif[223]. De plus, les VEP CD62P⁺ sont capables de contribuer au recrutement des leucocytes au site d'infection[316]. Les mêmes VEP CD62P⁺ facilitent les interactions entre leucocytes, via un mécanisme dépendant de CD62P[316]. Une autre étude, menée par Dinkla et collaborateurs a pu déterminer que les VEP CD62P⁺ pouvaient diminuer la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes pro-inflammatoires producteurs d'IL-17 et d'interféron (IFN) γ [317].

En cohérence avec leur participation à l'immunité, les VEP ont également été associées à certaines pathologies auto-immunes, comme le lupus érythémateux disséminé. Toutefois, bien que certaines études aient pu rapporter des concentrations accrues de VEP chez les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé (LED)[318, 319], d'autres ont décrit une diminution des VEP, au profit de vésicules PS⁺[320]. Les auteurs de cette dernière étude ont avancé l'hypothèse que cette différence de résultats pourrait être due à l'inclusion de patients possédant des niveaux de sévérité de maladie variables ou des différences dans les techniques utilisées pour quantifier les VEP[320]. Enfin, une étude par Fortin et collaborateurs a décrit que les VEP de patients lupiques étaient recouvertes d'IgG, mais également que les VEP corrélaient positivement avec la sévérité de la maladie[321].

Rôle dans la polyarthrite rhumatoïde

Des concentrations élevées de VEP en circulation sanguine de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ont été rapportées par plusieurs équipes[270, 322]. L'une d'entre elle, menée par Gitz et collaborateurs a pu déterminer que les plaquettes, plutôt que les mégacaryocytes constituaient la principale source de vésicules CD41⁺ dans la circulation sanguine de ces patients[270]. En effet, il leur a été possible de distinguer entre les vésicules CD41⁺ provenant de plaquettes ou de mégacaryocytes à l'aide de combinaison

des marqueurs CLEC-2 et GPVI[270]. Au niveau articulaire, plusieurs équipes ont décrit des concentrations accrues de VEP dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde[264, 323-325].

D'un point de vue mécanistique, les VEP ont été décrites comme capables de contribuer activement à l'inflammation articulaire. En particulier, les VEP contiennent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 α et l'IL-1 β , ce qui leur permet d'induire, dans un modèle *in vitro*, la production d'IL-6 et IL-8 par les synoviocytes fibroblastiques[324]. Toujours au niveau articulaire, une étude menée par Cloutier et collaborateurs a pu décrire que les VEP présentes dans les liquides synoviaux de patients arthritiques exposent à leur surface des auto-antigènes, comme du fibrinogène citrulliné ou de la vimentine, ce qui aboutit à la formation de complexes VEP - auto-anticorps[264]. Cette même étude a pu déterminer que ces complexes immuns pouvaient stimuler la production de leucotriènes par les neutrophiles, ainsi potentiellement participant à amplifier la réaction inflammatoire locale[264]. Un autre mécanisme impliquant les VEP et participant à amplifier l'inflammation articulaire concerne leur internalisation par les neutrophiles. En effet, les VEP peuvent être internalisées par les neutrophiles au sein des articulations de patients arthritiques[271]. Notamment, ce processus d'internalisation est finement régulé par l'action concertée de la 12-lipoxygénase (12-LO), présente dans les VEP, et de la phospholipase sécrétée A₂-IIA (sPLA₂-IIA), induite par l'inflammation[271]. Il est à noter que l'ablation des gènes codant pour la 12-LO ou pour la sPLA₂-IIA dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde aboutit à une forte réduction de l'internalisation des VEP par les neutrophiles, mais également à une réduction significative de la sévérité de l'arthrite inflammatoire[271].

0.2.6 Figure récapitulative des contributions des VEP à diverses pathologies

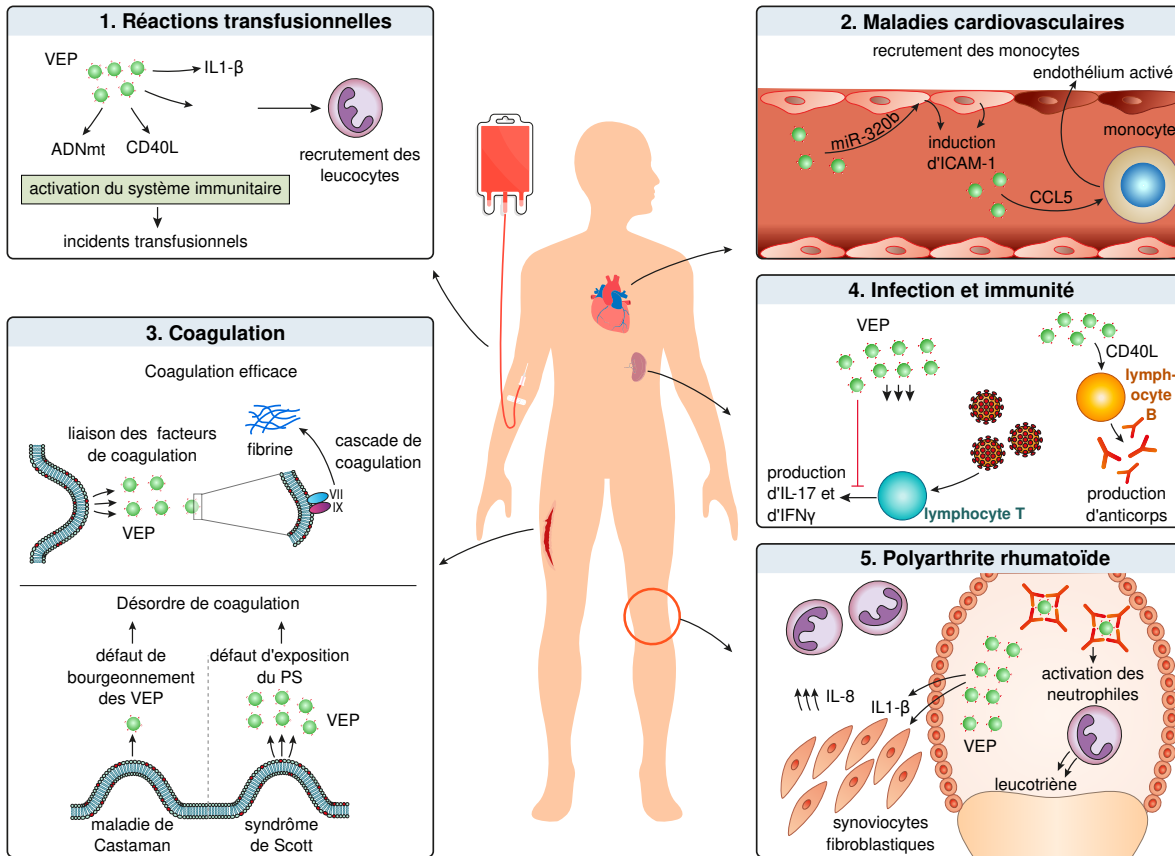


Figure 0.2 – Contribution des VEP à divers processus physiologiques et pathologiques

Contribution des VEP à divers processus physiologiques et pathologiques, mis à jour de Melki, Tessandier et al.[247] (1) Les VEP contribuent aux réactions transfusionnelles à travers la libération d'ADN mitochondrial (ADNmt). Les VEP interagissent également avec les leucocytes via CD62P et activent la production d'IgG via CD40L. (2) Les VEP promeuvent l'arrêt des monocytes sur l'endothélium activé, et sur les lésions d'athérome, via un mécanisme dépendant de CCL-5. Les VEP sont également capables de transférer le microARN-320b et ainsi contribuer au recrutement des leucocytes à la paroi artérielle. (3) La surface des VEP offre une interface capable de déclencher la cascade de coagulation, leur permettant ainsi de contribuer efficacement à la coagulation. Quand les concentrations de VEP sont réduites (défaut de bourgeonnement des VEP, ex. maladie de Castaman), ou quand les VEP exposent une quantité limitée de PS (ex. syndrome de Scott), les patients souffrent de désordres de la coagulation. (4) Les VEP peuvent transférer le CXCR4 à des cellules CXCR4^{-/-} les rendant ainsi sensibles à l'infection par la souche X4 du VIH. Les VEP sont aussi capables de moduler les productions lymphocytaires d'IL-17 et d'IFN γ via un mécanisme dépendant de CXCR3. Les VEP peuvent transférer le CD40L fonctionnel aux lymphocytes B, induisant leur production d'IgG. (5) Les VEP sont impliquées dans l'amplification de l'inflammation articulaire de la polyarthrite rhumatoïde, en formant des complexes immuns lorsque reconnues par des auto-anticorps, stimulant la production de leucotriènes par les neutrophiles. Les VEP peuvent également activer les synoviocytes fibroblastiques via leur contenu en IL-1 β , et stimulent leur production d'IL-8, ce qui contribue à recruter les neutrophiles à la membrane synoviale.

Dans le Chapitre 2 : Platelets disseminate extracellular vesicles in lymph in rheumatoid arthritis, nous pourrions voir que les VEP de la circulation lymphatique possèdent quelques particularités, permettant de les distinguer des VEP de la circulation sanguine

0.3 La circulation lymphatique

La découverte de vaisseaux « contenant du lait », ou lymphatiques a été alimentée par des contributions apportées par de nombreux anatomistes, mais c'est en 1628 qu'un anatomiste nommé Gasparo Aselli observa et décrivit pour la première fois des vaisseaux contenant un liquide translucide dans le mésentère de chiens[327].

La circulation lymphatique est un système circulatoire unidirectionnel, connectant l'ensemble des organes lymphoïdes. On distingue les organes lymphoïdes primaires, assurant la maturation des lymphocytes, et les organes lymphoïdes secondaires. Le thymus et la moelle osseuse sont les deux organes lymphoïdes primaires, où les lymphocytes T et B respectivement se différencient et prolifèrent. Les organes lymphoïdes secondaires sont les lieux de passage et d'accumulation des lymphocytes. Les organes lymphoïdes secondaires, comportent les ganglions lymphatiques, mais également la pulpe blanche de la rate, et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, comme les plaques de Peyer (gut-associated lymphoid tissue, GALT).

La circulation lymphatique, via les vaisseaux lymphatiques, sert de voie de circulation aux lymphocytes et autres cellules immunitaires, en permettant par exemple de transporter les antigènes se situant dans le tissu afférent jusqu'à l'organe lymphoïde secondaire. La circulation lymphatique dessert et traverse les ganglions lymphatiques.

Chaque ganglion centralise les produits de drainage lymphatique de grande zone du corps, qui leur est propre. On y trouve des veinules à endothélium épais (high endothelial venules, HEV), permettant l'arrivée des lymphocytes depuis la circulation sanguine.

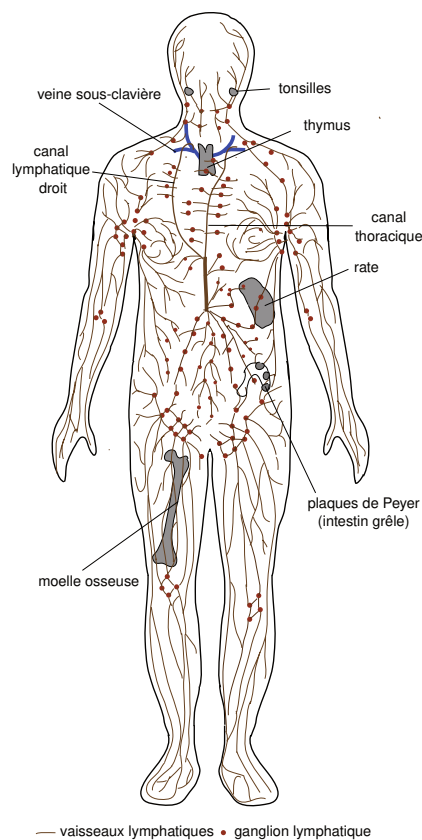


Figure 0.3 – Illustration schématique du système lymphatique humain. Adapté de Albrecht et Chirtofori, 2011[326]

Les ganglions lymphatiques sont le siège de rencontre entre les antigènes, apportés par la lymphe, les cellules présentatrices d'antigène, et les lymphocytes T et B. La lymphe quitte ensuite un ganglion lymphatique via un ou plusieurs vaisseaux lymphatiques efférents, et transite vers le canal thoracique.

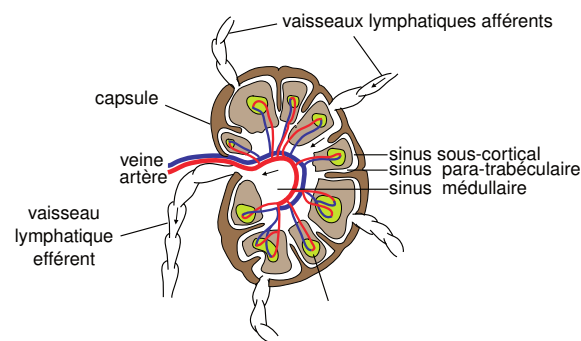


Figure 0.4 – Représentation schématique d'un ganglion lymphatique Adapté de Albrecht et Chritofori, 2011[326]

0.3.1 Structure des vaisseaux lymphatiques

Les capillaires lymphatiques, aussi dénommés vaisseaux lymphatiques initiaux, servent de point d'entrée pour le liquide interstitiel et les macromolécules de l'espace interstitiel. Les capillaires lymphatiques sont des vaisseaux à paroi fine, ouverts à une extrémité (blind ended), et de forme irrégulière. Les capillaires sont formés d'une seule couche de cellules endothéliales enchevêtrées, reliées par des jonctions discontinues, ressemblant à des valves (Fig. 0.5).

Cette structure particulière leur permet de drainer jusqu'à des larges macromolécules et des cellules en migration[328]. Ces capillaires lymphatiques ne sont pas soutenus par une membrane basale continue, et ne comportent pas non plus de cellules musculaires lisses. Toutefois, ils sont reliés à la matrice extra-cellulaire, par ce qu'on appelle des filaments d'ancrage, composés de collagène, de fibriline et d'émiline-1[329]. Les capillaires lymphatiques se regroupent ensuite en un réseau plus large de vaisseaux pré-collecteurs, suivis de vaisseaux collecteurs, jusqu'aux canaux lymphatiques, avant de se déverser dans la circulation sanguine. Les vaisseaux lymphatiques collecteurs sont caractérisés par la présence de valves bi-cuspides, permettant la remontée unidirectionnelle du liquide lymphatique. Ces vaisseaux sont également soutenus par des cellules musculaires lisses, bien que leur quantité varie en fonction des tissus (Fig. 0.5). La zone comprise entre deux valves,

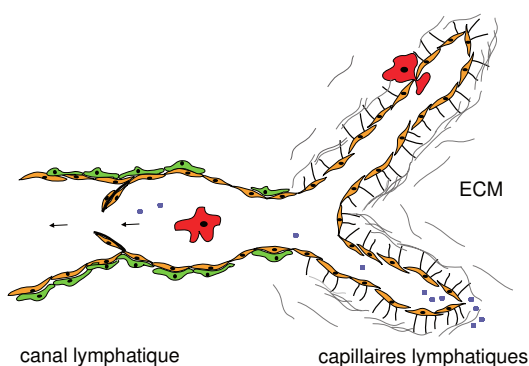


Figure 0.5 – Structure des vaisseaux lymphatiques. Adapté de Albrecht et Chritofori, 2011[326]

le long d'un vaisseau collecteur est nommée lymphangion. Ces structures permettent le transfert de lymphne d'un lymphangion à un autre par le pompage actif du liquide. Les vaisseaux collecteurs se présentent sous la forme d'une couche continue de cellules endothéliales, possédant des jonctions serrées agencées sous forme de fermeture éclair (« zipper-like »). Ces vaisseaux sont eux soutenus par une membrane basale continue. Des fibres élastiques et de collagène sont distribuées dans l'espace entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires elles, se positionnent généralement enroulées autour des cellules endothéliales constituant le lymphangion, tandis que la portion proche de la valve en est habituellement dépourvue[330].

0.3.2 Progression de la lymphne dans les vaisseaux lymphatiques

Il existe plusieurs composantes responsables de la remontée unidirectionnelle de la lymphne. La force qualifiée d'intrinsèque est générée par les contractions actives spontanées des lymphangions[331]. Ainsi, chaque unité composée d'un lymphangion agit comme une petite pompe individuelle, et est responsable du déplacement de lymphne sur sa portion. Ce processus est essentiel au transport de la lymphne en opposition au gradient hydrostatique, bien qu'insuffisant pour assurer à lui seul le transport de la lymphne. Une autre composante participant à propulser la lymphne, appelée extrinsèque, est composée de la somme de toutes les autres forces, différentes de la contraction intrinsèque des vaisseaux lymphatiques, et contribuant tout de même à la génération du flux lymphatique. Ces forces incluent les contractions des muscles adjacents, la contraction des vaisseaux sanguins adjacents, la motilité gastro-intestinale, la respiration et le déplacement des individus, notamment la marche. Ainsi, le flux lymphatique est la résultante d'une combinaison complexe d'une composante active et de multiples composantes passives, mais d'intensités variables et aléatoires.

Les vaisseaux lymphatiques ne se contractent pas de façon simultanée sur toute la longueur la succession de lymphangions. Au contraire, il a pu être montré que les contractions se propageaient sous forme de vagues le long de la chaîne des lymphangions[332-334]. Ainsi, la coordination des contractions des cellules musculaires lisses lymphatiques permet l'augmentation de la pression intra-lymphatique, et contribue à former un gradient de pression positif, vers l'aval du lymphangion, propulsant la lymphne. À l'opposé, la pression négative en amont du lymphangion, le gradient de pression transitoire génère un flux inverse, de courte durée, permettant la fermeture de la valve[335, 336]. Ce mécanisme empêche le flux inverse de la lymphne.

0.3.3 Rôles physiologiques de la circulation lymphatique

Le liquide interstitiel est formé, dans la plupart des tissus, par l'ultrafiltration du plasma sanguin, circulant dans les capillaires et les veinules. la circulation lymphatique est responsable quotidiennement de la réabsorption d'approximativement 50% des protéines plasmatiques, filtrées hors des vaisseaux sanguins et accumulées dans l'interstitium[337]. Ainsi, le système lymphatique joue un rôle clef dans la maintenance du volume de liquide interstitiel.

Les vaisseaux lymphatiques permettent également la circulation active de lymphocytes extravasés de la circulation sanguine, ou de cellules immunes, incluant les cellules dendritiques et les macrophages. Smith et collaborateurs ont pu estimer le flux cellulaire lymphatique à environ 200 à 10000 cellules par millilitre, avec toutefois une concentration significativement plus élevée pour la lymphe drainant le foie[338]. Une différence notable a pu être soulevée entre lymphe afférente (arrivant à un ganglion) et lymphe efférente (quittant un ganglion)[338]. En effet, la concentration cellulaire de la lymphe efférente est plus élevée que celle de la lymphe afférente[338]. Cette observation a permis de suggérer que l'arrivée des lymphocytes depuis la circulation sanguine, via les HEVs, contribuait significativement au flux de cellules quittant les ganglions lymphatiques via la lymphe efférente[339].

Canal thoracique : fonctions et variations anatomiques

En drainant le liquide interstitiel, la lymphe permet sa re-circulation jusque dans la circulation sanguine, au niveau de la région cardiaque. Les vaisseaux lymphatiques convergent ainsi en de plus gros canaux, regroupant la lymphe de grandes régions du corps. Le principal, le canal thoracique, draine jusqu'à 75% de la lymphe du corps, et transporte de 1 à 2 litres de lymphe par jour[340]. Les 25% restants sont drainés par le canal lymphatique droit, regroupant la lymphe provenant du bras droit, de l'épaule droite, et du côté droit de la tête et du cou. Le canal thoracique, quant à lui draine toutes les autres régions du corps. Le canal lymphatique droit rejoint la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière droite. Chez la majorité des personnes, le déversement

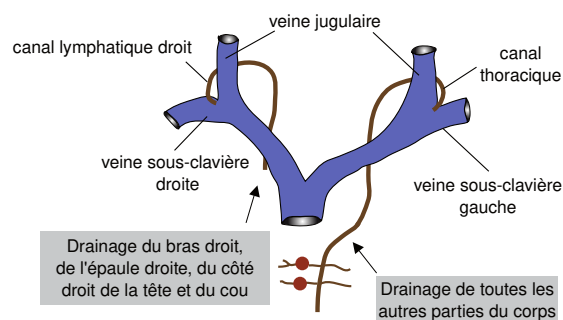


Figure 0.6 – La jonction des vaisseaux lymphatiques à la circulation sanguine s'effectue au niveau des veines sous-clavières. Adapté de Albrecht et Chritofori, 2011[326]

du canal thoracique dans la circulation sanguine s'effectue au niveau de la veine sous-clavière gauche, mais plusieurs variations anatomiques peuvent être observées. Ainsi, chez 40 à 60% des personnes, le canal thoracique ne suit pas son cours classique[341]. Le canal thoracique trouve son origine à la citerne du chyle, et longe la veine azygos jusqu'à la portion intra-thoracique, avant de passer à la droite de l'aorte descendante. Des variations anatomiques peuvent être observées à chacune de ces portions. On peut citer par exemple l'absence de citerne du chyle, le canal thoracique restant à gauche de l'aorte descendante, le canal thoracique traversant à droite de l'aorte descendante dès la citerne du chyle. Dans certains cas, le canal thoracique peut ainsi se déverser dans la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière droite, au lieu de la veine sous-clavière gauche. Ces variations anatomiques peuvent être expliquées par des perturbations du processus embryologique. En effet, la formation des différents ganglions lymphatiques peut influencer l'orientation du canal thoracique subséquent[341].

Composition cellulaire de la circulation lymphatique

La majorité des cellules circulant dans la lymphe sont des lymphocytes T, avec une prédominance de CD4⁺ par rapport aux CD8⁺[342]. Les lymphocytes arrivant aux ganglions, dans la lymphe afférente sont principalement des lymphocytes mémoires, tandis que ceux quittant les ganglions, dans la lymphe efférente sont majoritairement naïfs[342]. La circulation lymphatique permet également le transit de lymphocytes B. En effet, un sous-type de lymphocytes B innés (type B1) peut résider dans la peau, et peut ainsi être retrouvé, notamment au niveau de la lymphe drainant la peau[343]. En parallèle des lymphocytes, des cellules dendritiques empruntent également la circulation lymphatique[338, 344, 345], et représentent entre 5 à 20% des cellules de la lymphe afférente en condition basale. Enfin, au delà des lymphocytes et des cellules dendritiques, la circulation lymphatique transporte également d'autres types cellulaires, parmi lesquels on peut retrouver des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles et des plasmocytes, qui prises dans leur ensemble représentent 1 à 10% du contenu cellulaire de la lymphe à l'état basal[338].

0.3.4 La circulation lymphatique dans l'inflammation

Durant l'inflammation, la circulation lymphatique joue un rôle central dans la résorption de l'œdème et le transit des cellules immunitaires vers les ganglions. En transportant les cellules présentatrices d'antigène et des médiateurs inflammatoires, du tissu périphérique enflammé vers le ganglion drainant, la circulation lymphatique orchestre le développement de la réponse immune.

De plus, la condition inflammatoire s'accompagne d'une augmentation locale de la perméabilité vasculaire sanguine, causant une accumulation de liquide dans le milieu interstitiel, appelée œdème. Pour parer à ce phénomène, la circulation lymphatique augmente son débit de drainage[346]. Le flux lymphatique augmente rapidement en réponse à une inflammation aiguë intestinale. Cette augmentation s'accompagne d'une élévation de la fréquence de contraction des lymphangions, et des volumes d'éjections à chaque pulsion[346, 347]. Il est toutefois intéressant de noter que bien que le débit lymphatique augmente en cas d'inflammation aiguë, des réductions de flux lymphatiques ont été décrites lors d'inflammations chroniques[348, 349].

La lymphangiogenèse joue un rôle central dans la résorption de l'œdème, et contrebalance l'augmentation de liquide interstitiel caractéristique de l'inflammation. De même, la lymphangiogenèse en contexte inflammatoire permet de faciliter le transit des cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules dendritiques. Durant l'inflammation aiguë, les macrophages sont recrutés au site enflammé, et sont capables de produire du facteur de croissance endothéliale vasculaire C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C), ainsi que du facteur de croissance endothéliale vasculaire D (vascular endothelial growth factor D, VEGF-D), ainsi stimulant la lymphangiogenèse[350, 351]. De plus, les macrophages ont également été décrits comme pouvant se différencier en cellules endothéliales lymphatiques, et participent à la mise en place de la lymphangiogenèse[352, 353].

La lymphangiogenèse favorise la résolution de l'inflammation. En effet, les vaisseaux lymphatiques prolifèrent pendant l'inflammation[354]. La lymphangiogenèse pourrait avoir un effet bénéfique sur l'inflammation, en promouvant la résorption de l'œdème, mais également en drainant les cellules et cytokines inflammatoires accumulées au site inflammatoire[355]. Dans un modèle murin d'inflammation chronique des poumons, induite par la bactérie *Mycoplasma pulmonis*, la lymphangiogenèse induite par les VEGF-C et VEGF-D promeut la clairance de l'œdème, et participe à la résolution de l'inflammation. De même, lorsque la lymphangiogenèse a été ciblée, par inhibition sélective du récepteur au VEGF-C, le récepteur 3 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGF-3), l'œdème mucosal est aggravé[355]. Dans un autre modèle d'inflammation induite par exposition aux rayons ultraviolets B (UV-B), l'injection de VEGF-C induit la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques, participant à la lymphangiogenèse. De plus, l'injection de VEGF-C permet d'atténuer la formation de l'œdème induit par les UV[356].

La lymphangiogenèse a toutefois été incriminée comme étant délétère dans certains contextes inflammatoires. Ainsi, Kerjaschki et collaborateurs ont pu montrer que la

lymphangiogenèse induite via l'axe VEGFR-3 / VEGF-C contribuait au rejet de greffe rénale. En effet, les auteurs ont suggéré que les vaisseaux lymphatiques nouvellement créés par lymphangiogenèse pouvaient transporter les cellules dendritiques chimiotactes CC récepteur (CCR)-7⁺ aux ganglions drainant, et induisent ainsi la réponse immune allogénique[357]. De façon similaire, bloquer la lymphangiogenèse en contexte de greffe de cornée ou de cœur, via des inhibiteurs de VEGFR-3, diminue le transit de cellules dendritiques vers les ganglions drainant, et empêche le rejet du greffon[358, 359].

0.3.5 La circulation lymphatique et la progression des cancers

La circulation lymphatique a été impliquée dans la pathophysiologie des cancers. En effet, les vaisseaux lymphatiques jouent un rôle central dans la propagation des cancers, en offrant une route pour la métastase des tumeurs vers des sites distants. Ainsi, une des premières étapes de dissémination des cellules cancéreuses est le transfert de cellules métastatiques jusqu'au ganglion drainant la tumeur. Ce mécanisme serait rendu possible, soit par l'envahissement des vaisseaux lymphatiques existants, soit en promouvant la lymphangiogenèse, via la production de facteurs de croissance[353, 360, 361]. De façon intéressante, des paramètres comme la densité en vaisseaux lymphatiques et la concentration de facteurs lymphangiogéniques corréleraient positivement avec la récurrence des tumeurs et avec un plus grand nombre de métastases[362]. La production de facteurs lymphangiogéniques tels que le VEGF-C, le VEGF-D, ou le VEGFR-3 par les tumeurs a pu être rapportée dans différents types de cancers[363-365]. De plus, l'expression induite de VEGF-C et VEGF-D dans les tumeurs de xénogreffes induit la formation de vaisseaux lymphatiques associés aux tumeurs et les métastases vers les ganglions sentinelles et les poumons[363, 365].

Les vaisseaux lymphatiques intra-tumoraux sont majoritairement non-fonctionnels, puisqu'écrasés sous la forte pression présente au sein des tumeurs[361]. Toutefois, la présence de vaisseaux lymphatiques fonctionnels en périphérie de la tumeur est suffisante à induire la métastase lymphatique. En effet, dans les tumeurs sur-exprimant VEGF-C, une augmentation de la surface lymphatique fournit une plus grande zone d'opportunité pour l'exfiltration de cellules cancéreuses, et permet d'augmenter le nombre de métastases lymphatiques[366].

Ainsi, la circulation lymphatique peut jouer un rôle crucial dans le processus des métastases des cancers en propageant les cellules tumorales vers des sites distants. L'ensemble de ces données fait donc du VEGF-C un candidat thérapeutique potentiel pour contrôler tant la croissance tumorale que les métastases.

0.3.6 La circulation lymphatique dans l'athérosclérose

Développement des plaques d'athérome

L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par un rétrécissement progressif de la lumière des vaisseaux, ce qui peut entraîner l'ischémie des organes distaux. L'une des phases d'initiation du processus athéroscléreux est l'infiltration de macromolécules, en particulier de lipoprotéines dans l'intima des vaisseaux[367]. Les lipoprotéines de basse densité (low density lipoproteins, LDL) envahissent l'endothélium, où elles peuvent être oxydées par les cellules endothéliales[368]. Les lipoprotéines de basse densité oxydées (oxidized low density lipoproteins, ox-LDL) participent à l'activation de l'endothélium, qui en retour exprime des chimiokines et des molécules d'adhérence, permettant l'infiltration locale de monocytes, et de lymphocytes[369, 370]. Une fois entrés dans l'espace sous-endothélial, les macrophages internalisent les ox-LDL, les accumulent selon un mécanisme non contrôlé, et se transforment ainsi en cellules spumeuses[371]. Les macrophages spumeux participent à la réaction inflammatoire par le biais de sécrétion de cytokines, chimiokines, d'espèces réactives de l'oxygène et de protéases dégradant la matrice extra-cellulaire[371]. L'accumulation de lipides par les macrophages peut mener à leur mort par apoptose ou nécrose. Les macrophages spumeux nécrotiques libèrent ainsi leur contenu en lipides et facteurs tissulaires et participent à la formation d'un noyau pro-thrombotique, l'athérome fibreux[372]. L'amplification de ce phénomène peut aboutir à la formation d'une chape fibreuse ainsi qu'à la calcification de la plaque d'athérome[373].

De nombreux indices permettent de lier la pathophysiologie de l'athérosclérose au système lymphatique.

Présence de vaisseau lymphatiques drainant les plaques d'athérome

La présence de vaisseaux lymphatiques dans l'endothélium artériel a été décrite dès 1882 par G. Hoggan et F.E. Hoggan[374]. De nombreuses études ont pu mettre en évidence la présence de vaisseaux lymphatiques dans l'adventice d'artères atteintes d'athérosclérose. Une étude par Kholova et collaborateurs a révélé la présence de vaisseaux lymphatiques au sein même des lésions d'athérome[375]. Toutefois, des rapports contradictoires ont déclaré de pas détecter, ou détecter seulement un petit nombre de vaisseaux lymphatiques, tant dans les artères coronaires saines qu'atteintes d'athérosclérose, et ce malgré des concentrations élevées de VEGF-C détectées[376, 377]. Plus récemment, Kutkut et collaborateurs ont décrit la présence de petits vaisseaux lymphatiques dans des lésions d'athérome carotidiennes[378]. En particulier leur nombre augmente avec la sévérité de la maladie, et il a été suggéré que l'environnement pro-inflammatoire des vaisseaux

atteints d'athérosclérose favoriserait la lymphangiogenèse[379]. La présence de vaisseaux lymphatiques en contexte d'athérosclérose a également été étudiée dans des modèles animaux. Dans un modèle murin d'athérosclérose, des souris déficientes en apolipoprotéine-E (apoE^{-/-}), des vaisseaux lymphatiques ont été identifiés dans l'adventice d'aortes athéroscléreuses, et dans le tissu adipeux adjacent[380]. Particulièrement, des capillaires lymphatiques ont pu être décrits comme régulièrement observés à proximité de la courbure proche du sinus aortique. Aussi, dans un modèle d'hyperplasie aortique néointimale, la quantité de vaisseaux lymphatiques détectée dans l'adventice, augmentant avec la maladie, corrélait avec la sévérité de l'hyperplasie intimale[381].

La circulation participe à la résorption de l'œdème des lésions d'athérome

Les vaisseaux lymphatiques participent au drainage du liquide interstitiel accumulé dans la paroi endothéliale artérielle. En utilisant des stratégies permettant de bloquer le drainage lymphatique, plusieurs études ont pu montrer qu'interrompre le flux lymphatique pouvait causer un œdème, au niveau sous-endothélial, ou de la tunica media[382, 383]. La perturbation du flux lymphatique affecte négativement les propriétés biomécaniques de l'artère, et peut même mener à de la fibrose[383]. Une autre étude par Taher et collaborateurs a pu montrer une sur-expression de la forme soluble du récepteur 2 au facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor soluble receptor 2, sVEGFR-2), dans les aortes de souris apoE^{-/-}, nourries avec une diète riche en lipides (western diet). Le sVEGFR-2 peut se lier au VEGF-C, l'empêchant ainsi de participer à la maintenance des vaisseaux lymphatiques, et causant une régression des vaisseaux lymphatiques[384]. En lien avec un rôle protecteur des vaisseaux lymphatiques dans la pathologie de l'athérosclérose, Milasan et collaborateurs ont traité prophylactiquement des souris dépourvues de récepteur aux lipoprotéines de basse densité (low-density lipoprotein receptor, LDLR) (LDLR^{-/-} à l'aide de VEGF-C152S. Tandis que le VEGF-C est capable de se lier au VEGFR-3, induisant la lymphangiogenèse et participant au bon fonctionnement des vaisseaux lymphatiques, mais peut également se lier au récepteur 2 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (vascular endothelial growth factor soluble receptor 2, VEGFR-2), un récepteur bien connu pour participer à l'angiogenèse des vaisseaux sanguins; le VEGF-C152S quant à lui ne peut se lier qu'au VEGFR-3. Ainsi, le traitement prophylactique par le VEGF-C152S permet d'augmenter la contractilité des vaisseaux lymphatiques et le flux lymphatique, aboutissant à une atténuation du développement des plaques d'athérome dans les souris LDLR^{-/-}[385].

La circulation lymphatique contribue au drainage du cholestérol et des lipoprotéines de haute densité

La circulation lymphatique a plus précisément été étudiée, dans le cadre de l'athérosclérose, pour son rôle dans la clairance des lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins, HDL), des lipoprotéines responsables du transport du cholestérol. En effet, le cholestérol est un composant majeur des plaques d'athérome, et est majoritairement associé aux HDL. Son transport, du liquide interstitiel, vers le foie est assuré par les circulations lymphatique puis sanguine. Ce processus, nommé transport inverse de cholestérol, joue un rôle clef dans l'homéostasie tissulaire. Ainsi, le transport inverse de cholestérol orchestré par les macrophages, pourrait contribuer à diminuer l'accumulation de cholestérol dans les plaques d'athérome, et limiterait ainsi la sévérité de la maladie[386]. Martel et collaborateurs ont particulièrement étudié le rôle de la circulation lymphatique dans le transport inverse du cholestérol, en contexte d'athérosclérose. Des aortes de souris apoE^{-/-}, chargées en cholestérol marqué au deutérium (²H-cholestérol) ont été transférées dans des souris apoE^{-/-}, soit traitées avec un anticorps anti-VEGFR-3, bloquant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques, soit traitées avec un anticorps contrôle. Cette étude a pu montrer que, spécifiquement dans les souris traitées avec l'anti-VEGFR-3, le cholestérol marqué au deutérium restait immobilisé dans les cellules spumeuses, au sein de l'intima aortique[380]. Ces résultats indiquent que la circulation lymphatique est essentielle à l'élimination du cholestérol des plaques d'athérome.

La circulation lymphatique permet la sortie des cellules immunitaires hors des lésions d'athérome

Le recrutement des monocytes dans les plaques d'athérome est une étape cruciale du développement de l'athérosclérose. Dans les lésions, les monocytes absorbent les lipoprotéines, et sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires qui attirent et activent des cellules musculaires lisses, d'autres cellules immunitaires, et encore plus de monocytes[387]. La circulation lymphatique joue un rôle important dans l'élimination des leucocytes et des cytokines des plaques d'athérome[388].

Llordá et collaborateurs ont utilisé une stratégie de transplantation aortique pour étudier la sortie des cellules hors des lésions d'athérome. Ainsi, il a été suggéré que durant le développement des lésions d'athérome de souris apoE^{-/-}, la sortie des cellules immunitaires y était réduite[388]. Notamment, lorsque les lésions étaient à un stade de résolution, les monocytes peuvent emprunter la circulation lymphatique pour s'en extraire. À l'opposé, dans les lésions à un stade progressif, l'émigration des monocytes

via la circulation lymphatique est fortement réduite, suggérant que le développement des plaques d'athérome est rendu possible par le recrutement et l'accumulation des monocytes aux lésions, mais également dû à un défaut d'élimination par la circulation lymphatique[388].

Une autre étude, menée par Trogan et collaborateurs a décrit un mécanisme permettant d'expliquer la sortie des cellules spumeuses de la plaque d'athérome vers la circulation lymphatique. L'étude se base sur une stratégie de transplantation d'artères de souris apoE^{-/-}, contenant des plaques d'athérome, dans des souris receveuses WT, ou apoE^{-/-}. Dans les souris receveuses WT, le volume des plaques et la quantité de cellules spumeuses ont significativement décreu. À l'opposé, dans les souris apoE^{-/-}, le volume des plaques, et leur contenu en cellules spumeuses avaient augmenté. Les auteurs sont parvenus à bloquer la régression des plaques d'athéromes transplantées dans les souris WT, en bloquant la signalisation CCR7-CCL19/CCL21[389]. Or, les cellules endothéliales lymphatiques expriment CCL19 et CCL21, permettant de guider les cellules CCR7⁺, comme les macrophages vers la circulation lymphatique[390]. Ainsi, ces résultats nous renseignent sur le fait que la circulation lymphatique est essentielle à la sortie des cellules spumeuses de la plaque d'athérome, et implique la voie de signalisation CCR7[389].

Au delà des macrophages, une autre étude a pu mettre en évidence le rôle de la circulation lymphatique dans l'élimination des lymphocytes T CD3⁺ des plaques d'athérome. En effet, ils ont discontinué le drainage lymphatique des plaques d'athérome, par dissection des ganglions drainants. Cette interruption du drainage lymphatique a augmenté la formation de lésions d'athérome, et induit l'accumulation de lymphocytes T CD3⁺. De plus, l'inhibition de la signalisation VEGFR-3, bloquant la lymphangiogenèse, a aggravé l'accumulation de lymphocytes T CD3⁺ dans les lésions, indiquant que la circulation lymphatique était impliquée dans l'élimination de ces lymphocytes des plaques d'athérome[391].

L'ensemble de ces données nous indiquent que la circulation lymphatique participe activement à la résorption des plaques d'athérome, et joue un rôle important dans l'élimination des cellules spumeuses et immunitaires accumulées dans les lésions.

0.3.7 La circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde

La circulation lymphatique est également impliquée dans la polyarthrite rhumatoïde.

Perturbations du système lymphatique chez les patients arthritiques

De nombreux indices cliniques indiquent que le système lymphatique est affecté chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde. Par exemple, les patients souffrant de

polyarthrite rhumatoïde possèdent un nombre accru de ganglions poplitéaux (popliteal lymph nodes, PLNs), des ganglions drainant le pied et la cheville. Les PLN de patients arthritiques sont aussi plus volumineux, que ceux de contrôles sains, ou ceux de patients souffrant d'ostéoarthrite, une forme non-inflammatoire d'arthrite[392]. De plus, le plus grand nombre, et la plus grande taille de PLN corrént tous les deux avec le volume de synovie enflammée[392]. Concernant la circulation lymphatique, des cas cliniques de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont permis de suggérer que le flux de la circulation lymphatique était perturbé[393]. Toutefois, une contradiction existe à ce propos. Une étude a rapporté que les patients arthritiques présentent un flux lymphatique plus lent que celui de contrôles sains[394], tandis que dans une étude postérieure, le flux lymphatique était plus élevé dans les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, en comparaison à des patients ostéoarthritiques[395].⁷ Enfin une autre étude a révélé la présence de la forme mature du VEGF-C, dans les tissus arthritiques de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, et non dans ceux souffrant d'ostéoarthrite[396].

Composition en médiateurs inflammatoires de la lymphe arthritique

Une étude d'Olszewski et collaborateurs documente la composition lymphatique en immunoglobulines, protéines et cytokines de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde[395]. Les concentrations lymphatiques d'IgM et d'IgG étaient significativement plus élevées chez les patients polyarthritiques que dans les contrôles. Similairement, les concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine(IL)-1 β , le TNF, l'IL-6 et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) étaient augmentées dans la lymphe arthritique. Certaines cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1Ra et l'IL-10 ou chimiokines, comme l'IL-8 et le MIP-1 α étaient également plus concentrées. De plus, en prenant en compte le flux plus rapide dans la polyarthrite rhumatoïde, la même étude a évalué que les ganglions poplitéaux, recevant la lymphe arthritique, seraient exposés à des quantités supérieures de cytokines que celles des donneurs ostéoarthritiques (20 fois plus d'IL-1 β , 26 fois plus d'IL-6 ou 5 fois plus de TNF[395]. La concentration de la plupart de ces médiateurs n'était augmentée de façon spécifique que dans la lymphe, et non dans le sérum. Cette étude clef permet de décrire la circulation lymphatique de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde comme étant enrichie de nombreux médiateurs pro-inflammatoires.

7. Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats en opposition est formulée à la section 0.3.7. En effet, dans des modèles murins de polyarthrite rhumatoïde, dépendamment de la phase de développement de la maladie, le flux lymphatique drainant les articulations enflammées est dans un premier temps accru, puis dans un second diminué suite à une obstruction des ganglions drainent.

Altérations de la circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde

Les modèles murins ont permis d'approfondir notre compréhension du rôle de la circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde. Les synovies de souris arthritiques sont plus riches en vaisseaux lymphatiques que les souris contrôles[397]. Une explication proposée pour expliquer cette lymphangiogenèse dans les souris arthritiques concerne les précurseurs des ostéoclastes. En fait, Zhang et collaborateurs ont pu montrer que ces précurseurs, identifiés par les marquages $CD11b^+/Gr-1^-/lo$, lorsque stimulés par du TNF, étaient capables de produire du VEGF-C, un puissant médiateur de lymphangiogenèse[397]. Ces précurseurs d'ostéoclastes ont été décrits comme étant présents en plus grand nombre dans les rates de souris arthritiques[398] et sont capables de produire du VEGF-C.

L'inflammation articulaire peut influencer la fonction lymphatique. Ainsi, chez les souris K/BxN, la fréquence de contraction des vaisseaux lymphatiques est élevée lors de la phase aiguë de la maladie. En contraste, dans la phase chronique de la maladie, la fréquence de contraction des vaisseaux lymphatiques diminue significativement, de façon à retourner au niveau basal. En lien avec ce phénotype, la phase aiguë est caractérisée par une augmentation de la capacité de drainage lymphatique, tandis que cette capacité redescend similairement au niveau initial lors de la phase chronique. Cette étude a permis de mettre en évidence que la circulation lymphatique est perturbée selon deux séquences distinctes dans ce modèle murin de polyarthrite rhumatoïde. Une première étape où le drainage lymphatique est amplifié, suivie d'une seconde où il est diminué[399].

Une autre atteinte du système lymphatique pendant la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde concerne les ganglions poplitéaux. Il a été montré qu'eux aussi traversent des périodes cycliques, avec une phase où les ganglions poplitéaux augmentent de volume, et une phase où ils diminuent, vers un volume proche du niveau initial[400]. Il a été suggéré qu'une population de lymphocytes B, appelée B-in, était sélectivement augmentée dans les ganglions poplitéaux de souris arthritiques. Ces lymphocytes B-in sont polyclonaux, et n'exposent ni marqueur de prolifération, ni marqueur d'activation. L'augmentation du volume des ganglions poplitéaux impliquerait l'accumulation de ces lymphocytes B-in, tandis que la seconde phase, de réduction du volume des ganglions poplitéaux, serait influencée par la réduction du flux lymphatique, par obstruction des sinus par les lymphocytes B-in[400]. Ainsi, le flux lymphatique est perturbé par l'accumulation de ces lymphocytes B-in dans les sinus lymphatiques. En cohérence avec ce mécanisme, la délétion des lymphocytes B $CD20^+$ par une thérapie anti-CD20 permet la régression du volume des ganglions lymphatiques, du volume synovial, soulignant une diminution de l'inflammation synoviale, mais également la résurgence concomitante du

flux lymphatique[401].

Un autre facteur participant à la dysfonction du drainage lymphatique associée à la polyarthrite rhumatoïde, concerne le métabolisme de l'oxyde nitrique. En effet, l'oxyde nitrique (nitric oxide, NO) est un régulateur crucial de la contractilité des vaisseaux lymphatiques en agissant sur les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux collecteurs[402]. Une enzyme clef du métabolisme du NO est la synthase de NO inductible (inducible nitric oxide synthase, iNOS). Il a pu être montré que les cellules endothéliales lymphatiques des vaisseaux lymphatiques adjacents aux articulations enflammées de souris TNF-transgéniques exprimaient des niveaux élevés de iNOS. L'inhibition sélective d'iNOS permet de restaurer partiellement les contractions des vaisseaux lymphatiques, et le drainage lymphatique des souris TNF-transgéniques arthritiques, de façon concomitante avec la réduction de l'inflammation articulaire[403].

Impact de la circulation lymphatique sur l'inflammation articulaire

De nombreux indices quant à la contribution de la circulation lymphatique dans la polyarthrite rhumatoïde ont pu être obtenus grâce à l'utilisation de modèles murins. Lorsque des souris TNF-transgéniques ont été traitées avec un anticorps neutralisant le VEGFR-3 bloquant la lymphangiogenèse, l'inflammation articulaire a augmenté significativement. L'érosion du cartilage était aussi amplifiée. En parallèle, conséquence directe de l'inhibition de la lymphangiogenèse, la capacité de drainage lymphatique était diminuée et l'accumulation de cellules myéloïdes CD11b⁺ a été réduite aux ganglions poplitéaux[404]. L'ensemble de ces données permet de suggérer que la circulation lymphatique est un mécanisme clef permettant la régulation de l'inflammation lors de la polyarthrite rhumatoïde.

À l'opposé, dans le même modèle de souris, la sur-expression de VEGF-C a été induite dans les articulations et s'est révélée efficace pour réduire l'inflammation de la synovie, l'érosion du cartilage, et le nombre d'ostéoclastes[405]. En parallèle de la réduction d'inflammation, les auteurs ont pu montrer un drainage lymphatique accru, ce qui permet de suggérer que l'amplification du drainage lymphatique pourrait avoir un rôle bénéfique dans le développement inflammatoire de la polyarthrite rhumatoïde.

L'ensemble de ces données permet d'identifier la circulation lymphatique comme étant potentiellement bénéfique à la diminution de l'inflammation. Certaines équipes ont même suggéré qu'il pourrait être intéressant de cibler la circulation lymphatique dans l'objectif de restaurer ces capacités fonctionnelles au cours de la polyarthrite rhumatoïde, dans l'espoir d'accentuer la résorption de l'inflammation[406].

0.4 Hypothèse

Entrée des microvésicules de plaquettes dans l'articulation arthritique

L'étude par Cloutier et collaborateurs a permis de déterminer que, dans le modèle de transfert de sérum K/BxN, les interstices dans la vasculature sanguine arthritique étaient induits par la sérotonine sous le fait de la dégranulation plaquettaire[244]. Dans le cadre de cette même étude, des sphères fluorescentes ont été injectées en circulation sanguine, ce qui a permis de montrer qu'elles quittaient la circulation sanguine pour rapidement s'accumuler dans l'espace interstitiel des articulations enflammées. En utilisant des billes de différents diamètres, cette étude a pu déterminer que des billes, ayant jusqu'à un diamètre de 1 μm , pouvaient s'infiltrer dans l'articulation[264]. De tels interstices laissent à penser que les vésicules extra-cellulaires, y compris les VEP, pourraient y transiter, pour s'infiltrer dans l'articulation, jusqu'au liquide synovial. Toutefois, d'autres voies d'entrée des vésicules au liquide synovial ont été suggérées, comme le fait qu'elles pourraient entrer associées aux leucocytes s'infiltrant dans l'articulation[324].

La circulation lymphatique draine l'articulation

Les premières observations de vaisseaux lymphatiques dans les structures articulaires ont été effectuées par H. Tillmans, en 1876[407]. Par la suite, de nombreux auteurs ont étudié le drainage lymphatique articulaire par l'injection de solutions colorées. Ces auteurs décrivent un drainage jusqu'au ganglion proximal, le ganglion poplitéal, puis jusqu'au canal thoracique. W. Bauer, en 1933, a montré que la circulation lymphatique élimine l'albumine injectée dans l'articulation du genou, et a établi la cinétique de détection de l'albumine en circulation sanguine. Il précise même que le passage de l'albumine par le canal thoracique est une étape intermédiaire de l'élimination de l'albumine de l'articulation avant de pouvoir la détecter dans le sang[408].

Ainsi, mon hypothèse a été que la circulation lymphatique peut drainer les vésicules extra-cellulaires, notamment de plaquettes, accumulées dans le tissu interstitiel de souris arthritiques.

Mes objectifs de travaux ont été les suivants :

- 1) Déterminer la présence de vésicules extra-cellulaires en circulation lymphatique
 - a) Dans un modèle murin d'athérosclérose
 - b) Dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde
- 2) Caractériser les vésicules extra-cellulaires en circulation lymphatique arthritique

3) Déterminer la voie d'accès des vésicules extra-cellulaires à la circulation lymphatique arthritique

Chapitre 1 : Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis

Andreea Milasan^{1;#}, Nicolas Tessandier^{1;#}, Sisareuth Tan³, Alain R. Brisson³, Eric Boilard^{2;✉} and Catherine Martel^{1;✉}

¹ : Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal Heart Institute, Montréal, QC, Canada

² : Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Department of Infectious Diseases and Immunity, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada

³ : UMR-CBMN, CNRS, Université of Bordeaux, IPB, Pessac, France

[#] : These authors contributed equally to this work.

[✉] : Correspondence to :

Catherine Martel, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Montreal Heart Institute Research Center, Université de Montreal, 5000, Belanger Street, Room S3560, Montreal QC H1T 1C8 Canada, email : catherine.martel@icm-mhi.org

Éric Boilard, Department of Infectious Diseases and Immunity, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Faculté de Médecine de l'Université Laval, 2705, boulevard Laurier, Quebec City, Canada QC G1V 4G2, email : Eric.Boilard@crchudequebec.ulaval.ca

Andreea Milasan, Nicolas Tessandier, Éric Boilard et Catherine Martel ont conçu les expérimentations.

Andreea Milasan, Nicolas Tessandier et Sisareuth Tan ont réalisé les expérimentations.

Andreea Milasan, Nicolas Tessandier, Éric Boilard et Catherine Martel ont analysé les données, écrit et révisé le manuscrit.

Sisareuth Tan et Alain R. Brisson ont contribué à la conception des expérimentations, à l'analyse des données, et la révision du manuscrit.

1.1 Résumé

Le système lymphatique agit de concert avec le système cardiovasculaire afin de préserver l'équilibre fluide à travers le corps. Il est essentiel au trafic des cellules présentatrices d'antigène et aux lymphocytes vers les organes lymphoïdes. Des études récentes ont associé la dysfonction lymphatique avec la pathogenèse de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'inflammation, et l'obésité. Savoir si la dysfonction lymphatique est une cause ou une conséquence de ces maladies et quels en seraient les mécanismes fait l'objet d'études actuelles. Les vésicules extra-cellulaires (VEs) sont des vésicules de diamètre inférieur à un micron libérées par divers types cellulaires en réponse à une activation ou à une apoptose. Elles sont considérées comme des biomarqueurs importants pour plusieurs maladies inflammatoires. Ainsi, il est essentiel de caractériser la présence de VEs dans divers tissus et fluides biologiques afin de mieux appréhender leurs origines, puis leurs fonctions. Dans les dernières années, de nouvelles techniques permettant l'analyse quantitative et qualitative des VEs ont émergé, facilitant ainsi le développement d'études liant ces vésicules au système lymphatique. En utilisant plusieurs approches de pointe, cet article rapporte la présence de diverses populations de VEs, dérivées d'érythrocytes et de plaquettes, dans la lymphe d'animaux sains. De plus, nos résultats suggèrent que la lymphe de souris athérosclérotiques contient une concentration élevée de VEs, suggérant que les VEs contenues dans la lymphe pourraient être un biomarqueur de la dysfonction lymphatique, ou à l'inverse, de la progression de la maladie inflammatoire.

1.2 Abstract

The lymphatic system works in close collaboration with the cardiovascular system to preserve fluid balance throughout the body and is essential for the trafficking of antigen-presenting cells and lymphocytes to lymphoid organs. Recent findings have associated lymphatic dysfunction with the pathogenesis of cardiovascular-related diseases such as atherosclerosis, inflammation and obesity. Whether lymphatic dysfunction is a cause or a consequence of these diseases, as well as how, is under intensive investigation. Extracellular vesicles (EVs) are submicron vesicles released by diverse cell types upon activation or apoptosis and are considered important biomarkers for several inflammatory diseases. Thus, it is critical to characterize the presence of EVs in various biological tissues and fluids to delineate their origins and, subsequently, their functions. In the past few years, new techniques allowing the quantitative and qualitative analysis of EVs have emerged, thus facilitating the onset of studies bridging these vesicles to the lymphatic system. Using several state-of-the-art approaches, this article reports the presence of diverse EVs inclusively derived from red blood cells and platelets in lymph of healthy animals. Our results suggest that lymph from atherosclerotic mice displays a higher concentration of EVs, bringing forward the concept that EVs contained in lymph could either be a biomarker for lymphatic dysfunction or, conversely, for inflammatory disease progression.

1.3 Introduction

The lymphatic system is the principal route of transport from tissues for antigen and immune cells[409]. It is necessary to maintain fluid balance, fight infection, absorb dietary fat from the intestine and then transport it to the liver. Recently, dysfunction of this ubiquitous network has been linked to the pathogenesis of cardiovascular diseases, like ageing[410], hypercholesterolemia[411-413], and atherosclerosis[380]. Our own work[380] and that of others[376, 414] maintains that absence or obstruction of lymphatic vessels may accelerate inflammation occurring mostly in the intimal layer of the artery. Whereas inflammatory cell accumulation in peripheral tissues has been suggested to be responsible for the subsequent lymphatic transport impairment in obesity[415], it is still not clear whether lymphatic dysfunction is a cause or a consequence of other pathologies such as atherosclerosis, nor how.

The lymphatic network consists of an open, unidirectional and low-pressure vascular system. Plasma ultrafiltrate in peripheral tissues is first absorbed through absorptive blind-ended initial lymphatic vessels. Lymph subsequently moves into lymphatic collecting vessels, the entities responsible for maintaining lymph flow through the contraction of units called lymphangions. Bileaflet valves are present between the contractile units to prevent backflow[416], and the lymphatic endothelial cells (LECs) feature continuous "zipper-like" cell-cell junctions and a discontinuous smooth muscle cell (SMC) layer. Once they reach the lymph nodes, the afferent collecting vessels become the efferent collecting vessels, ultimately converging into the thoracic duct where lymph collected from all organs drains into the blood circulation at the subclavian veins through the lymphovenous (LV) junction[417]. Platelets have a unique role in lymphatic vessel development and maintenance, and they protect both the LV junction and the thoracic duct from backward flow. Furthermore, this platelet-dependent process is required throughout life to prevent retrograde blood flow and to maintain lymphatic function[418].

The composition of lymph is analogous to that of plasma, as it contains white blood cells, notably lymphocytes, but is essentially absent of red blood cells (RBCs), poorer in nutrients and richer in waste. A broad array of cytokines, proteins and growth factors are contained within lymphatic fluid, which play an important role in metabolism and cell proliferation[419]. Whereas studies have confirmed the presence of extracellular vesicles (EVs) of diverse origins in circulating blood[420], it is not clear yet whether these EVs can also be found in lymph per se. EVs are derived from cells upon activation and/or apoptosis[420, 421] and are considered important biomarkers and key players in several inflammatory settings including atherosclerosis and rheumatic disease[420, 422-

426]. Physiologically, EVs also constitute a heterogeneous population, differing in cellular origin, number, size, antigenic composition and functional properties[427]. They comprise exosomes, vesicles stored in multivesicular bodies (50 - 150 nm), and microvesicles (100 - 1,000 nm) produced by cytoplasmic-membrane budding and shedding. EVs generated from apoptotic cells are called apoptotic bodies ($>1 \mu\text{m}$). EVs are suggested to play key roles in intercellular communication by transporting messenger RNA, microRNA and proteins[428]; they can interact with neighbouring cells, causing structural and functional changes in tissues like the vascular wall, thereby affecting the endothelium[274] and myeloid cells such as macrophages[309] and neutrophils[271]. As one of the major roles of the lymphatic network is to orchestrate the clearance of cells and molecules from peripheral tissues, it is immunologically essential to maintain proper lymphatic vessel integrity throughout life. Recently, through in vivo near-infrared imaging, exosomes have been shown to be rapidly transported within minutes from the periphery to the lymph node by lymphatics[429]. Using the most advanced complementary methods to date, we herein sought to qualitatively and quantitatively report the presence of EVs in healthy and atherosclerotic mouse lymph collected in vivo. Our results suggest that EVs derived inclusively, but not exclusively, from RBCs and platelets circulate in the lymph of healthy animals and prevail in atherosclerosis.

1.4 Methods

1.4.1 Animals

Adult healthy 8-week old female wild-type (WT) C57BL/6 mice fed on a regular chow diet and age- and sex-matched low-density lipoprotein receptor^{-/-} (LDLR) mice also on a C57BL/6 background were purchased from Jackson Laboratory (Maine (ME), USA). LDLR^{-/-} mice were fed with a high fat diet Harlan Teklad 88137 (Indianapolis (IN), USA) for 8 weeks to ensure the atherosclerotic phenotype. Animals were housed in a pathogen-free environment under a 12-hour light-dark cycle with free access to water and food. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee.

1.4.2 Thoracic duct cannulation

Mice were anesthetized with isoflurane (4% for induction, 2-3% for maintenance). The anesthetized animal was positioned on its right side and a cannula was inserted into the thoracic lymph duct above the cisterna chyli between the transverse lumbar artery

and the diaphragm. Lymph was collected continuously, on average for 45 minutes to 1 hour, with a tube attached to a syringe coated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.1 M. Collected lymph was centrifuged at 1,200 g for 10 minutes at 4°C to remove most traces of whole cells, while being cautious not to create EVs due to high-speed centrifugation. Following that, 5% sucrose was added to each sample to improve preservation of the sample, which was then placed in a freezer at -80°C for further batch analysis. Although our technique ensures extreme care during collection, the absence of contaminating cells in lymph isolated from the thoracic duct was verified using a PC-based automated cell counter (Cellometer Auto X4, equipped with a 470/535 nm optic module; Nexcelom (Massachusetts (MA), USA)) that allowed bright field and fluorescent cell counting using acridine orange (AO), a nuclear-staining cell-permeable dye that stains all nucleated cells to generate green fluorescence. RBCs were considered as AO⁻ cells larger than 5 µm.

1.4.3 Cryo-transmission electron microscopy of lymph samples

Prior to electron microscopy (EM) analysis, lymph samples were labelled with 10 nm gold particles conjugated with annexin V as follows. An 8-µL lymph aliquot was mixed with 1 µL annexin-5-conjugated gold particles at 10¹⁷ particles/L and 1 µL 20 mM Ca²⁺. After 30 minutes' incubation at ambient temperature, 4-µL aliquots of lymph samples were deposited on EM grids coated with a perforated carbon film. After draining the excess liquid with a filter paper, grids were quickly plunged into liquid ethane and transferred to cryo-boxes and stored under liquid nitrogen. For cryo-EM observation, grids were mounted onto a Gatan 626 cryoholder and transferred in a Tecnai F20 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) microscope operated at 200 kV. Images were recorded with an USC1000-SSCCD camera (California (CA), United States).

1.4.4 Extracellular vesicle labelling

Lymph samples were rapidly thawed, which is considered optimal to maintain the EV integrity. Lymph (5 µL) containing D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chlorométhyl k tone (PPACK), at 10 µM), an anticoagulant with no effect on Ca²⁺ dynamics, was diluted in a total volume of 100 µL filtered (0.2 µM) annexin V buffer 1X (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) containing V450 conjugated annexin V (BD Biosciences, 1.5 µL) following the manufacturer's instructions. D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chlorométhyl k tone (PPACK) was included because addition of calcium was found to trigger the formation of micro-aggregates in some biological fluids, which are confounders in flow cytometry analysis

(EB, NT and AB, data not shown). Anti-CD41 antibodies conjugated with allophycocyanin (APC) (Biolegend (California (CA), United States), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and APC conjugated anti-Ter-119 (Biolegend, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added, in 2 different labelling cocktails, to identify EVs from platelets and RBCs, respectively. EVs were incubated in labelling cocktails for 30 minutes at room temperature, and the presence of esterase in EVs was established by the addition of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, eBioscience California (CA), United States) at 5 μM for the last 15 minutes of incubation. Cocktails were diluted by the addition of 400 μL of filtered (0.2 μM) annexin V buffer 1X prior analyses by flow cytometry. As controls, antibodies conjugated with the same fluorochromes but directed against human antigens were used to position the negative flow cytometry gates, whereas 50 μM EDTA or detergent Triton X-100 (0.05%) were respectively added to cocktails in order to verify the specificity of annexin V staining and the membrane moiety of EVs. Only for the EDTA control, the whole labelling process was done in PBS 1X instead of annexin V buffer 1X.

1.4.5 Flow cytometer sample analysis

To analyse EVs using flow cytometry, we used an improved high sensitivity flow cytometer (hs-FCM) Canto II special order product equipped with a small particle option (BD Biosciences)[265]. The forward scatter (FSC) on this dedicated equipment is coupled to a photomultiplier tube (PMT) with a 488 nm solid-state, 100 mW output blue laser (rather than the conventional 20 mW) and includes a 633 nm HeNe, 20 mW output red laser and a 405 nm solid state diode, 50 mW output violet laser. The hs-FCM is equipped with FSC-PMT and a Fourier optical transformation unit, reducing the background/noise and increasing the angle of diffusion, thus enhancing the detection of small diameter particles. The hs-FCM performance tracking was performed daily before all analyses using the BD cytometer setup and tracking beads (BD Biosciences). Size estimation was determined using silica beads of 100, 500 and 1,000 nm (Kisker Biotech GmbH & Co., Steinfurt, Germany), whereas volume quantification was performed by adding a known number of 3 μM dim polystyrene microspheres to each sample (BD Biosciences).

1.4.6 Statistics

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences were assessed using a 2-tailed non-parametric Student's t-test, with $p \leq 0.05$ reported as statistically significant, using Prism software, version 6.0c (GraphPad California (CA), United States). All experiments contained 3 or more replicate mice per

experimental parameter.

1.5 Results and discussion

1.5.1 Heterogeneous populations of EVs are present in lymph

Recently, emerging small-particle option analysing systems have been optimized to fully characterize EVs, and access to these tools awakens interest in a better understanding of the evident role of lymph as a route for EVs. Herein, we sought to assess their presence in circulating lymph using 3 different and complementary functional assays. First, to assess the purity of the lymph samples and the absence of possible contamination of blood that might occur during lymph collection (Fig. 1.1a), the number of AO^- cells larger than $5\ \mu\text{M}$ (e.g. RBCs, leukocytes) was determined in the lymph and compared to that of whole blood. We verified that, in contrast to blood, the lymph contained only a negligible trace of RBCs (0.11% compared to whole blood), thus confirming the high purity of the lymph preparations used for this study (Fig. 1.1b). In addition, by counting the number of nucleated (AO^+) cells in lymph before and after centrifugation, we demonstrated that centrifugation eliminated the vast majority of the cells in lymph samples (Fig. 1.1c). These observations validate our assertion that our pre-analytical conditions were optimal for the assessment of EVs in lymph.

In the first technique using cryo-EM, we detected spherical EVs with a diameter ranging from 50 to 800 nm (Fig. 1.2). As compared to the plasma samples[280], the lymph samples seemed to contain a significantly higher amount of EVs. Hence, although cryo-EM is not a quantitative method, the fact that 2 or more EVs were frequently observed at close distance (Fig. 1.2d) is in marked contrast with what is observed with pure plasma, which further excludes the impact of potential contamination of blood in the lymph analyses. Of interest, most EVs were not labelled by annexin V conjugated with gold nanoparticles, indicating that most do not expose phosphatidylserine (PS) on their outer surface (Fig. 1.2a through c). In addition to spherical EVs, some exhibiting multilayered structures (Fig. 1.2c) were also observed. Furthermore, another class of objects was abundant in the lymph samples. These objects present a mostly circular shape and a uniform greyness by cryo-EM. The absence of a lipid bilayer at their periphery enabled them to be easily distinguished from EVs (Fig. 1.2b and f); they are referred hereafter as lipoproteins. Surprisingly, lipoproteins were observed not only isolated in the lymph medium (Fig. 1.2f) but also encapsulated within EVs (Fig. 1.2c). The size of the lipoproteins varied from 100 nm to several 100 nm, yet smaller lipoproteins may well be present in lymph but are not detected here. Thus, EVs of various dimensions are

abundant in lymph, and a fraction of them expose PS.

A second approach we used was hs-FCM adapted with a small particle option. Silica beads are more appropriate than polystyrene beads to obtain an EV size estimation in flow cytometry because their refraction index is closer to that of EVs[430]. Thus we used silica beads of known dimensions and intact platelets to determine the lower and upper limits of our EV gate, respectively (Fig. 1.3a through c). To prudently assess EVs in complex fluids, we defined EVs as membrane cargo, containing active esterases (CFSE⁺), and positive for at least one surface marker such as PS or protein receptor (e.g. CD41). Although we recognize that extracellular esterases, complexed with lipoproteins or lipoprotein-like particles, might also be labelled with CFSE, such a combination of complementary markers greatly enhances the specificity of the approach. Having confirmed the specificity of our hs-FCM measurements using calcium chelation to prevent annexin V recognition of PS and of detergent to dissolve EVs (Fig. 1.3d through g), we found profuse amounts of CFSE⁺ particles in lymph, half of them exposing PS, suggesting that they were indeed EVs. Although these observations contrast with those made using cryo-EM, which revealed the preponderance of EVs lacking surface PS, they also suggest that a proportion of PS⁻ EVs remains undetected by hs-FCM, consistent with the lower limit of the EV gate, which we had intentionally set at approximately 100 nm accordingly to the silica beads.

1.5.2 EV levels are modulated in lymph during atherosclerosis

One of the main roles of the lymphatic system is to transport immune cells from peripheral tissues to lymphoid organs[409]. Inflammatory cell accumulation in peripheral tissues drives several chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis[431] and obesity[432], in which lymphatic transport has been reported as being defective[380, 415]. A growing number of studies are reporting that EVs are active pro-inflammatory players also present in inflammatory sites, becoming important biomarkers in several pathological settings. Altogether, these recent studies converge toward a key role of the lymphatic network in the clearance and production of EVs, thus explaining why EVs are more numerous in chronic inflammatory diseases. However, to our knowledge, this hypothesis has never been directly addressed.

Lymph composition is different than that of plasma or serum, and its content also varies according to the pathological setting. Studies have revealed that cholesterol-fed animals have higher phospholipid content, cholesterol-to-protein ratio and free cholesterol levels in their circulating lymph[433, 434]. In a first set of experiments, we sought to investigate whether the morphology and origin of EVs vary in WT versus atherosclerotic LDLR^{-/-}

mice. Size of nanoparticles was estimated using hydrodynamics, which does not however distinguish EVs from aggregated proteins and lipoproteins. Although this approach might not be optimal for the examination of polydisperse EV populations, it successfully revealed that, compared to WT animals, the main population of nanoparticles in lymph in atherosclerotic mice displayed a modest increase in diameter (175 ± 55 nm vs. 133 ± 41 nm). In addition, a second population of smaller nanoparticles (56 ± 10 nm) could be observed in these animals (Fig. 1.4). Whereas lymph composition appears altered in our atherosclerotic mouse model, further investigations are needed to determine whether this effect is due to hypercholesterolemia *per se*.

The most studied and abundant EV populations recognized in blood are derived from platelets and RBCs[280, 281]. In a normal physiological state, lymph is relatively free of RBCs. However, lymphatic transport impairment has been associated with improper lymphatic integrity and linked to the presence of RBC in lymph due to a defective LV junction[135]. Platelets are key players in that process, mainly through the binding of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC2) to LEC podoplanin. CLEC2 is constitutively expressed on the surface of blood platelets, and its interaction with podoplanin initiates a complex formed by fibrin-containing platelet thrombi that protects lymph from backward flow. Therefore, we hypothesized that EVs derived from both platelets and RBCs could accumulate in the lymph of mice displaying a defective lymphatic transport, as their lymphatic vessel integrity could be impaired.

To test our hypothesis, we used our adapted hs-FCM technique to measure platelet- and RBC-derived EVs in lymph. Overall, EV concentrations are increased in atherosclerosis (Fig. 1.5a). Indistinguishably from PS exposure, EVs from both platelet ($CD41^+$) and RBC ($Ter119^+$) origin are more abundant in the lymph of atherosclerotic animals (Fig. 1.5c and e), thus confirming our hypothesis. We suggest that the presence of RBC-derived EVs is due to an inappropriate backward flow from the LV or to a defective lymphatic endothelial cell-to-cell junction, thus reflecting increased vascular permeability. Whether the large accumulation of platelet-derived EVs in atherosclerotic lymph is a cause or a consequence of lymphatic dysfunction remains to be tested. We bring forward new concepts that could explain the presence of platelet-derived EVs in lymph. Therefore, we hypothesize that the stagnation of platelet EVs in lymph could either reflect (a) the incapacity of the lymphatic vessels to propel lymph down the road and thus to efficiently clear the interstitial space or (b) the incapacity of platelets to bind to LEC at the LV, which could lead to their shedding and backward flow in lymph. These hypotheses are currently under intensive investigation. Whereas PS^+ EVs from various origins were clearly increased, PS^- EVs were not significantly higher in sick animals (Fig. 1.5b, d,

and f), reflecting that the impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammation and atherosclerosis is also observed in lymph.

1.6 Discussion

Although the functional consequences of the presence of EVs in lymph remain to be established, this study reports that EVs, of diverse sources, are transported in lymph. EVs are involved in numerous physiological processes, and vesicles from both non-immune and immune cells have important roles in immune regulation. Whereas several stimuli, such as cytokines, lead to EV release from macrophages and monocytes in the atherosclerotic lesion[435], EVs produced by blood endothelial cells (BEC) can also be found in blood[436]. As pro-inflammatory cytokines and nitric oxide can trigger BEC-derived EVs production[437], it would be of interest to test whether these players involved in lymphatic function could also promote LEC-derived EVs in atherosclerosis-related collecting lymphatic dysfunction[263]. Albeit the full assessment of EV origin (e.g. immune cells) and subtypes (i.e. exosomes, microvesicles or apoptotic cells) using complementary biochemical approaches[438] would have been of interest, the volume of lymph collected was not suitable to perform these additional experiments and other studies will characterize them without doubt in the near future. At present, we speculate that lymph contains both exosomes and microvesicles and that the CD41⁺ and Ter119⁺ EVs, with their size and markers, correspond mainly to microvesicles derived from platelets (or megakaryocytes) and RBCs, respectively. We observed that a major proportion of EVs did not harbour surface PS. Considering that PS is implicated in the rapid clearance of EVs[427], PS⁻ EVs may predominantly accumulate in the lymphatic system where they might interact with other cells and lymphoid organs. Whereas the routes and mechanisms of EV uptake have been described extensively in the past few years[439], our results complement these findings and bring forth a possible direct role of the lymphatic network in the transport and also the production of EVs. Our results suggest that EVs derived from RBCs and platelets, inclusively but not exclusively, circulate in the lymph of healthy animals and are morphologically different and abundant in atherosclerosis. Whether increased concentrations of EVs in lymph in atherosclerosis and other chronic inflammatory diseases reflect a cause or a consequence of lymphatic dysfunction remains under intensive investigation.

1.7 Acknowledgements

We thank Tania Lévesque and François Dallaire for their technical help. This work was partially supported by the Montreal Heart Institute Foundation (CM), the Banting Research Foundation (CM) and a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Foundation grant (EB). EB is the recipient of a CIHR new investigator award, CM is the recipient of a FRQS Research Scholars Career Award - Junior 1 and NT of a fellowship from the Fonds de Recherche sur les Maladies Rhumatismales de l'Université Laval.

1.8 Conflict of interest and funding

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

1.9 Figures

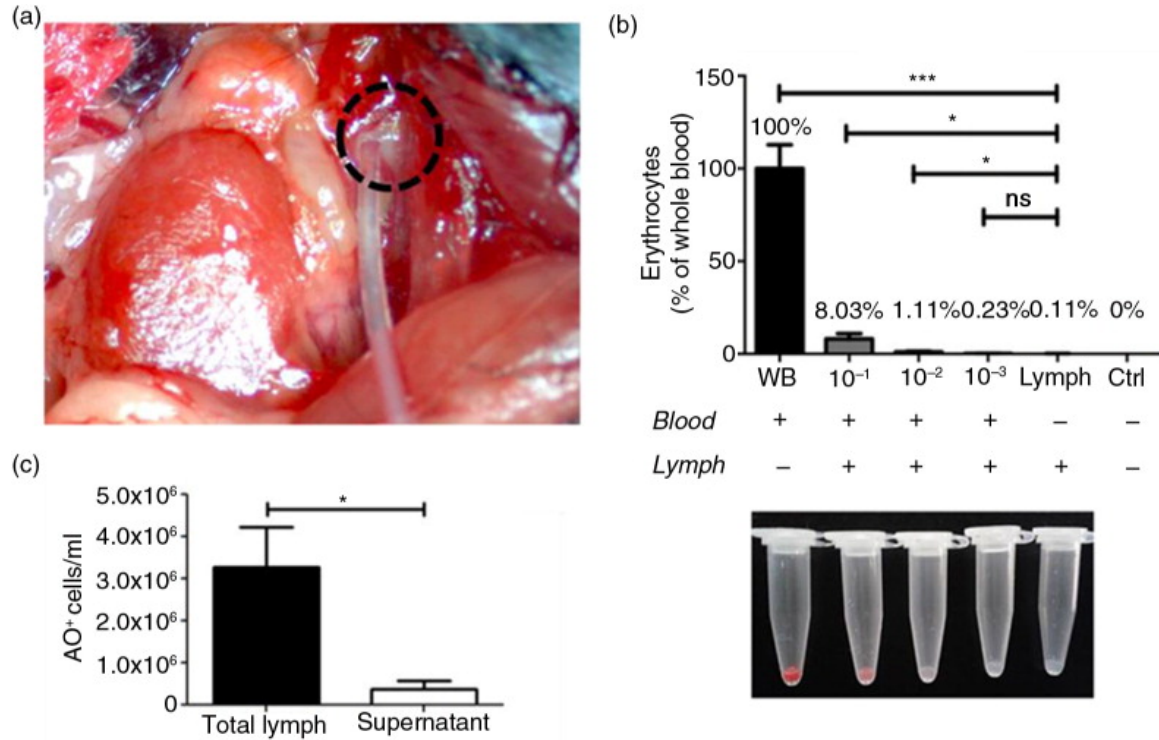


Figure 1.1 – Assessment of lymph purity following collection and processing :(a) Lymph was collected from the thoracic duct (dotted circle) on EDTA (0.1 M); following sample collection, cell counting was performed with a Nexcelom Auto X4 cell counter before (total lymph) and after (supernatant) centrifugation. Cells were stained with acridine orange (AO), a nuclear staining (nucleic acid binding) fluorescent dye that stains all nucleated cells, in whole blood and total lymph. The number of AO⁻ cells larger than 5 μ M in diameter (i.e. red blood cells) was assessed using brightfield and fluorescence imaging for AO. (b) Total lymph was purposely contaminated at different concentrations (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) with whole blood (WB) and our sample of interest (lymph) was then standardized to WB and compared to all concentrations and lymph supernatant (control). (c) Total number of AO⁺ cells was detected in total lymph and lymph supernatant using fluorescence imaging for AO. (n=4 per group ; * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.001$).

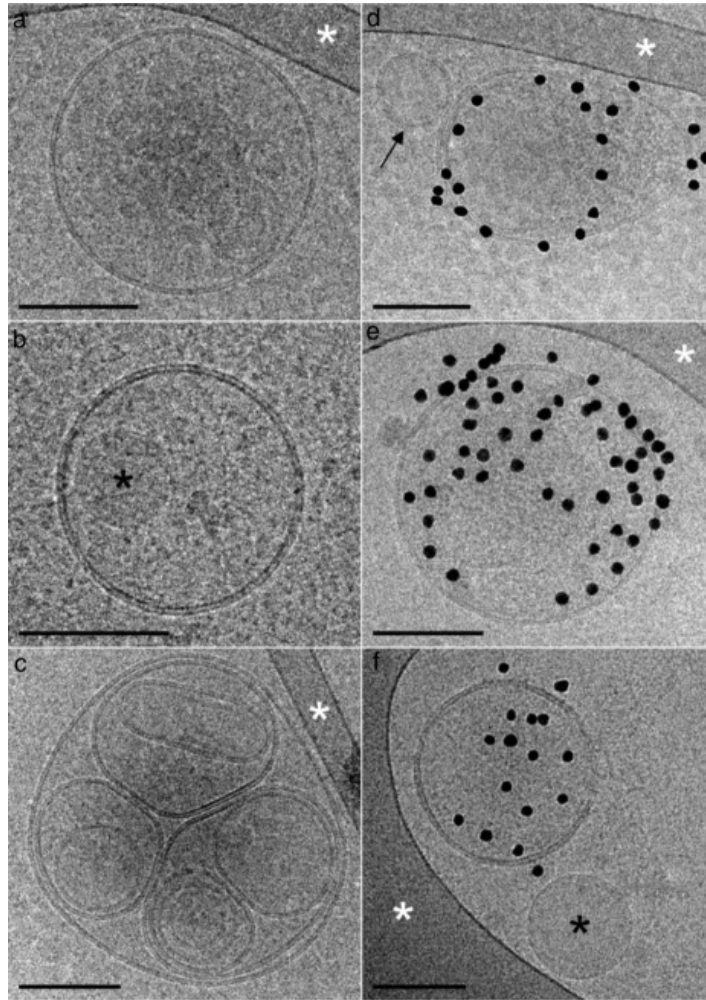


Figure 1.2 – Representative cryo-electron microscopy images of lymph extracellular vesicles (EVs) :(a through c) EVs devoid of annexin V gold nanoparticles indicate the absence of phosphatidylserine (PS) on their outer membrane surface. (d through f) EVs are labelled by annexin V gold nanoparticles, with the exception of the small unlabelled EVs marked with a black arrow. (b, d) The black asterisks point to circular shapes devoid of a lipid bilayer, which could most likely be lipoproteins. (b and f) The white asterisks point to areas of the supporting perforated carbon net. EVs devoid of annexin V gold nanoparticles and EVs labelled by annexin V gold nanoparticles in the lymph of atherosclerotic LDLR^{-/-} mice. Scale bars : 100 nm.

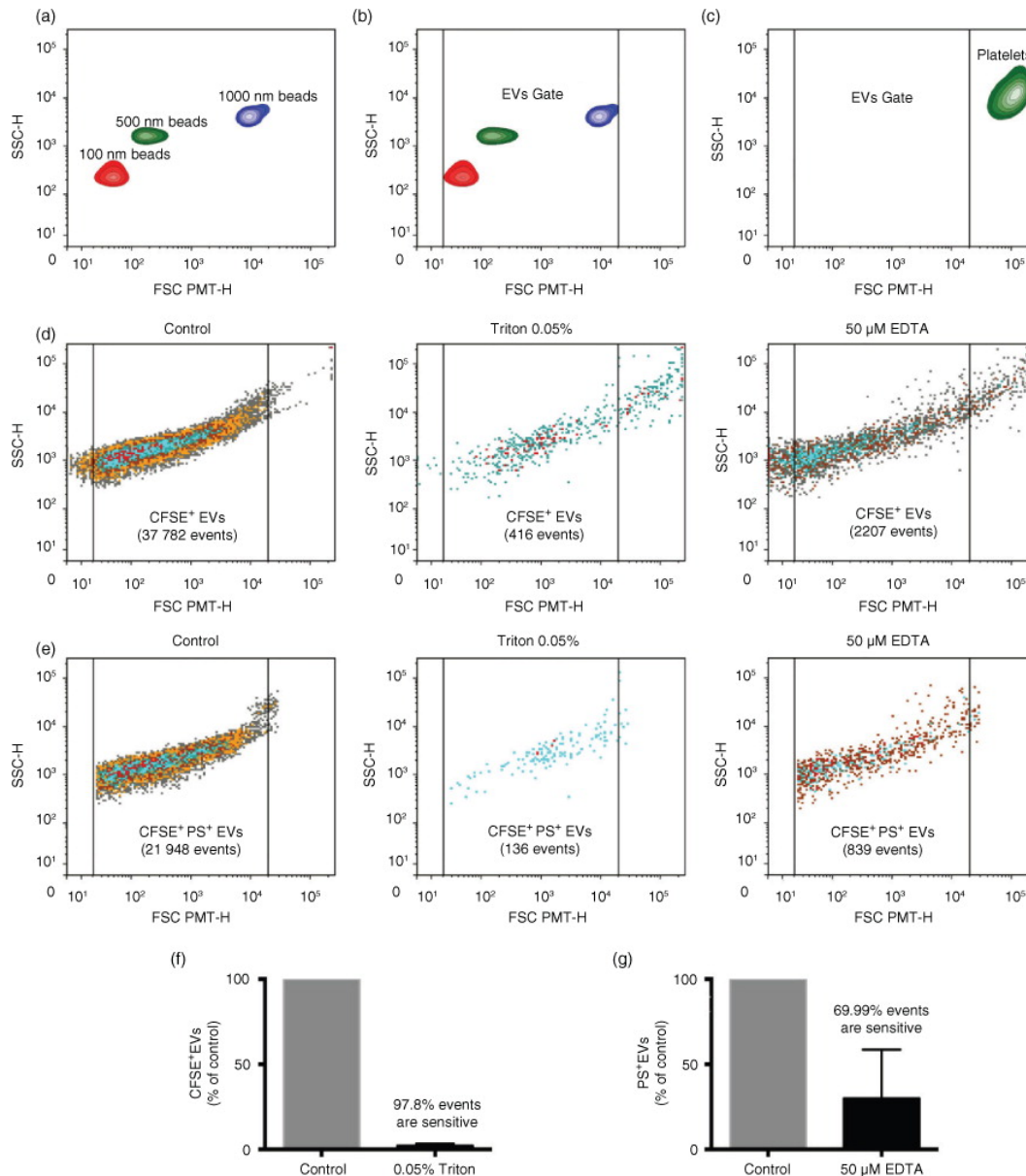


Figure 1.3 – Detection of EVs in lymph using flow cytometry :(a through e) A Canto II flow cytometer modified with a "small particle" FSC PMT-H option was used to detect and quantify silica microspheres of 100 nm (red), 500 nm (green) and 1,000 nm (violet) mean diameter and EVs. (a, b) An EV gate was designed for the detection of small particles from 100 to 1,000 nm in diameter, based on the silica microspheres sizes (FSC PMT-H). (c) CD41⁺ mouse platelets are excluded from the EV gate based on their size (FSC PMT-H). Representative flow cytometry dot plot of lymph (d) total CFSE⁺ and (e) CFSE⁺PS⁺ EVs in control conditions or treated with 0.05% Triton or 50 M EDTA. Sensitivity to (f) Triton or (g) EDTA of EVs.

