



**Étude du rôle extra-plaquettaire des microARN
Implication des microparticules de plaquettes dans les
communications intercellulaires**

Thèse

Benoit Laffont

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae doctor (Ph.D.)**

Québec, Canada

© Benoit Laffont, 2015

Résumé

Les plaquettes sanguines contiennent une quantité abondante et diversifiée de microARN, qui sont de petits ARN non-codants d'une vingtaine de nucléotides de long capables de réguler l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle et séquence spécifique. Suite à leur activation, les plaquettes libèrent des microparticules (MPs), qui contiennent du matériel génétique issu de leur cellule d'origine et susceptible d'être transmis à une autre cellule afin d'y exécuter une fonction biologique. Durant mes travaux de thèse, j'ai étudié le rôle extra-plaquettaire des microARN et la capacité des MPs de plaquettes à participer aux communications intercellulaires.

Les résultats que j'ai obtenus démontrent que les plaquettes activées à la thrombine libèrent la majorité de leur contenu en microARN dans les MPs, notamment miR-223. Les MPs sont internalisées par les cellules endothéliales HUVEC, et y délivrent leur contenu en miR-223. De plus, les MPs contiennent des complexes effecteurs Argonaute 2 (Ago2)•miR-223 fonctionnels et capables de réguler l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules cibles endothéliales. Enfin, miR-223 provenant des MPs est capable de réguler l'expression de deux gènes endogènes prédis pour être ciblés par miR-223 et présents dans les HUVEC, à la fois au niveau de l'ARN messager (ARNm) et de la protéine. Dans une deuxième étude, j'ai démontré que ce phénomène n'est pas exclusif aux cellules endothéliales et qu'il peut également se produire avec les macrophages primaires humains. Les MPs sont effectivement internalisées par les macrophages et y délivrent leur contenu en miR-126-3p, qui y est fonctionnel et y régule l'expression d'un gène rapporteur et de gènes endogènes. De plus, l'internalisation des MPs induit une modification du transcriptome des macrophages receveurs, avec 66 microARN et 653 ARN codants ou non codants dont les profils d'expression sont modifiés. Ces changements sont accompagnés d'une diminution de la sécrétion de cytokines et de chimiokines, et d'une augmentation de la capacité de phagocytose par les macrophages.

Mes travaux de doctorat démontrent que les microARN véhiculés par les MPs plaquettaires sont impliqués dans la reprogrammation de l'expression des gènes et des fonctions des cellules les internalisant, reflétant ainsi la complexité des communications intercellulaires.

Abstract

Blood platelets contain an abundant and diverse array of microRNAs, which are small non-coding RNAs of ~20 nucleotides involved in post-transcriptional regulation of gene expression in a sequence-specific manner. Upon activation, platelets release microparticles (MPs) containing genetic materials from their parental cells that may be transferred to, and exert potent biological effects in, recipient cells. During my PhD thesis, I studied the extra-platelet role of microRNAs, and the ability of platelet-derived MPs to mediate cell-to-cell communications.

The results that I obtained demonstrate that thrombin-activated platelets preferentially release their microRNA content in MPs, including miR-223. MPs can be internalized by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), to which they transfer their miR-223 content. Moreover, platelet MPs contain functional effector Argonaute 2 (Ago2)•miR-223 complexes that are capable of regulating expression of a reporter gene in recipient HUVEC. Finally, platelet MP-derived miR-223 could regulate expression of two endogenous genes in recipient HUVEC, both at the mRNA and protein levels. In a second study, I demonstrated that this process is not exclusive to endothelial cells, and could take place also in primary human macrophages. Following their internalization by macrophages, MPs deliver functional miR-126-3p, which regulated expression of both a reporter gene and endogenous genes. Furthermore, MP internalization modified the transcriptome of recipient macrophages, with 66 microRNAs and 464 coding and non-coding RNAs that are differentially expressed. These changes are associated with a reduced secretion of cytokines and chemokines, and a marked increase in the phagocytic capacity of macrophages.

My doctoral work demonstrate that platelet-derived microRNAs transferred by MPs are involved in reprogramming recipient cells' gene expression and functions, which illustrate the growing complexity of cell-to-cell communications.

Table des matières

Résumé	III
Abstract.....	V
Table des matières	VII
Liste des figures.....	XI
Liste des tableaux.....	XIII
Liste des abréviations	XV
Remerciements	XVII
Avant-propos.....	XXI
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 Les microARN	1
1.1.1 Découverte de la répression génique par l'ARN	1
1.1.2 Biogenèse des microARN chez l'humain	3
1.1.2.1 La voie classique des microARN	3
1.1.2.1.1 Transcription des gènes de microARN	3
1.1.2.1.2 Maturation du pri-microARN	4
1.1.2.1.3 Export du pré-microARN dans le cytoplasme	5
1.1.2.1.4 Clivage du pré-microARN par Dicer.....	6
1.1.2.1.5 Formation du complexe RISC	8
1.1.2.1.6 Source de variabilité des microARN	9
1.1.2.2 Les voies alternatives des microARN	10
1.1.3 Fonction des microARN	12
1.1.3.1 Appariement entre le microARN et l'ARNm cible.....	13
1.1.3.2 Répression de la traduction de l'ARNm cible.....	14
1.1.3.3 Dégradation de l'ARNm cible	15
1.1.3.4 Activation de la traduction.....	16
1.1.3.5 Compartimentalisation de la voie des microARN	17
1.1.4 Régulation de la voie des microARN.....	18
1.1.4.1 Régulation au niveau transcriptionnel.....	18
1.1.4.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel.....	18
1.1.4.2.1 Régulation de la biogenèse des microARN par les protéines liant l'ARN	18
1.1.4.2.2 Régulation des ARNm par les protéines liant l'ARN	19
1.1.4.2.3 Modifications post-traductionnelles des protéines de la voie des microARN	19
1.1.5 Les microARN circulants.....	20
1.1.5.1 Les microARN circulants associés aux vésicules extracellulaires	21
1.1.5.1.1 Les microARN dans les exosomes	22
1.1.5.1.2 Les microARN dans les microparticules (MPs)	23
1.1.5.1.3 Les microARN dans les corps apoptotiques	23
1.1.5.2 Les microARN circulants associés aux protéines	24
1.1.6 Implications physiologiques et pathologiques des microARN	25
1.2 Les plaquettes sanguines.....	26