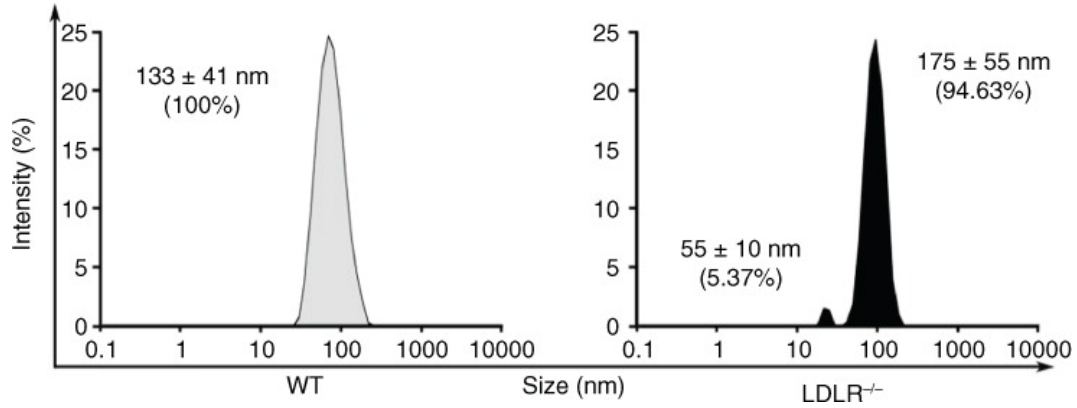


Figure 1.4 – Dynamic light scattering size characterization of particles present in lymph of wild-type (WT) and LDLR^{-/-} mice : Dimensions of the particles present in lymph from WT and LDLR^{-/-} mice were determined with a Zetasizer Nano S, Malvern Instruments, UK Experiments were performed with 3 mice per experimental group.

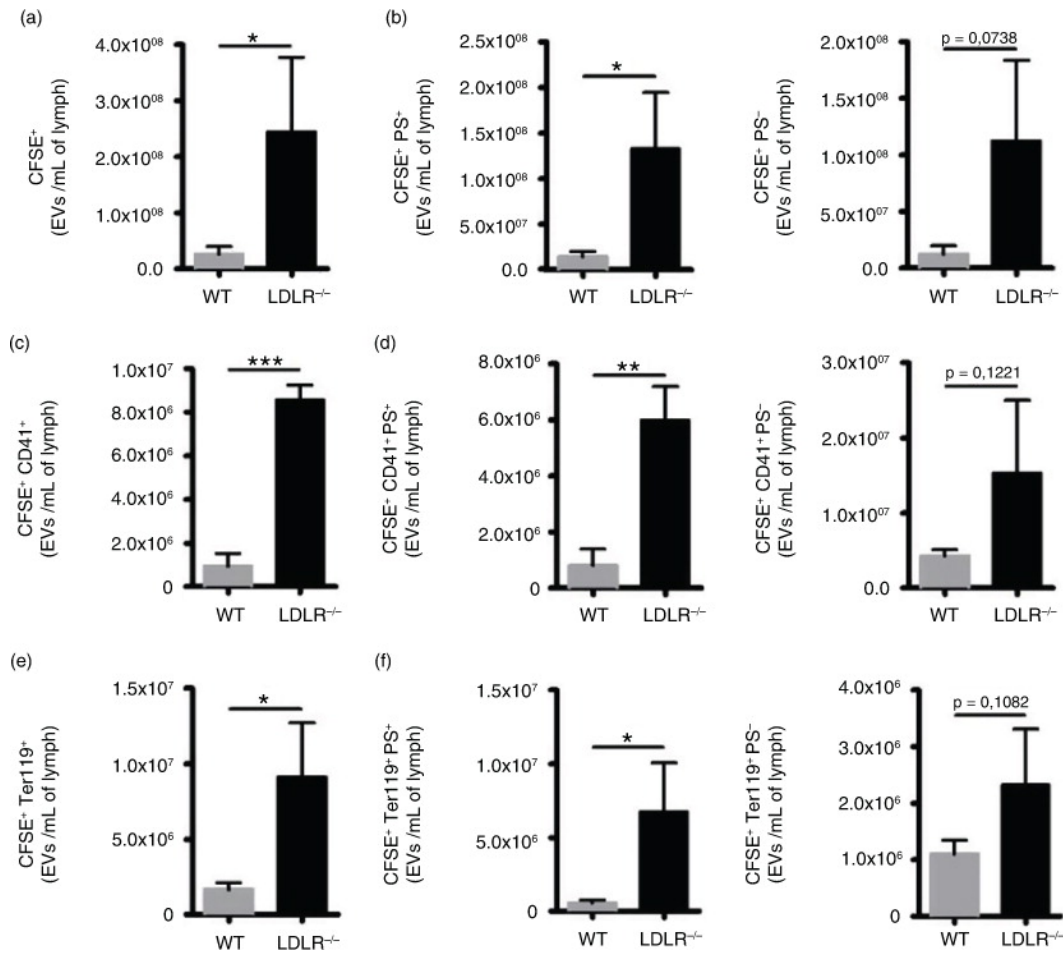


Figure 1.5 – Characterization of EVs in lymph of atherosclerotic mice : Flow cytometry was used to identify (a) total CFSE⁺ EVs based on their (b) PS expression. (c) CFSE⁺CD41⁺ and (e) CFSE⁺ Ter119⁺ EVs were analysed based on their (d, f) PS expression. Experiments were performed with 3 mice per experimental group. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Chapitre 2 : Platelets disseminate extracellular vesicles in lymph in rheumatoid arthritis

Nicolas Tessandier¹, Imene Melki¹, Nathalie Cloutier¹, Isabelle Allaeys¹, Adam Miszta², Sisareuth Tan³, Andreea Milasan⁴, Sara Michel¹, Abderrahim Benmoussa¹, Tania Lévesque¹, Francine Côté⁵, Steven E. McKenzie⁶, Caroline Gilbert¹, Patrick Provost¹, Alain R. Brisson³, Alisa S. Wolberg², Paul R. Fortin^{7,8}, Catherine Martel⁴ et Éric Boilard^{7,8,✉}

¹ Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, QC, Canada; Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Université Laval, Québec, QC, Canada.

² Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA.

³ Extracellular Vesicles and Membrane Repair, UMR-5248-CBMN CNRS-University of Bordeaux-IPB, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, Pessac, France.

⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada.

⁵ Institut Imagine, Inserm U1163, Laboratoire Olivier Hermine, Porte 216, 24 blvd Montparnasse, Paris, 75015, France.

⁶ Cardeza Foundation for Hematological Research, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107

⁷ Division de Rhumatologie, Département de Médecine, CHU de Québec – Université Laval, Québec, QC, Canada

⁸ Axe maladies infectieuses et inflammatoires, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, QC, Canada

Le Dr. Éric Boilard a conçu et dirigé le projet de recherche. Il a contribué à l'analyse des données et à l'écriture du manuscrit. Nicolas Tessandier, Imene Melki, Nathalie Cloutier, Isabelle Aelleys et Éric Boilard ont conçu les expérimentations. Nicolas Tessandier, Imene Melki, Nathalie Cloutier, Isabelle Aelleys, Adam Miszta, Sisareuth Tan, Sara Michel, Abderrahim Benmoussa et Tania Lévesque ont réalisé les expérimentations. Nicolas Tessandier, Imene Melki, Nathalie Cloutier, Isabelle Aelleys, Adam Miszta, Sara Michel,

Alisa Worlberg, Alain R. Brisson et Éric Boilard ont analysé les données. Adam Miszta, Sisareuth Tan, Andreea Milasan, Alisa Worlberg, Alain R. Brisson et Catherine Martel ont contribué à la conception des expérimentations, à l'analyse des données, et la révision du manuscrit. Francine Côté et Steven E. McKenzie ont développé et nous ont transmis des modèles murins essentiels à la réalisation de cette étude. Nicolas Tessandier, Imene Melki et Éric Boilard ont écrit le manuscrit. Tous les auteurs ont révisé et approuvé le manuscrit.

2.1 Résumé

Le système lymphatique est un système circulatoire drainant de façon unidirectionnelle le liquide interstitiel vers la circulation sanguine. Bien que la lymphe soit empruntée par les leucocytes participant à la surveillance immune, elle reste inaccessible aux plaquettes et aux érythrocytes. Les cellules activées libèrent des vésicules extra-cellulaires (VEs), de diamètre inférieur à 1 μm , transportant des molécules de la cellule mère. Dans l'arthrite rhumatoïde, les VEs s'accumulent dans l'articulation où elles interagissent avec de multiples cellules. Cependant, si les VEs peuvent quitter le tissu enflammé pour retourner dans la circulation sanguine reste inconnu. **Objectif :** Ici, nous étudions si la perméabilité vasculaire qui augmente pendant l'inflammation facilite l'entrée des VEs dans le système lymphatique. **Approche et résultats :** En utilisant un modèle *in vivo* d'arthrite inflammatoire, nous montrons qu'il se produit un influx de VEs de plaquettes (VEP) mais pas de VEs dérivées d'érythrocytes ou de leukocytes dans la lymphe drainant l'articulation. Contrairement aux VEP sanguines, les VEP lymphatiques ne possèdent pas d'organelles mitochondriaux et ne causent pas de coagulation. L'influx de VEP dans la lymphe concorde avec la perméabilité vasculaire et implique le récepteur de fibrinogène $\alpha 2\text{b}\beta 3$ ainsi que la sérotonine venant des plaquettes. Ces résultats indiquent que les plaquettes peuvent disséminer leurs VEs dans des fluides qui leurs sont inaccessibles et au delà de l'articulation dans cette maladie.

2.2 Abstract

The lymphatic system is a circulatory system that unidirectionally drains the interstitial tissue fluid back to blood circulation. While lymph is utilized by leukocytes for immune surveillance, it remains inaccessible to platelets and erythrocytes. Activated cells release submicron extracellular vesicles (EV) that transport molecules from the donor cells. In rheumatoid arthritis, EV accumulate in the joint where they can interact with numerous cellular lineages. However, whether EV can exit the inflamed tissue to recirculate is unknown. **Objective:** Here, we investigated whether vascular leakage that occurs during inflammation could favor EV access to the lymphatic system. **Approach and Results:** Using an *in vivo* model of autoimmune inflammatory arthritis, we show that there is an influx of platelet EV (PEV), but not EV from erythrocytes or leukocytes, in joint-draining lymph. In contrast to blood PEV, lymph PEV lacked mitochondrial organelles and failed to promote coagulation. PEV influx in lymph was consistent with joint vascular leakage and implicated the fibrinogen receptor $\alpha 2\text{b}\beta_3$ and platelet-derived serotonin. **Conclusions:** These findings show that platelets can disseminate their EV in fluid that is inaccessible to platelets and beyond the joint in this disease.

2.3 Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease with a global prevalence of 0.5 to 1%[3, 440]. The best-known manifestations implicate the joints, although it is recognized that RA also affects the cardiovascular system. RA is considered a leading cause of disability and is associated with multiple complications such as cardiovascular diseases[3]. Despite the emergence of several efficient therapies, a cure has not yet been achieved[3].

Joint invasion by immune cells and activation of resident immune cells and fibroblast-like synoviocytes contribute to the disease[148]. Inflammatory mediators drive progressive and irreversible disruption of the cartilage and bone[3]. Leukocytes play a central role in joint destruction through the release of inflammatory mediators and enzymes like elastases and collagenases[441]. The mechanism underlying disease initiation is not fully established, but auto-antibodies such as rheumatoid factor and those directed against citrullinated proteins, and activation of Fc receptors (FcR) by immune complexes (IC), are suggested to drive the disease in seropositive RA[440]. In mice, genetic ablation of the complete set of FcR for IgG (Fc γ R) protects from arthritis[110, 442, 443], further pointing to the critical role of auto-antibodies in this disease.

While platelets circulate in blood and maintain hemostasis, their role in the inflammatory response has also been recognized[444]. Platelets are activated in RA patients[231, 445] and their depletion in a mouse model of autoimmune inflammatory arthritis decreases arthritis severity[324, 446]. The genetic ablation of glycoprotein VI (GPVI), the platelet receptor for collagen, reduces arthritis[324], also pointing to platelet contribution to RA. Human platelets express Fc γ RIIA, a receptor for IC, which could also contribute to platelet activation in RA. However, murine platelets are completely devoid of any Fc γ R and thereby cannot respond to IC[246, 447, 448]. In transgenic Fc γ RIIA mice (Fc γ RIIA^{TGN}) expressing Fc γ RIIA on myeloid cells including platelets similarly to humans[105, 246, 449], circulating IC activate platelets[108, 450-452]. Antibody-mediated arthritis is also more severe in Fc γ RIIA^{TGN} mice[453, 454]. However, it remains unknown whether manifestations other than joint inflammation are affected by the expression of Fc γ RIIA by platelets in arthritis.

Extracellular vesicles (EV), such as exosomes and microvesicles, are small vesicles released from cells through exocytosis of multi-vesicular bodies or plasma membrane budding respectively[455]. Upon activation, platelets release EV (PEV) containing molecules and

organelles originating from the platelet[247, 272] and which can be transferred to cellular recipients if internalized[271, 274, 309]. PEV levels increase in the blood of RA patients and correlate with disease severity[322, 456]. PEV accumulate in the synovial fluid of RA patients[264, 323-325] where they amplify inflammation, in part through the activation of fibroblast-like synoviocytes by their IL-1 content[324]. In RA PEV harbor autoantigens (e.g. vimentin and citrullinated proteins) that are targeted by autoantibodies[264, 325]. Moreover, PEV are internalized by neutrophils in the arthritic joints[271] leading to the transfer of platelet components, which profoundly modify the neutrophil transcriptome[271]. Thus, PEV accumulate in the joint in RA where they can interact with numerous cellular lineages. Whether they can exit the inflamed tissue has never been examined.

Alongside the bloodstream, lymphatic circulation is a circulatory system that drains interstitial fluid from the tissue back into the blood via lymph nodes and the thoracic duct[457, 458]. Lymph transports immune cells, lipoproteins, soluble factors and EV[263] and is normally devoid of erythrocytes and platelets[459]. Studies in mice indicate that lymphatic vessels are involved in the clearance of atherosclerotic lesions[263, 380, 385], and are enriched in EV from platelets and erythrocytes[263]. How these EV reach lymph and whether this could also apply to other pathogeneses such as an autoimmune inflammatory disease is unknown.

During RA, enhanced permeability of the synovial microvasculature underlies tissue edema[238, 244]. Inflamed joints and neighboring tissues are drained by dense networks of lymphatics[395, 460], which is suggested to contribute to edema resorption and the attenuation joint damage[405, 406]. While the lymphatic system is mainly regarded as a route for immune cells to reach lymphoid organs, whether increased blood vessel permeability in inflammatory conditions can influence EV entry in lymphatics remains poorly documented.

Because lymphatic circulation connects the inflamed joints with lymph nodes and the blood circulation[395], we verified whether lymph could also drain EV of an inflamed joint during RA. Herein, we show that after draining the inflamed articulation, lymph is enriched in PEV during RA. We provide evidence that PEV egress is tightly regulated by vascular permeability and implicates serotonin released by activated platelets following their activation by autoantibodies in arthritis.

2.4 Materials and methods

More information on methodologies and related citations are presented as supplementary material. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

2.4.1 Mice

C57BL/6J ($\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{Null}}$ mice), $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}$ hemizygous mice were obtained from The Jackson Laboratory. $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}$ hemizygous mice described as expressing human $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ on platelets, megakaryocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, basophils, mast cells, and dendritic cells were backcrossed to C57BL/6J for more than ten generations. $\beta_3^{-/-}$ and $\text{Tph1}^{-/-}$ mice were crossed with $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}$ mice to obtain $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}:\beta_3^{-/-}$ and $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}:\text{Tph1}^{-/-}$ mice[108, 242, 461, 462]. $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}$ mice were also crossed with mice expressing red fluorescent protein (RFP) in mitochondria to generate $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}$ mice with fluorescent mitochondria, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}^{\text{TGN}}:\text{Mitochondria-DsRed}$ mice[463]. Guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed in a protocol approved by the Animal Welfare Committee at Laval University (2017122-2). The experiments implicating the examination of the role of β_3 and Tph1 required breeding of $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ transgenic mice and the respective gene deficient mice. In these conditions where a reduced number of mice with the desired genotypes are generated/breeding, male and female mice were pooled to achieve sufficient N for further analyses.

2.4.2 EV quantification

Samples (1 μL lymph) were labeled with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CD41-BV421 and 1 μM of CellTracker Deep Red for 30 min at room temperature in 100 μL phosphate-buffered saline (PBS), and diluted to 500 μL with PBS before flow cytometry analysis using BD Canto II Special Order Research Product, mounted with a forward scatter coupled to a photomultiplier tube, adapted to small particle quantification. For EV characterization 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLEC-2-PE, CD8-APC, CD45-PerCP-Cy5.5 and podoplanin-PE-Cy7, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CD4-FITC and Gr1-FITC, 1/50 of Annexin V-V450 and 1 μL of Ter119-APC were used. All antibodies and annexin were purchased from BD Biosciences, CA, USA, except for anti-podoplanin and anti-CLEC-2 (Biolegend, CA, USA). PEV were identified as double positive for both CD41 and CellTracker. Before acquisition, a known quantity of fluorescent microspheres (2 μm diameter, Cy5-labeled, Nanocs Inc, NY, USA) was

added to each tube. Silica beads were used to determine gates used to exclude events smaller than 100 nm or larger than 1 μm (Kisker BioTech, Germany). Triton 0.05% was used to establish EV labeling specificity given the detergent sensitivity of EV.

2.4.3 Statistical analysis

To avoid misinterpretations due to changes in laser performance or other confounders through the extended period that lasted this study, we only made comparisons between EV levels in lymph collected and processed the same day, and analyzed the same day on the same instrument. Results are presented as mean \pm SEM. Shapiro-Wilk test was used as a normality test. Samples were not tested for equal variance. Statistical significance between groups was determined with unpaired Student's t test, or Wilcoxon rank-sum test, when applicable. One-way ANOVA followed with a post hoc Tukey HSD or two-way ANOVA followed with a post hoc Holm-Šídák were used for multiple comparisons. In experiments where $n=3$ and $n=4$ were used, data must be interpreted accordingly to the limitations inherent to the sample size. All statistical analyses were done using R software[464].

2.5 Results

2.5.1 PEV circulate in lymph in autoimmune inflammatory arthritis

Lymph was collected at the peak of arthritis (day 7) and the absence of blood contamination was confirmed (Fig. 2.1a,b,c,d). High-sensitivity flow cytometry analyses were optimized to specifically quantify lymph EV (Fig. 2.1e,f). PEV concentrations in control lymph ($2.5 \pm 0.6 \times 10^7$ /mL) and in plasma ($2.1 \pm 0.1 \times 10^7$ /mL) were comparable (Fig. 2.1g). WT mice injected with K/BxN serum developed moderate arthritis, (Fig. 2.2a,b), and no increase in lymph PEV was detected in RA (Fig. 2.2c).

In the K/BxN serum transfer arthritis model, autoantibodies target glucose-6-phosphate isomerase and form pathogenic IC[162]. Given the absence of Fc γ R on murine platelets[105], Fc γ RIIA-expressing mice (Fc γ RIIA^{TGN}) were used. No significant differences in the levels of lymph PEV due to the expression of the transgene were observed (Fig. 2c,f, P-value = 0.25). Fc γ RIIA^{TGN} mice injected with K/BxN serum displayed more severe RA (Fig. 2.2d,e). Unlike WT mice, lymph PEV concentration increased during RA in Fc γ RIIA^{TGN} mice (Fig. 2.2f). Lymph immunoblotting (Supp. fig. 2.1a) showed a specific enrichment in CD41 fraction while proteins expressed by EV and exosomes (TSG101) were not modulated, suggesting that PEV accumulation in lymph during RA had no significant impact on the lymph content of these exosomal proteins. Increased PEV levels in Fc γ RIIA^{TGN} mice peaked at day 7 (Supp. fig. 2.1b). To obtain clues on whether PEV accumulate in lymph following drainage from the inflamed articulation, we assessed PEV in both thoracic and mesenteric lymph draining respectively the lower body including hind limbs and the digestive system. Only the thoracic lymph was enriched in PEV (Supp. fig. 2.1c), suggesting that PEV influx in arthritic Fc γ RIIA-expressing mice may originate from the joint vasculature.

2.5.2 PEV are a predominant EV population in Fc γ RIIA K/BxN lymph

The majority of the circulating cells in lymph in healthy conditions were B and T-lymphocytes (Supp. fig. 2.2a). Concentrations of CD45-, CD3- or CD4-harboring cells significantly decreased in K/BxN lymph (Supp. fig. 2.2a), suggesting that these cells may be sequestered in other tissue locations or lymph nodes. This further highlights the specificity of PEV enrichment in RA lymph. Minor fractions of the B ($3.3 \pm 0.7\%$) or T-lymphocytes ($1.7 \pm 0.8\%$) harbored the platelet marker CD41 suggesting that PEV interaction with lymphocytes in lymph is a minor event (Supp. fig. 2.2b). Multiple EV populations were detected in lymph in addition to PEV : EV from leukocytes

(CD45⁺), T-lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺), granulocytes (Gr1⁺), lymphatic endothelial cells (podoplanin⁺) and erythrocytes (Ter119⁺) (Fig. 2.3a). However, none of the EV derived from these cells were significantly modulated by K/BxN arthritis (Fig. 2.3a). As PEV proportion increased to represent the main EV population we detected in lymph in arthritic conditions (Fig. 2.3b), the data further points to the specificity of PEV enrichment in lymph during RA.

2.5.3 Characterization of EV in lymph

Cryo-transmission electron-microscopy permits the direct visualization of EV and the assessment of EV smaller in size than those distinguished by flow cytometry. The analysis of thoracic lymph from arthritic Fc γ RIIA^{TGN} mice revealed a wide variety of EV in lymph (Fig. 2.4a). Approximately 5% of EV harbored CD41, while the majority were CD41 negative, consistent with the large heterogeneity of the EV present in lymph and potentially reflecting the absence of CD41 on certain PEV[250, 465]. Furthermore, vesicles located inside other vesicles, and vesicles presenting a tubular shape were also observed (Fig. 2.4a).

EV from activated platelets in the blood of RA patients express C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), a receptor for podoplanin[270]; however, it is unknown whether this receptor is found on PEV in lymph. In healthy mice, 50% of lymph PEV harbor CLEC-2, but this percentage increased to 80% in K/BxN lymph, confirming that PEV maintain the expression of CLEC-2 in arthritis, and pointing to enrichment of CLEC-2⁺ PEV in lymph during RA (Fig. 2.4b). Moreover, half (58 \pm 4%) of the PEV in control and K/BxN mouse lymph exposed phosphatidylserine (Fig. 2.4c), a percentage similar to what has been reported in blood (55%)[281]. Analysis of lymph microRNA content, undertaken because platelets[466] and blood PEV[247, 274] contain gene-regulatory microRNA, showed profound alterations in the composition of the lymph extracellular microRNA during arthritis (Fig. 2.4d) and changes in the pathways potentially targeted by these microRNA during arthritis (Supp. fig. 2.3). Given the 5-fold enrichment of miR-451, a microRNA known to be contained in PEV[271] (Fig. 2.4d) we utilized of magnetic microspheres to specifically isolate PEV in lymph confirmed their content in miR-451 and miR-223 (Fig. 2.4e). Similar levels of these microRNA were quantified in PEV from plasma, suggesting that there is no enrichment in these microRNA species in lymph PEV. A proportion of PEV contain mitochondria, and have been described in blood and the synovial fluid in RA[272, 465]. To determine if lymph PEV contain mitochondria, Fc γ RIIA^{TGN} mice were crossed with mice expressing red fluorescent protein (RFP) in

the mitochondria[463]. Alongside platelets, CD41⁺ EV containing or not mitochondria, were detected in plasma from these mice but were absent in lymph (Fig. 2.4f), which is consistent with lymphatic EV being of a small size (123.5 ± 3.1 nm in control lymph vs 97.5 ± 5.1 nm in K/BxN lymph) (Supp. fig. 2.4). Taken together, these results reveal that lymph PEV, despite sharing common traits with blood PEV can be distinguished from blood PEV by the absence of mitochondria.

2.5.4 PEV do not contribute to lymph coagulation

Platelet EV circulating in blood can support the coagulation cascade[247, 248]. However, it is unknown whether lymph PEV can also participate in coagulation. Albeit at a lower level than plasma (Fig. 2.5a,c), lymph was able to generate thrombin, thereby demonstrating that coagulation can occur in lymph, as previously reported[467]. Thrombin generation in lymph of healthy versus arthritic mice was comparable, suggesting that the population of PEV enriched in Fc γ RIIA^{TGN} K/BxN mice does not augment lymph coagulation (Fig. 2.5a). The complete removal of EV following high-speed centrifugation of acellular lymph and plasma reduced the coagulation potential of the fluids, suggesting that particulate material, likely EV from different cells, supports coagulation in lymph and in plasma (Fig. 2.5a,c). However, the specific removal of CD41⁺ EV from lymph and plasma using magnetic beads coupled with anti-CD41 antibody effectively reduced thrombin generation in plasma, but not in lymph (Fig. 2.5b,d), despite the efficient PEV depletion (Supp. fig. 2.5). These data demonstrate that in contrast to PEV in blood, lymph PEV do not contribute to coagulation, pointing to other function(s) for PEV in lymph.

2.5.5 Role of Fc γ RIIA signaling through α IIB β ₃ in joint vasculature leakage

Blood vasculature leakage of the inflamed joint occurs during arthritis[239, 244, 424, 468]. Alterations to the blood vasculature permeability may be involved in the accumulation of PEV in lymph. Joint permeability was assessed by intravenous injection of fluorescent microspheres (510 nm) in the tail vein and quantification of their accumulation in joints[244]. Unlike healthy control mice, vascular leakage was confirmed in arthritic mice, and was significantly enhanced by the expression of Fc γ RIIA (Fig. 2.6a,b). Since platelets Fc γ RIIA signaling requires fibrinogen binding to the α IIB β ₃ receptor[245], mice lacking β ₃ subunit (Fc γ RIIA^{TGN}: β ₃^{-/-}) were compared to control mice (Fc γ RIIA^{TGN}: β ₃^{+/+}). Both groups developed similar arthritis (Fig. 2.6c,d), revealing that β ₃ is dispensable in

the promotion of joint inflammation. However, blood vessel leakage in joints was almost abrogated in the absence of β_3 (Fig. 2.6e,f), thereby pointing to critical $\alpha\text{IIb}\beta_3$ signaling in platelets during the leakage process.

In vitro stimulation of platelet Fc γ RIIA leads to PEV release, independently of β_3 expression (Supp. fig. 2.6), suggesting that PEV may still be produced locally in joints during arthritis in mice lacking β_3 . However, it was impossible to assess lymph PEV levels in Fc γ RIIA^{TGN}: $\beta_3^{-/-}$ mice due to unavoidable bleeding during lymph collection. To determine the potential role of β_3 in PEV egress to lymph, the transit of fluorescent microspheres was thus monitored. Microspheres were injected in the tail vein and after their accumulation in the joints (45min after injection), the microspheres were detected in hind paw-draining lymph nodes (Inguinal lymph node, ILN), suggesting that the microspheres that could leave the blood circulation were drained from the extravascular bed to the lymphatic node (Fig. 2.6g). Microsphere transit to the ILN was markedly increased in Fc γ RIIA^{TGN}: $\beta_3^{+/+}$ compared with WT (Fc γ RIIA^{Null}: $\beta_3^{+/+}$) arthritic mice. In contrast, Fc γ RIIA^{TGN}: $\beta_3^{-/-}$ mice showed a reduction in microsphere accumulation in ILN (Fig. 2.6g). Together, these data suggest that in arthritis, platelets are activated and mediate leakage of the joint blood vasculature in joints through a mechanism implicating Fc γ RIIA and $\alpha\text{IIb}\beta_3$, a process that favors the egress of small particles through the lymphatic system.

2.5.6 Blood vessel permeability induced by platelet-derived serotonin supports PEV egress to the lymphatic system

Serotonin and histamine are potent mediators capable of promoting blood vessel leakage[239, 468, 469]. Outside the brain, platelet dense granules are the main reservoir of serotonin. The latter is in fact produced by tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) in enterochromaffin cells in the intestine before their capture by platelets in blood[242]. Given that Fc γ RIIA activation by IC and $\alpha\text{IIb}\beta_3$ reportedly induces serotonin release[108], we examined the role of serotonin in PEV circulation in lymph using mice lacking peripheral serotonin (genetic ablation of the gene coding for TPH1)[242] and expressing Fc γ RIIA^{TGN}. Arthritis severity was the same in both Fc γ RIIA^{TGN}:Tph1^{+/+} and Fc γ RIIA^{TGN}:Tph1^{-/-} mice (Fig. 2.7a,b), consistent with the reported sustained arthritis in mice lacking the serotonin transporter, the receptor that permits the capture of serotonin by platelets[244]. Fc γ RIIA^{TGN}:Tph1^{-/-} mice had a marked reduction in joint blood vessel permeability (Fig. 2.7c). Fluorescent microspheres were injected in the tail vein and their quantification in ILN at later timepoints further highlighted that

$Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ mice showed a consistent reduction in microsphere transit from blood vessel to the lymphatic system (Fig. 2.7d). It is important to note that despite sustained arthritis severity in $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ mice, PEV levels in lymph of these mice were greatly reduced, suggesting that PEV influx in the lymph and promotion of joint inflammation may implicate different pathways (Fig. 2.7e). PEV reduction in lymph was not due to defective EV liberation by $Tph1^{-/-}$ platelets (Supp. fig. 2.7). Moreover, the quantification of lymphatic vessels ($Lyve1^{+}$) in $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{+/+}$ and $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ mice confirmed the absence of defects in lymphangiogenesis, as the lymphatic vessel number per mm^2 , lymphatic vessel area and total lymphatic vessel area per mm^2 of tissue were the same in both groups (Supp. fig. 2.8a-e). In summary, the data confirm that following $Fc\gamma RIIA$ activation by IC co-signaling by $\alpha IIb\beta_3$, platelet-derived serotonin promotes PEV egress to the lymphatic system.

2.6 Discussion

Platelets circulate in an activated state in the blood vessels of RA patients and studies have confirmed the presence of PEV in the synovial fluid of RA patients where they can interact with other cellular lineages[264, 323, 324]. The present study identifies PEV lymphatic influx as a consequence of articular inflammation and reveals that PEV can reach tissue locations beyond the inflamed tissue in RA. Moreover, the results show that platelets regulate the permeability of the blood vasculature to promote PEV influx into the lymphatic system in RA. As PEV transport platelet components, including inflammatory molecules and nucleic acids, this mechanism contributes to the dissemination of platelet molecules in a vasculature that is not usually accessible to platelets. As PEV influx in lymph also occurs in a mouse model of atherosclerosis[263], we further suggest that this concept may extend to other vascular inflammatory conditions in which platelets contribute.

Circulating leukocytes migrate into inflamed tissues. This process implicates both selectins and integrins, and studies suggest that platelets are critical to the efficient adhesion and migration of neutrophils in tissues. Activated platelets and neutrophils interact together through P-selectin or glycoprotein 1B on platelets, as well as P-selectin glycoprotein ligand and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) on neutrophils[213, 470-472]. Although platelets can use adhesion receptors, such as α IIb β ₃, to scan the blood vessel wall and migrate[473], it is currently unclear whether their migratory activity is sufficient to reach the inflamed synovium in RA. Thus, platelets may potentially leave blood vessels through interactions with the migrating leukocytes, or through an undefined intrinsic migratory activity.

In RA, the egress of PEV from leaky blood vessels is suggested to be a function of their small dimensions[244, 424]. Thus, the generation of EV and the promotion of vascular leakage may represent another means for platelets to transfer their cargo to tissue locations outside blood vessels. Human platelets express tyrosine-based activation motifs (ITAM) receptors : Fc γ RIIA, glycoprotein VI (GPVI) and CLEC-2. In this model, Fc γ RIIA could play two roles in the promotion of PEV egress in lymph by 1) increasing PEV generation in response to IC and 2) inducing platelet degranulation and thus serotonin release. GPVI, a collagen receptor, was previously shown implicated in PEV release and promotion of arthritis in the K/BxN serum transfer model[324]. While GPVI was also shown involved in joint vascular leakage in this model[244], the

present data suggest that its role is more modest in absence of Fc γ RIIA. We speculate that changes in K/BxN serum potency and animal facility environment may explain the much lower disease severity currently observed in our Fc γ RIIA^{Null} mice and may thereby mask the role of GPVI[474, 475]. Although enhanced arthritis severity in Fc γ RIIA^{Null} mice was achieved by the injection of higher volume of K/BxN serum, Fc γ RIIA^{TGN} mice still presented higher levels of PEV in lymph than their Fc γ RIIA^{Null} counterparts, and no positive correlation between arthritis severity and PEV concentration was detected (Supp. fig. 2.9). While these data point to a critical involvement of Fc γ RIIA in PEV egress in lymph, the reduction PEV accumulation in lymph in absence of α Ib β ₃ or peripheral serotonin, despite full blown arthritis in these mice, clearly illustrates the disconnect between arthritis severity and PEV recirculation. Given that Fc γ RIIA can amplify platelet activation in response to antibodies as well as in response to fibrinogen in mediating α Ib β ₃ outside-in integrin signaling[476], we suggest that Fc γ RIIA also regulates PEV egress in lymph in other models of inflammation. Whether CLEC-2 is also involved in the release of EV by platelets or the promotion of joint leakage in RA was not investigated in the present study.

While platelets are absent in lymph, their PEV are found in lymph under healthy conditions[263]. They may be generated for instance by sustained platelet CLEC-2 activation at the separation of the blood and lymphatic systems, or from megakaryocytes as they too express CD41 and CLEC-2[270, 418]. In autoimmune idiopathic thrombocytopenic purpura, PEV can cross-express CD markers from other cells[477], pointing to interactions of PEV with EV from different cellular lineages. Such interactions were not investigated in the present study, but given the dominance of PEV in lymph in comparison to EV from other cells, these events would be expected to be rare. EV participate in intercellular communication[247] and contain nucleic acid (e.g.mRNA, microRNA, cytokines, and organelles)[247, 271-273]. We could verify that lymph PEV also contain at least two microRNA species (miR-223 and miR-451). However, CD41⁺ PEV did not account for the majority of lymphatic microRNA (Fig. 2.4e), suggesting that the profound change affecting microRNA lymphatic composition during RA could not be solely explained by the lymph PEV influx. The results hint that other vesicles, such as PEV lacking the expression of CD41, exosomes (from platelets or other cells), lipid vesicles, or Argonaute2-microRNA complexes[478] could contribute to the alteration of the microRNA repertoire. Future investigations are needed to better describe microRNA content of lymph PEV and their role in this tissue location.

In accordance with previous literature[467], lymph can clot, but less efficiently than plasma or blood. It may be explained by altered levels of the clotting factors in lymph relative to plasma[479] or potentially a reduced number of tissue factor exposing EV[480, 481]. Exosomes or other soluble mediators might also participate in lymph coagulation. Moreover, unlike in plasma, depletion of CD41⁺ EV had no impact on lymph coagulation, possibly due to the presence of other more potent populations of EV not harboring CD41. This suggests that lymph PEV may play roles other than in coagulation, such as the transmission of platelet-derived molecules to lymph nodes and cells that populate the lymphatics. Whether the drainage of PEV is a process that can reduce joint inflammation in RA could not be demonstrated in this present study, but others reported that interruption of lymphatic drainage due to lymphoproliferation in lymph nodes could enhance joint bone erosion and inflammation in mice[401, 406]. The drainage of inflammatory molecules (e.g. cytokines, PEV) may thus reduce local inflammation in joints, but may disseminate these molecules to other tissue locations and to cells that populate the lymphatics.

Lymphatic vessels draining the interstitial fluid are blind-ended by a mesh of pores, that selectively uptake smaller vesicles, up to 1 μm in diameter[482]. The pore size possibly explains the size-filtration of EV entering the lymph, thereby favoring enrichment of smaller EV, possibly explaining the absence of mitochondria-containing PEV in lymph, in contrast to plasma. Another explanation is that certain populations of PEV may have preferentially interacted with other cells such as endothelial cells, macrophages and neutrophils[271, 274, 309], and even with the lymphatic endothelial cells which, we observed, can also internalize PEV (Supp. fig. 2.10). Like EV, small molecules such as cytokines may thus be drained by the lymphatic vessels. By measuring 32 different cytokines and chemokines in mouse lymph, we found that solely G-CSF and IL-6 were increased during RA (Supp. fig. 2.11). However, with the exception of IL-6, serotonin deficiency did not hinder the presence of other cytokines or chemokines in arthritic lymph (Supp. fig. 2.12). While PEV were able to stimulate the release of cytokines (e.g. G-CSF, IL-1ra) by lymphatic endothelial cells, PEV failed to induce IL-6 release (Supp. fig. 2.13). Together the data point to the specificity of serotonin-induced vascular permeability in the presence of PEV and IL-6 in lymph.

The lymphatic network is best known for its role in the transportation of immune cells to lymph nodes. Lymph is also utilized by metastatic lymphoma cells to reach the lung vasculature and propagate cancer[483, 484]. However, our work identifies platelets

as cell capable of propagating their PEV through lymph in RA. This novel activity for platelets occurs downstream the inflamed site. Given that lymph unidirectionally converges at the thoracic duct near the heart in the left subclavian vein, PEV may also return to the blood circulation near this organ, and may contribute to the enhanced risk of cardiovascular diseases[485]. These observations are particularly relevant in RA, where inflammation affects the joints, but cardiovascular manifestations are one of the leading causes of death in patients[485].

In sum, PEV have a privileged access to the lymphatic system relatively to platelets, and their examination in lymph may reveal outstanding physio- and pathological roles played by PEV that cannot be performed by platelets themselves.

2.7 Acknowledgments

We are grateful to the generous technical help provided by Dr Emmanuelle Rollet- Labelle throughout the study. We thank the Bioimagerie du petit animal, the Cytometry, and the Microscopie platforms (CHU de Quebec). We are also grateful for the generous donation of $Fc\gamma RIIA^{TGN}; \beta_3^{-/-}$ mice by Dr Peter Newman.

2.8 Sources of Funding

This work was supported by a Foundation grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to E.B.); it was also supported, in part, by grant from the Institut Universitaire de France to A.Br. E.B. is recipient of a new investigator award from the CIHR and the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S). P.R.F. is recipient of a tier 1 Canada Research Chair on Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. A.Be, N.T. and I.M. are recipients of fellowships from FRQ-S. N.T. and I.M are recipients of fellowships from The Arthritis Society (TAS).

2.9 Disclosures

The authors have no conflict of interest to disclose.