1.2.1 Origine et structure des plaquettes chez l'humain	26
1.2.1.1 Origine des plaquettes	26
1.2.1.2 Structure des plaquettes	29
1.2.2 Fonction des plaquettes	30
1.2.2.1 Le recrutement des plaquettes	31
1.2.2.2 L'adhésion et l'activation des plaquettes	31
1.2.2.3 L'amplification de l'activation par les agonistes solubles	32
1.2.2.4 La cascade de la coagulation et la génération de thrombine	32
1.2.2.5 Contrôle de la croissance du thrombus et fibrinolyse	33
1.2.3 Transcriptome et microARN des plaquettes.....	34
1.2.4 Activation des plaquettes et libération de microparticules	35
1.2.5 Implications physiologiques et pathologiques des plaquettes	36
1.3 Les microparticules de plaquettes.....	37
1.3.1 Définition et généralités	38
1.3.2 Mécanismes de formation des microparticules	39
1.3.2.1 Le réarrangement des phospholipides membranaires	39
1.3.2.2 Le réarrangement du cytosquelette d'actine.....	40
1.3.3 Élimination des microparticules circulantes.....	41
1.3.4 Microparticules et communications intercellulaires.....	42
1.3.5 Implications physiologiques et pathologiques des microparticules.....	44
1.4 Les cellules endothéliales	47
1.4.1 Définition et origine	47
1.4.1.1 Définition et généralités	47
1.4.1.2 Origine des cellules endothéliales	47
1.4.2 Fonctions de l'endothélium	50
1.4.2.1 La barrière endothéliale	50
1.4.2.2 Coagulation et fibrinolyse	50
1.4.2.3 La réaction inflammatoire	51
1.4.2.4 Angiogenèse.....	52
1.4.3 Interactions entre les microparticules de plaquettes et l'endothélium.....	53
1.4.4 Implications physiologiques et pathologiques des cellules endothéliales	54
1.5 Les macrophages	56
1.5.1 Définition et origine	56
1.5.1.1 Définition et généralités	56
1.5.1.2 Origine des macrophages	57
1.5.2 Polarisation des macrophages.....	59
1.5.3 Fonction des macrophages	59
1.5.3.1 La perception de l'environnement	60
1.5.3.2 La chimiотaxie	61
1.5.3.3 La phagocytose et la réparation des tissus	61
1.5.3.4 La présentation d'antigènes.....	62
1.5.4 Interactions entre les microparticules de plaquettes et les monocytes/macrophages	64
1.5.5 Implications physiologiques et pathologiques des macrophages	65
1.6 Raisonnement, hypothèse et objectifs de recherche	68
1.6.1 Raisonnement	68
1.6.2 Hypothèse	68

1.6.3 Objectifs	69
Chapitre 2: Les plaquettes activées peuvent délivrer des complexes régulateurs d'ARNm Ago2•microARN dans les cellules endothéliales via les microparticules	71
2.1 Résumé	71
2.2 Abstract.....	73
2.3 Introduction.....	74
2.4 Materials and Methods	75
2.4.1 Platelet purification, activation and microparticle (MP) isolation	75
2.4.2 Flow cytometry	76
2.4.3 Cell culture	76
2.4.4 Production of labeled MP and HUVEC-MP co-incubation assays	76
2.4.5 RNA extraction, microRNA quantification and gene expression studies	77
2.4.6 Immunoprecipitation and functional assay of Ago2•microRNA complexes.....	77
2.4.7 Reporter gene activity assays	78
2.4.8 Western blot analysis	78
2.5 Results.....	78
2.5.1 Activated platelets release MPs that contain miR-223.....	78
2.5.2 Platelet-derived MPs contain functional Ago2•miR-223 effector complexes	79
2.5.3 Platelet-derived MPs are internalized by HUVEC	80
2.5.4 Platelet-derived MPs can deliver functional Ago2•miR-223 effector complexes to HUVEC	80
2.5.5 Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the mRNA level	81
2.5.6 Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the protein level	82
2.6 Discussion.....	82
2.7 Figures and legends.....	88
2.8 Supplementary figures and tables	98
Chapitre 3: Les microparticules de plaquettes reprogramment l'expression des gènes et la fonction des macrophages	103
3.1 Résumé	103
3.2 Abstract.....	106
3.3 Introduction.....	107
3.4 Materials and Methods	108
3.4.1 Isolation of platelet-derived microparticles.....	108
3.4.2 Primary human macrophages	109
3.4.3 Macrophage coincubation with platelet MPs	110
3.4.4 Gene expression analysis	110
3.4.5 Constructs and reporter gene activity assays.....	111
3.4.6 Western blotting	111
3.4.7 Microarray analyses	111
3.4.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	112
3.4.9 Phagocytosis assay	112

3.4.10 Statistical analysis	112
3.5 Results	113
3.5.1 Platelet MPs are internalized by primary human macrophages	113
3.5.2 Platelet MPs deliver functional miR-126-3p to primary human macrophages	113
3.5.3 Platelet MPs-derived miR-126-3p can regulate macrophage gene expression	114
3.5.4 Platelet MPs modify the transcriptome of primary human macrophages.....	115
3.5.5 Platelet MPs inhibit cytokine/chemokine release by primary human macrophages	116
3.5.6 Platelet MPs enhance the phagocytic capacity of primary human macrophages	117
3.6 Discussion	118
3.7 Figures and legends	124
3.8 Supplementary figures and tables.....	139
Chapitre 4: Discussion générale.....	159
4.1 Mise en contexte.....	159
4.2 Choix du modèle d'étude	159
4.3 Internalisation des MPs de plaquettes.....	161
4.4 Transfert des microARN par les MPs de plaquettes.....	163
4.5 Fonctionnalité des microARN de MPs	164
4.6 Effets de l'internalisation des MPs sur le transcriptome des macrophages primaires humains	167
4.7 Effets de l'internalisation des MPs sur les fonctions des macrophages primaires humains	169
4.8 Pertinence <i>in vivo</i>.....	172
Chapitre 5: Conclusion	175
Chapitre 6: Bibliographie.....	177

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Contexte génomique des microARN.....	4
Figure 2: La voie classique de la biogénèse des microARN	6
Figure 3: Les voies alternatives de la biogénèse des microARN.	12
Figure 4: Interaction du microARN avec son ARNm cible.....	14
Figure 5: Représentation schématique de la répression traductionnelle et de la dégradation des ARNm cibles par les microARN.....	16
Figure 6: Les microARN circulants.....	21
Figure 7: Production et libération des plaquettes des cellules MK.....	28
Figure 8: Structure d'une plaquette.	30
Figure 9: Libération de MPs par les plaquettes	36
Figure 10: Formation et libération des différents types de vésicules extracellulaires.....	38
Figure 11: Les différentes voies et constituants moléculaires utilisés par les MPs lors des communications intercellulaires.....	44
Figure 12: Origine des cellules progénitrices endothéliales	49
Figure 13: Origine des macrophages.	58
Figure 14: Polarisation des macrophages	63

Chapitre 2

Figure 1: Activated platelets release MPs that contain miR-223.....	89
Figure 2: Platelet-derived MPs contain functional Ago2•miR-223 effector complexes.	91
Figure 3: Platelet-derived MPs are internalized by HUVEC.....	93
Figure 4: Platelet-derived MPs can deliver functional Ago2•microRNA effector complexes to HUVEC.	94
Figure 5: Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the mRNA level.	95
Figure 6: Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the protein level.	97
Supplementary Figure S1: Flow cytometry measurement of platelet CD62p (P-selectin) surface expression, a marker of platelet activation.	98
Supplementary Figure S2: Detection of platelet MP-derived miR-223 association to Ago2 proteins.	100
Supplementary Figure S3: Identification of potential miR-223 binding sites in the 3'UTR of two selected endothelial cell mRNAs.....	101

Chapitre 3

Figure 1: Platelet MPs are internalized by primary human macrophages.....	125
Figure 2: Platelet MPs deliver functional miR-126-3p to primary human macrophages. .	127
Figure 3: Platelet MP-derived miR-126-3p can regulate macrophage gene expression at the mRNA level.	129
Figure 4: Platelet MPs can regulate macrophage gene expression at the protein level.	130
Figure 5: Platelet MPs modify the microRNA and mRNA transcriptomes of recipient primary human macrophages.....	133
Figure 6: Platelet MPs inhibit cytokine/chemokine release by primary human macrophages.	134
Figure 7: Platelet MPs enhance the phagocytic capacity of primary human macrophages.	137
Supplementary Figure S1. Characterization of platelet MPs isolated from thrombin-activated platelets by flow cytometry.	150
Supplementary Figure S2. Macrophage miR-125b levels are not affected by exposure to platelet MPs and/or treatment with actinomycin D.	151
Supplementary Figure S3: The level of 5 different mRNAs, that are devoid of predicted binding sites for miR-126-3p, was not affected by the miR-126-3p sponge.	152
Supplementary Figure S4: Platelet MP-induced downregulation of CCL4, CSF1 and TNF mRNA levels may not be mediated by miR-126-3p.....	153
Supplementary Figure S5: Platelet MPs do not induce apoptosis of recipient primary human macrophages.	154
Supplementary Figure S6. Several mRNAs altered by platelet MPs are involved in phagosome formation.....	155
Supplementary Figure S7. Several mRNAs altered by platelet MPs are involved in caveolae-mediated endocytosis signaling.	156
Supplementary Figure S8. The mRNA level of three macrophage genes, which are positive regulators of phagocytosis, were confirmed to be up-regulated by platelet MPs.	157
Supplementary Figure S9. The phagocytosis of latex microbeads by primary human macrophages is blocked by Cytochalasin D.	158

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1: Caractéristiques des différents types de vésicules extra-cellulaires.	22
--	----

Chapitre 2

Supplementary Table S1: Sequence of the oligonucleotides used for qPCR quantitation of selected endothelial mRNAs.	99
--	----

Chapitre 3

Table 1. Platelet MPs modify cytokine/chemokine mRNA expression by primary human macrophages.	138
Supplementary Table S1: Sequences of the oligonucleotides used for qPCR quantification of selected macrophage mRNAs and microRNAs.	139
Supplementary Table S2: List of the microRNAs up-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.	140
Supplementary Table S3: List of the microRNAs downregulated in macrophages exposed to platelet MPs.	142
Supplementary Table S4: List of the top 20 RNAs down-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.	144
Supplementary Table S5: List of the top 20 RNAs up-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.	145
Supplementary Table S6: Correlation between the microRNAs that are up-regulated by platelet MPs and their putative mRNA targets in primary human macrophages.	146
Supplementary Table S7: List of the top 20 canonical signaling pathways of primary human macrophages altered by platelet MPs.	149

Liste des abréviations

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
Ago	Argonaute
ARNm	ARN messager
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
iARN	Interférence à l'ARN
IL	Interleukine
miRNP	<i>MicroRNA-containing ribonucleoprotein complex</i>
MPs	Microparticules
NO	<i>Nitric oxide</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
<i>P-bodies</i>	<i>Processing bodies</i>
Pol II	ARN polymérase II
Poly(A)	Polyadénylé
Pri-microARN	MicroARN primaire
Pré-microARN	Précursor de microARN
PS	Phosphatidylsérine
RBP	<i>RNA binding protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLC	<i>RISC loading complex</i>
RNase	Ribonucléase
RNP	Ribonucléoprotéique
siARN	<i>Small interfering RNA</i>
SnoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRBP	<i>Trans-activation response (TAR) RNA-binding protein</i>
XPO5	Exportine 5

Remerciements

Maintenant que la fin approche, je prends conscience du chemin parcouru et du fait que cela n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de mes encadrants, collègues, amis et famille.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Dr. Patrick Provost, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'évoluer et de travailler dans d'excellentes conditions. Je le remercie pour la formation scientifique qu'il m'a dispensé ainsi que pour l'encadrement tout au long de ma formation, durant laquelle il m'a toujours témoigné sa confiance en m'accordant de nombreuses libertés, tout en étant disponible lorsque j'en ressentais le besoin.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont fait partie de notre équipe durant mon doctorat. Merci à Geneviève Pépin, pour son encadrement, ses conseils et sa bonne humeur permanente. Merci à Patricia Landry, pour la formation technique ainsi que son humour pince sans rire. Je remercie également Hélène Plé et Raphaël Matusiak, qui ont partagé avec moi les épreuves du Doctorat. Un merci particulier à Aurélie Corduan, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à collaborer, et avec qui j'ai tissé des liens d'amitié au cours des nombreuses soirées, activités ou encore voyages partagés avec nos conjoints et amis. Je voudrais également remercier Henry Deng, que j'ai pris plaisir à encadrer durant son stage de Baccalauréat et les deux nouveaux étudiants du laboratoire, Abderrahim Benmoussa et Jean Denoyel, qui amènent un vent de fraîcheur à notre équipe. Je souhaiterais aussi remercier le Dr. Éric Boilard, qui m'a permis de travailler avec les membres de son équipe et sur les microparticules, pour son aide et sa collaboration tout au long de mon doctorat. Enfin, je remercie tous les professionnels de recherche et autres étudiants ou personnels du Bloc T1 avec qui j'ai eu la chance de travailler ou d'échanger, et plus spécialement Louise Deschênes, pour son aide inestimable et qui jouit maintenant d'une retraite bien méritée.

J'aimerais également remercier les personnes que j'ai rencontrées au CHUL et avec qui j'ai partagé d'excellents moments, aussi bien au laboratoire qu'à l'extérieur. Un merci particulier à Matthieu Rousseau et sa conjointe Caroline Loiseau, à Aurélie Corduan, son

mari Nicolas Lescaret et leur fils Evan, à Mathieu Lampietro et sa femme Sharon Poulain, à Audrey Magron et son conjoint Éric Poulain, à Audrey Hubert et son conjoint Yanis Issad, à Anne-Claire Duchez et son conjoint Maxime Savard, à Émilien Drouot et sa femme Jessica et enfin à Pascal Jalaguier. Il me faudrait une thèse pour raconter les voyages, soirées, activités de plein air et débats sans fin partagés avec vous ces dernières années, alors je me contenterai de vous dire à tous un grand merci et de vous souhaiter le meilleur pour votre futur.

En terminant, j’aimerais remercier ma famille. Un grand merci à mon ami d’enfance (et futur beau-frère) Hervé Jehenne, qui a toujours été présent malgré la distance et qui m’a fait l’immense plaisir de venir nous rendre visite à Québec avec sa femme Nathalie et ma filleule Chloé (en espérant une prochaine venue avec le petit dernier, Lucas). Merci également à ses parents, Françoise et Jean-Luc Jehenne, pour leurs encouragements ainsi que pour les excellents moments passés autour d’une bonne table durant nos vacances en France. Merci à mes beaux-parents, Nadine et Roger Brondelli, pour leur soutien ainsi que pour les très bons moments durant les vacances en France et à Québec, où ils sont venus nous rendre visite très souvent. Merci à mon frère, Jérôme Laffont, pour les repas et rigolades durant les vacances en France. Un immense merci à ma grand-mère, Annie Laffont, pour son soutien et tout ce qu’elle a fait pour moi. Un grand merci à mon frère Jean-Michel et toute sa famille, (Chrystelle, Maël, Kylian, Léa et Sara Landrin) pour leur soutien, visite (pour Maël) et accueil au cours de mes passages en France, durant lesquels il était vraiment agréable de se retrouver (sous la pluie ;). Je souhaite aussi, tout particulièrement, remercier ma sœur, Laetitia Landrin, qui a toujours été comme une deuxième maman et donc présente pour moi. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et pour les inoubliables voyages durant tes visites pendant ma thèse. Merci (même si le mot est bien trop faible) à ma maman, Louise Laffont, à qui je dédie cette thèse, qui a toujours fait des sacrifices pour moi et qui m’a toujours soutenu dans n’importe quelle situation. Tu es un modèle pour moi et les mots me manquent pour te remercier par rapport à tous ce que tu fais pour moi. Je suis, en tous cas, heureux d’avoir pu partager ces voyages au Canada (et même aux USA), dont tu me parles depuis mon enfance, et ceci à toutes les saisons – tu es d’ailleurs la seule à avoir eu le courage d’affronter l’hiver ;). Enfin, je remercie ma fiancée, Nadège Brondelli, qui m’a démontré la plus belle preuve d’amour en me suivant

jusqu'ici, au Canada, lorsque j'ai fait le choix de venir y faire ma thèse. Tu es une femme en or au quotidien et j'ai beaucoup de chance de t'avoir. Ton soutien au quotidien, ta patience (je ne compte plus les répétitions de présentations que tu as subi dans notre petit appartement) et ta bonne humeur quotidienne ont rendu cela beaucoup plus facile car, si maintenant tout va bien, au départ c'était loin d'être évident. Je suis aussi super fier de tout ce que tu as accompli depuis notre arrivée. Je t'aime et je suis le plus heureux à tes côtés. J'ai vraiment beaucoup de chance de tous vous avoir et du fond du cœur, MERCI !!!!