2.10 Figures

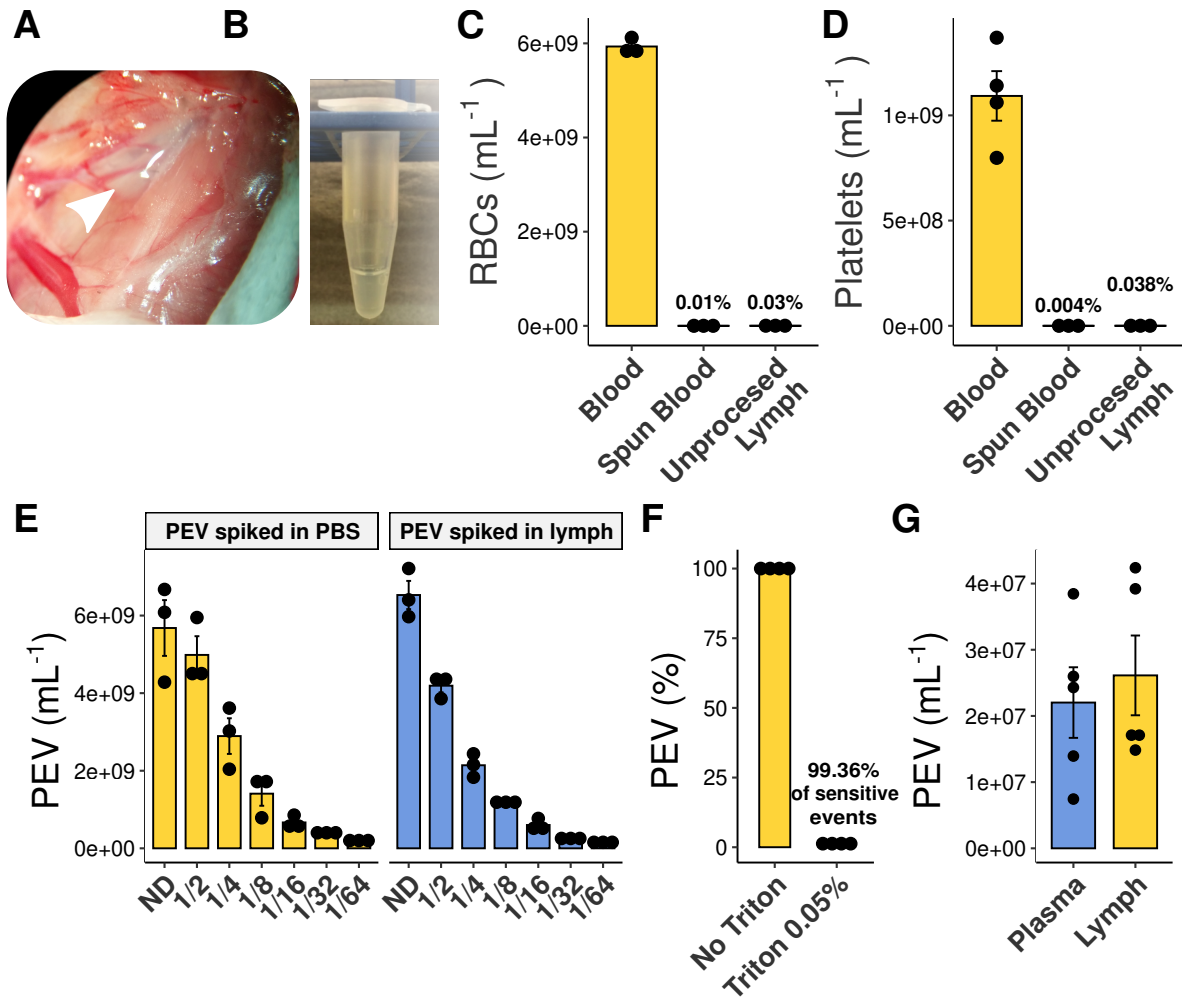


Figure 2.1 – Lymph collection and lymph PEV quantification

(A) Lymph is collected at the thoracic duct, between the transverse lumbar artery and the diaphragm in a collection tube coated with EDTA (0.1 M). (B) Representative picture of translucent collected lymph. (C and D) Red blood cell (RBCs) (C) and platelet (D) counts in blood, spun blood (plasma), and unprocessed lymph (n=3). (E) Efficient flow cytometry quantification of PEV in lymph was verified by spiking and serial-dilutions of *in vitro*-generated PEV in either lymph or PBS. (ND : Non-Diluted, n=3). (F) Sensitivity to Triton 0.05% of the PEV quantified by flow cytometry (n=4). (G) PEV were quantified in platelet-free plasma and in lymph in C57BL/6 wild-type mice (n=5).

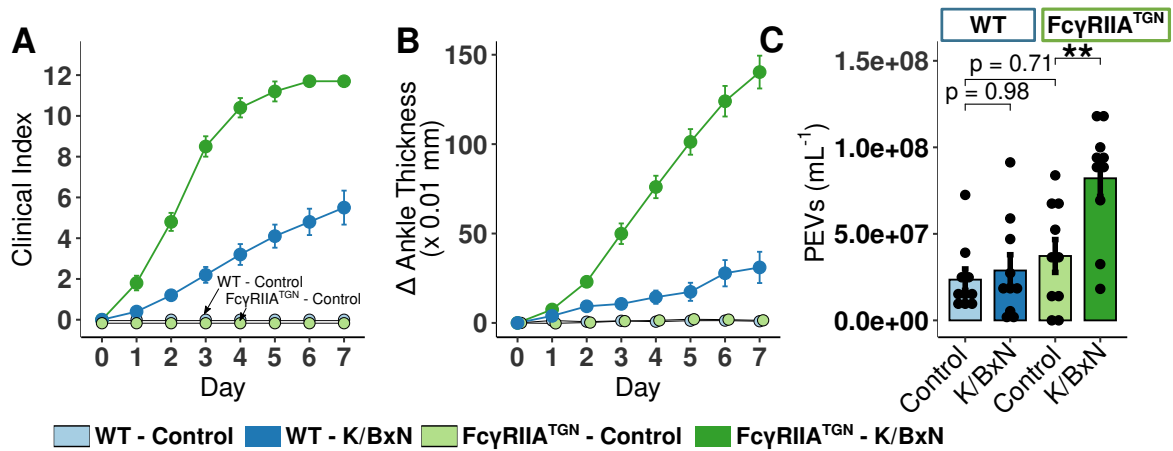


Figure 2.2 – PEV circulate in lymph in autoimmune inflammatory arthritis

(**A and B**) Clinical index (A) and delta ankle thickness (B) in wild-type (WT; blue) and FcγRIIA^{TGN} (green) mice injected with either 150 μL PBS (respectively light blue and light green) or 150 μL K/BxN serum (respectively dark blue and dark green) on day 0 and day 2 (n=10). (**C**), Flow cytometry quantification of lymph PEV in WT and FcγRIIA^{TGN} mice at the peak of arthritis severity, day 7 (n=10). ** : $p \leq 0.01$, using a one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey HSD for multiple comparisons.

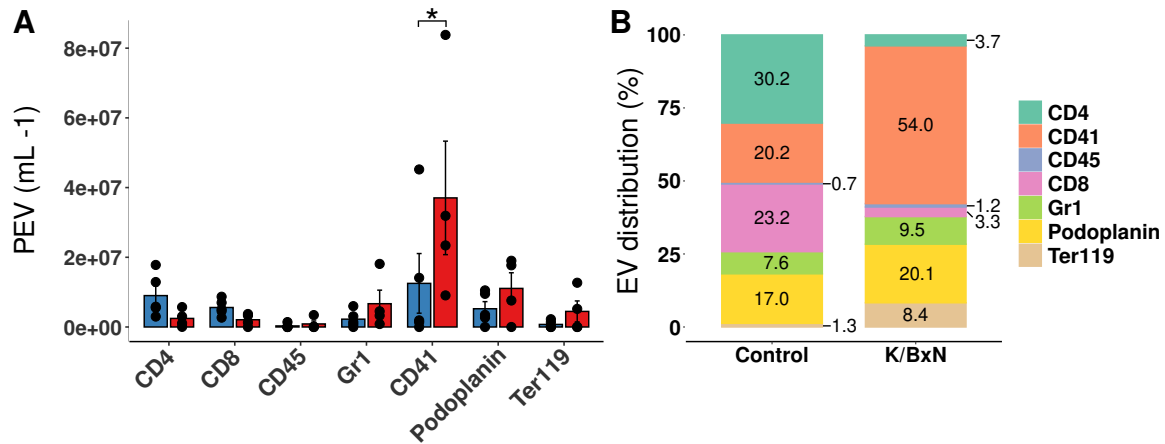


Figure 2.3 – PEV are a predominant EV population in Fc γ RIIA^{TGN} K/BxN lymph

(A) Quantification of EV populations between control and K/BxN lymph, as assessed by flow cytometry. (B) Assessment of EV populations proportion by flow cytometry in lymph from control and K/BxN mice. EV distribution are presented as a percentage based on the selected EV markers (CD4, CD41, CD45, CD8, Gr1, Podoplanin, Ter119). EV not presenting those markers were therefore not taken into account for the total EV population in this representation (n=4). Same samples were used for creating both A and B panels. * : $p \leq 0.05$ using a two-way ANOVA, followed by post hoc Holm-Šídák for multiple comparisons.

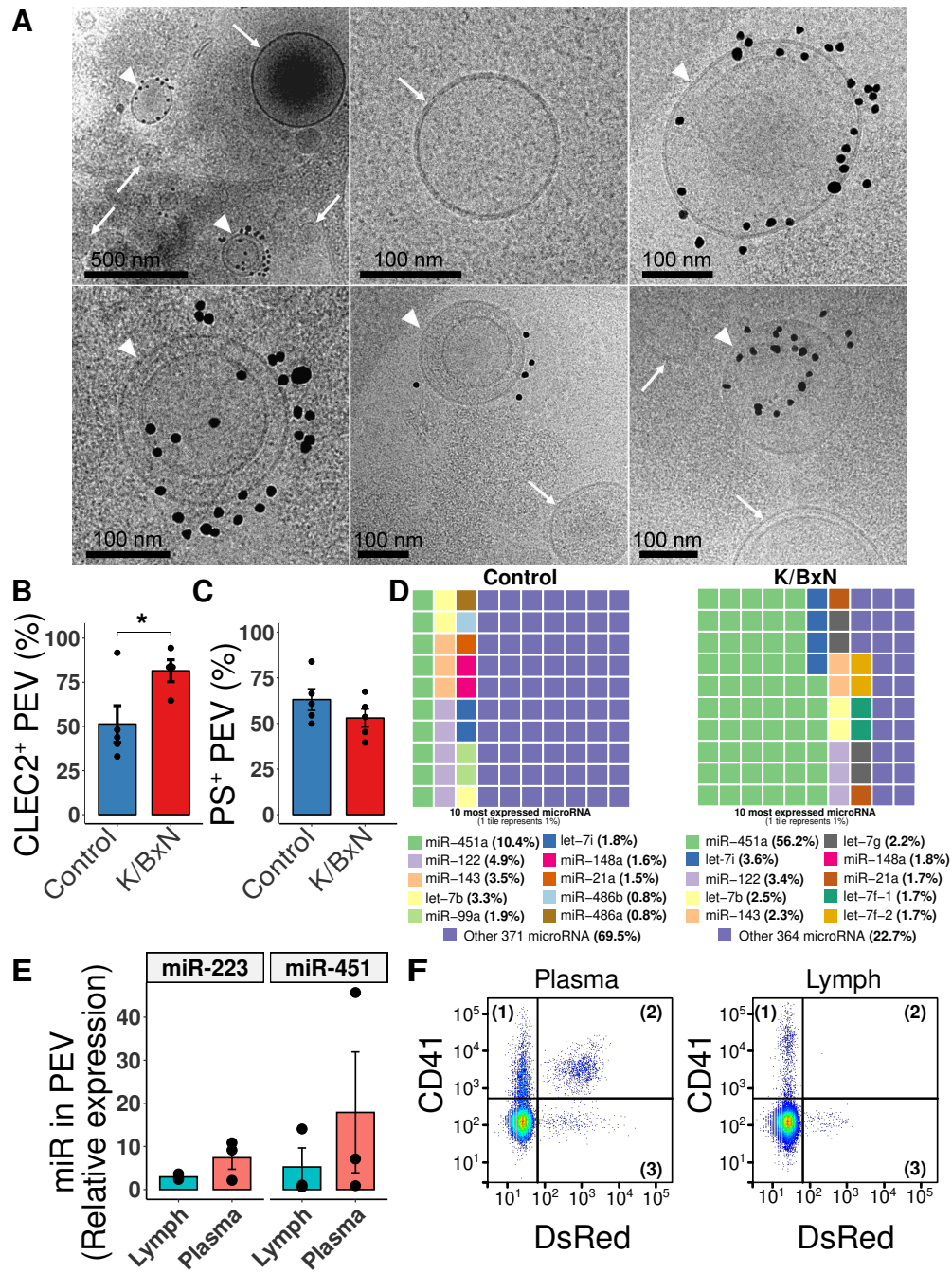


Figure 2.4 – Characterization of EV in lymph

(A) Representative cryo-electron-microscopy images of vesicles detected in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN lymph. Black dots identify CD41 antibody coupled to gold beads. Top left panel illustrates the specificity of labelling, as all the black dots can be found in close proximity with EV. White arrowheads identify $CD41^+$ EV, whereas white arrows identify $CD41^-$ EV. (lymph pooled from 3 $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN mice). **(B)** CLEC-2 (C-type lectin domain family 1 member B) exposure and **(C)** Phosphatidylserine (PS) exposure on PEV in control and K/BxN mice (n=4 and n=5). **(D)** Representations of the proportions of the 10 most expressed extracellular microRNA in Control (left) and K/BxN (right) $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ lymph. Each tile represents 1% (n=1, pooled from 3 mice per condition). **(E)** Proportion of miR-223 and miR-451 contained in K/BxN immunoprecipitated $CD41^+$ PEV over total extracellular content in lymph versus plasma, as determined by RT-qPCR (n=3). **(F)** Representative gating illustration of plasma and lymph from K/BxN mice (n=2). Samples were labeled with an anti-CD41 (Pacific Blue), whereas mitochondria are endogenously fluorescent (Mitochondria-DsRed). * : $p \leq 0.05$, using an unpaired t-test.

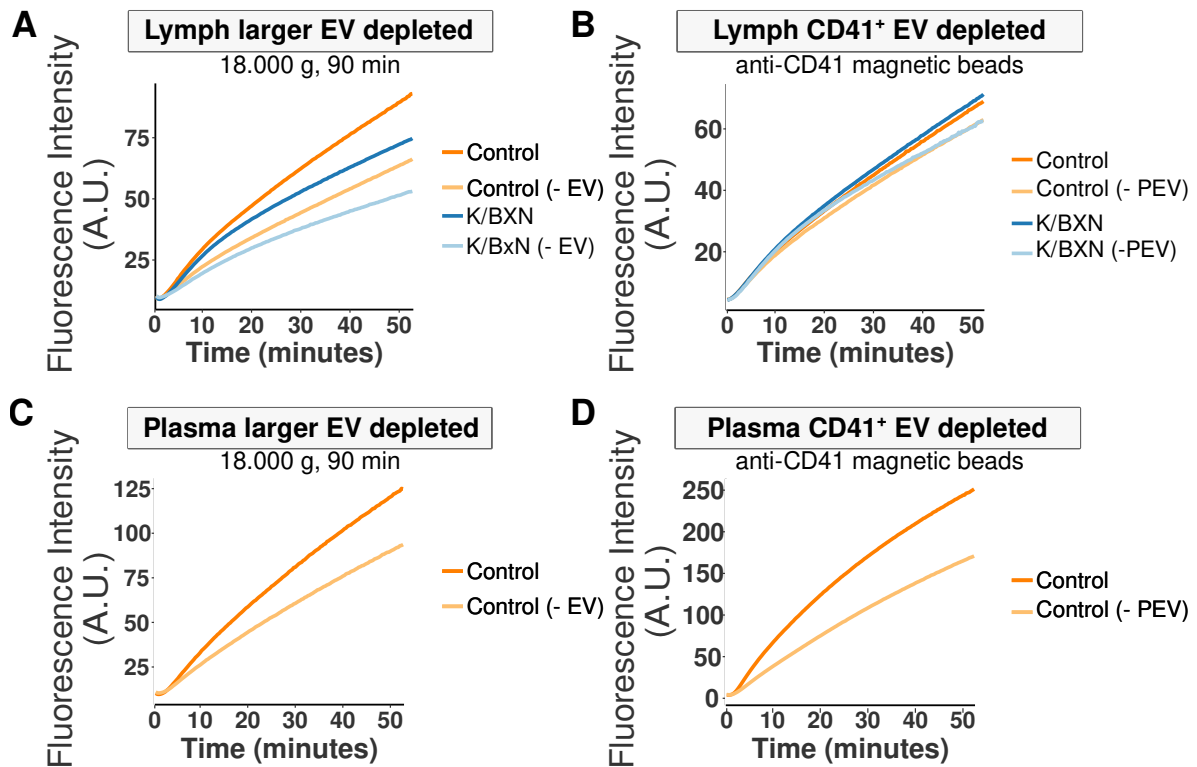


Figure 2.5 – PEV do not contribute to lymph coagulation but interact with lymphatic endothelial cells

(**A and B**) Averaged curves showing fluorescence from cleavage of a fluorogenic substrate of thrombin in Control (PBS) or Fc γ RIIA^{TGN} K/BxN lymph, either native or larger EV-depleted (centrifugation at 18,000 g for 90 minutes) (**A**), or native and CD41⁺-EV-depleted (**B**) (n=4). (**C and D**) Averaged curves showing fluorescence from cleavage of a fluorogenic substrate of thrombin in Control (PBS) or Fc γ RIIA^{TGN} K/BxN plasma, either native or larger EV-depleted (**C**), or native and CD41⁺-EV-depleted (**D**) (n=3 and n=2).

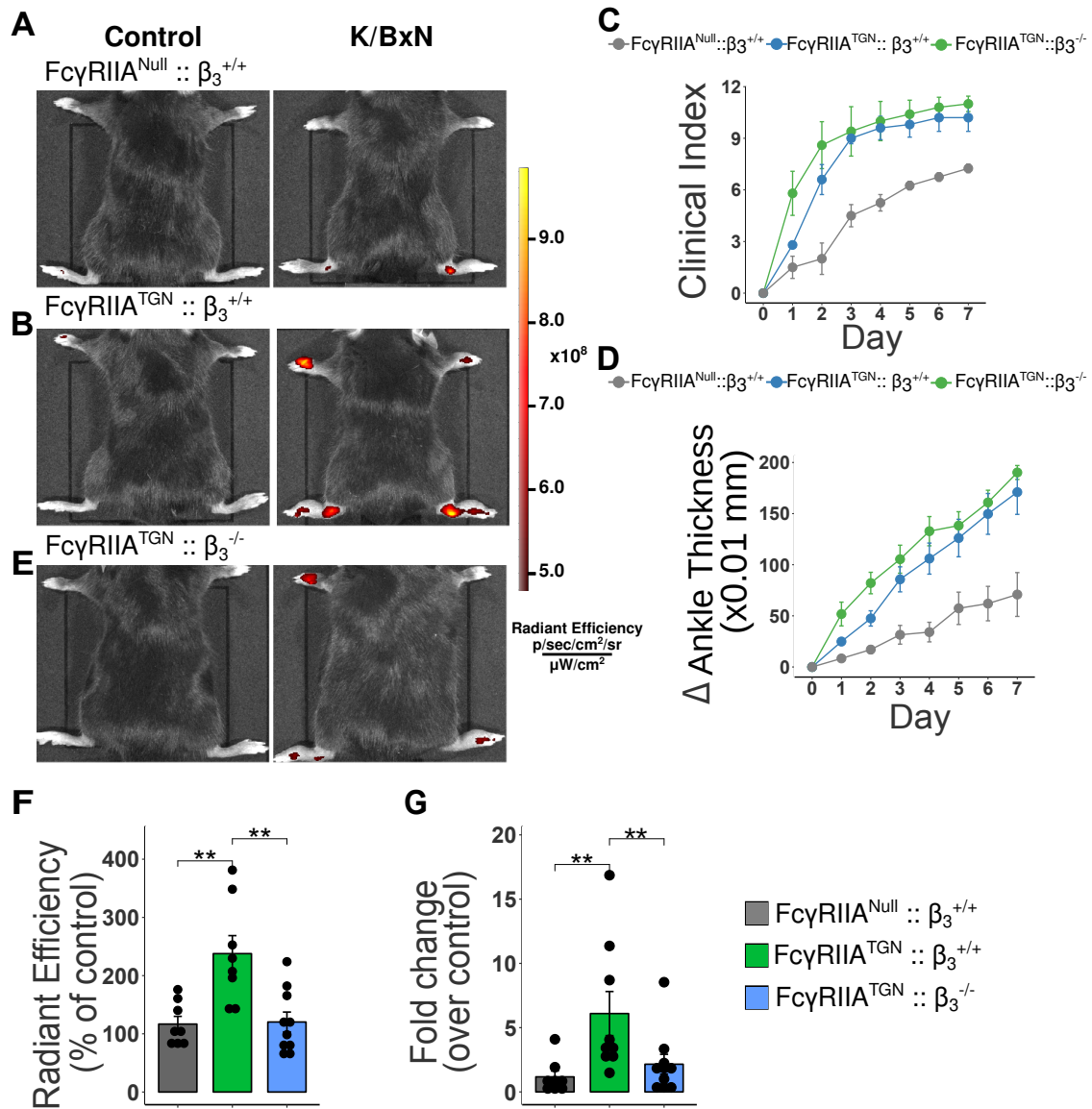


Figure 2.6 – Role of FcγRIIA and its signaling through β₃ in joint vasculature leakage

(A, B and E) Fc γ RIIA^{Null}:: $\beta_3^{+/+}$ (A), Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{+/+}$ (B) and Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{-/-}$ (E) K/BxN mice were injected intravenously with 0.51 μ m-diameter microspheres and visualized 2 minutes later using a Xenogen IVIS *in vivo* imaging system. All mice received the same concentration of fluorescent microspheres. **(C and D)** Clinical index (C) and delta ankle thickness measured at the malleoli with the ankle in a fully flexed position (D). Comparison of arthritis severity for Fc γ RIIA^{Null}:: $\beta_3^{+/+}$, Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{+/+}$ and Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{-/-}$. **(F)** Radiant efficiency quantification of 0.51 μ m-diameter sky-blue-conjugated microspheres accumulation in arthritic joints 2 minutes after intra-venous injection, in Fc γ RIIA^{Null}:: $\beta_3^{+/+}$, Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{+/+}$ and Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{-/-}$. Data are presented as a percentage of non-arthritic control mice injected with the same concentration of microspheres. **(G)** Fold change of sky-blue fluorescence detected in the inguinal lymph nodes, 45 minutes after microsphere injection in Fc γ RIIA^{Null}:: $\beta_3^{+/+}$, Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{+/+}$ vs Fc γ RIIA^{TGN}:: $\beta_3^{-/-}$ K/BxN mice relative to non-arthritic control mice injected with the same concentration of microspheres. ** : $p \leq 0.01$ using a one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey HSD for multiple comparisons.

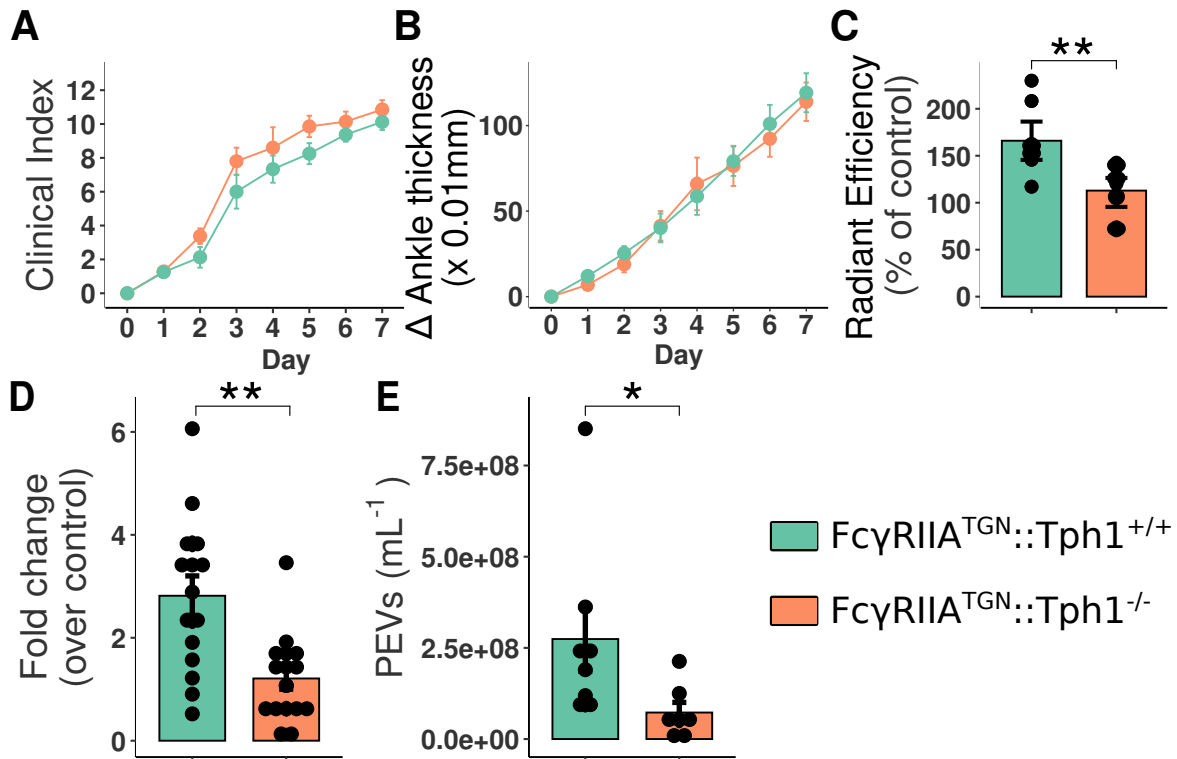
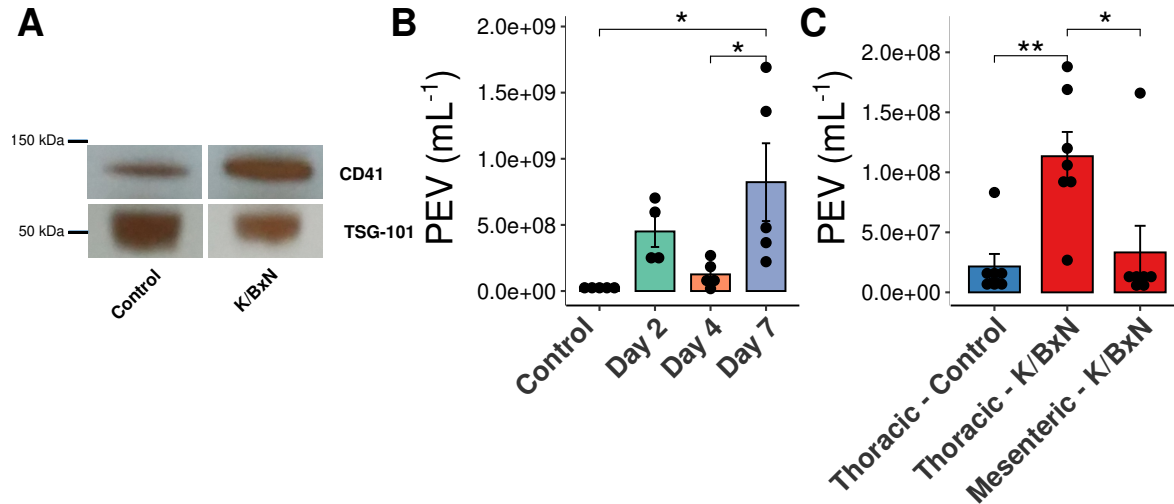


Figure 2.7 – Blood vascular permeability induced by platelet-derived serotonin increases PEV content in the lymphatic system

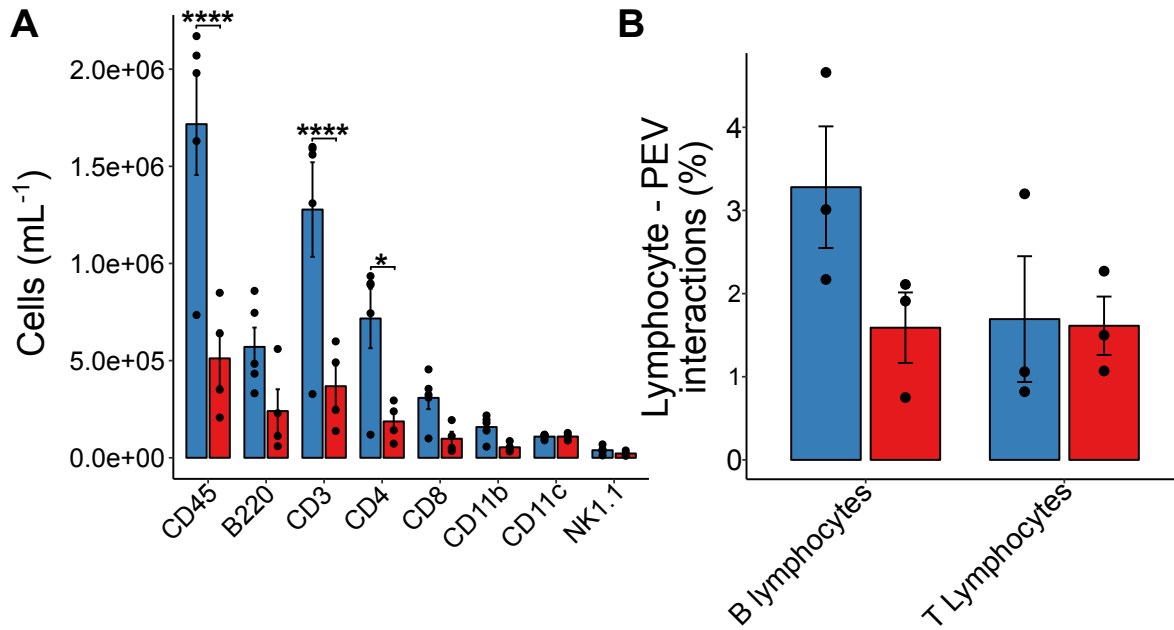
(**A and B**) Clinical index (A) and delta ankle thickness measured at the malleoli with the ankle in a fully flexed position (B). Comparison of arthritis severity for FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+} and FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} K/BxN mice. (**C**) Radiant efficiency quantifications of 0.51 μm-diameter sky-blue-conjugated microspheres accumulation in arthritic joints 2 minutes after intra-venous injection, in FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+} and FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} K/BxN mice. Data are presented as a percentage of non-arthritic control mice injected with the same concentration of microspheres. (**D**) Fold change of sky-blue fluorescence detected in the inguinal lymph nodes, 45 minutes after microsphere injection into FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+} and FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} K/BxN mice relative to non-arthritic control mice injected with the same concentration of microspheres. (**E**) PEV quantification in FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+} and FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} thoracic lymph, in arthritic mice.

2.11 Supplementary Figures



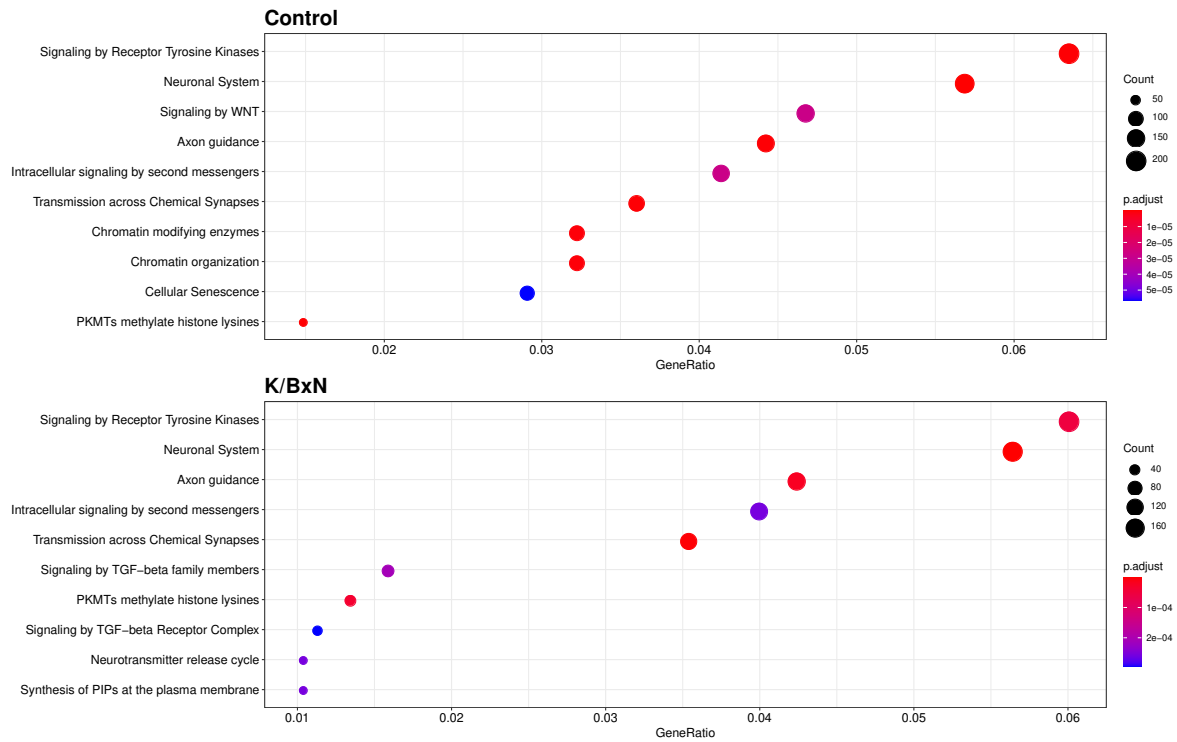
Supplementary Figure 2.1 – Characterization of PEV influx in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN lymph

(A) Platelet-free lymph (PFL) from $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ control and K/BxN mice were lysed in sample buffer and equivalent volumes were loaded in all lanes. Anti-CD41 antibody was diluted 1 : 1000 in TBS-T 1% milk and incubated for 2 h at RT. Anti-tumor susceptibility gene 101 (TSG-101) was diluted 1 : 100 in TBS-T 1% milk and incubated overnight at 4°C (n=3 (CD41) and n=2 (TSG-101), image representative of 3 experiments (CD41) and 2 experiments (TSG-101). (B) PEV quantification in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN thoracic lymph, throughout disease progression. Lymph was collected on day 2, day 4 and day 7 following K/BxN serum injection (n=4 (Day 2) or n=5). (C) PEV were quantified in thoracic lymph and mesenteric lymph on day 7 after K/BxN serum injection. (n=7). Blue denotes control mice, whereas red identifies K/BxN mice. * : $p \leq 0.05$ and ** : $p \leq 0.01$ using a one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey HSD for multiple comparisons (I and J).



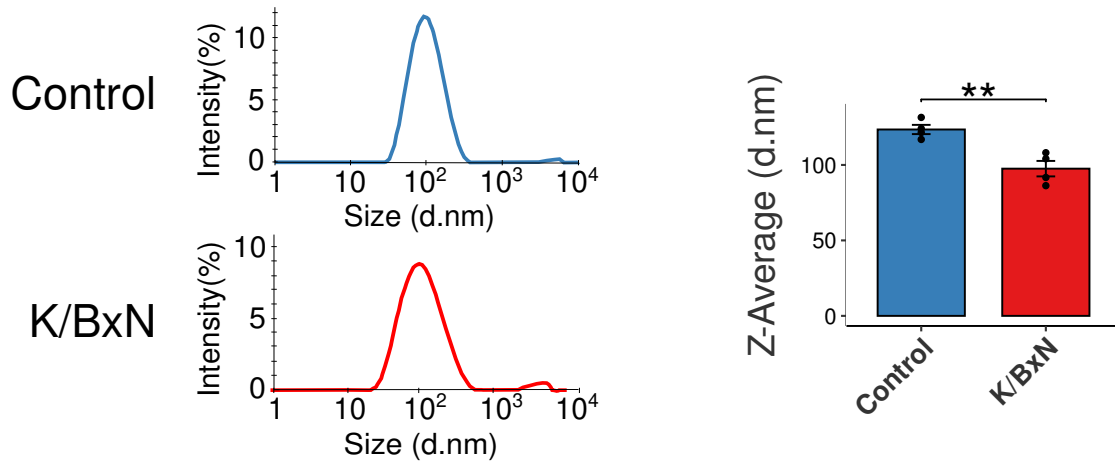
Supplementary Figure 2.2 – Cellular characterization of control and K/BxN lymph

(A) Cellular diversity was assessed by flow-cytometry to quantify several immune cell populations in lymph from control and K/BxN lymph at day 7 after K/BxN serum injection in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ mice (n=5 control and n=4 K/BxN). (B) Percentage of PEV associated with circulating B- and T-lymphocytes in lymph (n=3). Blue denotes control mice, whereas red identifies RA mice. * : $p \leq 0.05$ and **** : $p \leq 0.0001$ using a two-way ANOVA, followed by post hoc Holm-Šidák for multiple comparisons.



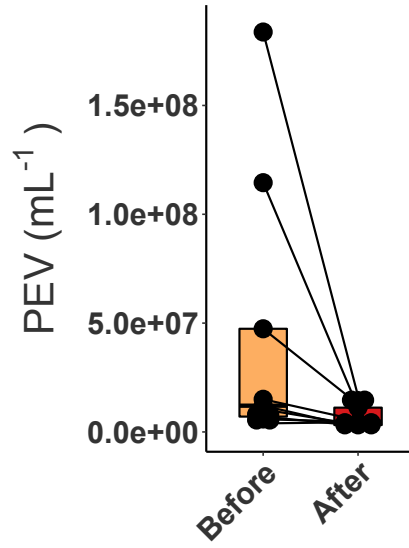
Supplementary Figure 2.3 – Pathways potentially impacted by the thirty most frequent micro-RNAs in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ control and K/BxN lymph

Illustration of the 10 pathways most probably impacted by the thirty most frequent micro-RNAs in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ control and K/BxN lymph. Micro-RNAs genes targets were predicted with DIANA-microT and pathways were identified by KEGG PATHWAY (n=3 mice, pooled together into one sample for miR sequencing). GeneRatio identifies the ratio of genes predicted to be targeted by the top 30 lymph micro-RNAs over all the genes forming the pathway.



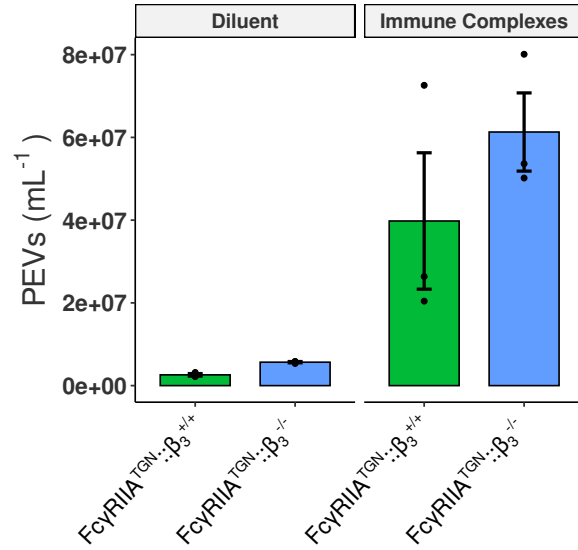
Supplementary Figure 2.4 – Lymph EV diameter analysis

Analysis of lymph EV population diameter was assessed by zetasizer. Representative distribution of EV population in control and K/BxN lymph identifies a major peak at 100 nm of diameter (left). Quantification of mean diameter of main EV population for control and K/BxN lymph (right) (n=4). ** : $p \leq 0.01$, using an unpaired t-test.