Avant-propos

Les résultats présentés dans cette thèse font l'objet de deux publications. Ces résultats ont été obtenus grâce à la collaboration de tous les auteurs cités, dont le rôle est précisé dans cette section.

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

Benoit Laffont, Aurélie Corduan, Hélène Plé, Anne-Claire Duchez, Nathalie Cloutier, Éric Boilard, Patrick Provost.

Blood. 2013 Jul 11;122(2):253-61.

Benoit Laffont:

- Conception et planification des expériences
- Réalisation des expériences et analyse des données
- Conception des figures
- Rédaction du manuscrit

Aurélie Corduan, Hélène Plé, Anne-Claire Duchez et Nathalie Cloutier:

- Réalisation des expériences et analyse des données

Eric Boilard:

- Mise à disposition d'outil analytique, expertise, supervision et conseils
- Commentaires et édition sur le manuscrit

Patrick Provost:

- Supervision globale et coordination du projet
- Révision finale et soumission du manuscrit

Platelet microparticles reprogram macrophages gene expression and function

Benoit Laffont, Aurélie Corduan, Matthieu Rousseau, Anne-Claire Duchez, Chan Ho C. Lee, Éric Boilard, Patrick Provost.

Thrombosis and Haemostasis. 2013 July 22. In press.

Benoit Laffont et Aurélie Corduan:

- Conception et planification des expériences
- Réalisation des expériences et analyse des données
- Conception des figures

- Rédaction du manuscrit

Matthieu Rousseau :

- Réalisation des expériences et analyse des données
- Commentaires et édition sur le manuscrit

Anne-Claire Duchez et Chan Ho C. Lee :

- Réalisation des expériences et analyse des données

Eric Boillard:

- Mise à disposition d'outil analytique, expertise, supervision et conseils
- Commentaires et édition sur le manuscrit

Patrick Provost:

- Supervision globale et coordination du projet
- Révision finale et soumission du manuscrit

Au cours de mon doctorat, j'ai également collaboré à plusieurs projets de recherche qui donneront, ou ont déjà donné lieu à, des publications. Les études publiées sont référencées ci-dessous.

Dissociation of SERPINE1 mRNA from the translational repressor proteins Ago2 and TIA-1 upon platelet activation.

Corduan A, Plé H, Laffont B, Wallon T, Plante I, Landry P, Provost P.

Thromb Haemost. 2015 Feb 12;113(5).

Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation, and function.

Osman A, Hitzler WE, Meyer CU, Landry P, Corduan A, Laffont B, Boillard E, Hellstern P, Vamvakas EC, Provost P.

Platelets. 2015;26(2):154-63.

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

Duchez AC, Boudreau LH, Bollinger J, Belleannée C, Cloutier N, Laffont B, Mendoza-Villarroel RE, Lévesque T, Rollet-Labelle E, Rousseau M, Allaey I, Tremblay JJ, Poubelle PE, Lambeau G, Pouliot M, Provost P, Soulet D, Gelb MH, Boillard E.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jun 23. In press.

Elevated abundance, size and microRNA content of plasma extracellular vesicles in viremic HIV-1+ patients: correlations with known markers of disease progression.

Hubert A, Subra C, Jenabian MA, Tremblay Labrecque PF, Tremblay C, Laffont B, Provost P, Routy JP, Gilbert C.

J Acquir Immune Defic Syndr. 2015 Jul 11. In press.

Chapitre 1: Introduction

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse portent sur les microARN d'origine plaquettaire, plus particulièrement sur les microARN de microparticules (MPs) de plaquettes humaines et leur rôle dans les communications intercellulaires. La première partie de ce chapitre portera donc sur la biogénèse et la fonction des microARN chez l'humain. Ensuite, j'introduirai les plaquettes sanguines et les MPs de plaquettes. Pour conclure, je présenterai deux types cellulaires (cellules endothéliales et macrophages) qui interagissent avec les MPs de plaquettes et qui font l'objet des deux publications qui forment le corps de cette thèse de doctorat.

1.1 Les microARN

1.1.1 Découverte de la répression génique par l'ARN

La répression génique par l'ARN, ou interférence à l'ARN (iARN), est un mécanisme par lequel un gène est réprimé de manière post-transcriptionnelle et séquence-spécifique par un ARN double brin (ARNdb). L'ARN messager (ARNm) cible et le brin complémentaire s'apparent grâce à un complexe ribonucléoprotéique (RNP) au sein duquel l'ARNm est clivé puis dégradé, inhibant ainsi l'expression du gène de manière post-transcriptionnelle et irréversible. En 1993 deux groupes de recherche ont découvert le premier petit ARN endogène régulateur de l'expression génique chez le nématode *C. elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Ils ont démontré que le gène lin-4 produit un petit ARN de 22 nucléotides (nt) à partir d'un précurseur de 61 nt, et que ce petit ARN est capable d'inhiber l'expression du gène lin-14 via la présence de sites partiellement complémentaires à ce petit ARN dans la région 3' non-codante (*3' untranslated region, 3'UTR*) de son ARNm. Cette découverte est donc à la base de la voie des microARN classique, puisque le petit ARN de 61 nt, issu de la transcription du gène lin-4, est clivé en un petit ARN de 22 nt qui lie l'ARNm cible par complémentarité imparfaite. Sept ans plus tard, un deuxième petit ARN régulateur, let-7, fut découvert par le groupe du Dr. Gary Ruvkun (Reinhart et al., 2000). Ils démontrent que let-7 possède des sites de liaison dans la région 3'UTR de plusieurs ARNm, et qu'il est notamment capable de réguler négativement l'expression du gène lin-41. La très forte conservation de let-7 a ensuite permis de déduire la présence de cette

nouvelle classe de petits ARN, appelés microARN, chez la quasi-totalité des métazoaires, dont l'Homme (Pasquinelli et al., 2000).

Durant cette période, le groupe du Dr. Craig Mello découvrit le phénomène de l'iARN. Ils ont constaté, chez *Caenorhabditis elegans*, que l'insertion de plusieurs ARNdb ciblant différents ARNm provoquait une répression traductionnelle spécifique, mais aussi plus efficace que l'insertion d'un simple brin d'ARN antisens, et que cette répression génique pouvait être transmise à la descendance (Fire et al., 1998). La transposition de cette découverte aux cellules de mammifères n'a, en revanche, pas pu se faire immédiatement. En effet, dans ces cellules, les longs ARNdb ne permettent pas de réprimer de manière séquence spécifique les ARNm, du fait de la réponse antivirale, appelée réponse à l'interféron, que ceux-ci déclenchent. L'activation de la protéine kinase R (PKR), suite à la reconnaissance d'un ARNdb >30 paires de bases (pb), induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction *Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha* (eIF2- α), aboutissant à la diminution générale de la traduction, indépendamment de la séquence introduite (Manche et al., 1992). Néanmoins, divers rôles du mécanisme d'iARN ont été rapidement mis en évidence, notamment dans la réponse antivirale chez les plantes (Ratcliff et al., 1999), ainsi que dans l'immobilisation des transposons chez le nématode (Tabara et al., 1999).

Suite à cela, le groupe du Dr. Thomas Tuschl a démontré, dans différents types de cellules de mammifères, la capacité de petits ARN interférents (*small interfering RNA*, siARN) à réprimer leurs ARNm cibles (Elbashir et al., 2001). Cette découverte majeure a fourni un outil fantastique, toujours très populaire de nos jours, pour étudier la fonction des gènes, et a également ouvert la voie à l'utilisation des petits ARN en thérapie génique.

Ces travaux ont donc permis l'avènement de nouvelles technologies dans les laboratoires de recherche et ont ouvert la porte à de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, l'utilisation directe de siARN, d'ARNdb ou encore d'ARN en tige-boucle, permet de réprimer un gène de manière spécifique pour en étudier sa fonction ou pour traiter des pathologies associées à la surexpression d'un gène.

1.1.2 Biogenèse des microARN chez l'humain

Les microARN matures sont des ARN de 19 à 24 nt de long impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, et ce, de manière séquence-spécifique. À ce jour, ils ont été mis en évidence chez la quasi-totalité des organismes eucaryotes, y compris les plantes (Reinhart et al., 2002). Malgré l'exception notable de la levure *S. cerevisiae* (Drinnenberg et al., 2009), les champignons et les levures possèdent aussi un système d'iARN, initialement appelé *quelling* (Raponi and Arndt, 2003; Romano and Macino, 1992).

Comme les travaux de cette thèse ont été réalisés en utilisant des cellules primaires humaines, et que chaque organisme possède ses spécificités, je discuterai uniquement la voie des microARN chez les mammifères, particulièrement chez l'humain.

1.1.2.1 La voie classique des microARN

1.1.2.1.1 Transcription des gènes de microARN

Les gènes de microARN sont transcrits en microARN primaires (pri-microARN), qui sont de longs ARN formant une structure en tige-boucle et pouvant atteindre plusieurs milliers de nt. La majorité des transcrits font entre 3000 et 4000 nt de long, et ils peuvent contenir une ou plusieurs structures en tige-boucle séparées par au moins 10 nt (Saini et al., 2007). Ces pri-microARN sont, pour la plupart, transcrits par l'ARN polymérase II (pol II), et possèdent ainsi les caractéristiques des transcrits produits par cette enzyme, à savoir une coiffe 7-méthyl-guanosine en 5' et une queue polyadenylée (polyA) en 3' (Cai et al., 2004). Le profil d'expression des microARN varie dans les différents types cellulaires et selon les différentes conditions environnementales, ce qui implique leur régulation par des facteurs de transcription et des complexes co-activateurs (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Les pri-microARN proviennent majoritairement de la transcription de gènes de microARN, seuls ou polycistroniques (Ozsolak et al., 2008), ou d'introns d'ARNm codant pour une protéine (Lee et al., 2002). Cependant, plusieurs contextes génomiques différents peuvent donner naissance à un ou plusieurs pri-microARN, tel qu'illustré à la Figure 1. Qu'ils soient d'origine intronique ou non, les pri-microARN subissent un processus de maturation

similaire, mais indépendant des complexes impliqués dans l'épissage (Kim and Kim, 2007).

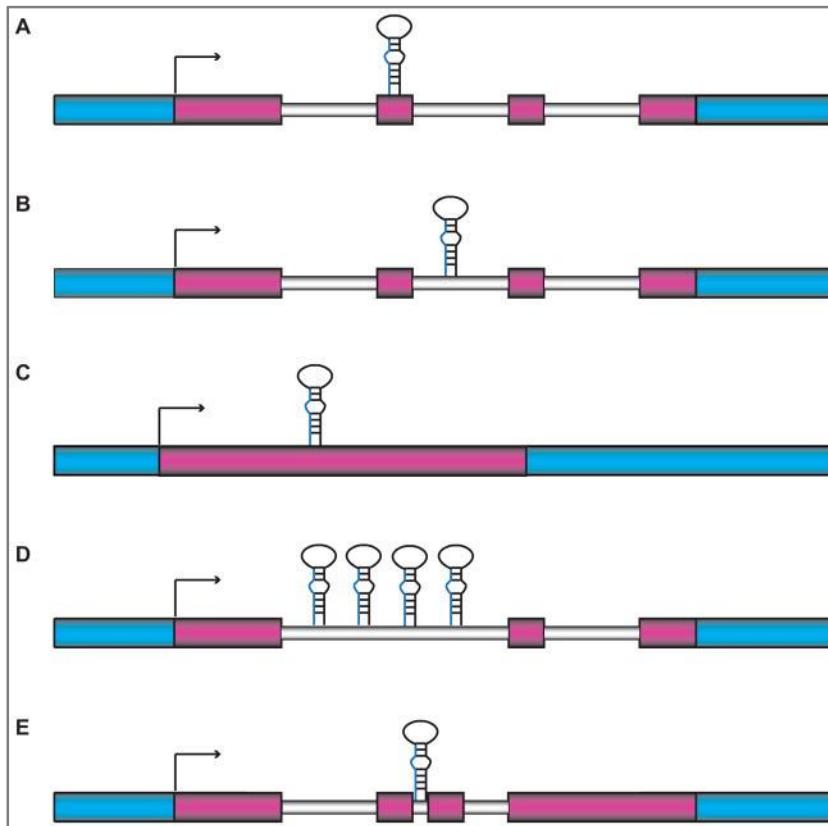


Figure 1: Contexte génomique des microARN

Les microARN peuvent être localisés dans les exons (A) ou les introns (B) de transcrits codants ou non. Des microARN sont positionnés entre deux gènes et ne sont pas soumis à l'épissage (C). Les situations A-B-C peuvent aussi se produire dans le cas d'un ARN polycistronique, qui intègre plusieurs structures d'ARN tige-boucles dans un même transcript primaire (D). Les microARN qui sont excisés par le complexe d'épissage, de manière indépendante du complexe microprocesseur, sont appelés miRtrons (E). Bleu, ADN non-transcrit; rose, exon; gris, intron. Figure tirée de Finnegan and Pasquinelli (2013).

1.1.2.1.2 Maturation du pri-microARN

Tel qu'illustré à la Figure 2, les pri-microARN vont subir deux étapes de maturation successives, avant que les microARN matures puissent être incorporés au sein des complexes effecteurs et servir de guide pour la régulation de l'expression de l'ARNm cible. Ces pri-microARN se replient sur eux-mêmes et forment plusieurs structures en tige-

boucle, à l'intérieur desquelles se retrouvent les microARN matures. Les structures en tige-boucle du pri-microARN sont reconnues par un complexe nucléaire appelé Micropcesseur, qui réalise la première étape de maturation des microARN (Han et al., 2004). Ce complexe est formé de la ribonucléase III (RNase III) Drosha et de son cofacteur *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8). Pour effectuer le clivage du pri-microARN, le Micropcesseur reconnaît la structure d'ARN en forme de tige-boucle, dont la tige fait ~33 nt et dont la boucle terminale est faite d'ARN simple brin (ARNsb). Grâce à ses deux domaines de liaison à l'ARN, DGCR8 se positionne à la jonction de la tige-boucle et facilite le recrutement ainsi que le positionnement de Drosha, qui coupe à 11 paires de bases (pb) de la base de la tige (Han et al., 2006). Afin de préserver les niveaux adéquats des composantes du complexe, une boucle de rétroaction négative entre Drosha et DGCR8 existe. En se liant à Drosha, DGCR8 stabilise le complexe et stimule son activité, alors que Drosha régule négativement DGCR8 en clivant une structure tige-boucle dans le deuxième exon de son ARNm, limitant ainsi sa traduction (Han et al., 2009).