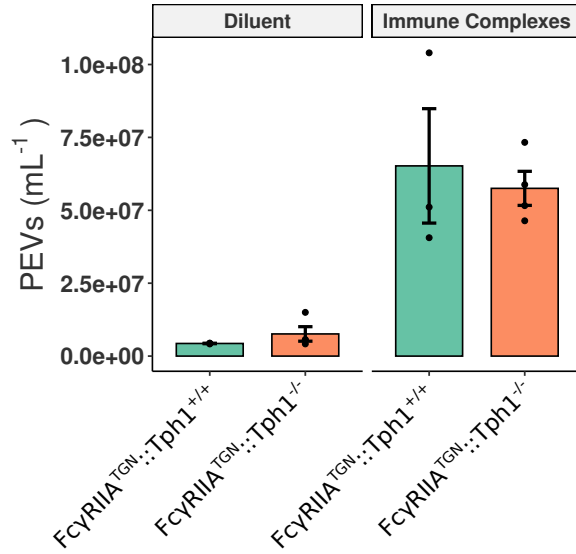
Supplementary Figure 2.5 – Assessment of PEV depletion in thrombin generation assay

Thoracic lymph from Fc γ RIIA^{TGN} control and K/BxN mice was collected. CD41⁺ PEV were depleted using magnetic beads coupled with anti-CD41 antibodies. PEV were quantified before (Before) and after (After) CD41⁺ depletion (n=8)



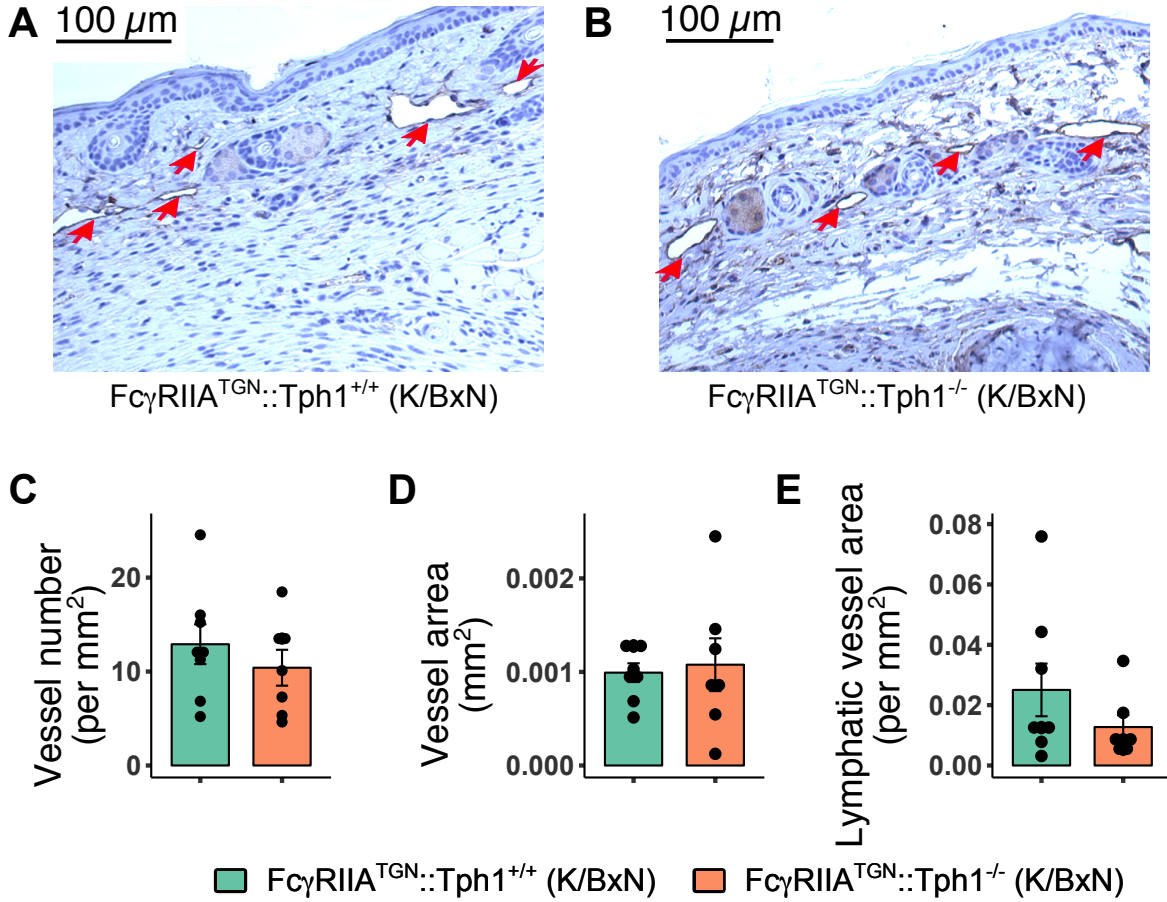
Supplementary Figure 2.6 – The potential of FcγRIIA^{TGN};;β₃^{-/-} platelets to generate PEV upon immune complex stimulation is not hindered

(A) Platelets from FcγRIIA^{TGN};;β₃^{+/+} and FcγRIIA^{TGN};;β₃^{-/-} mice were isolated and diluted to 200 x 10⁶ per mL before stimulation for 45 minutes with PBS (Diluent) or 500 μg/mL of heat-aggregated IgGs (Immune complexes). PEV were quantified by flow cytometry in the supernatant (n=3).



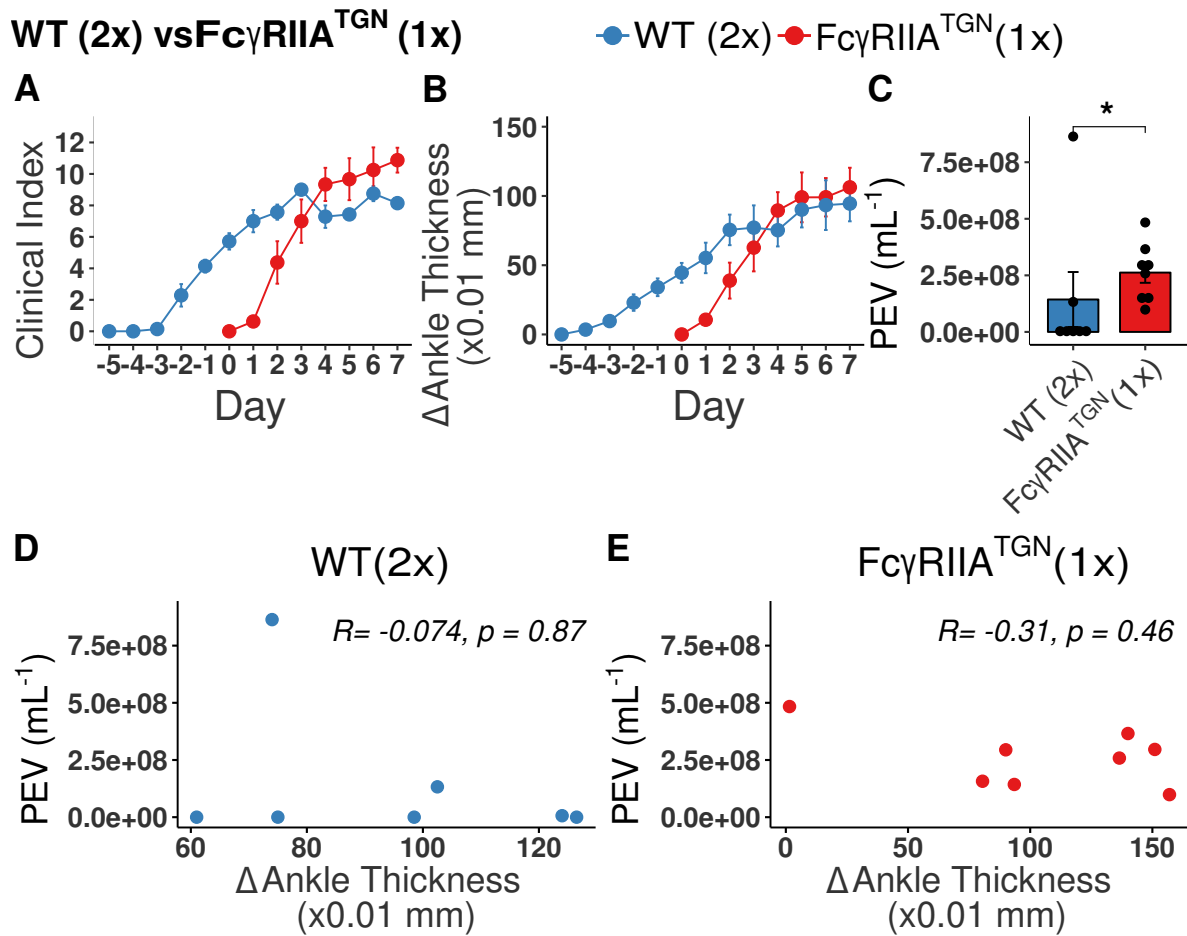
Supplementary Figure 2.7 – The potential of FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} platelets to generate PEV upon immune complex stimulation is not hindered

Platelets from FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+} and FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-} mice were isolated and diluted to 200 x 10⁶ per mL before stimulation for 45 minutes with PBS (Diluent) or 500 μg/mL of heat-aggregated IgGs (Immune complexes). PEV were quantified by flow cytometry in the supernatant (n=4 (FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{+/+}) and n=3 (FcγRIIA^{TGN::Tph1}^{-/-})).



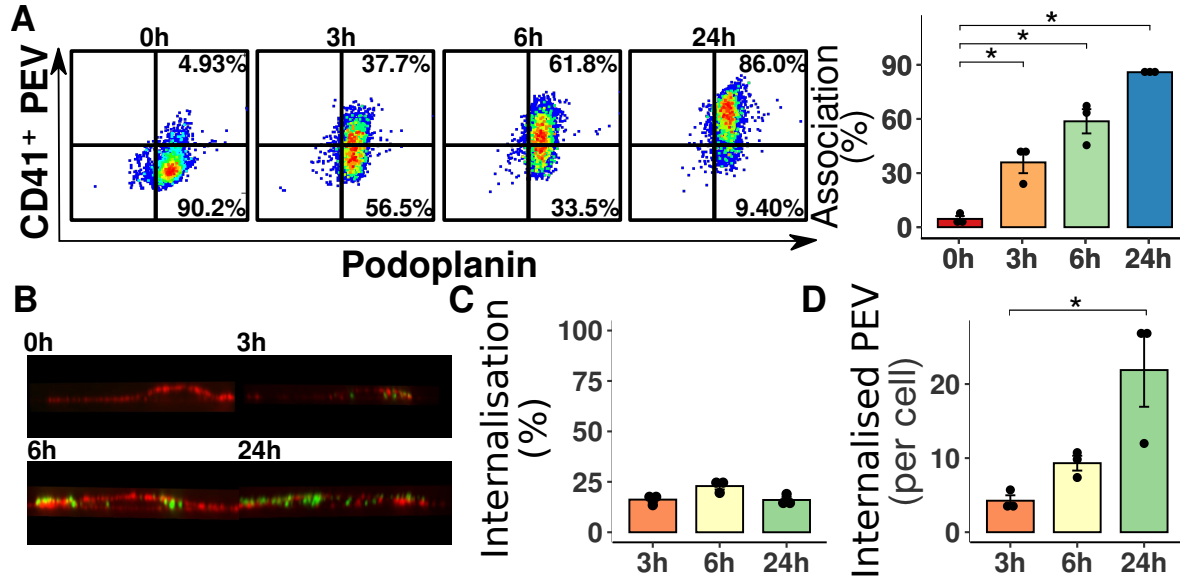
Supplementary Figure 2.8 – Fc γ RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-} mice do not display defective lymphangiogenesis

(**A and B**) Representative micrographs illustrating lymphatic vessels in the hind paw of Fc γ RIIA^{TGN}::Tph1^{+/+} (**A**) and Fc γ RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-} (**B**) arthritic mice. Lymphatic vessels were detected with an anti-LYVE-1 antibody. (**C, D and E**) Quantification of the mean lymphatic vessel number per square millimeter of tissue (**C**), mean lymphatic vessel area (**D**), and total lymphatic area per square millimeter of tissue in Fc γ RIIA^{TGN}::Tph1^{+/+} and Fc γ RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-} arthritic mice (**E**).



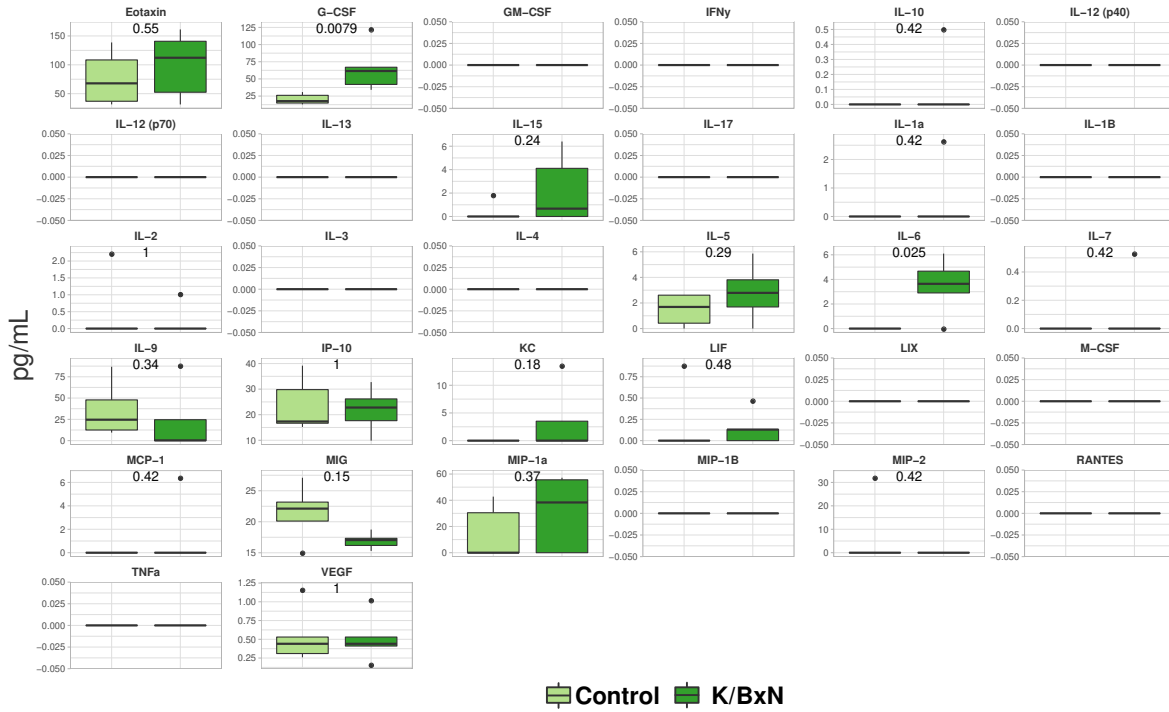
Supplementary Figure 2.9 – Lymph PEV influx in arthritic mice may implicate FcγRIIA expression

(A and B) Clinical index (A) and delta ankle thickness (B) in WT mice injected with 300 μ L K/BxN serum (2x) (blue) on day -5 and day -3 and FcγRIIA^{TGN} mice injected with 150 μ L K/BxN serum (1x) (red) on day 0 and day 2. (n=7) **(C)** Quantification of lymph PEV in WT 2x and FcγRIIA^{TGN} 1x mice at the peak of arthritis severity, day 7. **(D and E)** Spearman correlations of lymph PEV concentration and delta ankle thickness in WT 2x mice **(D)** and FcγRIIA^{TGN} 1x mice **(E)** (n=7 and n=8). * : $p \leq 0.05$, using a Wilcoxon rank-sum test.



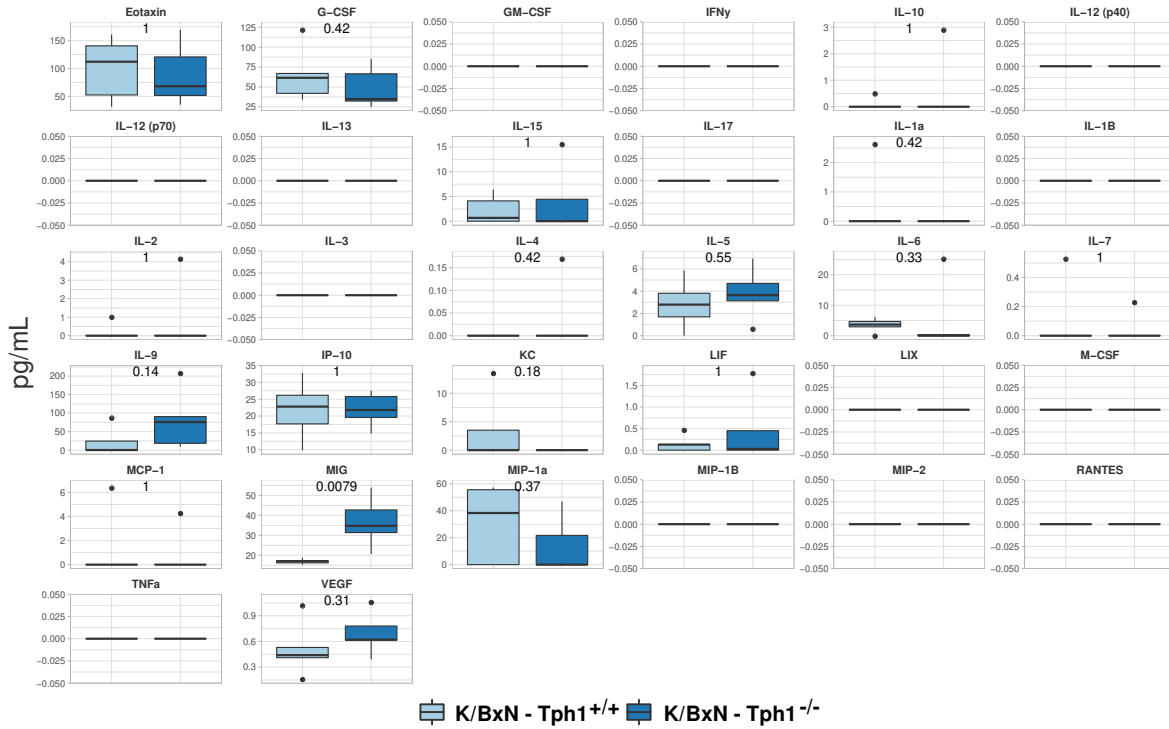
Supplementary Figure 2.10 – PEV can be internalised by lymphatic endothelial cells

(A) Representative flow cytometry illustrations of 5-chloromethylfluorescein diacetate-(CMFDA) labeled PEV associating over time with Human Lymphatic Endothelial Cells (hLEC) after co-incubation. Human LEC were washed and labeled with an anti-phycoerythrin-podoplanin antibody. (n=3) (left). Quantification of PEV association with hLEC at 0h, 3h, 6h and 24h post co-incubation (n=3) (right). (B) Representative image illustrating PEV internalized by hLECs at 0h, 3h, 6h and 24h post co-incubation. hLECs were 3D-reconstructed with FIJI and visualized as orthoslices with 3D-Viewer plugin. Only yz planes are shown. Red labelling corresponds to wheat germ agglutinin-594, green labeling corresponds to CMFDA⁺ PEV. (C and D) Quantification of PEV internalized by LEC over time for three different PEV donors (n=3, 50 cells per PEV donor). Data are expressed as a percentage of PEV detected in the cytoplasm over PEV bound on the outer leaflet of the membrane (C) or mean PEV number quantified in the cytoplasm of a LEC (D). * : p ≤ 0.05 using a one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey HSD for multiple comparisons (A and D).



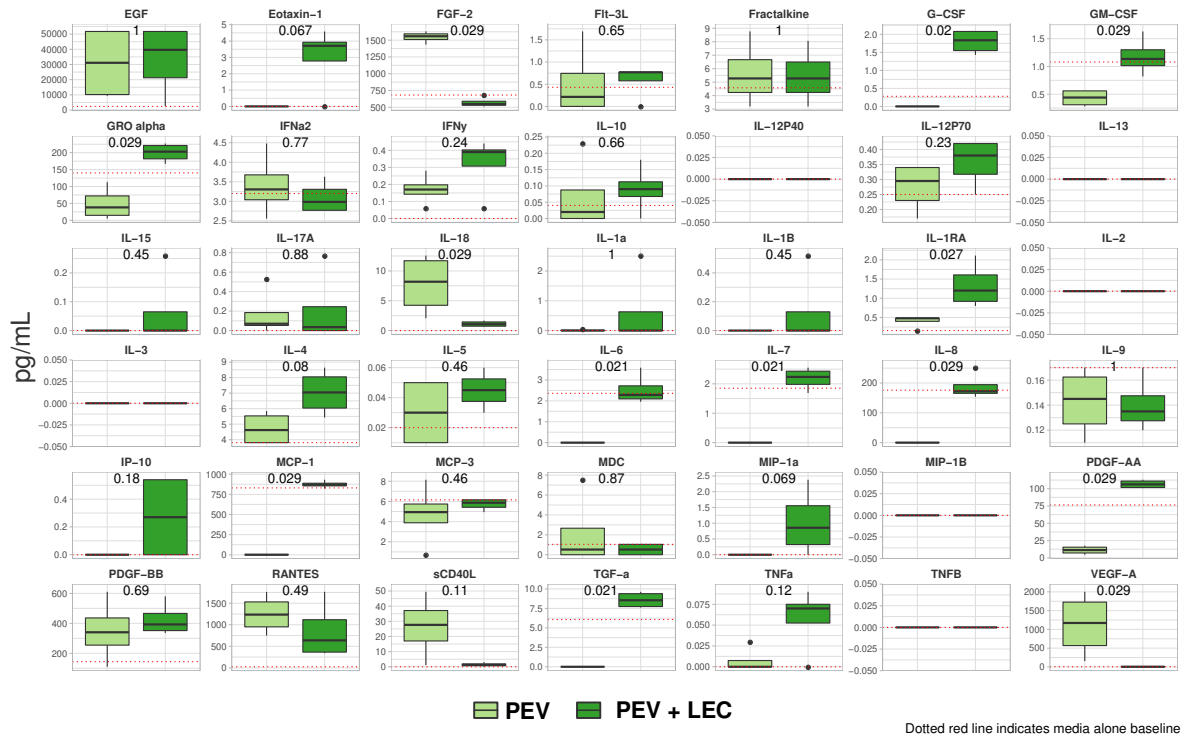
Supplementary Figure 2.11 – Cytokines and chemokines detected in $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ control and K/BxN lymph

Quantification of 32 cytokines and chemokines contained in $Fc\gamma RIIA^{Null}$ control and $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN lymph (n=5). P-value for Wilcoxon rank-sum test is reported on each individual graph.



Supplementary Figure 2.12 – Cytokines and chemokines detected in $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{+/+}$ and $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ K/BxN lymph

Quantification of 31 cytokines and chemokines contained in $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{+/+}$ K/BxN and $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ K/BxN lymph (n=5). The same $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ K/BxN mice (n=5) were reported for Supp. fig. 2.11 and Supp. fig. 2.12. P-value for Wilcoxon rank-sum test is reported on each individual graph.



Supplementary Figure 2.13 – Cytokines and chemokines induced upon PEV co-incubation with lymphatic endothelial cells

Quantification of 42 cytokines and chemokines produced upon PEV co-incubation with LEC for 24h. Cytokines and chemokines were quantified by multiplex assay. Dotted red line indicates the media alone baseline production of each analyte (n=4). P-value for Wilcoxon rank-sum test is reported on each individual graph.

2.12 Supplementary methods

2.12.1 Inflammatory arthritis induction in mice

Inflammatory arthritis was induced using arthritogenic K/BxN serum (150 μ L for all experiments, except when specified otherwise), transferred by intra-peritoneal injection to age- and sex-matched $Fc\gamma RIIA^{Null}$, $Fc\gamma RIIA^{TGN}$, $Fc\gamma RIIA^{TGN}:\beta_3^{-/-}$, $Fc\gamma RIIA^{TGN}::Tph1^{-/-}$ or $Fc\gamma RIIA^{TGN}::DsRed$ mice, on experimental day 0 and 2. The development of arthritis was monitored daily by assessing the clinical index of arthritis, graded on a scale from 0 to 12, as previously described[162, 486]. Delta ankle thickness was measured at the malleoli, with the ankle in a fully-flexed position, using a spring-loaded precision caliper (Käfer dial thickness gauge J15, Germany).

2.12.2 Lymph collection

Mice were fasted for 12h before lymph collection. Mice were anesthetized with isoflurane (2.5% for induction, 2% for maintenance) and placed on their right side, and a cannula was inserted into the thoracic duct, above the cisterna chyli, between the transverse lumbar artery and the diaphragm (Fig. 1a), as previously described[263]. Thoracic lymph was collected continuously for 45 min, with a syringe coated with EDTA 0.1 M, except for coagulation assays where lymph was collected on 9 :1 volume of 3.2% sodium citrate. Thoracic lymph collection yielded a mean of 30-100 μ L of clear, translucent lymph (Fig. 1b). For some experiments, where mentioned, mesenteric lymph was collected at the mesenteric lymph duct level, close to the superior mesenteric artery. Extreme care was taken throughout the collection procedures to ensure minimal blood contamination. Potential blood contamination in unprocessed fresh lymph was verified by quantifying red blood cells (RBC) and platelets, in comparison to unprocessed anticoagulated blood, or centrifuged plasma (twice at 2,500 g for 15 min, to remove all cells). Unprocessed lymph presented a level of RBC equivalent to 0.03% of blood, and a platelet count equivalent to 0.04% of blood, which were both similar to platelet-free centrifuged plasma (Fig. 1c,d). For all experiments involving EVs, lymph was centrifuged twice at 2,500 g for 15 min, to remove all residual cells, before being frozen at $-80^{\circ}C$.

2.12.3 Western blot

Lymph was centrifuged twice at 2,500 g for 15 min, to remove all residual cells. Platelet-free lymph (PFL) from $Fc\gamma RIIA^{TGN}$ control and K/BxN mice were lysed in sample buffer and equivalent volumes were loaded in all lanes. Anti-CD41 antibody was diluted

1 : 1000 in TBS-T 1% milk and incubated for 2 h at RT. Anti-tumor susceptibility gene 101 (TSG-101) was diluted 1 : 666 in TBS-T 1% milk and incubated overnight at 4°C. Anti-CD41 and anti-TSG-101 antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, United Kingdom).

2.12.4 MicroRNA analysis

Fc γ R1IA^{TGN} control and K/BxN lymph were centrifuged twice at 2,500 g for 15 min, to remove all residual cells, before being frozen. RNA was extracted using TRIzol LS Reagent, according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Equal amounts of lymph total RNA, extracted from 3 control and 3 K/BxN mice were respectively pooled together. MicroRNA sequencing library preparation and sequencing were conducted by Arraystar, Inc (Rockville, MA, USA). The libraries were denatured as single-stranded DNA molecules, captured on Illumina flow cells, amplified in situ as clusters and finally sequenced for 51 cycles on Illumina HiSeq per the manufacturer's instructions. The clean reads that passed the quality filter were processed to remove the adaptor sequence as the trimmed reads. Trimmed reads were aligned to pre-microRNA in miRBase. MicroRNA read counts were normalized as tag counts per million microRNA alignments (TPM). MicroRNA were ranked by highest TPM, and expressed as a percentage over total read counts per sample. For analysis of PEV microRNA content, CD41⁺ PEV were immunoprecipitated using anti-CD41 coupled magnetic beads (Dynabeads Magnetic Separation Technology, ThermoFisher Scientific, MA, USA). RNA was extracted using TRIzol LS Reagent. For each RNA extractions, an exogenous synthetic control microRNA (Caenorhabditis elegans let-7-as mutated) was spiked-in at the TRIzol-LS homogenization step, as described previously[487]. Total RNA was reverse transcribed using the HiFlex miScript RTII kit (Qiagen), and mature mmu-miR-223 and mature mmu-miR-451 were detected by SYBR Green (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, BioRad, CA, USA) qPCR, using the miScript Primer Assay kit (Qiagen) and oligonucleotides specific to mmu-miR-223 (5'UGUCAGUUU-GUCAAUACCCCA; Qiagen) and mmu-miR-451 (5'AAACCGUUACCAUACUGA-GUU; Qiagen). The synthetic let-7-as mutated microRNA was used as a qPCR internal control to calculate the efficiency of microRNA extraction. For pathway analysis, the thirty most frequent microRNAs in control or K/BxN lymph were selected, and their targets were predicted using the multiMiR R package[488], with the DIANA-microT database[489]. Top 10 pathways potentially affected by the identified target genes were obtained using the clusterProfiler[490] R package and the KEGG Pathway[491] enrichment tool.

2.12.5 Cell screening

Samples (10 μ L total lymph) were incubated with 2 μ g/mL of the following antibodies : anti-mouse-CD8a-V500, anti-mouse-CD11b-BUV661, anti-mouse-CD11c-AF700, anti-mouse-CD45-PerCP, anti-mouse-B220-PE, anti-mouse-Ly6G-PE-CF594, anti-mouse-NK1.1-BV605 and anti-mouse-CD3e-PECy7, 2.5 μ g/mL of anti-mouse-CD4-FITC and 1 μ L of anti-mouse-Ter119-APC in 100 μ L PBS for 30 min. All antibodies were purchased from BD Biosciences, CA, USA. Samples were diluted to 500 μ L in PBS and analyzed using a BD LSRII cytometer.

2.12.6 Coagulation assay

Lymph was collected and centrifuged twice at 2,500 g for 15 min. Mouse blood was obtained by cardiac puncture in syringe containing 20% acid citrate dextrose (ACD), and blood was diluted by the addition of 35% of Tyrode's buffer, pH 6.5. Platelet-free plasma was prepared by centrifuging twice at 2,500 g for 15 min. CD41 vesicles were immunoprecipitated using anti-CD41 coupled magnetic beads (Dynabeads Magnetic Separation Technology, ThermoFisher scientific, MA, USA) and lymph and plasma were stored at -80°C. Thrombin-generating potential was measured by fluorescence in a 96-well plate by incubating 10 μ L of tissue factor (TF)/phospholipids (1 pM and 4 μ M, final, respectively) with 40 μ L of 1 :3 diluted samples for 10 minutes at 37°C. Ten μ L of CaCl₂ mixed with thrombin cleavable fluorogenic substrate (ZGGR-AMC, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) (16.6 mM and 0.416 mM, final, respectively) was automatically dispensed in each well and plates were mixed by shaking for 10 seconds. Fluorescence was detected by a Fluoroskan Ascent[®] fluorometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) at 390/460 nm (excitation/emission). The increase in fluorescence, signifying thrombin generation, was recorded every 20 seconds.

2.12.7 Blood vessel permeability

One microgram of Sky Blue fluorescent microspheres (510 nm) (Spherotech Inc, IL, USA) were injected intravenously into Fc γ RII^{Null}: $\beta_3^{+/+}$, Fc γ RII^{TGN}: $\beta_3^{+/+}$, Fc γ RII^{TGN}: $\beta_3^{-/-}$, Fc γ RII^{TGN}:Tph1^{+/+} and Fc γ RII^{TGN}:Tph1^{-/-} K/BxN mice, on the seventh day of arthritis (peak of disease). Mice were anesthetized with 3 % isoflurane in O₂ during the procedure. Imaging was performed using a fluorescence imaging system, Xenogen IVIS Lumina III LT (PerkinElmer, MA, USA) and images were captured 2 min after the injection. Images were analyzed using Living Image software. Mice were euthanized

45 min after the microsphere injection and inguinal lymph nodes (ILN) were harvested. Sky-Blue fluorescence was quantified in the ILN using an Infinite M1000 fluorescence plate reader (Tecan, Switzerland).

2.12.8 Ankle lymphatic vessel quantification

Hind paws were collected and fixed for 24 h in 4 % paraformaldehyde prior to paraffin embedding. Sections were stained with 0.5 μg anti-Lyve1 per slide (Abcam, Cambridge, England) and mean vessel area, vessel number and total lymphatic vessel area per square millimeter were quantified with Image J.

2.12.9 PEV generation

Human platelets from were obtained from citrated blood of healthy male and female donors, following an Institutional Review Board-approved protocol (Centre de Recherche Hospitalier Universitaire de Québec et de l'Université Laval, B14-08-2108). Blood was centrifuged at 282 g for 10 min at room temperature (RT) and the supernatant was collected and supplemented with 1/5 volume ACD and 10 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), before centrifugation at 600 g for 5 min at RT. The supernatant was then centrifuged at 1300 g for 5 min at RT, and the pellet was resuspended in 2 mL Tyrode's buffer pH 6.5, before transfer into 13 mL Tyrode's buffer pH 7.4. Platelets were counted with a Cellometer Auto M10 (Nexcelom Bioscience, MA, USA) and diluted to 100×10^6 or 600×10^6 platelets / mL in Tyrode's buffer pH 7.4. Optionally, for association and confocal experiments, platelets were labeled with 1 μM 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA, green fluorescent, Life Technologies, CA, USA) for 10 min at RT. 5 mM CaCl_2 was added to platelets before their stimulation with collagen (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chrono-Par, PA, ISA) for 18 or 5 h at RT. Platelet activation was stopped by the addition of 20 mM EDTA. Remnant platelets were removed by centrifugation at 2000 g for 10 min, at RT. Platelet EV were obtained by centrifugation in swinging buckets at 18,000 g for 90 min at 18°C. Pellets containing PEV were resuspended in Tyrode's buffer pH 7.4 with 5 mM calcium. Platelet EV were quantified by flow cytometry, and frozen at -80°C.

2.12.10 PEV and lymphatic endothelial cell co-incubation

Human microvascular endothelial cells from female dermal tissue (HMVEC-dLyAd, Lonza, NJ, USA) were cultured in EGM-2 MV Microvascular Endothelial BulletKit

(Lonza, NJ, USA). At confluence, cells were incubated with 2000 PEV per cell. The supernatants were collected after 3 h, 6 h and 24 h co-incubation. Cells were washed then analyzed by flow cytometry. For immunofluorescence staining, cells were cultured on poly-L-lysine- (0.01%) coated micro-slides before co-incubation with PEV. Cells were washed and fixed with 2 % paraformaldehyde for 20 min then stained with Hoechst, dilution 1/10000 (Millipore-sigma, Darmstadt, Germany).

2.12.11 Data sharing statement

MicroRNA sequencing data are available at ArrayExpress under accession number E-MTAB-8171. Data, analytic methods and study materials are available upon reasonable request, please contact : Eric.Boilard@crchudequebec.ulaval.ca

2.13 Supplementary material

Animals (in vivo studies)

Species	Vendor or Source	Background Strain	Sex
C57BL/6J	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	M and F
Fc γ RIIATGN	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	M and F
Fc γ RIIATGN: : β 3 ^{-/-}	Dr Peter Newman's laboratory	C57BL/6J	M and F
Fc γ RIIATGN: :Tph1 ^{-/-}	Dr Francine Côté's laboratory	C57BL/6J	M and F
Fc γ RIIATGN: : Mitochondria-DsRed	Dr. Masaru Okabe's laboratory	C57BL/6J	M and F

Table 2.1 – Animals (in vivo studies)

Animal breeding

	Species	Vendor or Source	Background Strain
Parent - Male	β 3 ^{-/-}	Dr Peter Newman's laboratory	C57BL/6J
Parent - Female	Fc γ RIIATGN	The Jackson Laboratory	C57BL/6J
Parent - Male	Tph1 ^{-/-}	Dr Francine Côté's laboratory	C57BL/6J
Parent - Female	Fc γ RIIATGN	The Jackson Laboratory	C57BL/6J
Parent - Male	B6D2F1-Tg(CAG/su9-DsRed2, Acr3-EGFP)RBGS002Osb	Dr. Masaru Okabe's laboratory	C57BL/6J
Parent - Female	Fc γ RIIATGN	The Jackson Laboratory	C57BL/6J

Table 2.2 – Animal breeding

Antibodies

Target antigen	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration
CD41-BV421	BD Biosciences	747729	2 µg/mL
CellTracker Deep Red	Thermofisher Scientific	C34565	1 µM
CLEC-2-PE	Biologend	146104	2 µg/mL
CD8-APC	BD Biosciences	553035	2 µg/mL
CD45-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	550994	2 µg/mL
podoplanin-PE-Cy7	Biologend	127412	2 µg/mL
CD4-FITC	BD Biosciences	561835	5 µg/mL
Gr1-FITC	BD Biosciences	553127	5 µg/mL
Annexin-V450	BD Biosciences	560506	1/50
Ter119-APC	BD Biosciences	557909	1/50
CD8a-V500,	BD Biosciences	560776	2 µg/mL
CD11b-BUV661	BD Biosciences	565080	2 µg/mL
CD11c-AF700	BD Biosciences	560583	2 µg/mL
B220-PE	BD Biosciences	553089	2 µg/mL
Ly6G-PE-CF594	BD Biosciences	562700	2 µg/mL
NK1.1-BV605	BD Biosciences	563220	2 µg/mL
CD3e-PECy7	BD Biosciences	552774	2 µg/mL
CD4-FITC	BD Biosciences	561835	2.5 µg/mL
CD41	Biologend	133910	25 µg/mL
Lyve1	Angiobio	11-034	0.5 µg / slide
CD41	Abcam	ab134131	1 :1000
TSG-101	Abcam	ab83	1 :666

Table 2.3 – Antibodies

Cultured Cells

Name	Vendor or Source	Sex (F, M, or unknown)
HMVEC-dLyAd	Lonza CC-2810	F

Table 2.4 – Cultured Cells

Discussion et perspectives

Discussion

La circulation lymphatique draine le liquide interstitiel, lui permettant de regagner la circulation sanguine. En contexte inflammatoire, la circulation lymphatique permet la résorption de l'œdème et draine son contenu. Nos travaux décrivent une augmentation des concentrations de vésicules de plaquettes et d'érythrocytes dans la lymphe lors de l'athérosclérose. Nos résultats suggèrent également que dans la polyarthrite rhumatoïde, la lymphe s'enrichit en vésicules dérivées de plaquettes, suite au drainage de l'articulation enflammée. Dans ce contexte, notre étude identifie les plaquettes comme participant au contrôle du transit de ces vésicules vers la lymphe.

Quantification des vésicules dans la lymphe

La première publication de cette étude a établi, pour la première fois, la présence de vésicules extra-cellulaires en circulation lymphatique. Ces travaux nous ont permis de poser les bases des éléments techniques permettant la quantification des vésicules dans la lymphe. Notamment, un changement majeur entre notre première publication et le second article concerne le jeûne des souris avant la collection de lymphe. En effet, la lymphe est connue comme étant particulièrement riche en lipoprotéines issues de la digestion, comme les chylomicrons, suite au drainage de l'intestin grêle, via de petits vaisseaux lymphatiques spécialisés, appelés chylifères[492]. Son analyse par cytométrie en flux nécessite une dilution de la lymphe, afin de faciliter son acquisition par le cytomètre en flux. Le fait de contraindre les souris à jeûner avant la collection de lymphe, nous a permis d'éliminer une grande partie de ces particules lipidiques et de nous affranchir de ces dilutions. Toutefois, il est important de garder en mémoire que le jeûne est connu pour influencer le métabolisme et la réponse immunitaire[493]. Cette approche constitue donc un compromis, qu'il serait intéressant de pouvoir dépasser dans le futur, par exemple en utilisant des seuils de fluorescence pour caractériser certaines populations de vésicules par cytométrie en flux. Nous n'avons pas utilisé cette astuce dans le

cadre de nos études, car nous souhaitions pouvoir décrire le plus fidèlement possible la diversité des vésicules présente dans la lymphe.

Toutefois, il est important de rappeler que, bien que la cytométrie de flux soit une technique particulièrement intéressante pour caractériser et quantifier les vésicules, il serait pertinent de confirmer nos résultats à l'aide d'autres techniques permettant l'étude des vésicules. On pourrait par exemple penser à l'analyse des trajectoires des nanoparticules (fluorescent nanoparticle tracking analysis), technique permettant également la quantification de vésicules, ciblant un marqueur membranaire spécifique[494]

Impact de l'inflammation articulaire sur la composition de la lymphe thoracique

Les vésicules sont présentes dans la circulation lymphatique, et ce même en contexte physiologique. Bien que cette étude se soit centralisée sur les vésicules plaquettaires, la circulation lymphatique véhicule également d'autres populations de vésicules, certaines d'entre elles ayant été identifiées à la figure 2.3. Nos résultats n'ont pas rapporté de différence significative entre les conditions saine et arthritique pour les populations de vésicules autres que plaquettaires. Il est cependant possible qu'avec un plus grand nombre d'échantillons, certaines d'entre elles pourraient être détectées comme modulées significativement à la hausse. Toutefois, ces résultats indiquent clairement que les VEP sont les vésicules majoritaires en circulation lymphatique, tout du moins en contexte arthritique.

Au delà des vésicules, notre étude s'est intéressée à d'autres composants de la circulation lymphatique. Les concentrations de lymphocytes T et B circulants sont réduites durant la condition inflammatoire arthritique suggérant que, dans ce contexte, les lymphocytes sont séquestrés dans les ganglions, possiblement sous le contrôle de la sphingosine-1-phosphate[495] ou en réponse à la modulation de chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes aux ganglions, comme CCL19 et CCL21[496]. De même, la composition en micro-ARNs est fortement perturbée durant l'arthrite inflammatoire. Il est possible que ce changement puisse avoir un impact sur le système lymphatique, par exemple sur les cellules endothéliales lymphatiques, mais répondre à ces questions nécessiterait des études complémentaires.

Fonctions des VEP lymphatiques

Nos résultats (Figure 2.5) suggèrent que les VEP lymphatiques ne participent que peu voire pas du tout à la coagulation. Toutefois, notre déplétion des VEP se base sur une

déplétion des vésicules CD41⁺. Or, il est connu qu'*in vitro* tout du moins, seules 40% des VEP expriment CD41[465]. Ainsi, il est possible que les VEP CD41⁻ restantes aient été suffisamment nombreuses pour assurer la coagulation lymphatique. En effet, la capacité de génération de thrombine, indicatrice de la capacité de coagulation, est inférieure dans la lymphe que dans le sang (Figure 2.5). De plus, la concentration de vésicules CD41⁺ est supérieure dans la lymphe, ce qui laisse à penser que la concentration de VEP CD41⁻ serait elle aussi accrue.

L'ensemble de ces éléments va dans le sens que possiblement, la quantité restante de vésicules CD41⁻ dans nos expériences de coagulation lymphatique pourrait être suffisante pour assurer la coagulation lymphatique, moins élevée que la coagulation sanguine. Toutefois, la concentration de vésicules dans la lymphe arthritique est plus élevée que dans la lymphe contrôle, et la figure 2.5 indique que la coagulation lymphatique est similaire dans la lymphe arthritique et contrôle, suggérant un manque d'association entre concentration de vésicules plaquettaires et coagulation lymphatique.

Un autre aspect des potentielles fonctions des VEP en circulation lymphatique concerne leurs interactions avec les cellules endothéliales lymphatiques. Nos résultats *in vitro* illustrent une association entre les cellules endothéliales lymphatiques et les VEP. Cependant, nos expériences d'internalisation ne rapportent qu'une quantité relativement faible de VEP internalisées. Il est à noter que ces expériences ont été réalisées en absence de flux lymphatique, ce qui pourrait influencer ce processus. Toutefois, nous pouvons poser l'hypothèse, que les cellules endothéliales lymphatiques, exposées à un flux basal constant, et accru en condition inflammatoire de VEP, pourraient présenter des mécanismes de protection, leur permettant de ne pas subir négativement la présence de VEP dans la lymphe.

Passage des vésicules vers la circulation sanguine

Plusieurs indices de cette étude nous suggèrent que l'influx de vésicules, détecté en condition arthritique au niveau du canal thoracique, proviendrait du drainage de l'articulation enflammée. L'utilisation de particules fluorescentes injectées en intraveineux nous a permis de les détecter accumulées dans les pattes enflammées, donc probablement exfiltrées de la circulation sanguine, par les interstices décrits à la section 0.1.9, vers l'espace interstitiel.¹ Quelques minutes après leur détection dans les articulations enflammées, les particules ont pu être repérées au niveau des ganglions drainants, suggérant qu'elles aient pu être drainées par la circulation lymphatique.

1. En effet, les particules fluorescentes ne peuvent être détectées par l'appareil que nous avons utilisé lorsqu'en circulation rapide. La fluorescence n'est captée que lorsque les particules sont immobiles pendant plusieurs secondes.

Il est possible que les VEP puissent emprunter un chemin similaire. En effet, les vésicules sont détectées jusque dans les liquides synoviaux de patients arthritiques. Pour procéder à de telles descriptions, il pourrait être intéressant d'imager par microscopie deux photons, cette zone interstitielle en condition arthritique. Cette technique a déjà été appliquée dans l'article de 2010 par N. Cloutier et collaborateurs, afin de visualiser la sortie de particules synthétiques de la circulation sanguine, et leur accumulation en tissu interstitiel[244]. Une stratégie similaire pourrait permettre de visualiser leur éventuelle entrée dans les capillaires lymphatiques.

Toutefois, l'influx de vésicules de plaquettes, rapporté dans cette étude a été identifié au niveau du canal thoracique, et plusieurs ganglions sont présents sur la remontée de la lymphe jusqu'à ce canal. Pour atteindre le canal thoracique, il est probable que les vésicules provenant de l'articulation doivent traverser chacun de ces ganglions. Au passage, elles pourraient interagir avec les lymphocytes qui y sont présents. Notamment, il a été rapporté que les vésicules plaquettaires peuvent transmettre du CD40L aux lymphocytes B CD40⁺, et ainsi permettre leur maturation, commutation isotypique, et production d'anticorps[223]. Étant donné l'expansion des ganglions au cours de la polyarthrite rhumatoïde[497], il est possible d'imaginer que les vésicules pourraient participer à leur prolifération et maturation.

L'influx de vésicules dérivées de plaquettes a été détecté au niveau du canal thoracique. Ainsi, si ces vésicules proviennent effectivement du produit de drainage de l'articulation enflammée, et qu'elles ont traversé plusieurs ganglions sur leur chemin, il est possible que les concentrations de vésicules quantifiées dans la lymphe collectée au niveau du canal thoracique sous-estiment la concentration présente juste en aval de l'articulation. De plus, nos résultats *in vitro* suggèrent que les vésicules peuvent s'associer avec les cellules endothéliales lymphatiques, ce qui pourrait d'autant plus réduire la quantité de vésicules détectées dans la lymphe collectée.

Mécanisme de propagation des vésicules vers la lymphe, sous le contrôle des plaquettes ?

Notre étude s'est focalisée sur les plaquettes et leur contribution à la perméabilité vasculaire. Nous identifions la signalisation Fc γ RIIA, α IIB β ₃ comme contribuant à la libération de sérotonine et à l'augmentation de perméabilité vasculaire permettant aux vésicules de plaquettes de quitter la circulation sanguine pour rejoindre la circulation sanguine.

Le modèle potentiel en résultant est illustré la figure 2.8.

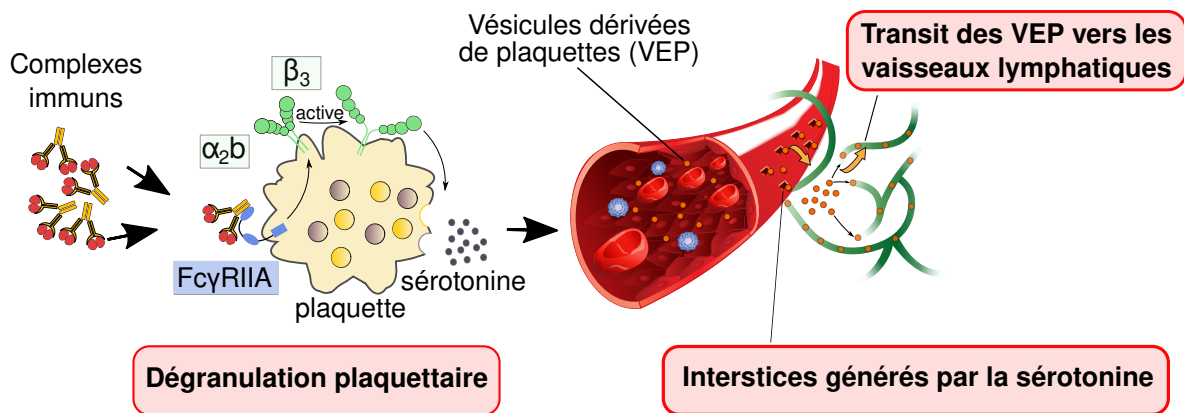


Figure 2.8 – Modèle proposé, illustrant la libération de vésicules, jusqu’à leur transit de la circulation sanguine vers la lymphe.

Toutefois, plusieurs limites peuvent être apportées à ce modèle :

- Si nous faisons l’hypothèse que la majorité de l’influx de vésicules provient de l’articulation enflammée, il est possible d’imaginer que les vésicules aient été générées suite à l’activation des plaquettes aux sites des lésions endothéliales articulaires, tant par l’exposition de composants de la matrice extra-cellulaire, que par la présence de complexes immuns anti-G6PI, accumulés au niveau de l’articulation. Dans le modèle de transfert K/BxN, bien que les dommages articulaires soient évidents dès le septième jour après l’induction, il est possible d’imaginer que lorsque les dommages deviennent plus sévères, la proportion de plaquettes activées par le collagène soit plus importante, et pourrait donc limiter la dépendance de l’influx vésiculaire lymphatique, de l’expression transgénique du FcγRIIA.
- D’autres substances contenues dans les plaquettes et libérées lors de leur dégranulation pourraient participer à l’augmentation de perméabilité vasculaire. Les plaquettes contiennent notamment de l’histamine, qu’elles peuvent sécréter en réponse à des stimuli d’activation[498].
- D’autres cellules, exprimant elles aussi le FcγRIIA, peuvent libérer des médiateurs vasoactifs, et participent ainsi à la modulation de la perméabilité vasculaire. En particulier, les mastocytes sont acteurs clés de l’arthrite inflammatoire du modèle de transfert de sérum K/BxN, et sont connus pour libérer de l’histamine et du facteur d’activation plaquettaire en réponse aux complexes immuns[167, 499].
- Le fait que les concentrations de vésicules soit élevées dans différents contextes pathologiques, suggère que ces modulations pourraient aussi être présentes dans d’autres maladies, en particulier lorsque le système lymphatique a été décrit comme affecté ou participant à la pathogenèse. Cependant, le modèle proposé ci-dessus ne

peut être formulé, d'après cette étude, que pour le contexte d'arthrite inflammatoire. Au jour présent, aucun élément ne nous permet d'affirmer qu'il pourrait s'appliquer de façon similaire à la pathologie athéroscléreuse.

Est-ce que la circulation lymphatique pourrait influencer le développement de maladies cardiovasculaires ?

La circulation lymphatique draine l'ensemble des tissus interstitiels et converge, chez la majorité des personnes, au niveau de la veine sous-clavière droite. Ainsi, les produits de la circulation lymphatique se mêlent à la circulation sanguine, juste en amont de l'oreillette droite du cœur. En sortant du cœur, la circulation sanguine transite par la circulation pulmonaire, avant de retourner à l'oreillette gauche du cœur, puis le quitte via l'artère aorte.

La polyarthrite rhumatoïde est associée à des maladies cardiovasculaires, mais des manifestations pulmonaires sont également fréquemment détectées chez ces patients[67]. De plus, la circulation lymphatique est connue comme étant impliquée dans le transit de cellules métastatiques, et leur propagation, de ganglions jusqu'aux poumons (section 0.3.5). Ainsi, il est établi que la circulation lymphatique puisse être responsable du transit de cellules métastatiques, via le système lymphatique, jusqu'aux poumons. Il est ainsi permis de penser que le même phénomène pourrait s'appliquer de façon similaire, aux médiateurs inflammatoires, comme les vésicules.

L'influx de vésicules plaquettaires décrit dans ce document, a été caractérisé au niveau du canal thoracique, donc en aval de plusieurs ganglions, et surtout relativement proche de la jonction avec la veine sous-clavière, laissant à penser qu'elles pourraient atteindre le cœur.

Au delà de la polyarthrite rhumatoïde, d'autres maladies auto-immunes sont également associées à des manifestations extra-articulaires, particulièrement cardiaques. On peut citer par exemple le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie systémique, ou le syndrome de Sjögren[500]. Le fait que de nombreuses maladies auto-immunes soient associées à des complications cardiaques laisse à penser qu'il pourrait exister un mécanisme commun entre ces pathologies et les manifestations cardiovasculaires.

En conséquence, il serait particulièrement intéressant d'étudier si cet influx de vésicules plaquettaires pourrait contribuer au développement de manifestations extra-articulaires, pulmonaires ou cardiaques, et ce sujet pourrait faire l'objet d'investigations futures.

Perspectives

VEPs et ganglions lymphatiques

Cette étude a permis de suggérer que les VEP pouvaient être propagées, au delà de l'articulation enflammée, par la circulation lymphatique, dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde. Détectées au niveau du canal thoracique, les VEP ont possiblement traversé plusieurs ganglions lymphatiques sur le parcours.

Les VEP sont connues comme pouvant interagir avec les lymphocytes B situés aux ganglions, pour leur délivrer du CD40L et leur permettre de contribuer à leur commutation isotypique[223]. Étant donné l'expansion des ganglions au cours de la polyarthrite rhumatoïde[497], il serait pertinent de vérifier si la circulation lymphatique propageant les VEP durant la polyarthrite rhumatoïde pourrait contribuer à déposer des VEP au niveau des ganglions drainant l'articulation arthritique. Pour ce faire, une première étape pourrait constituer en l'injection intradermique de VEP fluorescentes, au niveau de la cheville. En effet, l'injection intradermique permet leur drainage par le système lymphatique[501]. Ainsi, les VEP, suite à leur captation éventuelle par les vaisseaux lymphatiques, pourraient être détectées au niveau du ganglion drainant. La microscopie confocale pourrait permettre de visualiser leur présence au sein du ganglion, mais également leur localisation préférentielle, par exemple au niveau des centres germinatifs. Cette expérience renseignerait sur le fait que les VEP puissent directement emprunter la circulation lymphatique, et se rendre aux ganglions drainant.

Notre étude a décrit la perméabilité vasculaire sanguine comme contribuant au transit des VEP, de la circulation sanguine vers l'articulation, puis vers la circulation lymphatique. Ainsi, une seconde étape pourrait constituer à injecter les VEP fluorescentes non pas en intradermique, mais en intraveineux, dans des souris arthritiques. Cette expérience permettrait de vérifier que les VEP peuvent transiter de la circulation sanguine vers le système lymphatique en contexte arthritique. Ici aussi, la microscopie confocale permettrait de confirmer que suite à l'injection intraveineuse, les VEP fluorescentes sont capables d'atteindre les ganglions drainant l'articulation. Il serait également intéressant de vérifier si la localisation des VEP au sein des ganglions pourrait être modifiée suite à cette différence dans la provenance des VEP.

Si l'ensemble de ces expériences s'avèrent positives, il serait pertinent de poursuivre par l'étude de l'effet des VEP sur les cellules repérées à l'étape précédente comme étant préférentiellement associées aux VEP, s'il y en a. En effet, les ganglions lymphatiques drainant l'articulation arthritique sont le siège d'une expansion, et de prolifération lymphocytaire, notamment une sous-population de lymphocytes B appelée B-in[400, 497].

Cette population de lymphocytes B-in a été identifiée comme s'accumulant au niveau des sinus paracorticaux ganglionnaires, et contribuerait ainsi à perturber le drainage lymphatique au sein du ganglion[400]. Dans divers modèles murins de polyarthrite rhumatoïde, cette accumulation de B-in au niveau des ganglions drainant l'articulation enflammée est associée à une amplification des dommages articulaires, tandis qu'une stratégie permettant d'éliminer les lymphocytes B (thérapie par déplétion des lymphocytes B CD20⁺, Anti-CD20 B cell depletion therapy) permet de réduire les atteintes articulaires[400]. Il pourrait ainsi être intéressant d'évaluer, par des expériences *in vitro* de co-incubation VEP - lymphocytes B, si les VEP peuvent influencer leur prolifération, voire leur polarisation en lymphocytes B-in.

VEPs et vaisseaux lymphatiques

Un autre aspect de la circulation des VEP dans les vaisseaux lymphatiques relève de leur interaction avec les cellules endothéliales lymphatiques. En effet, nos résultats indiquent, qu'*in vitro* tout du moins, les VEP s'associent rapidement et efficacement avec les cellules endothéliales lymphatiques. Ainsi, il serait pertinent de vérifier si cette association peut également être détectée sur les vaisseaux lymphatiques *in vivo*, en particulier sur ceux drainant les articulations arthritiques. Pour ce faire, il est possible de prélever les vaisseaux lymphatiques collecteurs, voir Milasan et collaborateurs ([502]). Toutefois, cette technique présente certaines limites, puisqu'elle ne permet de prélever que les plus larges vaisseaux collecteurs, et même ainsi, la difficulté technique de prélèvement de ces vaisseaux est élevée de part leur petite taille et leur grande fragilité. Il serait ainsi possible d'explorer la présence de VEP associées aux cellules endothéliales présentes sur ces vaisseaux. Une façon d'approcher cette problématique serait d'utiliser, comme indiqué précédemment, l'injection de VEP fluorescentes, injectées soit en intradermique soit en intraveineux. Ces VEP fluorescentes, si associées aux cellules endothéliales lymphatiques, seraient repérables par microscopie confocale. Toutefois, l'utilisation de VEP fluorescentes présente le désavantage de ne pas révéler la présence de VEP endogènes associées aux cellules endothéliales lymphatiques de vaisseaux collecteurs d'articulation arthritique. De plus, de part leur petit diamètre, les VEP pourraient être difficiles à identifier, malgré leur profil fluorescent. Pour contourner ces problèmes, il serait possible d'utiliser un modèle murin exprimant l'uracile phosphoribosyltransférase de *Toxoplasma gondii* (T. gondii uracil phosphoribosyltransferase, UPRT) spécifiquement dans la lignée des mégacaryocytes. En effet, cette enzyme permet l'incorporation du 4-thiouracile (4TU), un analogue non-natif de l'uracile, dans l'ARN de mammifères. Ainsi, seule la lignée des mégacaryocytes peut produire du thio-ARN en réponse à l'exposition au 4TU. Ainsi, les plaquettes et leur vésicules, les VEP de cette lignée murine contiennent elles

aussi du thio-ARN, qui peut être spécifiquement isolé à l'aide de thiol-biotinylation et de chromatographie par avidine[503]. En conséquence, l'utilisation de cette lignée murine permettrait, si l'on détecte du thio-ARN contenu dans les cellules endothéliales lymphatiques de souris arthritiques, d'indiquer l'internalisation par les cellules endothéliales lymphatiques de VEP endogènes. En effet, la circulation lymphatique est dépourvue de plaquettes. Au delà de leur simple association avec les cellules endothéliales lymphatiques, il serait également intéressant d'évaluer l'impact fonctionnel des VEP sur ces cellules. Par exemple, il serait pertinent d'étudier si les VEP peuvent influencer la prolifération ou l'activation de cellules endothéliales lymphatiques, sur des modèles de culture *in vitro*. De plus, une culture cellulaire tri-dimensionnelle, par exemple en utilisant du matrigel, permettrait d'explorer leur effet sur l'organisation en vaisseaux.

Conclusion

L'ensemble de cette étude a permis de mettre en évidence la contribution du système lymphatique à la propagation de vésicules de plaquettes, au delà de l'articulation au cours de la polyarthrite rhumatoïde. La perméabilité vasculaire sanguine a été identifiée comme une composante essentielle permettant le transit de vésicules de plaquettes de la zone enflammée vers le système lymphatique. Les plaquettes contribuent à instaurer cette perméabilité, notamment via leur sécrétion de sérotonine. La circulation lymphatique est connue pour son rôle essentiel dans la résorption de l'œdème articulaire. Ainsi, plusieurs études ont suggéré de la cibler afin d'accentuer son activité drainante, dans l'espoir d'améliorer l'inflammation articulaire[406]. Cette étude suggère, qu'à tout du moins concernant les vésicules de plaquettes, en les éliminant de l'articulation enflammée, la circulation lymphatique semble également les déplacer vers d'autres sites anatomiques. Des études subséquentes seront nécessaires pour comprendre si ce phénomène s'applique à d'autres entités biologiques, ainsi que les conséquences de l'accentuation de leur propagation vers le système lymphatique.

Bibliographie

- [1] Marita CROSS et al. “The global burden of rheumatoid arthritis : estimates from the global burden of disease 2010 study.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 73.7 (2014), p. 1316-1322. DOI : [10.1136/annrheumdis-2013-204627](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204627) (cf. p. 1).
- [2] Gabriel J. TOBÓN et al. “The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease : Rheumatoid arthritis.” eng. In : *Autoimmunity reviews* 9.5 (2010), A288-A292. DOI : [10.1016/j.autrev.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.019) (cf. p. 1).
- [3] Josef S. SMOLEN et al. “Rheumatoid arthritis.” eng. In : *Nature reviews. Disease primers* 4 (2018), p. 18001. DOI : [10.1038/nrdp.2018.1](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1) (cf. p. 1, 75).
- [4] C. A. PESCHKEN et J. M. ESDAILE. “Rheumatic diseases in North America’s indigenous peoples.” eng. In : *Seminars in arthritis and rheumatism* 28.6 (1999), p. 368-391 (cf. p. 1).
- [5] C. A. PESCHKEN et al. “Rheumatoid arthritis in a north american native population : longitudinal followup and comparison with a white population”. In : *J. Rheumatol.* 37.8 (2010), p. 1589-1595 (cf. p. 1).
- [6] Cynthia S. CROWSON et al. “The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 63.3 (2011), p. 633-639. DOI : [10.1002/art.30155](https://doi.org/10.1002/art.30155) (cf. p. 1).
- [7] Maurizio CUTOLO et al. “Sex hormones and rheumatoid arthritis.” eng. In : *Autoimmunity reviews* 1.5 (2002), p. 284-289 (cf. p. 1).
- [8] Deshiré ALPÍZAR-RODRÍGUEZ et al. “The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 56.8 (2017), p. 1254-1263. DOI : [10.1093/rheumatology/kew318](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew318) (cf. p. 2).
- [9] Yannis ALAMANOS et al. “Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria : a systematic review.” eng. In : *Seminars in arthritis and rheumatism* 36.3 (2006), p. 182-188. DOI : [10.1016/j.semarthrit.2006.08.006](https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2006.08.006) (cf. p. 2).

- [10] S. LAIVORANTA-NYMAN et al. “Differences between female and male patients with familial rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 60.4 (2001), p. 413-415. DOI : [10.1136/ard.60.4.413](https://doi.org/10.1136/ard.60.4.413) (cf. p. 2).
- [11] Leonid PADYUKOV et al. “A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 70.2 (2011), p. 259-265. DOI : [10.1136/ard.2009.126821](https://doi.org/10.1136/ard.2009.126821) (cf. p. 2).
- [12] Nina A. DAHA et Rene E. M. TOES. “Rheumatoid arthritis : Are ACPA-positive and ACPA-negative RA the same disease?” eng. In : *Nature reviews. Rheumatology* 7.4 (2011), p. 202-203. DOI : [10.1038/nrrheum.2011.28](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.28) (cf. p. 2).
- [13] A. J. MACGREGOR et al. “Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 43.1 (2000), p. 30-37. DOI : [10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B) (cf. p. 2).
- [14] Thomas FRISELL et al. “Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis : role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 65.11 (2013), p. 2773-2782. DOI : [10.1002/art.38097](https://doi.org/10.1002/art.38097) (cf. p. 2).
- [15] A. J. SILMAN et al. “Twin concordance rates for rheumatoid arthritis : results from a nationwide study.” eng. In : *British journal of rheumatology* 32.10 (1993), p. 903-907. DOI : [10.1093/rheumatology/32.10.903](https://doi.org/10.1093/rheumatology/32.10.903) (cf. p. 2).
- [16] P. K. GREGERSEN et al. “The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 30.11 (1987), p. 1205-1213. DOI : [10.1002/art.1780301102](https://doi.org/10.1002/art.1780301102) (cf. p. 2, 3).
- [17] Sebastien VIATTE et al. “Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response.” eng. In : *JAMA* 313.16 (2015), p. 1645-1656. DOI : [10.1001/jama.2015.3435](https://doi.org/10.1001/jama.2015.3435) (cf. p. 3).
- [18] Yukinori OKADA et al. “Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.” eng. In : *Nature* 506.7488 (2014), p. 376-381. DOI : [10.1038/nature12873](https://doi.org/10.1038/nature12873) (cf. p. 3).
- [19] WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM. “Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.” eng. In : *Nature* 447.7145 (2007), p. 661-678. DOI : [10.1038/nature05911](https://doi.org/10.1038/nature05911) (cf. p. 3).

- [20] Ann B. BEGOVICH et al. “A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis.” eng. In : *American journal of human genetics* 75.2 (2004), p. 330-337. DOI : 10.1086/422827 (cf. p. 3).
- [21] Soumya RAYCHAUDHURI et al. “Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk.” eng. In : *Nature genetics* 41.12 (2009), p. 1313-1318. DOI : 10.1038/ng.479 (cf. p. 3).
- [22] Mercedes GARCÍA-BERMÚDEZ et al. “Study of association of CD40-CD154 gene polymorphisms with disease susceptibility and cardiovascular risk in Spanish rheumatoid arthritis patients.” eng. In : *PloS one* 7.11 (2012), e49214. DOI : 10.1371/journal.pone.0049214 (cf. p. 3).
- [23] Sebastien VIATTE et al. “Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 71.12 (2012), p. 1984-1990. DOI : 10.1136/annrheumdis-2011-201225 (cf. p. 3).
- [24] Sebastien VIATTE et al. “Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide-Negative Rheumatoid Arthritis.” eng. In : *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68.7 (2016), p. 1603-1613. DOI : 10.1002/art.39619 (cf. p. 3).
- [25] Yun LIU et al. “Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Nature biotechnology* 31.2 (2013), p. 142-147. DOI : 10.1038/nbt.2487 (cf. p. 3).
- [26] David GOMEZ-CABRERO et al. “High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis.” eng. In : *Genome medicine* 8.1 (2016), p. 124. DOI : 10.1186/s13073-016-0374-0 (cf. p. 3).
- [27] Adam P. CRIBBS et al. “Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway.” eng. In : *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66.9 (2014), p. 2344-2354. DOI : 10.1002/art.38715 (cf. p. 3).
- [28] Mojca FRANK-BERTONCELJ et al. “Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions.” eng. In : *Nature communications* 8 (2017), p. 14852. DOI : 10.1038/ncomms14852 (cf. p. 3).
- [29] Stephan BLÜML et al. “Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 63.5 (2011), p. 1281-1288. DOI : 10.1002/art.30281 (cf. p. 4).

- [30] Victoria SAFERDING et al. “MicroRNA-146a governs fibroblast activation and joint pathology in arthritis.” eng. In : *Journal of autoimmunity* 82 (2017), p. 74-84. DOI : 10.1016/j.jaut.2017.05.006 (cf. p. 4).
- [31] Yuji NAKAMACHI et al. “MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 60.5 (2009), p. 1294-1304. DOI : 10.1002/art.24475 (cf. p. 4).
- [32] Valerio FULCI et al. “miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis.” eng. In : *Human immunology* 71.2 (2010), p. 206-211. DOI : 10.1016/j.humimm.2009.11.008 (cf. p. 4).
- [33] E. M. CAMACHO et al. “Association between socioeconomic status, learned helplessness, and disease outcome in patients with inflammatory polyarthritis.” eng. In : *Arthritis care & research* 64.8 (2012), p. 1225-1232. DOI : 10.1002/acr.21677 (cf. p. 4).
- [34] Yang HU et al. “Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women.” eng. In : *The American journal of clinical nutrition* 100.3 (2014), p. 959-967. DOI : 10.3945/ajcn.114.086918 (cf. p. 4).
- [35] Lotta LJUNG et Solbritt RANTAPÄÄ-DAHLQVIST. “Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis - a nested case-control study.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 18.1 (2016), p. 277. DOI : 10.1186/s13075-016-1171-2 (cf. p. 4).
- [36] Bing LU et al. “Alcohol consumption and risk of incident rheumatoid arthritis in women : a prospective study.” eng. In : *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66.8 (2014), p. 1998-2005. DOI : 10.1002/art.38634 (cf. p. 4).
- [37] Yvonne C. LEE et al. “Post-Traumatic Stress Disorder and Risk for Incident Rheumatoid Arthritis.” eng. In : *Arthritis care & research* 68.3 (2016), p. 292-298. DOI : 10.1002/acr.22683 (cf. p. 4).
- [38] D. SUGIYAMA et al. “Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis : a meta-analysis of observational studies.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 69.1 (2010), p. 70-81. DOI : 10.1136/ard.2008.096487 (cf. p. 4).
- [39] Henrik KÄLLBERG et al. “Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis : estimations of risks after various exposures to cigarette smoke.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 70.3 (2011), p. 508-511. DOI : 10.1136/ard.2009.120899 (cf. p. 4).
- [40] Jeremy SOKOLOVE et al. “Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis : a cross-sectional analysis of US veterans.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 55.11 (2016), p. 1969-1977. DOI : 10.1093/rheumatology/kew285 (cf. p. 4).

- [41] A. NARANJO et al. “Smokers and non smokers with rheumatoid arthritis have similar clinical status : data from the multinational QUEST-RA database.” eng. In : *Clinical and experimental rheumatology* 28.6 (2010), p. 820-827 (cf. p. 5).
- [42] P. STOLT et al. “Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis : results from the Swedish EIRA study.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 64.4 (2005), p. 582-586. DOI : 10.1136/ard.2004.022053 (cf. p. 5).
- [43] Chun Lai TOO et al. “Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis : results from a Malaysian population-based case-control study.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 75.6 (2016), p. 997-1002. DOI : 10.1136/annrheumdis-2015-208278 (cf. p. 5).
- [44] M. P. WEBBER et al. “Nested case-control study of selected systemic autoimmune diseases in World Trade Center rescue/recovery workers.” eng. In : *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67.5 (2015), p. 1369-1376. DOI : 10.1002/art.39059 (cf. p. 5).
- [45] Jun CHEN et al. “An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis.” eng. In : *Genome medicine* 8.1 (2016), p. 43. DOI : 10.1186/s13073-016-0299-7 (cf. p. 5).
- [46] Jose U. SCHER et al. “Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis.” eng. In : *eLife* 2 (2013), e01202. DOI : 10.7554/eLife.01202 (cf. p. 5).
- [47] Annalisa PIANTA et al. “Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 127.8 (2017), p. 2946-2956. DOI : 10.1172/JCI93450 (cf. p. 5).
- [48] Milda NACIUTE et al. “Frequency and significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of general virology* 97.12 (2016), p. 3302-3312. DOI : 10.1099/jgv.0.000621 (cf. p. 5).
- [49] Milda NACIUTE et al. “Parvovirus B19 infection modulates the levels of cytokines in the plasma of rheumatoid arthritis patients.” eng. In : *Cytokine* 96 (2017), p. 41-48. DOI : 10.1016/j.cyto.2017.03.002 (cf. p. 6).
- [50] Milda NACIUTE et al. “Increased Numbers of CD4CD25 and CD8CD25 T-Cells in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis with Parvovirus B19 Infection.” eng. In : *In vivo (Athens, Greece)* 31.2 (2017), p. 181-185. DOI : 10.21873/invivo.11043 (cf. p. 6).
- [51] Karen H. COSTENBADER et Elizabeth W. KARLSON. “Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis : is there a link ?” eng. In : *Arthritis research & therapy* 8.1 (2006), p. 204. DOI : 10.1186/ar1893 (cf. p. 6).

- [52] L. J. ALBERT et R. D. INMAN. “Molecular mimicry and autoimmunity.” eng. In : *The New England journal of medicine* 341.27 (1999), p. 2068-2074. DOI : 10.1056/NEJM199912303412707 (cf. p. 6).
- [53] P. B. FERRELL et al. “Seroepidemiological study of relationships between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 67.3 (1981), p. 681-687. DOI : 10.1172/JCI110083 (cf. p. 6).
- [54] M. A. CATALANO et al. “Antibodies to Epstein-Barr virus-determined antigens in normal subjects and in patients with seropositive rheumatoid arthritis.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76.11 (1979), p. 5825-5828. DOI : 10.1073/pnas.76.11.5825 (cf. p. 6).
- [55] M. TAKEI et al. “Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients.” eng. In : *International immunology* 9.5 (1997), p. 739-743. DOI : 10.1093/intimm/9.5.739 (cf. p. 6).
- [56] J. G. SAAL et al. “Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 42.7 (1999), p. 1485-1496. DOI : 10.1002/1529-0131(199907)42:7<1485::AID-ANR24>3.0.CO;2-7 (cf. p. 6).
- [57] A. RIBÉRA et al. “[Chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection : clinical description and therapeutic considerations].” fre. In : *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial* 72 Spec No (2012), p. 83-85 (cf. p. 6).
- [58] Sherine E. GABRIEL et al. “Survival in rheumatoid arthritis : a population-based analysis of trends over 40 years.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 48.1 (2003), p. 54-58. DOI : 10.1002/art.10705 (cf. p. 6).
- [59] Juan Antonio AVINA-ZUBIETA et al. “Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis : a meta-analysis of observational studies.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 71.9 (2012), p. 1524-1529. DOI : 10.1136/annrheumdis-2011-200726 (cf. p. 7).
- [60] Marie-Christine AUBRY et al. “Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 34.5 (2007), p. 937-942 (cf. p. 7).
- [61] Ali TORKAMANI et al. “Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association.” eng. In : *Genomics* 92.5 (2008), p. 265-272. DOI : 10.1016/j.ygeno.2008.07.011 (cf. p. 7).

- [62] Konrad J. KARCZEWSKI et al. “Systematic functional regulatory assessment of disease-associated variants.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.23 (2013), p. 9607-9612. DOI : [10.1073/pnas.1219099110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219099110) (cf. p. 7).
- [63] Riitta PAAKKANEN et al. “Proinflammatory HLA-DRB1*01-haplotype predisposes to ST-elevation myocardial infarction.” eng. In : *Atherosclerosis* 221.2 (2012), p. 461-466. DOI : [10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.024](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.024) (cf. p. 7).
- [64] Ying CHEN et al. “Interaction between smoking and polymorphism in the promoter region of the VEGFA gene is associated with ischemic heart disease and myocardial infarction in rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 38.5 (2011), p. 802-809. DOI : [10.3899/jrheum.101095](https://doi.org/10.3899/jrheum.101095) (cf. p. 7).
- [65] Geraldine CAMBRIDGE et al. “Antibodies to citrullinated peptides and risk of coronary heart disease.” eng. In : *Atherosclerosis* 228.1 (2013), p. 243-246. DOI : [10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.009](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.009) (cf. p. 7).
- [66] Sarah SKEOCH et Ian N. BRUCE. “Atherosclerosis in rheumatoid arthritis : is it all about inflammation?” eng. In : *Nature reviews. Rheumatology* 11.7 (2015), p. 390-400. DOI : [10.1038/nrrheum.2015.40](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.40) (cf. p. 7).
- [67] Tim BONGARTZ et al. “Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis : a population-based study.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 62.6 (2010), p. 1583-1591. DOI : [10.1002/art.27405](https://doi.org/10.1002/art.27405) (cf. p. 8, 122).
- [68] Teresa A. SIMON et al. “Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis : a meta-analysis.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 17 (2015), p. 212. DOI : [10.1186/s13075-015-0728-9](https://doi.org/10.1186/s13075-015-0728-9) (cf. p. 8).
- [69] L. A. CRISWELL et al. “Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 65.9 (2006), p. 1163-1167. DOI : [10.1136/ard.2005.049676](https://doi.org/10.1136/ard.2005.049676) (cf. p. 8).
- [70] Faith MATCHAM et al. “The prevalence of depression in rheumatoid arthritis : a systematic review and meta-analysis.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 52.12 (2013), p. 2136-2148. DOI : [10.1093/rheumatology/ket169](https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket169) (cf. p. 8).
- [71] Jasvinder A. SINGH et al. “Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis : a systematic review and meta-analysis.” eng. In : *Lancet (London, England)* 386.9990 (2015), p. 258-265. DOI : [10.1016/S0140-6736\(14\)61704-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61704-9) (cf. p. 8).
- [72] Gianfranco FERRACCIOLI et al. “Rheumatoid arthritis and Alzheimer’s disease : genetic and epigenetic links in inflammatory regulation.” eng. In : *Discovery medicine* 14.79 (2012), p. 379-388 (cf. p. 8).

- [73] Kevin D. DEANE et al. “Preclinical rheumatoid arthritis : identification, evaluation, and future directions for investigation.” eng. In : *Rheumatic diseases clinics of North America* 36.2 (2010), p. 213-241. DOI : [10.1016/j.rdc.2010.02.001](https://doi.org/10.1016/j.rdc.2010.02.001) (cf. p. 8).
- [74] Marianna M. NEWKIRK. “Rheumatoid factors : host resistance or autoimmunity ?” eng. In : *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 104.1 (2002), p. 1-13 (cf. p. 8).
- [75] A. J. SILMAN et al. “Incidence of rheumatoid arthritis in a genetically predisposed population.” eng. In : *British journal of rheumatology* 31.6 (1992), p. 365-368. DOI : [10.1093/rheumatology/31.6.365](https://doi.org/10.1093/rheumatology/31.6.365) (cf. p. 8).
- [76] K. AHO et al. “Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 18.9 (1991), p. 1282-1284 (cf. p. 8).
- [77] Angel GONZALEZ et al. “Mortality trends in rheumatoid arthritis : the role of rheumatoid factor.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 35.6 (2008), p. 1009-1014 (cf. p. 8).
- [78] Floris A. van GAALEN et al. “Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 50.7 (2004), p. 2113-2121. DOI : [10.1002/art.20316](https://doi.org/10.1002/art.20316) (cf. p. 8).
- [79] Serena BUGATTI et al. “Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 18.1 (2016), p. 226. DOI : [10.1186/s13075-016-1116-9](https://doi.org/10.1186/s13075-016-1116-9) (cf. p. 8).
- [80] Xiaoyan ZHAO et al. “Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 10.4 (2008), R94. DOI : [10.1186/ar2478](https://doi.org/10.1186/ar2478) (cf. p. 8).
- [81] Florence ANQUETIL et al. “IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194.8 (2015), p. 3664-3674. DOI : [10.4049/jimmunol.1402334](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402334) (cf. p. 8).
- [82] Céline FOULQUIER 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.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 56.11 (2007), p. 3541-3553. DOI : [10.1002/art.22983](https://doi.org/10.1002/art.22983) (cf. p. 9).
- [83] Jonathan A. HILL et al. “Cutting edge : the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.2 (2003), p. 538-541. DOI : [10.4049/jimmunol.171.2.538](https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.538) (cf. p. 9).

- [84] Natalia WEGNER et al. "Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis." eng. In : *Immunological reviews* 233.1 (2010), p. 34-54. DOI : 10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x (cf. p. 9).
- [85] Markus M. J. NIELEN et al. "Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis : a study of serial measurements in blood donors." eng. In : *Arthritis and rheumatism* 50.2 (2004), p. 380-386. DOI : 10.1002/art.20018 (cf. p. 9).
- [86] Anca I. CATRINA et al. "Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis." eng. In : *Nature reviews. Rheumatology* 10.11 (2014), p. 645-653. DOI : 10.1038/nrrheum.2014.115 (cf. p. 9).
- [87] D. MAKRYGIANNAKIS et al. "Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells." eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 67.10 (2008), p. 1488-1492. DOI : 10.1136/ard.2007.075192 (cf. p. 9).
- [88] Robert VASSALLO et al. "Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD ; a Lung Tissue Research Consortium study." eng. In : *Respiratory research* 11 (2010), p. 45. DOI : 10.1186/1465-9921-11-45 (cf. p. 9).
- [89] Gudrun REYNISDOTTIR et al. "Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis." eng. In : *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66.1 (2014), p. 31-39. DOI : 10.1002/art.38201 (cf. p. 9).
- [90] Javier RANGEL-MORENO et al. "Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis." eng. In : *The Journal of clinical investigation* 116.12 (2006), p. 3183-3194. DOI : 10.1172/JCI28756 (cf. p. 9).
- [91] C. MASSON-BESSIÈRE et al. "The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin." eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166.6 (2001), p. 4177-4184. DOI : 10.4049/jimmunol.166.6.4177 (cf. p. 9).
- [92] Erik R. VOSSENAAR et al. "Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin." eng. In : *Arthritis research & therapy* 6.2 (2004), R142-R150. DOI : 10.1186/ar1149 (cf. p. 9).
- [93] Y. TAKIZAWA et al. "Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids." eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 65.8 (2006), p. 1013-1020. DOI : 10.1136/ard.2005.044743 (cf. p. 9).
- [94] Federico PRATESI et al. "Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis." eng. In : *Arthritis and rheumatism* 54.3 (2006), p. 733-741. DOI : 10.1002/art.21629 (cf. p. 9).

- [95] Andrew KINLOCH et al. “Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 58.8 (2008), p. 2287-2295. DOI : [10.1002/art.23618](https://doi.org/10.1002/art.23618) (cf. p. 9).
- [96] D. MAKRYGIANNAKIS et al. “Citrullination is an inflammation-dependent process.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 65.9 (2006), p. 1219-1222. DOI : [10.1136/ard.2005.049403](https://doi.org/10.1136/ard.2005.049403) (cf. p. 9).
- [97] Yoann ROMBOUTS et al. “Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 75.3 (2016), p. 578-585. DOI : [10.1136/annrheumdis-2014-206598](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206598) (cf. p. 9).
- [98] Priscilla F. KERKMAN et al. “Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 72.7 (2013), p. 1259-1263. DOI : [10.1136/annrheumdis-2012-202893](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202893) (cf. p. 9).
- [99] Frances HUMBY et al. “Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium.” eng. In : *PLoS medicine* 6.1 (2009), e1. DOI : [10.1371/journal.pmed.0060001](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0060001) (cf. p. 9, 14).
- [100] Ulrike HARRE et al. “Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 122.5 (2012), p. 1791-1802. DOI : [10.1172/JCI60975](https://doi.org/10.1172/JCI60975) (cf. p. 9, 17).
- [101] Ritika KHANDPUR et al. “NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Science translational medicine* 5.178 (2013), 178ra40. DOI : [10.1126/scitranslmed.3005580](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580) (cf. p. 10).
- [102] L. A. TROUW et al. “Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 60.7 (2009), p. 1923-1931. DOI : [10.1002/art.24622](https://doi.org/10.1002/art.24622) (cf. p. 10).
- [103] Jeremy SOKOLOVE et al. “Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fc γ receptor.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 63.1 (2011), p. 53-62. DOI : [10.1002/art.30081](https://doi.org/10.1002/art.30081) (cf. p. 10).
- [104] J. SUURMOND et al. “Toll-like receptor triggering augments activation of human mast cells by anti-citrullinated protein antibodies.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 74.10 (2015), p. 1915-1923. DOI : [10.1136/annrheumdis-2014-205562](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205562) (cf. p. 10).
- [105] Pierre BRUHNS et Friederike JÖNSSON. “Mouse and human FcR effector functions.” eng. In : *Immunological reviews* 268.1 (2015), p. 25-51. DOI : [10.1111/imr.12350](https://doi.org/10.1111/imr.12350) (cf. p. 11, 75, 79).

- [106] J. V. RAVETCH et J. P. KINET. “Fc receptors.” eng. In : *Annual review of immunology* 9 (1991), p. 457-492. DOI : [10.1146/annurev.iy.09.040191.002325](https://doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.002325) (cf. p. 12).
- [107] Pierre BRUHNS. “Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models.” eng. In : *Blood* 119.24 (2012), p. 5640-5649. DOI : [10.1182/blood-2012-01-380121](https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121) (cf. p. 12).
- [108] Nathalie CLOUTIER et al. “Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115.7 (2018), E1550-E1559. DOI : [10.1073/pnas.1720553115](https://doi.org/10.1073/pnas.1720553115) (cf. p. 12, 26, 75, 77, 82).
- [109] Teresita Díaz de STÅHL et al. “Expression of FcγRIII is required for development of collagen-induced arthritis.” eng. In : *European journal of immunology* 32.10 (2002), p. 2915-2922. DOI : [10.1002/1521-4141\(2002010\)32:10<2915::AID-IMMU2915>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2915::AID-IMMU2915>3.0.CO;2-4) (cf. p. 12).
- [110] Hong JI et al. “Arthritis critically dependent on innate immune system players.” eng. In : *Immunity* 16.2 (2002), p. 157-168 (cf. p. 12, 20, 75).
- [111] P. L. van LENT et al. “Role of Fc receptor gamma chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 43.4 (2000), p. 740-752. DOI : [10.1002/1529-0131\(200004\)43:4<740::AID-ANR4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200004)43:4<740::AID-ANR4>3.0.CO;2-0) (cf. p. 12).
- [112] Charles D. KAPLAN et al. “Development of inflammation in proteoglycan-induced arthritis is dependent on Fc gamma R regulation of the cytokine/chemokine environment.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169.10 (2002), p. 5851-5859. DOI : [10.4049/jimmunol.169.10.5851](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5851) (cf. p. 12).
- [113] Arjen B. BLOM et al. “Increased expression of Fcγ receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 48.4 (2003), p. 1002-1014. DOI : [10.1002/art.10871](https://doi.org/10.1002/art.10871) (cf. p. 12).
- [114] S. WIJNGAARDEN et al. “Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 42.5 (2003), p. 681-688. DOI : [10.1093/rheumatology/keg174](https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg174) (cf. p. 12).
- [115] J. E. SALMON et L. PRICOP. “Human receptors for immunoglobulin G : key elements in the pathogenesis of rheumatic disease.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 44.4 (2001), p. 739-750. DOI : [10.1002/1529-0131\(200104\)44:4<739::AID-ANR129>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200104)44:4<739::AID-ANR129>3.0.CO;2-0) (cf. p. 12).