1.1.2.1.3 Export du pré-microARN dans le cytoplasme

Cette première étape de maturation mène à la production d'un précurseur de microARN (pré-microARN) de ~ 60-70 nt caractérisé par une structure en tige-boucle avec une extrémité 3' protubérante de 2 nt, qui est la signature de son clivage par une RNase III (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Cette structure particulière des pré-microARN est reconnue par le système RanGTP et la karyophérine Exportine 5 (XPO5). Une fois lié, le pré-microARN transite alors par le pore nucléaire vers le cytoplasme, où l'hydrolyse du GTP en GDP permet la dissociation du complexe et la libération du pré-microARN au cytoplasme, où il subira une deuxième étape de maturation (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). XPO5 reconnaît les ARNdb faisant plus de 14 pb et possédant une extrémité protubérante de 1 à 8 nt en 3' (Zeng and Cullen, 2004). Elle est ainsi capable d'exporter d'autres ARN en structure tige-boucle, tels que les petits ARN nucléolaires (*small nucleolar RNAs*, snoARN) (Ender et al., 2008) et les ARN de transfert (ARNt) (Babiarz et al., 2008).

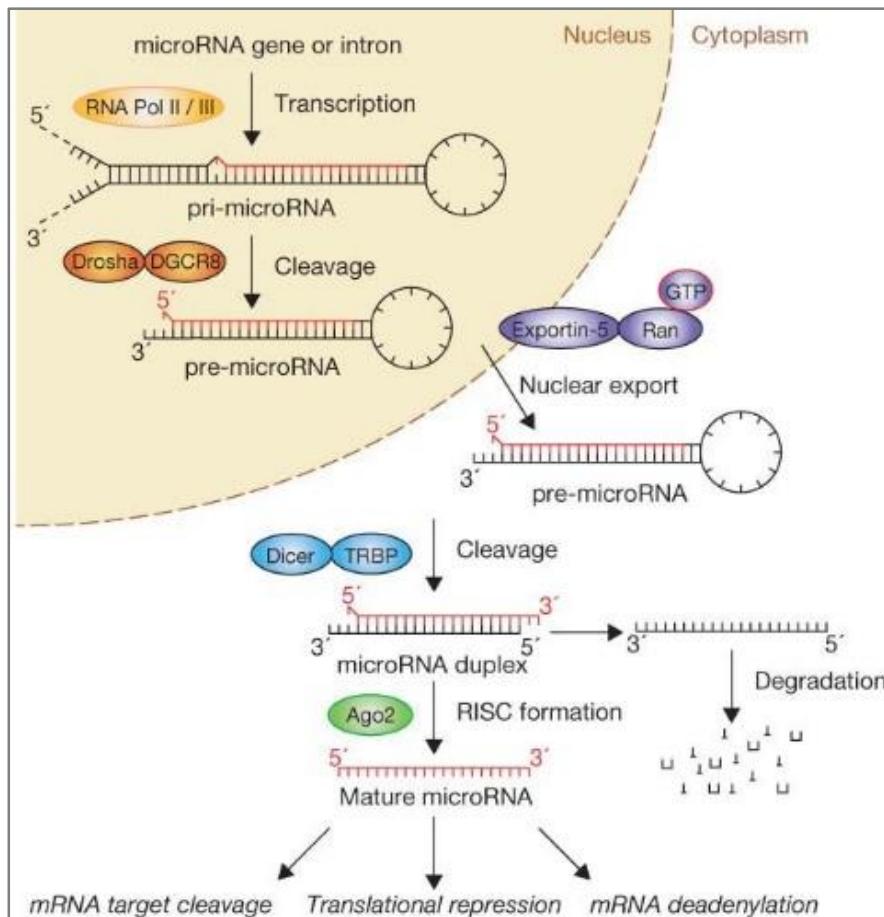


Figure 2: La voie classique de la biogénèse des microARN

La majorité des pri-microARN sont transcrits à partir d'un gène de microARN par la Pol II et sont clivés par le complexe Microprocesseur, composé de Drosha et DGCR8, en un précurseur de microARN (pré-microARN). Suite à son export vers le cytoplasme causé par le système RanGTP et la karyophérine Exportine 5, le pré-microARN subit un deuxième clivage par Dicer, assistée par un de ses cofacteurs (TRBP ou PACT). Le produit de clivage, un duplex de microARN mature, sera ensuite incorporé dans une protéine Argonaute au sein du complexe RISC, dans lequel il y aura sélection du brin guide et dégradation du brin passager. Le complexe RISC se liera alors à un ARNm cible pour le réprimer et/ou le déstabiliser et le dégrader, empêchant ainsi sa traduction. Figure tirée de Winter et al. (2009).

1.1.2.1.4 Clivage du pré-microARN par Dicer

Dans le cytoplasme, la RNase III Dicer va, avec l'aide de ses co-facteurs, cliver le pré-microARN pour donner un duplex linéaire d'ARN d'une vingtaine de nt de long (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Le duplex de microARN mature ainsi produit est

formé de deux brins asymétriques, nommés 5p et 3p, et est associé à la protéine Argonaute (Ago) pour former le complexe effecteur *microRNA-containing ribonucleoprotein complex* (miRNP), ou *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Rose et al., 2005).

Initialement déterminée chez le protozoaire *Giardia intestinalis*, la structure de Dicer a permis de mettre en évidence que le domaine PAZ de la protéine lie l'extrémité 3' protubérante de 2 nt du pré-microARN. La distance entre ce domaine PAZ et le cœur catalytique, formé par la dimérisation des 2 domaines RNases, permet de définir la localisation du site de clivage à ~ 25 nt de l'extrémité 3' du pré-microARN chez le protozoaire (MacRae et al., 2007; Macrae et al., 2006). Chez l'humain, la distance entre les domaines PAZ et RNase III est plus courte, et l'orientation du domaine catalytique diffère, ce qui explique le clivage préférentiel à ~ 21-23 nt de l'extrémité 3' du pré-microARN (Lau et al., 2012).

Le clivage du pré-microARN par Dicer se fait à l'aide de co-facteurs, dont le premier à avoir été découvert chez les mammifères est la protéine *Trans-activation response (TAR) RNA-binding protein* (TRBP). Contenant 3 domaines de liaison à l'ARNdb, TRBP stimule l'activité catalytique de Dicer en précisant les sites de clivage des pré-microARN. La répression de TRBP mène à une diminution des niveaux de la protéine Dicer sans affecter ceux de son ARNm, suggérant un rôle stabilisateur de TRBP envers Dicer (Chendrimada et al., 2005), alors qu'un mutant tronqué de TRBP, caractérisé à partir d'une lignée cellulaire de cancer colorectal, réduit la biosynthèse des microARN (Melo et al., 2009). Cependant, selon une récente étude, une déplétion de TRBP dans des cellules HeLa n'induit aucune différence en ce qui concerne l'abondance de microARN matures, le chargement des microARN dans la protéine Ago ou encore la sélection du brin mature du microARN. La déplétion de TRBP affecte uniquement la précision du clivage par Dicer, ce qui pourrait toutefois avoir une influence importante sur les ARNm ciblés par les microARN en question (Kim et al., 2014). Un autre cofacteur de Dicer, la protéine *Protein Activator of PKR* (PACT), possède deux domaines de liaison à l'ARNdb et joue un rôle semblable à celui de TRBP dans la voie des microARN, en liant les protéines du complexe RISC, Dicer et Ago. La liaison de PACT à Dicer se fait via le même domaine que TRBP, soit le N-terminal de Dicer (Lee et al., 2006), et la répression de PACT mène à une baisse de la

biogenèse des microARN qui s'apparente à celle provoquée par la répression de TRBP. Tout comme TRBP, PACT modifie le site de clivage de Dicer et entraîne la production d'isomiRs spécifiques capables de cibler un répertoire d'ARNm différents (Fukunaga et al., 2012). En revanche, comme pour TRBP, la déplétion de PACT n'induit aucune différence sur l'abondance de microARN matures, le chargement des microARN dans la protéine Ago ou la sélection du brin mature du microARN (Kim et al., 2014), suggérant ainsi que d'autres facteurs, à ce jour inconnus, peuvent influencer la maturation des microARN.