- [116] Johan G. BRUN et al. “Immunoglobulin G fc-receptor (FcγR) IIA, IIIA, and IIIB polymorphisms related to disease severity in rheumatoid arthritis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 29.6 (2002), p. 1135-1140 (cf. p. 12).
- [117] A. W. MORGAN et al. “Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 43.10 (2000), p. 2328-2334. DOI : 10.1002/1529-0131(200010)43:10<2328::AID-ANR21>3.0.CO;2-Z (cf. p. 12).
- [118] A. MILICIC et al. “The F158V polymorphism in FcγRIIIA shows disparate associations with rheumatoid arthritis in two genetically distinct populations.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 61.11 (2002), p. 1021-1023. DOI : 10.1136/ard.61.11.1021 (cf. p. 12).
- [119] A. W. MORGAN et al. “FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis : a confirmation study.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 42.4 (2003), p. 528-533. DOI : 10.1093/rheumatology/keg169 (cf. p. 12).
- [120] R. W. KINNE et al. “Macrophages in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis research* 2.3 (2000), p. 189-202. DOI : 10.1186/ar86 (cf. p. 13).
- [121] Beatrix BARTOK et Gary S. FIRESTEIN. “Fibroblast-like synoviocytes : key effector cells in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Immunological reviews* 233.1 (2010), p. 233-255. DOI : 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x (cf. p. 13, 16).
- [122] Marta F. BUSTAMANTE et al. “Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 19.1 (2017), p. 110. DOI : 10.1186/s13075-017-1303-3 (cf. p. 13).
- [123] H. G. FASSBENDER. “Specific and nonspecific structures developing in inflammatory rheumatic diseases.” eng. In : *Acta pathologica japonica* 20.4 (1970), p. 409-422. DOI : 10.1111/j.1440-1827.1970.tb00098.x (cf. p. 13).
- [124] U. MÜLLER-LADNER et al. “Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice.” eng. In : *The American journal of pathology* 149.5 (1996), p. 1607-1615 (cf. p. 13, 16).
- [125] Stephanie LEFÈVRE et al. “Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints.” eng. In : *Nature medicine* 15.12 (2009), p. 1414-1420. DOI : 10.1038/nm.2050 (cf. p. 13).
- [126] Trieneke C. G. TIMMER et al. “Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology : identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 56.8 (2007), p. 2492-2502. DOI : 10.1002/art.22748 (cf. p. 14).

- [127] I. RANDEN et al. “Clonally related IgM rheumatoid factors undergo affinity maturation in the rheumatoid synovial tissue.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148.10 (1992), p. 3296-3301 (cf. p. 14).
- [128] Karim RAZA et al. “Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 32.2 (2005), p. 231-238 (cf. p. 14).
- [129] H. E. SEYMOUR et al. “Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis.” eng. In : *British journal of clinical pharmacology* 51.3 (2001), p. 201-208. DOI : 10.1046/j.1365-2125.2001.00321.x (cf. p. 14).
- [130] P. P. TAK et al. “Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 39.7 (1996), p. 1077-1081. DOI : 10.1002/art.1780390702 (cf. p. 14).
- [131] P. C. TAYLOR et al. “Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 43.1 (2000), p. 38-47. DOI : 10.1002/1529-0131(200001)43:1<38::AID-ANR6>3.0.CO;2-L (cf. p. 14).
- [132] F. M. BRENNAN et al. “Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy.” eng. In : *British journal of rheumatology* 36.6 (1997), p. 643-650. DOI : 10.1093/rheumatology/36.6.643 (cf. p. 14).
- [133] E. M. PALEOLOG et al. “Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 39.7 (1996), p. 1082-1091. DOI : 10.1002/art.1780390703 (cf. p. 14).
- [134] Michael R. EHRENSTEIN et al. “Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy.” eng. In : *The Journal of experimental medicine* 200.3 (2004), p. 277-285. DOI : 10.1084/jem.20040165 (cf. p. 14).
- [135] Andreas HESS et al. “Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.9 (2011), p. 3731-3736. DOI : 10.1073/pnas.1011774108 (cf. p. 14, 64).
- [136] U. SACK et al. “Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Rheumatology international* 13.2 (1993), p. 45-51 (cf. p. 15).

- [137] Eva V. ACOSTA-RODRIGUEZ et al. “Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.” eng. In : *Nature immunology* 8.9 (2007), p. 942-949. DOI : [10.1038/ni1496](https://doi.org/10.1038/ni1496) (cf. p. 15).
- [138] Frank LALLY et al. “A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 52.11 (2005), p. 3460-3469. DOI : [10.1002/art.21394](https://doi.org/10.1002/art.21394) (cf. p. 15).
- [139] Gilles KAPLANSKI et al. “IL-6 : a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.” eng. In : *Trends in immunology* 24.1 (2003), p. 25-29 (cf. p. 15).
- [140] G. JEGO et al. “Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts.” eng. In : *Blood* 97.6 (2001), p. 1817-1822. DOI : [10.1182/blood.v97.6.1817](https://doi.org/10.1182/blood.v97.6.1817) (cf. p. 15).
- [141] Oliver DIENZ et al. “The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells.” eng. In : *The Journal of experimental medicine* 206.1 (2009), p. 69-78. DOI : [10.1084/jem.20081571](https://doi.org/10.1084/jem.20081571) (cf. p. 15).
- [142] E. LUBBERTS et al. “IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167.2 (2001), p. 1004-1013. DOI : [10.4049/jimmunol.167.2.1004](https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1004) (cf. p. 15).
- [143] M. CHABAUD et al. “IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis research* 3.3 (2001), p. 168-177. DOI : [10.1186/ar294](https://doi.org/10.1186/ar294) (cf. p. 15).
- [144] Susumu NAKAE et al. “Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.11 (2003), p. 6173-6177. DOI : [10.4049/jimmunol.171.11.6173](https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6173) (cf. p. 15).
- [145] Giulia BENEDETTI et Pierre MIOSSEC. “Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.” eng. In : *European journal of immunology* 44.2 (2014), p. 339-347. DOI : [10.1002/eji.201344184](https://doi.org/10.1002/eji.201344184) (cf. p. 15).
- [146] Noushin LOTFI et al. “Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases : An Update.” eng. In : *Frontiers in immunology* 10 (2019), p. 1265. DOI : [10.3389/fimmu.2019.01265](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01265) (cf. p. 15).
- [147] Tsutomu TAKEUCHI et al. “Efficacy and safety of mavrilimumab in Japanese subjects with rheumatoid arthritis : findings from a Phase IIa study.” eng. In : *Modern rheumatology* 25.1 (2015), p. 21-30. DOI : [10.3109/14397595.2014.896448](https://doi.org/10.3109/14397595.2014.896448) (cf. p. 15).

- [148] David M. LEE et al. “Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis.” eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 315.5814 (2007), p. 1006-1010. DOI : 10.1126/science.1137306 (cf. p. 16, 75).
- [149] Hans P. KIENER et al. “Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 60.5 (2009), p. 1305-1310. DOI : 10.1002/art.24453 (cf. p. 16).
- [150] T. RÈME et al. “Mutations of the p53 tumour suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue.” eng. In : *Clinical and experimental immunology* 111.2 (1998), p. 353-358. DOI : 10.1046/j.1365-2249.1998.00508.x (cf. p. 16).
- [151] T. PAP et al. “Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 44.3 (2001), p. 676-681. DOI : 10.1002/1529-0131(200103)44:3<676::AID-ANR117>3.0.CO;2-6 (cf. p. 16).
- [152] K. R. AUPPERLE et al. “Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene.” eng. In : *The American journal of pathology* 152.4 (1998), p. 1091-1098 (cf. p. 16).
- [153] H. YOSHIDA et al. “The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene.” eng. In : *Nature* 345.6274 (1990), p. 442-444. DOI : 10.1038/345442a0 (cf. p. 17).
- [154] N. NAKAGAWA et al. “RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis.” eng. In : *Biochemical and biophysical research communications* 253.2 (1998), p. 395-400. DOI : 10.1006/bbrc.1998.9788 (cf. p. 17).
- [155] H. YASUDA et al. “Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerinosteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCERANKL.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.7 (1998), p. 3597-3602. DOI : 10.1073/pnas.95.7.3597 (cf. p. 17).
- [156] Y. FUJIKAWA et al. “Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 55.11 (1996), p. 816-822. DOI : 10.1136/ard.55.11.816 (cf. p. 17).
- [157] P. STASHENKO et al. “Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro.” eng. In : *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2.6 (1987), p. 559-565. DOI : 10.1002/jbmr.5650020612 (cf. p. 17).
- [158] Linda GILBERT et al. “Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha.” eng. In : *The Journal of biological chemistry* 277.4 (2002), p. 2695-2701. DOI : 10.1074/jbc.M106339200 (cf. p. 17).

- [159] Melissa M. MATZELLE et al. “Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 64.5 (2012), p. 1540-1550. DOI : 10.1002/art.33504 (cf. p. 17).
- [160] Wim B. van den BERG. “Lessons from animal models of arthritis over the past decade.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 11.5 (2009), p. 250. DOI : 10.1186/ar2803 (cf. p. 18).
- [161] V. KOUSKOFF et al. “Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity.” eng. In : *Cell* 87.5 (1996), p. 811-822. DOI : 10.1016/s0092-8674(00)81989-3 (cf. p. 19).
- [162] I. MATSUMOTO et al. “Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme.” eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 286.5445 (1999), p. 1732-1735. DOI : 10.1126/science.286.5445.1732 (cf. p. 19, 79, 110).
- [163] A. S. KORGANOW et al. “From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins.” eng. In : *Immunity* 10.4 (1999), p. 451-461. DOI : 10.1016/s1074-7613(00)80045-x (cf. p. 19, 20).
- [164] Isao MATSUMOTO et al. “How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease.” eng. In : *Nature immunology* 3.4 (2002), p. 360-365. DOI : 10.1038/ni772 (cf. p. 19).
- [165] Brian T. WIPKE et al. “Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis : a critical role for immune complexes.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.12 (2004), p. 7694-7702. DOI : 10.4049/jimmunol.172.12.7694 (cf. p. 19).
- [166] Anne D. CHRISTENSEN et al. “K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis.” eng. In : *Frontiers in immunology* 7 (2016), p. 213. DOI : 10.3389/fimmu.2016.00213 (cf. p. 19, 20).
- [167] David M. LEE et al. “Mast cells : a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis.” eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 297.5587 (2002), p. 1689-1692. DOI : 10.1126/science.1073176 (cf. p. 19, 20, 121).
- [168] Paul A. MONACH et al. “Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis : critical producers of Fc receptor gamma, the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 62.3 (2010), p. 753-764. DOI : 10.1002/art.27238 (cf. p. 20).
- [169] B. T. WIPKE et P. M. ALLEN. “Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167.3 (2001), p. 1601-1608. DOI : 10.4049/jimmunol.167.3.1601 (cf. p. 20).

- [170] Samuel SOLOMON et al. “A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis.” eng. In : *European journal of immunology* 35.10 (2005), p. 3064-3073. DOI : [10.1002/eji.200526167](https://doi.org/10.1002/eji.200526167) (cf. p. 20).
- [171] Hye Young KIM et al. “FcγRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 116.9 (2006), p. 2484-2492. DOI : [10.1172/JCI27219](https://doi.org/10.1172/JCI27219) (cf. p. 20).
- [172] Hong JI et al. “Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis.” eng. In : *The Journal of experimental medicine* 196.1 (2002), p. 77-85. DOI : [10.1084/jem.20020439](https://doi.org/10.1084/jem.20020439) (cf. p. 20).
- [173] Gerald M. WATTS et al. “Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174.6 (2005), p. 3668-3675. DOI : [10.4049/jimmunol.174.6.3668](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3668) (cf. p. 20).
- [174] W. B. van den BERG. “Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis.” eng. In : *Arthritis research* 3.1 (2001), p. 18-26. DOI : [10.1186/ar136](https://doi.org/10.1186/ar136) (cf. p. 20).
- [175] W. OSLER. “An Account of Certain Organisms Occurring in the Liquor Sanguinis”. In : *Proceedings of the Royal Society of London Series I* 22 (1873), p. 391-398 (cf. p. 21).
- [176] G. HAYEM. “Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés”. In : *Archives de physiologie normale et pathologique, 2e série* 5 (1878), p. 692-734 (cf. p. 21).
- [177] J. BIZZOZERO. “Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung”. In : *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 90 (1882), p. 261-332 (cf. p. 21).
- [178] O. BEHNKE. “The morphology of blood platelet membrane systems.” eng. In : *Series haematologica (1968)* 3.4 (1970), p. 3-16 (cf. p. 21).
- [179] Secil KOSEOGLU et Robert FLAUMENHAFT. “Advances in platelet granule biology.” eng. In : *Current opinion in hematology* 20.5 (2013), p. 464-471. DOI : [10.1097/MOH.0b013e3283632e6b](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283632e6b) (cf. p. 21).
- [180] Patricia LANDRY et al. “Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets.” eng. In : *Nature structural & molecular biology* 16.9 (2009), p. 961-966. DOI : [10.1038/nsmb.1651](https://doi.org/10.1038/nsmb.1651) (cf. p. 21).
- [181] Melvin M. DENIS et al. “Escaping the nuclear confines : signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets.” eng. In : *Cell* 122.3 (2005), p. 379-391. DOI : [10.1016/j.cell.2005.06.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.015) (cf. p. 21).
- [182] Andrew S. WEYRICH et al. “Change in protein phenotype without a nucleus : translational control in platelets.” eng. In : *Seminars in thrombosis and hemostasis* 30.4 (2004), p. 491-498. DOI : [10.1055/s-2004-833484](https://doi.org/10.1055/s-2004-833484) (cf. p. 21).

- [183] N. KIEFFER et al. “Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets.” eng. In : *European journal of biochemistry* 164.1 (1987), p. 189-195. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1987.tb11010.x (cf. p. 21).
- [184] F. M. BOOYSE et M. E. RAFELSON. “Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system.” eng. In : *Biochimica et biophysica acta* 166.3 (1968), p. 689-697. DOI : 10.1016/0005-2787(68)90376-6 (cf. p. 21).
- [185] S. LINDEMANN et al. “Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control.” eng. In : *The Journal of biological chemistry* 276.36 (2001), p. 33947-33951. DOI : 10.1074/jbc.M104281200 (cf. p. 22).
- [186] R. PABLA et al. “Integrin-dependent control of translation : engagement of integrin alphaIIb beta3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets.” eng. In : *The Journal of cell biology* 144.1 (1999), p. 175-184. DOI : 10.1083/jcb.144.1.175 (cf. p. 22).
- [187] Andrew H. WEI et al. “New insights into the haemostatic function of platelets.” eng. In : *British journal of haematology* 147.4 (2009), p. 415-430. DOI : 10.1111/j.1365-2141.2009.07819.x (cf. p. 22).
- [188] A. SONNENBERG et al. “Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6.” eng. In : *Nature* 336.6198 (1988), p. 487-489. DOI : 10.1038/336487a0 (cf. p. 22).
- [189] Ana KASIRER-FRIEDE et al. “Platelet integrins and immunoreceptors.” eng. In : *Immunological reviews* 218 (2007), p. 247-264. DOI : 10.1111/j.1600-065X.2007.00532.x (cf. p. 22).
- [190] S. KANAJI et al. “Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis.” eng. In : *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10.8 (2012), p. 1646-1652. DOI : 10.1111/j.1538-7836.2012.04797.x (cf. p. 22).
- [191] Zaverio M. RUGGERI. “The role of von Willebrand factor in thrombus formation.” eng. In : *Thrombosis research* 120 Suppl 1 (2007), S5-S9. DOI : 10.1016/j.thromres.2007.03.011 (cf. p. 22).
- [192] S. J. SHATTIL et al. “Integrin signaling : the platelet paradigm.” eng. In : *Blood* 91.8 (1998), p. 2645-2657 (cf. p. 22).
- [193] M. MOROI et al. “A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 84.5 (1989), p. 1440-1445. DOI : 10.1172/JCI114318 (cf. p. 22).
- [194] M. TSUJI et al. “A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets.” eng. In : *The Journal of biological chemistry* 272.38 (1997), p. 23528-23531. DOI : 10.1074/jbc.272.38.23528 (cf. p. 22).

- [195] J. ASSELIN et al. "A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1." eng. In : *Blood* 89.4 (1997), p. 1235-1242 (cf. p. 22).
- [196] J. M. PASQUET et al. "LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI." eng. In : *Molecular and cellular biology* 19.12 (1999), p. 8326-8334. DOI : 10.1128/mcb.19.12.8326 (cf. p. 22).
- [197] B. S. GROSS et al. "Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets." eng. In : *European journal of biochemistry* 263.3 (1999), p. 612-623. DOI : 10.1046/j.1432-1327.1999.00560.x (cf. p. 22).
- [198] B. S. GROSS et al. "Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets." eng. In : *The Journal of biological chemistry* 274.9 (1999), p. 5963-5971. DOI : 10.1074/jbc.274.9.5963 (cf. p. 22).
- [199] Zhenyu LI et al. "Signaling during platelet adhesion and activation." eng. In : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30.12 (2010), p. 2341-2349. DOI : 10.1161/ATVBAHA.110.207522 (cf. p. 22).
- [200] Marcus J. COFFEY et al. "Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI : involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis." eng. In : *Circulation research* 94.12 (2004), p. 1598-1605. DOI : 10.1161/01.RES.0000132281.78948.65 (cf. p. 22).
- [201] P. COMFURIUS et al. "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase." eng. In : *Biochimica et biophysica acta* 1026.2 (1990), p. 153-160. DOI : 10.1016/0005-2736(90)90058-v (cf. p. 22, 27).
- [202] M. M. HUANG et al. "Activation of Fc gamma RII induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins including Fc gamma RII." eng. In : *The Journal of biological chemistry* 267.8 (1992), p. 5467-5473 (cf. p. 22).
- [203] G. W. CHACKO et al. "Phosphoinositide 3-kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc gamma receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. Reconstitution with synthetic phosphopeptides." eng. In : *The Journal of biological chemistry* 271.18 (1996), p. 10775-10781. DOI : 10.1074/jbc.271.18.10775 (cf. p. 22).
- [204] Meggan CZAPIGA et al. "Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors." eng. In : *Experimental hematology* 33.1 (2005), p. 73-84. DOI : 10.1016/j.exphem.2004.09.010 (cf. p. 23).

- [205] Fabrice COGNASSE et al. “The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors.” eng. In : *Frontiers in immunology* 6 (2015), p. 83. DOI : [10.3389/fimmu.2015.00083](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00083) (cf. p. 23).
- [206] Milka KOUPENOVA et al. “Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis.” eng. In : *Blood* 124.5 (2014), p. 791-802. DOI : [10.1182/blood-2013-11-536003](https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-536003) (cf. p. 23).
- [207] D. ZUCKER-FRANKLIN et al. “Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets.” eng. In : *Blood* 75.10 (1990), p. 1920-1923 (cf. p. 23).
- [208] Chawaree CHAIPAN et al. “DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets.” eng. In : *Journal of virology* 80.18 (2006), p. 8951-8960. DOI : [10.1128/JVI.00136-06](https://doi.org/10.1128/JVI.00136-06) (cf. p. 23).
- [209] Eric BOILARD et al. “Influenza virus H1N1 activates platelets through Fc γ RIIA signaling and thrombin generation.” eng. In : *Blood* 123.18 (2014), p. 2854-2863. DOI : [10.1182/blood-2013-07-515536](https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515536) (cf. p. 23, 26).
- [210] B. ROGALA et al. “Platelet aggregation in IgE-mediated allergy with elevated soluble Fc epsilon RII/CD23 level.” eng. In : *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 5.3 (1995), p. 161-165 (cf. p. 23).
- [211] Michael R. YEAMAN et al. “Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins.” eng. In : *Biochimica et biophysica acta* 1768.3 (2007), p. 609-619. DOI : [10.1016/j.bbamem.2006.11.010](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.010) (cf. p. 23).
- [212] D. I. SIMON et al. “Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).” eng. In : *The Journal of experimental medicine* 192.2 (2000), p. 193-204. DOI : [10.1084/jem.192.2.193](https://doi.org/10.1084/jem.192.2.193) (cf. p. 23).
- [213] Vinatha SREERAMKUMAR et al. “Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation.” eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 346.6214 (2014), p. 1234-1238. DOI : [10.1126/science.1256478](https://doi.org/10.1126/science.1256478) (cf. p. 23, 84).
- [214] C. WEBER et T. A. SPRINGER. “Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 100.8 (1997), p. 2085-2093. DOI : [10.1172/JCI119742](https://doi.org/10.1172/JCI119742) (cf. p. 23).
- [215] Yan-Qing MA et al. “P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaM beta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils.” eng. In : *Blood* 104.8 (2004), p. 2549-2556. DOI : [10.1182/blood-2004-03-1108](https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1108) (cf. p. 23).

- [216] Harald F. LANGER et al. "Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro." eng. In : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27.6 (2007), p. 1463-1470. DOI : 10.1161/ATVBAHA.107.141515 (cf. p. 23).
- [217] X. D. NGUYEN et al. "Differentiation of monocyte-derived dendritic cells under the influence of platelets." eng. In : *Cytotherapy* 10.7 (2008), p. 720-729. DOI : 10.1080/14653240802378912 (cf. p. 24).
- [218] H. K. NIEUWENHUIS et al. "Studies with a monoclonal antibody against activated platelets : evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation." eng. In : *Blood* 70.3 (1987), p. 838-845 (cf. p. 24).
- [219] V. HENN et al. "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." eng. In : *Nature* 391.6667 (1998), p. 591-594. DOI : 10.1038/35393 (cf. p. 24).
- [220] Dirk LIEVENS et al. "Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis." eng. In : *Blood* 116.20 (2010), p. 4317-4327. DOI : 10.1182/blood-2010-01-261206 (cf. p. 24).
- [221] T. M. FOY et al. "gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory." eng. In : *The Journal of experimental medicine* 180.1 (1994), p. 157-163. DOI : 10.1084/jem.180.1.157 (cf. p. 24).
- [222] Bennett D. ELZEY et al. "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments." eng. In : *Immunity* 19.1 (2003), p. 9-19. DOI : 10.1016/s1074-7613(03)00177-8 (cf. p. 24).
- [223] Daniel L. SPRAGUE et al. "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity : unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles." eng. In : *Blood* 111.10 (2008), p. 5028-5036. DOI : 10.1182/blood-2007-06-097410 (cf. p. 24, 35, 120, 123).
- [224] Norbert GERDES et al. "Platelets regulate CD4⁺ T-cell differentiation via multiple chemokines in humans." eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 106.2 (2011), p. 353-362. DOI : 10.1160/TH11-01-0020 (cf. p. 24).
- [225] Metin IŞIK et al. "New platelet indices as inflammatory parameters for patients with rheumatoid arthritis." eng. In : *European journal of rheumatology* 1.4 (2014), p. 144-146. DOI : 10.5152/eurjrheumatol.2014.140023 (cf. p. 24).
- [226] S. YAZICI et al. "The platelet indices in patients with rheumatoid arthritis : mean platelet volume reflects disease activity." eng. In : *Platelets* 21.2 (2010), p. 122-125. DOI : 10.3109/09537100903474373 (cf. p. 24).

- [227] Bunyamin KISACIK et al. “Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis.” eng. In : *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 75.3 (2008), p. 291-294. DOI : [10.1016/j.jbspin.2007.06.016](https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.06.016) (cf. p. 24).
- [228] M. FARR et al. “Thrombocytosis of active rheumatoid disease.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 42.5 (1983), p. 545-549. DOI : [10.1136/ard.42.5.545](https://doi.org/10.1136/ard.42.5.545) (cf. p. 24, 25).
- [229] I. ERTENLI et al. “P-selectin as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 25.6 (1998), p. 1054-1058 (cf. p. 24).
- [230] P. C. FINK et al. “Platelet aggregation and aggregation inhibition by different antiglobulins and antiglobulin complexes from sera of patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 22.8 (1979), p. 896-903. DOI : [10.1002/art.1780220814](https://doi.org/10.1002/art.1780220814) (cf. p. 24).
- [231] Paul A. MAC MULLAN et al. “Platelet hyper-reactivity in active inflammatory arthritis is unique to the adenosine diphosphate pathway : a novel finding and potential therapeutic target.” eng. In : *Rheumatology (Oxford, England)* 49.2 (2010), p. 240-245. DOI : [10.1093/rheumatology/kep377](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep377) (cf. p. 24, 75).
- [232] A. J. LITTLER et al. “A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis.” eng. In : *British journal of rheumatology* 36.2 (1997), p. 164-169. DOI : [10.1093/rheumatology/36.2.164](https://doi.org/10.1093/rheumatology/36.2.164) (cf. p. 24).
- [233] M. YARON et M. DJALDETTI. “Platelets in synovial fluid.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 21.5 (1978), p. 607-608. DOI : [10.1002/art.1780210509](https://doi.org/10.1002/art.1780210509) (cf. p. 25).
- [234] G. K. ENDRESEN. “Investigation of blood platelets in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.” eng. In : *Scandinavian journal of rheumatology* 10.3 (1981), p. 204-208. DOI : [10.3109/03009748109095299](https://doi.org/10.3109/03009748109095299) (cf. p. 25).
- [235] M. H. GINSBERG et al. “Platelets in the synovial space.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 21.8 (1978), p. 994-995. DOI : [10.1002/art.1780210825](https://doi.org/10.1002/art.1780210825) (cf. p. 25).
- [236] H. R. SCHUMACHER. “The microvasculature of the synovial membrane of the monkey : ultrastructural studies.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 12.4 (1969), p. 387-404. DOI : [10.1002/art.1780120406](https://doi.org/10.1002/art.1780120406) (cf. p. 25).
- [237] Peter A. SIMKIN et John E. BASSETT. “Pathways of microvascular permeability in the synovium of normal and diseased human knees.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 38.12 (2011), p. 2635-2642. DOI : [10.3899/jrheum.110785](https://doi.org/10.3899/jrheum.110785) (cf. p. 25).

- [238] H. R. SCHUMACHER. “Synovial membrane and fluid morphologic alterations in early rheumatoid arthritis : microvascular injury and virus-like particles.” eng. In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 256 (1975), p. 39-64. DOI : 10.1111/j.1749-6632.1975.tb36034.x (cf. p. 25, 76).
- [239] Bryce A. BINSTADT et al. “Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack.” eng. In : *Nature immunology* 7.3 (2006), p. 284-292. DOI : 10.1038/ni1306 (cf. p. 25, 81, 82).
- [240] M. G. BUCKLEY et al. “Mast cell activation in arthritis : detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid.” eng. In : *Clinical science (London, England : 1979)* 93.4 (1997), p. 363-370. DOI : 10.1042/cs0930363 (cf. p. 25).
- [241] Paul P. BERTRAND et Rebecca L. BERTRAND. “Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract.” eng. In : *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 153.1-2 (2010), p. 47-57. DOI : 10.1016/j.autneu.2009.08.002 (cf. p. 25).
- [242] Francine CÔTÉ et al. “Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.23 (2003), p. 13525-13530. DOI : 10.1073/pnas.2233056100 (cf. p. 26, 77, 82).
- [243] J. ZELLER et al. “Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 26.4 (1983), p. 532-540. DOI : 10.1002/art.1780260413 (cf. p. 26).
- [244] Nathalie CLOUTIER et al. “Platelets can enhance vascular permeability.” eng. In : *Blood* 120.6 (2012), p. 1334-1343. DOI : 10.1182/blood-2012-02-413047 (cf. p. 26, 53, 76, 81, 82, 84, 120).
- [245] Huiying ZHI et al. “Platelet Activation and Thrombus Formation over IgG Immune Complexes Requires Integrin α IIb β ₃ and Lyn Kinase.” eng. In : *PloS one* 10.8 (2015), e0135738. DOI : 10.1371/journal.pone.0135738 (cf. p. 26, 81).
- [246] S. E. MCKENZIE et al. “The role of the human Fc receptor Fc γ RIIA in the immune clearance of platelets : a transgenic mouse model.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162.7 (1999), p. 4311-4318 (cf. p. 26, 75).
- [247] Imene MELKI et al. “Platelet microvesicles in health and disease.” eng. In : *Platelets* 28.3 (2017), p. 214-221. DOI : 10.1080/09537104.2016.1265924 (cf. p. 27, 30, 38, 76, 80, 81, 85).
- [248] P. WOLF. “The nature and significance of platelet products in human plasma.” eng. In : *British journal of haematology* 13.3 (1967), p. 269-288. DOI : 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x (cf. p. 27, 81).

- [249] A. J. WEBBER et S. A. JOHNSON. “Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis.” eng. In : *The American journal of pathology* 60.1 (1970), p. 19-42 (cf. p. 27).
- [250] H. F. HEIJNEN 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.” eng. In : *Blood* 94.11 (1999), p. 3791-3799 (cf. p. 27, 80).
- [251] Maria T. AATONEN et al. “Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles.” eng. In : *Journal of extracellular vesicles* 3 (2014). DOI : 10.3402/jev.v3.24692 (cf. p. 27).
- [252] R. F. ZWAAL et al. “Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells ; mechanisms and physiological significance.” eng. In : *Molecular and cellular biochemistry* 91.1-2 (1989), p. 23-31 (cf. p. 27).
- [253] E. M. BEVERS et al. “Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation.” eng. In : *Biochimica et biophysica acta* 736.1 (1983), p. 57-66. DOI : 10.1016/0005-2736(83)90169-4 (cf. p. 27).
- [254] Toshihiro FUJII et al. “TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.41 (2015), p. 12800-12805. DOI : 10.1073/pnas.1516594112 (cf. p. 27, 28, 33).
- [255] Jun SUZUKI et al. “Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F.” eng. In : *Nature* 468.7325 (2010), p. 834-838. DOI : 10.1038/nature09583 (cf. p. 27, 28, 33).
- [256] Nilaksh GUPTA et al. “Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis.” eng. In : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34.1 (2014), p. 160-168. DOI : 10.1161/ATVBAHA.113.302116 (cf. p. 28).
- [257] Claudia TERSTEEG et al. “Flow-induced Protrusions (FLIPRs) : a platelet-derived platform for the retrieval of microparticles by monocytes and neutrophils.” eng. In : *Circulation research* 114.5 (2014), p. 780-791. DOI : 10.1161/CIRCRESAHA.114.302361 (cf. p. 28).
- [258] William L. DEAN et al. “Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 102.4 (2009), p. 711-718. DOI : 10.1160/TH09-04-243 (cf. p. 28, 31).
- [259] Ela SHAI et al. “Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus.” eng. In : *Journal of proteomics* 76 Spec No. (2012), p. 287-296. DOI : 10.1016/j.jprot.2012.02.030 (cf. p. 28).

- [260] Benjamin A. GARCIA et al. “The platelet microparticle proteome.” eng. In : *Journal of proteome research* 4.5 (2005), p. 1516-1521. DOI : [10.1021/pr0500760](https://doi.org/10.1021/pr0500760) (cf. p. 28).
- [261] Geneviève MARCOUX et al. “Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses.” eng. In : *Scientific reports* 6 (2016), p. 35928. DOI : [10.1038/srep35928](https://doi.org/10.1038/srep35928) (cf. p. 28).
- [262] David Ewan CONNOR et al. “The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 103.5 (2010), p. 1044-1052. DOI : [10.1160/TH09-09-0644](https://doi.org/10.1160/TH09-09-0644) (cf. p. 28).
- [263] Andreea MILASAN et al. “Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis.” eng. In : *Journal of extracellular vesicles* 5 (2016), p. 31427. DOI : [10.3402/jev.v5.31427](https://doi.org/10.3402/jev.v5.31427) (cf. p. 28, 31, 65, 76, 84, 85, 110).
- [264] Nathalie CLOUTIER et al. “The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components : the microparticle-associated immune complexes.” eng. In : *EMBO molecular medicine* 5.2 (2013), p. 235-249. DOI : [10.1002/emmm.201201846](https://doi.org/10.1002/emmm.201201846) (cf. p. 28, 36, 53, 76, 84).
- [265] Matthieu ROUSSEAU 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.” eng. In : *PloS one* 10.1 (2015), e0116812. DOI : [10.1371/journal.pone.0116812](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116812) (cf. p. 28, 61).
- [266] Sharissa L. LATHAM et al. “Immuno-analysis of microparticles : probing at the limits of detection.” eng. In : *Scientific reports* 5 (2015), p. 16314. DOI : [10.1038/srep16314](https://doi.org/10.1038/srep16314) (cf. p. 28).
- [267] Maria AATONEN et al. “Platelet-derived microvesicles : multitasking participants in intercellular communication.” eng. In : *Seminars in thrombosis and hemostasis* 38.1 (2012), p. 102-113. DOI : [10.1055/s-0031-1300956](https://doi.org/10.1055/s-0031-1300956) (cf. p. 28, 29).
- [268] Silvia PEREZ-PUJOL et al. “Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism : studies using a new digital flow cytometer.” eng. In : *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 71.1 (2007), p. 38-45. DOI : [10.1002/cyto.a.20354](https://doi.org/10.1002/cyto.a.20354) (cf. p. 28).
- [269] Robert FLAUMENHAFT et al. “Megakaryocyte-derived microparticles : direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles.” eng. In : *Blood* 113.5 (2009), p. 1112-1121. DOI : [10.1182/blood-2008-06-163832](https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163832) (cf. p. 28).
- [270] Eelo GITZ et al. “CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles.” eng. In : *Blood* 124.14 (2014), p. 2262-2270. DOI : [10.1182/blood-2014-05-572818](https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-572818) (cf. p. 29, 35, 36, 80, 85).

- [271] Anne-Claire DUCHEZ et al. “Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.27 (2015), E3564-E3573. DOI : 10.1073/pnas.1507905112 (cf. p. 29, 31, 34, 36, 59, 76, 80, 85, 86).
- [272] Luc H. BOUDREAU et al. “Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation.” eng. In : *Blood* 124.14 (2014), p. 2173-2183. DOI : 10.1182/blood-2014-05-573543 (cf. p. 31, 76, 80, 85).
- [273] Mélanie DIEUDÉ et al. “The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection.” eng. In : *Science translational medicine* 7.318 (2015), 318ra200. DOI : 10.1126/scitranslmed.aac9816 (cf. p. 31, 85).
- [274] Benoit LAFFONT et al. “Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2 • microRNA complexes to endothelial cells via microparticles.” eng. In : *Blood* 122.2 (2013), p. 253-261. DOI : 10.1182/blood-2013-03-492801 (cf. p. 31, 34, 59, 76, 80, 86).
- [275] Denise M. RAY et al. “Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 99.1 (2008), p. 86-95. DOI : 10.1160/TH07-05-0328 (cf. p. 31).
- [276] Cory R. LINDSAY et Leonard C. EDELSTEIN. “MicroRNAs in Platelet Physiology and Function.” eng. In : *Seminars in thrombosis and hemostasis* 42.3 (2016), p. 215-222. DOI : 10.1055/s-0035-1570077 (cf. p. 31).
- [277] R. J. BERCKMANS et al. “Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 85.4 (2001), p. 639-646 (cf. p. 31, 32).
- [278] Tetsuya UEBA et al. “Level, distribution and correlates of platelet-derived microparticles in healthy individuals with special reference to the metabolic syndrome.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 100.2 (2008), p. 280-285 (cf. p. 31).
- [279] A. Phillip OWENS et Nigel MACKMAN. “Microparticles in hemostasis and thrombosis.” eng. In : *Circulation research* 108.10 (2011), p. 1284-1297. DOI : 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056 (cf. p. 31, 32).
- [280] N. ARRAUD et al. “Extracellular vesicles from blood plasma : determination of their morphology, size, phenotype and concentration.” eng. In : *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 12.5 (2014), p. 614-627. DOI : 10.1111/jth.12554 (cf. p. 31, 62, 64).

- [281] Nicolas ARRAUD et al. “Fluorescence triggering : A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry.” eng. In : *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 89.2 (2016), p. 184-195. DOI : 10.1002/cyto.a.22669 (cf. p. 31, 64, 80).
- [282] M. L. RAND et al. “Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits.” eng. In : *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4.7 (2006), p. 1621-1623. DOI : 10.1111/j.1538-7836.2006.02011.x (cf. p. 31).
- [283] A. RANK et al. “Clearance of platelet microparticles in vivo.” eng. In : *Platelets* 22.2 (2011), p. 111-116. DOI : 10.3109/09537104.2010.520373 (cf. p. 31).
- [284] Swapan K. DASGUPTA et al. “Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles.” eng. In : *Blood* 113.6 (2009), p. 1332-1339. DOI : 10.1182/blood-2008-07-167148 (cf. p. 32).
- [285] Swapan Kumar DASGUPTA et al. “Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium.” eng. In : *Circulation* 125.13 (2012), p. 1664-1672. DOI : 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.068833 (cf. p. 32).
- [286] Daniela D’ARCANGELO et al. “Acidification prevents endothelial cell apoptosis by Axl activation.” eng. In : *Circulation research* 91.7 (2002), e4-12. DOI : 10.1161/01.res.0000036753.50601.e9 (cf. p. 32).
- [287] Elena I. SINAURIDZE et al. “Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 97.3 (2007), p. 425-434 (cf. p. 32).
- [288] K. JOOP et al. “Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 85.5 (2001), p. 810-820 (cf. p. 32).
- [289] G. TANS et al. “Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles.” eng. In : *Blood* 77.12 (1991), p. 2641-2648 (cf. p. 32).
- [290] Laily D. ZUBAIROVA et al. “Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots.” eng. In : *Scientific reports* 5 (2015), p. 17611. DOI : 10.1038/srep17611 (cf. p. 33).
- [291] Beth A. BOUCHARD et al. “No evidence for tissue factor on platelets.” eng. In : *Blood* 116.5 (2010), p. 854-855. DOI : 10.1182/blood-2010-05-285627 (cf. p. 33).
- [292] Marina CAMERA et al. “Tissue factor expression on platelets is a dynamic event.” eng. In : *Blood* 116.23 (2010), p. 5076-5077. DOI : 10.1182/blood-2010-09-307306 (cf. p. 33).

- [293] Bjarne ØSTERUD et Jan Ole OLSEN. “Human platelets do not express tissue factor.” eng. In : *Thrombosis research* 132.1 (2013), p. 112-115. DOI : 10.1016/j.thromres.2013.04.010 (cf. p. 33).
- [294] Irene LOPEZ-VILCHEZ et al. “Internalization of Tissue Factor-Rich Microvesicles by Platelets Occurs Independently of GPIIb-IIIa, and Involves CD36 Receptor, Serotonin Transporter and Cytoskeletal Assembly.” eng. In : *Journal of cellular biochemistry* 117.2 (2016), p. 448-457. DOI : 10.1002/jcb.25293 (cf. p. 33).
- [295] G. CASTAMAN et al. “A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation.” eng. In : *Lancet (London, England)* 347.9002 (1996), p. 700-701. DOI : 10.1016/s0140-6736(96)91259-3 (cf. p. 33).
- [296] G. CASTAMAN et al. “Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation.” eng. In : *British journal of haematology* 96.3 (1997), p. 458-463. DOI : 10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2072.x (cf. p. 33).
- [297] N. SATTA et al. “Scott syndrome : an inherited defect of the procoagulant activity of platelets.” eng. In : *Platelets* 8.2-3 (1997), p. 117-124. DOI : 10.1080/09537109709169326 (cf. p. 33).
- [298] Robert F. A. ZWAAL et al. “Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids.” eng. In : *Biochimica et biophysica acta* 1636.2-3 (2004), p. 119-128. DOI : 10.1016/j.bbailip.2003.07.003 (cf. p. 33).
- [299] Elisabetta CASTOLDI et al. “Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome.” eng. In : *Blood* 117.16 (2011), p. 4399-4400. DOI : 10.1182/blood-2011-01-332502 (cf. p. 33).
- [300] Thierry BURNOUF et al. “Platelet microparticles : detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine.” eng. In : *Blood reviews* 28.4 (2014), p. 155-166. DOI : 10.1016/j.blre.2014.04.002 (cf. p. 33, 34).
- [301] W. JY et al. “Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias.” eng. In : *The Journal of laboratory and clinical medicine* 119.4 (1992), p. 334-345 (cf. p. 33, 34).
- [302] María T. ÁLVAREZ-ROMÁN et al. “Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia.” eng. In : *British journal of haematology* 175.5 (2016), p. 925-934. DOI : 10.1111/bjh.14412 (cf. p. 33).
- [303] Nagato KURIYAMA et al. “Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction.” eng. In : *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 16.1 (2010), p. 26-32. DOI : 10.1177/1076029609338047 (cf. p. 34).