1.1.2.1.5 Formation du complexe RISC

Le complexe effecteur des microARN est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) appelé RISC. Il est composé minimalement d'une protéine Ago associée à un microARN mature (Mourelatos et al., 2002). Quatre protéines de la famille Ago (Ago1 à Ago4) participent à la voie des microARN. Ces protéines Ago contiennent 3 domaines conservés, PAZ, MID et PIWI, et un domaine N-terminal. Chez les mammifères, seule Ago2 possède un domaine PIWI capable de cliver l'ARNm cible du siRISC, grâce à une activité endonucléase de type RNase H. Le clivage de l'ARNm exécuté par Ago2 s'effectue alors au centre du duplex formé par la liaison parfaitement complémentaire entre l'ARNm cible et le siARN (Liu et al., 2004).

Lorsque le pré-microARN est clivé, le duplex est d'abord orienté de manière à ce que celui-ci puisse être incorporé à la protéine Ago, dans un complexe appelé pré-RISC. Cette étape d'incorporation du duplex au sein de la protéine Ago requiert un changement conformationnel nécessitant l'hydrolyse d'ATP et la présence de protéines chaperonnes, appelées *Heat shock cognate 70 kDa protein* (Hsc70) et *Heat shock 90 kDa protein* (Hsp90) (Iwasaki et al., 2010). Suite au relâchement du duplex par Dicer, l'extrémité la plus stable est liée par TRBP2 et l'autre extrémité est liée par Ago (Preall and Sontheimer, 2005; Tomari et al., 2004). Pour être chargé au sein de la protéine Ago, le duplex est présenté par ses extrémités 5'-phosphate et 3'-OH terminales de l'hélice d'ARN, et est lié par le domaine PAZ de la protéine (Meister et al., 2004). Dès lors débute le processus de sélection de brin, où un des brins sera dégradé et l'autre servira de guide pour l'étape suivante, i.e. l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible (Matranga et al., 2005). Le choix du brin dépend de la stabilité thermodynamique du duplex. Généralement, le brin

dont l'extrémité 5' est la plus instable sera choisi comme guide (Kwak and Tomari, 2012). Cependant, pour certains microARN tels que miR-24 ou miR-194, les deux brins sont retrouvés à des niveaux très similaires, alors que dans d'autres cas, le choix du brin mature dépend du type cellulaire et peut varier en fonction des conditions (Ro et al., 2007). Ceci implique donc que d'autres facteurs, à ce jour inconnus, peuvent influencer la sélection du brin mature. Pour aboutir à un complexe RISC mature fonctionnel, le brin passager doit ensuite être écarté. Cette élimination peut se faire soit par clivage endonucléolytique via Ago2, si les 2 brins sont parfaitement complémentaires (Matranga et al., 2005), soit par déroulement des 2 brins via le domaine N-terminal de la protéine Argonaute (Kwak and Tomari, 2012). La structure de la protéine Ago2 humaine en complexe avec un microARN a été récemment déterminée, révélant ainsi la conformation des différents domaines qui permet l'ancrage du microARN ainsi que le positionnement du domaine PIWI responsable de l'activité endonucléolytique de la protéine (Elkayam et al., 2012; Schirle and MacRae, 2012). Ces travaux démontrent que l'extrémité 5' phosphorylée du microARN est ancrée dans une poche basique du domaine MID, alors que l'extrémité 3' interagit avec le domaine PAZ. Tout au long du microARN, ce sont les résidus hydroxyles du squelette de riboses, et non les bases azotées, qui sont en contact avec la protéine. Cet agencement permet l'exposition des bases azotées et explique le fait que l'interaction entre les microARN et la protéine Ago2 soit indépendante de la séquence du microARN (Ma et al., 2005).

1.1.2.1.6 Source de variabilité des microARN

Chez l'humain, on dénombre, à ce jour, 1881 pré-microARN et 2588 microARN matures, découverts principalement grâce aux méthodes de séquençage à haut débit (<http://www.mirbase.org>, Release 21, Juin 2014). Ces données doivent cependant être interprétées avec précaution car, depuis 2007, la majorité des entrées proviennent de séquençage à haut débit. Cette technique est très sensible pour détecter des produits de dégradation d'autres types d'ARN, ce qui a mené à l'annotation de nombreux nouveaux microARN de très faible abondance (Ha and Kim, 2014). Une étude réalisée sur la version 14 de miRBase a d'ailleurs démontré que presqu'un tiers des loci testés n'ont pu être validés de façon expérimentale comme étant d'authentiques microARN (Chiang et al., 2010). Les principaux critères à respecter pour définir un microARN sont: (i) une homogénéité en 5' (bien que d'authentiques loci de microARN peuvent produire différents

isoformes), (ii) une abondance du nombre de séquences détectées, (iii) une conservation phylogénique, (iv) une signature de clivage par des RNases de type III, et (v) une preuve d'association avec une protéine Ago.

Ceci étant dit, les microARN peuvent être modifiés par différentes enzymes, que ce soit au niveau du pri-microARN, du pré-microARN ou même du microARN mature. Ces modifications peuvent altérer à la fois leur biogénèse, leur fonction, leur stabilité, leur diversité ainsi que les effets qu'elles peuvent exercer.

Ainsi, à la diversité des microARN s'ajoute, tout d'abord, l'existence d'isomiRs, qui correspondent à un microARN dont les extrémités sont décalées de 1-2 nt. Ces variations peuvent s'expliquer par un certain degré d'imprécision lié à la coupure effectuée par les RNases III Drosha et Dicer, qui amène une variation au niveau des extrémités 5'-P et 3'-OH (Starega-Roslan et al., 2011; Wu et al., 2009; Zhou et al., 2012). En provoquant le décalage de la région *seed* du microARN de 1 ou 2 nt, les changements à l'extrémité 5'-P ont une plus grande conséquence. La répression par les complexes miRNP étant principalement basée sur la complémentarité de la région *seed*, ce changement affecte la spécificité du complexe en le redirigeant vers de nouveaux ARNm cibles. La déamination des adénosines en inosines par les enzymes *adenosine deaminase acting on RNA* (ADAR), via un phénomène appelé édition, que l'on retrouve dans environ 20% des pri-microARN, est un autre mécanisme qui augmente la diversité des microARN. L'inosine sera alors reconnue comme une guanosine, changeant ainsi la structure du pré-microARN ainsi que la cible du microARN mature (Kawahara and Mieda-Sato, 2012; Kawahara et al., 2007). D'autres enzymes capables d'ajouter des A ou des U en 3', via des réactions d'adénylation et d'uridylation, peuvent aussi stabiliser ou déstabiliser le microARN, respectivement (Burroughs et al., 2010; Chiang et al., 2010).