- [304] Anggoro Budi HARTOPO et al. "Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction." eng. In : *Archives of medical science : AMS* 12.3 (2016), p. 529-537. DOI : 10.5114/aoms.2016.59926 (cf. p. 34).
- [305] Annika E. MICHELSEN et al. "Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state." eng. In : *Thrombosis research* 123.6 (2009), p. 881-886. DOI : 10.1016/j.thromres.2008.10.016 (cf. p. 34).
- [306] T. RAJAVASHISTH et al. "Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice." eng. In : *The Journal of clinical investigation* 101.12 (1998), p. 2702-2710. DOI : 10.1172/JCI119891 (cf. p. 34).
- [307] O. P. BARRY et al. "Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles." eng. In : *The Journal of clinical investigation* 102.1 (1998), p. 136-144. DOI : 10.1172/JCI2592 (cf. p. 34).
- [308] Sebastian F. MAUSE et al. "Platelet microparticles : a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium." eng. In : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25.7 (2005), p. 1512-1518. DOI : 10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37 (cf. p. 34).
- [309] Benoit LAFFONT et al. "Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function." eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 115.2 (2016), p. 311-323. DOI : 10.1160/TH15-05-0389 (cf. p. 34, 59, 76, 86).
- [310] Olof GIDLÖF et al. "Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression." eng. In : *Blood* 121.19 (2013), 3908-17, S1-26. DOI : 10.1182/blood-2012-10-461798 (cf. p. 34).
- [311] J. G. REN et al. "Elevated Level of Circulating Platelet-derived Microparticles in Oral Cancer." eng. In : *Journal of dental research* 95.1 (2016), p. 87-93. DOI : 10.1177/0022034515592593 (cf. p. 34).
- [312] Violetta DYMICKA-PIEKARSKA et al. "Platelet-Derived Microparticles in Patients with Colorectal Cancer". In : *Journal of Cancer Therapy* 03.06 (2012), p. 898-901. DOI : 10.4236/jct.2012.326115 (cf. p. 34).
- [313] Bettina TOTTH et al. "Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients." eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 100.4 (2008), p. 663-669 (cf. p. 34).
- [314] Hyun Kyung KIM et al. "Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro." eng. In : *British journal of haematology* 124.3 (2004), p. 376-384. DOI : 10.1046/j.1365-2141.2003.04773.x (cf. p. 35).

- [315] Alexander BRILL et al. “Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization.” eng. In : *Cardiovascular research* 67.1 (2005), p. 30-38. DOI : 10.1016/j.cardiores.2005.04.007 (cf. p. 35).
- [316] S. B. FORLOW et al. “Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow.” eng. In : *Blood* 95.4 (2000), p. 1317-1323 (cf. p. 35).
- [317] Sip DINKLA et al. “Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin.” eng. In : *Blood* 127.16 (2016), p. 1976-1986. DOI : 10.1182/blood-2015-04-640300 (cf. p. 35).
- [318] Jaime PEREIRA et al. “Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state.” eng. In : *Thrombosis and haemostasis* 95.1 (2006), p. 94-99 (cf. p. 35).
- [319] Jérémie SELLAM et al. “Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren’s syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 11.5 (2009), R156. DOI : 10.1186/ar2833 (cf. p. 35).
- [320] Christoffer T. NIELSEN et al. “Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 63.10 (2011), p. 3067-3077. DOI : 10.1002/art.30499 (cf. p. 35).
- [321] Paul R. FORTIN et al. “Distinct Subtypes of Microparticle-containing Immune Complexes Are Associated with Disease Activity, Damage, and Carotid Intima-media Thickness in Systemic Lupus Erythematosus.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 43.11 (2016), p. 2019-2025. DOI : 10.3899/jrheum.160050 (cf. p. 35).
- [322] E. A. J. KNIJFF-DUTMER et al. “Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 46.6 (2002), p. 1498-1503. DOI : 10.1002/art.10312 (cf. p. 35, 76).
- [323] Bence GYÖRGY et al. “Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases.” eng. In : *PloS one* 7.11 (2012), e49726. DOI : 10.1371/journal.pone.0049726 (cf. p. 36, 76, 84).
- [324] Eric BOILARD et al. “Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production.” eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 327.5965 (2010), p. 580-583. DOI : 10.1126/science.1181928 (cf. p. 36, 53, 75, 76, 84).
- [325] Catalina BURBANO et al. “Extracellular vesicles are associated with the systemic inflammation of patients with seropositive rheumatoid arthritis.” eng. In : *Scientific reports* 8.1 (2018), p. 17917. DOI : 10.1038/s41598-018-36335-x (cf. p. 36, 76).

- [326] Imke ALBRECHT et Gerhard CHRISTOFORI. “Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer.” eng. In : *The International journal of developmental biology* 55.4-5 (2011), p. 483-494. DOI : [10.1387/ijdb.103226ia](https://doi.org/10.1387/ijdb.103226ia) (cf. p. 39, 40, 42).
- [327] Gasparo. ASELLI. *De lactibus sive lacteis venis quarto vasorum mesaraicorum genere*. 1628 (cf. p. 39).
- [328] Elisabetta DEJANA et al. “Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees.” eng. In : *Cell and tissue research* 335.1 (2009), p. 17-25. DOI : [10.1007/s00441-008-0694-5](https://doi.org/10.1007/s00441-008-0694-5) (cf. p. 40).
- [329] Carla DANUSSI et al. “Emilin1 deficiency causes structural and functional defects of lymphatic vasculature.” eng. In : *Molecular and cellular biology* 28.12 (2008), p. 4026-4039. DOI : [10.1128/MCB.02062-07](https://doi.org/10.1128/MCB.02062-07) (cf. p. 40).
- [330] Osamu OHTANI et Yuko OHTANI. “Organization and developmental aspects of lymphatic vessels.” eng. In : *Archives of histology and cytology* 71.1 (2008), p. 1-22 (cf. p. 41).
- [331] H. MISLIN. “Experimental detection of autochthonous automatism of lymph vessels.” ger. In : *Experientia* 17 (1961), p. 29-30. DOI : [10.1007/bf02157935](https://doi.org/10.1007/bf02157935) (cf. p. 41).
- [332] M. J. CROWE et al. “Co-ordination of contractile activity in guinea-pig mesenteric lymphatics.” eng. In : *The Journal of physiology* 500 (Pt 1) (1997), p. 235-244. DOI : [10.1113/jphysiol.1997.sp022013](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022013) (cf. p. 41).
- [333] D. C. ZAWIEJA et al. “Distribution, propagation, and coordination of contractile activity in lymphatics.” eng. In : *The American journal of physiology* 264.4 Pt 2 (1993), H1283-H1291. DOI : [10.1152/ajpheart.1993.264.4.H1283](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.4.H1283) (cf. p. 41).
- [334] N. G. MCHALE et M. K. MEHARG. “Co-ordination of pumping in isolated bovine lymphatic vessels.” eng. In : *The Journal of physiology* 450 (1992), p. 503-512. DOI : [10.1113/jphysiol.1992.sp019139](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019139) (cf. p. 41).
- [335] N. G. MCHALE et I. C. RODDIE. “The effect of transmural pressure on pumping activity in isolated bovine lymphatic vessels.” eng. In : *The Journal of physiology* 261.2 (1976), p. 255-269. DOI : [10.1113/jphysiol.1976.sp011557](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011557) (cf. p. 41).
- [336] A. A. GASHEV. “The mechanism of the formation of a reverse fluid filling in the lymphangions.” rus. In : *Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni I. M. Sechenova* 77.7 (1991), p. 63-69 (cf. p. 41).
- [337] J. R. LEVICK. “Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors.” eng. In : *Experimental physiology* 76.6 (1991), p. 825-857 (cf. p. 42).
- [338] J. B. SMITH et al. “The traffic of cells through tissues : a study of peripheral lymph in sheep.” eng. In : *Journal of anatomy* 107.Pt 1 (1970), p. 87-100 (cf. p. 42, 43).

- [339] C. R. MACKAY et al. "Lymphocyte subsets show marked differences in their distribution between blood and the afferent and efferent lymph of peripheral lymph nodes." eng. In : *The Journal of experimental medicine* 167.6 (1988), p. 1755-1765. DOI : 10.1084/jem.167.6.1755 (cf. p. 42).
- [340] John E. SKANDALAKIS et al. "Anatomy of the lymphatics." eng. In : *Surgical oncology clinics of North America* 16.1 (2007), p. 1-16. DOI : 10.1016/j.soc.2006.10.006 (cf. p. 42).
- [341] Oren W. JOHNSON et al. "The thoracic duct : clinical importance, anatomic variation, imaging, and embolization." eng. In : *European radiology* 26.8 (2016), p. 2482-2493. DOI : 10.1007/s00330-015-4112-6 (cf. p. 43).
- [342] C. R. MACKAY et al. "Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation." eng. In : *The Journal of experimental medicine* 171.3 (1990), p. 801-817. DOI : 10.1084/jem.171.3.801 (cf. p. 43).
- [343] Skye A. GEHERIN et al. "The skin, a novel niche for recirculating B cells." eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188.12 (2012), p. 6027-6035. DOI : 10.4049/jimmunol.1102639 (cf. p. 43).
- [344] H. A. DREXHAGE et al. "A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell." eng. In : *Cell and tissue research* 202.3 (1979), p. 407-430. DOI : 10.1007/bf00220434 (cf. p. 43).
- [345] C. J. SPRY et al. "Large mononuclear (veiled) cells like 'Ia-like' membrane antigens in human afferent lymph." eng. In : *Clinical and experimental immunology* 39.3 (1980), p. 750-755 (cf. p. 43).
- [346] J. N. BENOIT et al. "Characterization of intact mesenteric lymphatic pump and its responsiveness to acute edemagenic stress." eng. In : *The American journal of physiology* 257.6 Pt 2 (1989), H2059-H2069. DOI : 10.1152/ajpheart.1989.257.6.H2059 (cf. p. 44).
- [347] L. NESIS et E. E. STERNS. "Lymph flow from the colon under varying conditions." eng. In : *Annals of surgery* 177.4 (1973), p. 422-427. DOI : 10.1097/00000658-197304000-00007 (cf. p. 44).
- [348] Pier-Anne LACHANCE et al. "Lymphatic vascular response to acute inflammation." eng. In : *PloS one* 8.9 (2013), e76078. DOI : 10.1371/journal.pone.0076078 (cf. p. 44).
- [349] Walter CROMER et al. "Colonic Insult Impairs Lymph Flow, Increases Cellular Content of the Lymph, Alters Local Lymphatic Microenvironment, and Leads to Sustained Inflammation in the Rat Ileum." eng. In : *Inflammatory bowel diseases* 21.7 (2015), p. 1553-1563. DOI : 10.1097/MIB.0000000000000402 (cf. p. 44).

- [350] Sebastian F. SCHOPPMANN et al. “Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis.” eng. In : *The American journal of pathology* 161.3 (2002), p. 947-956. DOI : [10.1016/S0002-9440\(10\)64255-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64255-1) (cf. p. 44).
- [351] Kosuke WATARI et al. “Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis : Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kappaB activation.” eng. In : *Biochemical and biophysical research communications* 377.3 (2008), p. 826-831. DOI : [10.1016/j.bbrc.2008.10.077](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.077) (cf. p. 44).
- [352] Kazuichi MARUYAMA et al. “Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 115.9 (2005), p. 2363-2372. DOI : [10.1172/JCI23874](https://doi.org/10.1172/JCI23874) (cf. p. 44).
- [353] Francis T. HALL et al. “Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma.” eng. In : *Archives of otolaryngology-head & neck surgery* 129.7 (2003), p. 716-719. DOI : [10.1001/archotol.129.7.716](https://doi.org/10.1001/archotol.129.7.716) (cf. p. 44, 45).
- [354] Beatrice D. PULLINGER et H W. FLOREY. “Proliferation of lymphatics in inflammation”. eng. In : *The Journal of Pathology and Bacteriology* 45 (juin 1937), p. 157-170. DOI : [10.1002/path.1700450115](https://doi.org/10.1002/path.1700450115) (cf. p. 44).
- [355] Peter BALUK et al. “Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 115.2 (2005), p. 247-257. DOI : [10.1172/JCI22037](https://doi.org/10.1172/JCI22037) (cf. p. 44).
- [356] Kentaro KAJIYA et al. “Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis.” eng. In : *The Journal of investigative dermatology* 129.5 (2009), p. 1292-1298. DOI : [10.1038/jid.2008.351](https://doi.org/10.1038/jid.2008.351) (cf. p. 44).
- [357] Donscho KERJASCHKI et al. “Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates.” eng. In : *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15.3 (2004), p. 603-612. DOI : [10.1097/01.asn.0000113316.52371.2e](https://doi.org/10.1097/01.asn.0000113316.52371.2e) (cf. p. 45).
- [358] Lu CHEN et al. “Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity.” eng. In : *Nature medicine* 10.8 (2004), p. 813-815. DOI : [10.1038/nm1078](https://doi.org/10.1038/nm1078) (cf. p. 45).
- [359] Antti I. NYKÄNEN et al. “Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts.” eng. In : *Circulation* 121.12 (2010), p. 1413-1422. DOI : [10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910703](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910703) (cf. p. 45).

- [360] Nigel J. P. BEASLEY et al. "Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer." eng. In : *Cancer research* 62.5 (2002), p. 1315-1320 (cf. p. 45).
- [361] M. S. PEPPER. "Lymphangiogenesis and tumor metastasis : myth or reality ?" eng. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7.3 (2001), p. 462-468 (cf. p. 45).
- [362] Jonathan P. SLEEMAN et Wilko THIELE. "Tumor metastasis and the lymphatic vasculature." eng. In : *International journal of cancer* 125.12 (2009), p. 2747-2756. DOI : 10.1002/ijc.24702 (cf. p. 45).
- [363] S. A. STACKER et al. "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." eng. In : *Nature medicine* 7.2 (2001), p. 186-191. DOI : 10.1038/84635 (cf. p. 45).
- [364] S. J. MANDRIOTA et al. "Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis." eng. In : *The EMBO journal* 20.4 (2001), p. 672-682. DOI : 10.1093/emboj/20.4.672 (cf. p. 45).
- [365] M. SKOBE et al. "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis." eng. In : *Nature medicine* 7.2 (2001), p. 192-198. DOI : 10.1038/84643 (cf. p. 45).
- [366] Timothy P. PADERA et al. "Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics." eng. In : *Science (New York, N.Y.)* 296.5574 (2002), p. 1883-1886. DOI : 10.1126/science.1071420 (cf. p. 45).
- [367] Anton GISTERÅ et Göran K. HANSSON. "The immunology of atherosclerosis." eng. In : *Nature reviews. Nephrology* 13.6 (2017), p. 368-380. DOI : 10.1038/nrneph.2017.51 (cf. p. 46).
- [368] K. SKALEN et al. "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis". In : *Nature* 417.6890 (2002), p. 750-754 (cf. p. 46).
- [369] H. LI et al. "An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium". In : *Arterioscler. Thromb.* 13.2 (1993), p. 197-204 (cf. p. 46).
- [370] S. D. CUSHING et al. "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells". In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87.13 (1990), p. 5134-5138 (cf. p. 46).
- [371] K. J. MOORE et al. "Macrophages in atherosclerosis : a dynamic balance". In : *Nat. Rev. Immunol.* 13.10 (2013), p. 709-721 (cf. p. 46).
- [372] I. TABAS. "Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis : the importance of lesion stage and phagocytic efficiency". In : *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25.11 (2005), p. 2255-2264 (cf. p. 46).

- [373] J. F. BENTZON et al. “Mechanisms of plaque formation and rupture”. In : *Circ. Res.* 114.12 (2014), p. 1852-1866 (cf. p. 46).
- [374] G. HOGGAN et F. E. HOGGAN. “The Lymphatics of the Walls of the Larger Blood-Vessels and Lymphatics.” eng. In : *Journal of anatomy and physiology* 17.Pt 1 (1882), p. 1-23 (cf. p. 46).
- [375] Ivana KHOLOVÁ et al. “Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions.” eng. In : *European journal of clinical investigation* 41.5 (2011), p. 487-497. DOI : 10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x (cf. p. 46).
- [376] O. ELISKA et al. “The absence of lymphatics in normal and atherosclerotic coronary arteries in man : a morphologic study.” eng. In : *Lymphology* 39.2 (2006), p. 76-83 (cf. p. 46, 58).
- [377] Toshiaki NAKANO et al. “Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries.” eng. In : *Human pathology* 36.4 (2005), p. 330-340. DOI : 10.1016/j.humpath.2005.01.001 (cf. p. 46).
- [378] Issa KUTKUT et al. “Lymphatic vessels : an emerging actor in atherosclerotic plaque development.” eng. In : *European journal of clinical investigation* 45.1 (2015), p. 100-108. DOI : 10.1111/eci.12372 (cf. p. 46).
- [379] Katarzyna DROZDZ et al. “Adventitial lymphatics of internal carotid artery in healthy and atherosclerotic vessels.” eng. In : *Folia histochemica et cytobiologica* 46.4 (2008), p. 433-436. DOI : 10.2478/v10042-008-0083-7 (cf. p. 47).
- [380] Catherine MARTEL et al. “Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 123.4 (2013), p. 1571-1579. DOI : 10.1172/JCI63685 (cf. p. 47, 48, 58, 63, 76).
- [381] Xinsheng XU et al. “Aortic adventitial angiogenesis and lymphangiogenesis promote intimal inflammation and hyperplasia.” eng. In : *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 18.5 (2009), p. 269-278. DOI : 10.1016/j.carpath.2008.07.004 (cf. p. 47).
- [382] G. L. NÁDASY et al. “Effect of two week lymphatic occlusion on the mechanical properties of dog femoral arteries.” eng. In : *Atherosclerosis* 78.2-3 (1989), p. 251-260. DOI : 10.1016/0021-9150(89)90231-1 (cf. p. 47).
- [383] F. SOLTI et al. “Coronary arteriopathy after lymphatic blockade : an experimental study in dogs.” eng. In : *Lymphology* 27.4 (1994), p. 173-180 (cf. p. 47).

- [384] Mahdi TAHER et al. “Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis : a regulatory role for soluble VEGF receptor 2.” eng. In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30.7 (2016), p. 2490-2499. DOI : 10.1096/fj.201500112 (cf. p. 47).
- [385] Andreea MILASAN et al. “Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr^{-/-} mice.” eng. In : *Atherosclerosis* 283 (2019), p. 106-119. DOI : 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.031 (cf. p. 47, 76).
- [386] Gwendalyn J. RANDOLPH et Norman E. MILLER. “Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 124.3 (2014), p. 929-935. DOI : 10.1172/JCI71610 (cf. p. 48).
- [387] C. K. GLASS et J. L. WITZTUM. “Atherosclerosis. the road ahead.” eng. In : *Cell* 104.4 (2001), p. 503-516. DOI : 10.1016/s0092-8674(01)00238-0 (cf. p. 48).
- [388] Jaime LLODRÁ et al. “Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.32 (2004), p. 11779-11784. DOI : 10.1073/pnas.0403259101 (cf. p. 48, 49).
- [389] Eugene TROGAN et al. “Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.10 (2006), p. 3781-3786. DOI : 10.1073/pnas.0511043103 (cf. p. 49).
- [390] Catherine M. CARD et al. “Emerging roles of lymphatic endothelium in regulating adaptive immunity.” eng. In : *The Journal of clinical investigation* 124.3 (2014), p. 943-952. DOI : 10.1172/JCI73316 (cf. p. 49).
- [391] Timo RADEMAKERS et al. “Adventitial lymphatic capillary expansion impacts on plaque T cell accumulation in atherosclerosis.” eng. In : *Scientific reports* 7 (2017), p. 45263. DOI : 10.1038/srep45263 (cf. p. 49).
- [392] Yong-Min HUH et al. “The role of popliteal lymph nodes in differentiating rheumatoid arthritis from osteoarthritis by using CE 3D FSPGR MR imaging : relationship of the inflamed synovial volume.” eng. In : *Korean journal of radiology* 6.2 (2005), p. 117-124. DOI : 10.3348/kjr.2005.6.2.117 (cf. p. 50).
- [393] B. GRILLET et J. DEQUEKER. “Rheumatoid lymphedema.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 14.6 (1987), p. 1095-1097 (cf. p. 50).
- [394] M. I. JAYSON et al. “Lymphatic clearance rates in rheumatoid arthritis.” eng. In : *Annals of the rheumatic diseases* 30.6 (1971), p. 638-639. DOI : 10.1136/ard.30.6.638 (cf. p. 50).

- [395] W. L. OLSZEWSKI et al. “Lymph draining from foot joints in rheumatoid arthritis provides insight into local cytokine and chemokine production and transport to lymph nodes.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 44.3 (2001), p. 541-549. DOI : 10.1002/1529-0131(200103)44:3<541::AID-ANR102>3.0.CO;2-6 (cf. p. 50, 76).
- [396] Koichi WAUKE et al. “Expression and localization of vascular endothelial growth factor-C in rheumatoid arthritis synovial tissue.” eng. In : *The Journal of rheumatology* 29.1 (2002), p. 34-38 (cf. p. 50).
- [397] Qian ZHANG et al. “Increased lymphangiogenesis in joints of mice with inflammatory arthritis.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 9.6 (2007), R118. DOI : 10.1186/ar2326 (cf. p. 51).
- [398] Ping LI et al. “Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 50.1 (2004), p. 265-276. DOI : 10.1002/art.11419 (cf. p. 51).
- [399] Quan ZHOU et al. “Near-infrared lymphatic imaging demonstrates the dynamics of lymph flow and lymphangiogenesis during the acute versus chronic phases of arthritis in mice.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 62.7 (2010), p. 1881-1889. DOI : 10.1002/art.27464 (cf. p. 51).
- [400] Jie LI et al. “Expanded CD23(+)/CD21(hi) B cells in inflamed lymph nodes are associated with the onset of inflammatory-erosive arthritis in TNF-transgenic mice and are targets of anti-CD20 therapy.” eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.11 (2010), p. 6142-6150. DOI : 10.4049/jimmuno1.0903489 (cf. p. 51, 123, 124).
- [401] Jie LI et al. “Efficacy of B cell depletion therapy for murine joint arthritis flare is associated with increased lymphatic flow.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 65.1 (2013), p. 130-138. DOI : 10.1002/art.37709 (cf. p. 52, 86).
- [402] Geert W. SCHMID-SCHÖNBEIN. “Nitric oxide (NO) side of lymphatic flow and immune surveillance.” eng. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.1 (2012), p. 3-4. DOI : 10.1073/pnas.1117710109 (cf. p. 52).
- [403] Qianqian LIANG et al. “Lymphatic endothelial cells efferent to inflamed joints produce iNOS and inhibit lymphatic vessel contraction and drainage in TNF-induced arthritis in mice.” eng. In : *Arthritis research & therapy* 18 (2016), p. 62. DOI : 10.1186/s13075-016-0963-8 (cf. p. 52).

- [404] Ruolin GUO et al. “Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 60.9 (2009), p. 2666-2676. DOI : 10.1002/art.24764 (cf. p. 52).
- [405] Quan ZHOU et al. “Vascular endothelial growth factor C attenuates joint damage in chronic inflammatory arthritis by accelerating local lymphatic drainage in mice.” eng. In : *Arthritis and rheumatism* 63.8 (2011), p. 2318-2328. DOI : 10.1002/art.30421 (cf. p. 52, 76).
- [406] Echoe M. BOUTA et al. “Targeting lymphatic function as a novel therapeutic intervention for rheumatoid arthritis.” eng. In : *Nature reviews. Rheumatology* 14.2 (2018), p. 94-106. DOI : 10.1038/nrrheum.2017.205 (cf. p. 52, 76, 86, 125).
- [407] H. TILLMANS. *Arch. f. mikr. Anat.* T. 12. 649. 1876 (cf. p. 53).
- [408] W. BAUER et al. “THE MANNER OF REMOVAL OF PROTEINS FROM NORMAL JOINTS”. In : *J. Exp. Med.* 57.3 (1933), p. 419-433 (cf. p. 53).
- [409] T. TAMMELA et K. ALITALO. “Lymphangiogenesis : Molecular mechanisms and future promise”. In : *Cell* 140.4 (2010), p. 460-476 (cf. p. 58, 63).
- [410] V. ZOLLA et al. “Aging-related anatomical and biochemical changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance”. In : *Aging Cell* 14.4 (2015), p. 582-594 (cf. p. 58).
- [411] K. S. BLUM et al. “Chronic high-fat diet impairs collecting lymphatic vessel function in mice”. In : *PLoS ONE* 9.4 (2014), e94713 (cf. p. 58).
- [412] T. VUORIO et al. “Lymphatic vessel insufficiency in hypercholesterolemic mice alters lipoprotein levels and promotes atherogenesis”. In : *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34.6 (2014), p. 1162-1170 (cf. p. 58).
- [413] V. ANGELI et al. “Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization”. In : *Immunity* 21.4 (2004), p. 561-574 (cf. p. 58).
- [414] A. J. MILLER et al. “The role of the lymphatic system in coronary atherosclerosis”. In : *Med. Hypotheses* 37.1 (1992), p. 31-36 (cf. p. 58).
- [415] J. S. TORRISI et al. “Inhibition of Inflammation and iNOS Improves Lymphatic Function in Obesity”. In : *Sci Rep* 6 (2016), p. 19817 (cf. p. 58, 63).
- [416] P. BALUK et al. “Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels”. In : *J. Exp. Med.* 204.10 (2007), p. 2349-2362 (cf. p. 58).
- [417] D. ZAWIEJA. “Lymphatic biology and the microcirculation : past, present and future”. In : *Microcirculation* 12.1 (2005), p. 141-150 (cf. p. 58).

- [418] P. R. HESS et al. “Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life”. In : *J. Clin. Invest.* 124.1 (2014), p. 273-284 (cf. p. 58, 85).
- [419] M. ZALESKA et al. “Signaling proteins are represented in tissue fluid/lymph from soft tissues of normal human legs at concentrations different from serum”. In : *Lymphat Res Biol* 11.4 (2013), p. 203-210 (cf. p. 58).
- [420] B. GYÖRGY et al. “Membrane vesicles, current state-of-the-art : emerging role of extracellular vesicles”. In : *Cell. Mol. Life Sci.* 68.16 (2011), p. 2667-2688 (cf. p. 58).
- [421] M. COLOMBO et al. “Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles”. In : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014), p. 255-289 (cf. p. 58).
- [422] M. DIAMANT et al. “Cellular microparticles : new players in the field of vascular disease?” In : *Eur. J. Clin. Invest.* 34.6 (2004), p. 392-401 (cf. p. 58).
- [423] Edit I. BUZÁS et al. “Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases”. In : *Nat Rev Rheumatol* 10.6 (2014), p. 356-364 (cf. p. 58).
- [424] E. BOILARD et al. “Platelets : active players in the pathogenesis of arthritis and SLE”. In : *Nat Rev Rheumatol* 8.9 (2012), p. 534-542 (cf. p. 58, 81, 84).
- [425] X. LOYER et al. “Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases”. In : *Circ. Res.* 114.2 (2014), p. 345-353 (cf. p. 58).
- [426] E. van der POL et al. “Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles”. In : *J. Thromb. Haemost.* 14.1 (2016), p. 48-56 (cf. p. 58).
- [427] E. BOILARD et al. “The diversity of platelet microparticles”. In : *Curr. Opin. Hematol.* 22.5 (2015), p. 437-444 (cf. p. 59, 65).
- [428] J. M. PITT et al. “Extracellular vesicles : masters of intercellular communication and potential clinical interventions”. In : *J. Clin. Invest.* 126.4 (2016), p. 1139-1143 (cf. p. 59).
- [429] S. SRINIVASAN et al. “Lymphatic transport of exosomes as a rapid route of information dissemination to the lymph node”. In : *Sci Rep* 6 (2016), p. 24436 (cf. p. 59).
- [430] W. L. CHANDLER. “Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry”. In : *Cytometry B Clin Cytom* 90.4 (juil. 2016), p. 326-336 (cf. p. 63).
- [431] P. LIBBY et al. “Inflammation and atherosclerosis”. In : *Circulation* 105.9 (2002), p. 1135-1143 (cf. p. 63).
- [432] A. S. GREENBERG et M. S. OBIN. “Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism”. In : *Am. J. Clin. Nutr.* 83.2 (2006), 461S-465S (cf. p. 63).

- [433] C. H. SLOOP et al. "Lipoproteins and apolipoproteins in peripheral lymph of normal and cholesterol-fed dogs". In : *Atherosclerosis* 49.1 (1983), p. 9-21 (cf. p. 63).
- [434] C. H. SLOOP et al. "Characterization of dog peripheral lymph lipoproteins : the presence of a disc-shaped "nascent" high density lipoprotein". In : *J. Lipid Res.* 24.11 (1983), p. 1429-1440 (cf. p. 63).
- [435] A. JUNGEL et al. "Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1". In : *Arthritis Rheum.* 56.11 (2007), p. 3564-3574 (cf. p. 65).
- [436] D. A. CHISTIakov et al. "Extracellular vesicles and atherosclerotic disease". In : *Cell. Mol. Life Sci.* 72.14 (2015), p. 2697-2708 (cf. p. 65).
- [437] B. SZOTOWSKI et al. "Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells". In : *Cardiovasc. Res.* 73.4 (2007), p. 806-812 (cf. p. 65).
- [438] J. LOTVALL et al. "Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions : a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles". In : *J Extracell Vesicles* 3 (2014), p. 26913 (cf. p. 65).
- [439] L. A. MULCAHY et al. "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake". In : *J Extracell Vesicles* 3 (2014) (cf. p. 65).
- [440] Josef S SMOLEN et al. "Rheumatoid arthritis". In : *The Lancet* 6736.16 (2016), p. 1-16. DOI : 10.1016/S0140-6736(16)30173-8 (cf. p. 75).
- [441] H. L. WRIGHT et al. "The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis". In : *Nat Rev Rheumatol* 10.10 (2014), p. 593-601 (cf. p. 75).
- [442] D. A. MANCARDI et al. "Cutting Edge : The murine high-affinity IgG receptor FcγRIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis". In : *J. Immunol.* 186.4 (2011), p. 1899-1903 (cf. p. 75).
- [443] D. KYBURZ et al. "The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis". In : *Arthritis Rheum.* 43.11 (2000), p. 2571-2577 (cf. p. 75).
- [444] Rick KAPUR et al. "Nouvelle cuisine : platelets served with inflammation." eng. In : *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194.12 (2015), p. 5579-5587. DOI : 10.4049/jimmunol.1500259 (cf. p. 75).
- [445] F. WANG et al. "The significance of platelet activation in rheumatoid arthritis". In : *Clin. Rheumatol.* 26.5 (2007), p. 768-771 (cf. p. 75).
- [446] P. J. MOTT et A. H. LAZARUS. "CD44 antibodies and immune thrombocytopenia in the amelioration of murine inflammatory arthritis". In : *PLoS ONE* 8.6 (2013), e65805 (cf. p. 75).

- [447] S. I. ROSENFELD et al. “Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes”. In : *J. Clin. Invest.* 76.6 (1985), p. 2317-2322 (cf. p. 75).
- [448] C. L. ANDERSON et R. J. LOONE. “Human leukocyte IgG Fc receptors”. In : *Immunol. Today* 7.9 (1986), p. 264-266 (cf. p. 75).
- [449] S. BOURNAZOS et J. V. RAVETCH. “Fc γ receptor pathways during active and passive immunization”. In : *Immunol. Rev.* 268.1 (2015), p. 88-103 (cf. p. 75).
- [450] L. ROBLES-CARRILLO et al. “Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice”. In : *J. Immunol.* 185.3 (2010), p. 1577-1583 (cf. p. 75).
- [451] H. BEUTIER et al. “Platelets expressing IgG receptor Fc γ RIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis”. In : *Sci Immunol* 3.22 (avr. 2018) (cf. p. 75).
- [452] A. AMIRKHOSRAVI et al. “CalDAG-GEFI deficiency protects mice from Fc γ RIIa-mediated thrombotic thrombocytopenia induced by CD40L and β 2GPI immune complexes”. In : *J. Thromb. Haemost.* 12.12 (2014), p. 2113-2119 (cf. p. 75).
- [453] N. C. Van de VELDE et al. “Transgenic mice expressing human Fc γ RIIa have enhanced sensitivity to induced autoimmune arthritis as well as elevated Th17 cells”. In : *Immunol. Lett.* 130.1-2 (2010), p. 82-88 (cf. p. 75).
- [454] C. TAN SARDJONO et al. “Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fc γ RIIa-transgenic mice”. In : *Arthritis Rheum.* 52.10 (2005), p. 3220-3229 (cf. p. 75).
- [455] A. BOBRIE et al. “Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation”. In : *J Extracell Vesicles* 1 (2012) (cf. p. 75).
- [456] V. Viñuela BERNI et al. “Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease”. In : *Clin. Exp. Immunol.* 180.3 (2015), p. 442-451 (cf. p. 76).
- [457] Florence R. SABIN. “On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig”. In : *American Journal of Anatomy* 1.3 (1902), p. 367-389. DOI : 10.1002/aja.1000010310. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/aja.1000010310> (cf. p. 76).
- [458] G. OLIVER et K. ALITALO. “The lymphatic vasculature : recent progress and paradigms”. In : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005), p. 457-483 (cf. p. 76).
- [459] J. L. GOWANS. “The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat”. In : *J. Physiol. (Lond.)* 146.1 (1959), p. 54-69 (cf. p. 76).

- [460] H. XU et al. “Distribution of lymphatic vessels in normal and arthritic human synovial tissues”. In : *Ann. Rheum. Dis.* 62.12 (2003), p. 1227-1229 (cf. p. 76).
- [461] K. M. HODIVALA-DILKE et al. “Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival”. In : *J. Clin. Invest.* 103.2 (1999), p. 229-238 (cf. p. 77).
- [462] H. ZHI et al. “Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo”. In : *Blood* 121.10 (2013), p. 1858-1867 (cf. p. 77).
- [463] H. HASUWA et al. “Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo”. In : *Exp. Anim.* 59.1 (2010), p. 105-107 (cf. p. 77, 81).
- [464] R CORE TEAM. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2019 (cf. p. 78).
- [465] A. R. BRISSON et al. “Extracellular vesicles from activated platelets : a semi-quantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study”. In : *Platelets* 28.3 (2017), p. 263-271 (cf. p. 80, 119).
- [466] H. PLE et al. “The repertoire and features of human platelet microRNAs”. In : *PLoS ONE* 7.12 (2012), e50746 (cf. p. 80).
- [467] P. FANTL et J. F. NELSON. “Coagulation in lymph”. In : *J. Physiol. (Lond.)* 122.1 (1953), p. 33-37 (cf. p. 81, 86).
- [468] J. R. LEVICK. “Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins”. In : *Arthritis Rheum.* 24.12 (1981), p. 1550-1560 (cf. p. 81, 82).
- [469] G. MAJNO et G. E. PALADE. “Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability : an electron microscopic study”. In : *J Biophys Biochem Cytol* 11 (1961), p. 571-605 (cf. p. 82).
- [470] E. KOLACZKOWSKA et P. KUBES. “Neutrophil recruitment and function in health and inflammation”. In : *Nat. Rev. Immunol.* 13.3 (2013), p. 159-175 (cf. p. 84).
- [471] R. EHLERS et al. “Targeting platelet-leukocyte interactions : identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ib α ”. In : *J. Exp. Med.* 198.7 (2003), p. 1077-1088 (cf. p. 84).
- [472] B. HO-TIN-NOE et al. “Platelets and vascular integrity : how platelets prevent bleeding in inflammation”. In : *Blood* 131.3 (jan. 2018), p. 277-288 (cf. p. 84).
- [473] F. GAERTNER et al. “Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria”. In : *Cell* 171.6 (2017), p. 1368-1382 (cf. p. 84).
- [474] E. SEFIK et al. “MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ regulatory T cells”. In : *Science* 349.6251 (2015), p. 993-997 (cf. p. 85).

- [475] H. J. WU et al. “Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells”. In : *Immunity* 32.6 (2010), p. 815-827 (cf. p. 85).
- [476] B. BOYLAN et al. “Identification of FcγRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets”. In : *Blood* 112.7 (2008), p. 2780-2786 (cf. p. 85).
- [477] J. W. SEMPLE et al. “Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura : relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity”. In : *Blood* 87.10 (1996), p. 4245-4254 (cf. p. 85).
- [478] J. D. ARROYO et al. “Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma”. In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108.12 (2011), p. 5003-5008 (cf. p. 85).
- [479] G. J. MILLER et al. “Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph”. In : *Thromb. Haemost.* 83.3 (2000), p. 427-432 (cf. p. 86).
- [480] C. TRIPISCIANO et al. “Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation : Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin”. In : *Sci Rep* 7.1 (juil. 2017), p. 6522 (cf. p. 86).
- [481] Y. HISADA et N. MACKMAN. “Measurement of tissue factor activity in extracellular vesicles from human plasma samples”. In : *Res Pract Thromb Haemost* 3.1 (2019), p. 44-48 (cf. p. 86).
- [482] M. A. SWARTZ. “The physiology of the lymphatic system”. In : *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50.1-2 (2001), p. 3-20 (cf. p. 86).
- [483] Q. MA et al. “Unexpected contribution of lymphatic vessels to promotion of distant metastatic tumor spread”. In : *Sci Adv* 4.8 (août 2018), eaat4758 (cf. p. 86).
- [484] S. PODGRABINSKA et M. SKOBE. “Role of lymphatic vasculature in regional and distant metastases”. In : *Microvasc. Res.* 95 (2014), p. 46-52 (cf. p. 86).
- [485] M. T. NURMOHAMED et al. “Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases”. In : *Nat Rev Rheumatol* 11.12 (2015), p. 693-704 (cf. p. 87).
- [486] P. MONACH et al. “The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis : theory and practice”. In : *Methods Mol. Med.* 136 (2007), p. 269-282 (cf. p. 110).
- [487] A. BENMOUSSA et al. “Commercial Dairy Cow Milk microRNAs Resist Digestion under Simulated Gastrointestinal Tract Conditions”. In : *J. Nutr.* 146.11 (2016), p. 2206-2215 (cf. p. 111).
- [488] Y. RU et al. “The multiMiR R package and database : integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations”. In : *Nucleic Acids Res.* 42.17 (2014), e133 (cf. p. 111).

- [489] M. D. PARASKEVOPOULOU et al. “DIANA-microT web server v5.0 : service integration into miRNA functional analysis workflows”. In : *Nucleic Acids Res.* 41.Web Server issue (2013), W169-173 (cf. p. 111).
- [490] G. YU et al. “clusterProfiler : an R package for comparing biological themes among gene clusters”. In : *OMICS* 16.5 (2012), p. 284-287 (cf. p. 111).
- [491] M. KANEHISA et al. “KEGG as a reference resource for gene and protein annotation”. In : *Nucleic Acids Res.* 44.D1 (2016), p. D457-462 (cf. p. 111).
- [492] J. B. DIXON. “Lymphatic lipid transport : sewer or subway?” In : *Trends Endocrinol. Metab.* 21.8 (2010), p. 480-487 (cf. p. 117).
- [493] M. NAGAI et al. “Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses”. In : *Cell* 178.5 (2019), p. 1072-1087 (cf. p. 117).
- [494] D. L. M. RUPERT et al. “Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples”. In : *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861.1 Pt A (2017), p. 3164-3179 (cf. p. 118).
- [495] J. G. CYSTER et S. R. SCHWAB. “Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs”. In : *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012), p. 69-94 (cf. p. 118).
- [496] J. P. GIRARD et al. “HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes”. In : *Nat. Rev. Immunol.* 12.11 (2012), p. 762-773 (cf. p. 118).
- [497] F. BENAGLIO et al. “The draining lymph node in rheumatoid arthritis : current concepts and research perspectives”. In : *Biomed Res Int* 2015 (2015), p. 420251 (cf. p. 120, 123).
- [498] E. MASINI et al. “Platelet aggregation and histamine release by immunological stimuli”. In : *Immunopharmacology* 28.1 (1994), p. 19-29 (cf. p. 121).
- [499] G. CAMUSSI et al. “Release of platelet-activating factor and histamine. I. Effect of immune complexes, complement and neutrophils on human and rabbit mastocytes and basophils”. In : *Immunology* 33.4 (1977), p. 523-534 (cf. p. 121).
- [500] J. AMAYA-AMAYA et al. *Cardiovascular involvement in autoimmune diseases*. 2013. Chap. 38 (cf. p. 122).
- [501] T. W. KERSEY et al. “Comparison of intradermal and subcutaneous injections in lymphatic mapping”. In : *J. Surg. Res.* 96.2 (2001), p. 255-259 (cf. p. 123).
- [502] A. MILASAN et al. “Apolipoprotein A-I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependent Mechanisms in Mice”. In : *J Am Heart Assoc* 6.9 (2017) (cf. p. 124).
- [503] J. V. MICHAEL et al. “Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth”. In : *Blood* 130.5 (2017), p. 567-580 (cf. p. 125).