1.1.2.2 Les voies alternatives des microARN

Des voies alternatives de la biogénèse des microARN, indépendantes des complexes Microprocesseur ou de maturation, ont été découvertes et sont résumées à la Figure 3.

La biogénèse de microARN dérivant d'introns, dont la taille correspond à celle d'un pré-microARN, est indépendante du complexe Microprocesseur. Une fois l'intron épissé et

libéré de sa structure en lasso par une enzyme de débranchement, les mirtrons peuvent être directement transférés au complexe de maturation Dicer•TRBP (Berezikov et al., 2007; Ruby et al., 2007).

D'autres mirtrons, possédant une longue queue en 5' ou en 3', ont été découverts récemment chez l'humain et la souris. Bien que des exonucléases permettent de dégrader leur queue en 5' ou en 3', leur biogenèse est cependant dépendante des enzymes d'épissage (Ladewig et al., 2012).

Toujours indépendamment du Microprocesseur, des ARN non-codants structurés (ex. ARN de transfert, ribosomaux, nucléolaires) peuvent également être clivés de manière à produire des microARN fonctionnels (Yang and Lai, 2011).

Il existe aussi un pré-microARN qui n'est pas exporté par XPO5, soit pré-miR-320. Ce pré-microARN, dont la formation est indépendante du complexe Microprocesseur et qui possède une coiffe en 5', est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 1 (XPO1), pour y subir l'étape de maturation par Dicer et ne donner qu'un seul brin mature, soit le brin 3p (Xie et al., 2013).

Enfin, il existe un microARN dont la biogenèse est indépendante de Dicer, soit miR-451. Le microARN mature est composé du brin 5' de la tige, mais comprend également la boucle de son pré-microARN. Le pré-microARN de miR-451 présente une tige caractéristique de 17 nt, trop courte pour être clivée par Dicer, et dont l'appariement est quasi-parfait. Il est, par conséquent, directement incorporé au sein de la protéine effectrice Ago2. Grâce à son domaine endonucléase fonctionnel, Ago2 est capable de la cliver au centre du brin 3', générant un ARN de 30 nt qui va donner naissance au microARN mature fonctionnel, suite à une nouvelle coupure réalisée par la ribonucléase PARN (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010).

Ainsi, même si la majorité des microARN sont dépendants des enzymes de biogenèse de la voie classique, d'autres voies alternatives existent et sont impliquées dans la biogenèse de microARN dont l'origine et/ou la structure diffèrent de ceux utilisant la voie classique.

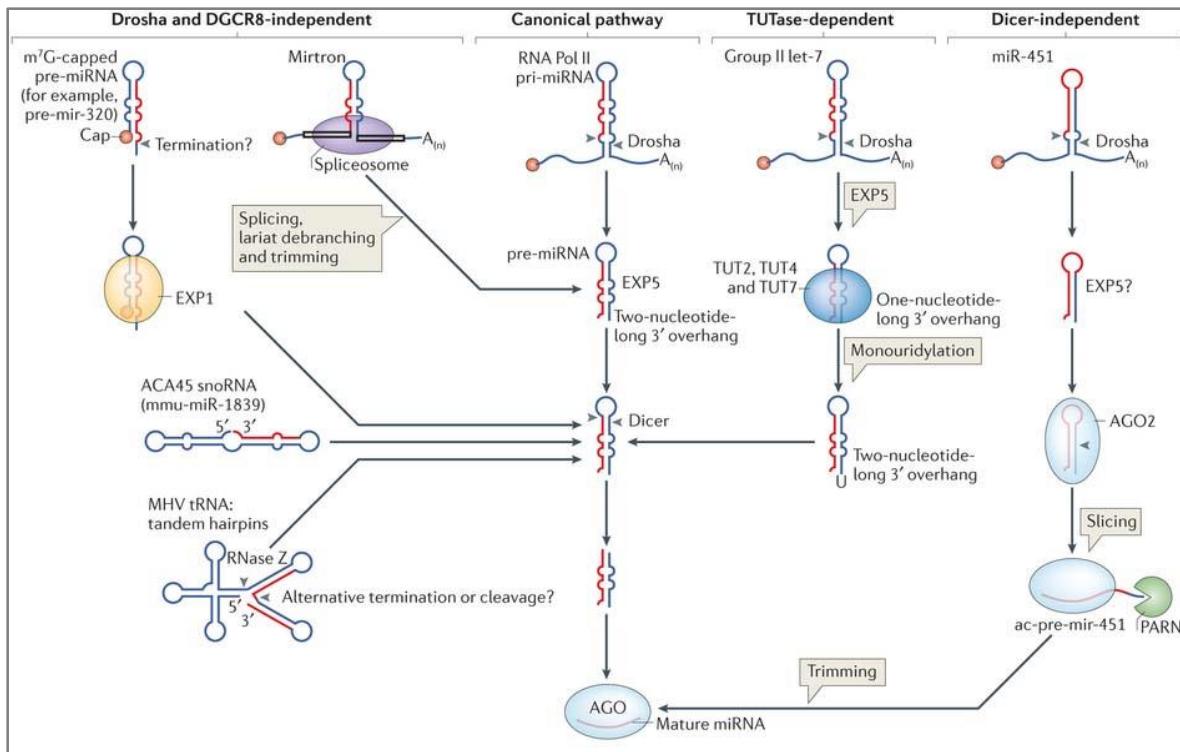


Figure 3: Les voies alternatives de la biogénèse des microARN.

Le pré-miR-320, indépendant du complexe Microprocesseur, est exporté par Exportine 1 (XPO1) et ne donnera qu'un seul brin mature, le 3p. Les loci de mirtrons produisent des pré-microARN à partir de l'épissage d'introns très courts. D'autres mirtrons possèdent une queue en 5' ou 3' qui doit être clivée avant leur prise en charge par Dicer. Des snoARN ou ARNt peuvent également être clivés et ainsi produire des pré-microARN. Des pré-microARN dépendants des Terminal uridyle transférase (TUTase) produisent des pré-microARN possédant une extrémité protubérante en 3' d'un seul nt, et qui doit donc être mono-uridylée pour pouvoir être liée et clivée efficacement par Dicer. Pré-miR-451 est directement produit par Drosha avant d'être exporté dans le cytoplasme puis chargé dans Ago2 indépendamment de Dicer. Le précurseur clivé par Ago2 sera ensuite fonctionnel suite à son clivage par la ribonucléase PARN. Figure tirée de Ha and Kim (2014).

1.1.3 Fonction des microARN

Les microARN incorporés au sein de complexes miRNP matures permettent la reconnaissance et la liaison des complexes sur des sites de liaison présents au sein des ARNm cibles. Dans l'iARN, la complémentarité parfaite du siARN avec le site de liaison sur l'ARNm permet à la protéine Ago2 de cliver l'ARNm entre les nucléotides 10 et 11 du brin guide, menant à la dégradation éventuelle du messager (Meister et al., 2004). Dans la

voie des microARN, où la complémentarité de base entre le microARN et son ARNm cible est imparfaite, le complexe miRNP peut induire plusieurs effets, dont la répression traductionnelle, la déstabilisation/dégradation de l'ARNm cible, mais également l'activation de la traduction.

1.1.3.1 Appariement entre le microARN et l'ARNm cible

Le premier nt en position 5' des microARN permet leur ancrage au sein d'une protéine Ago, et n'est donc pas impliqué dans la reconnaissance des ARNm cibles (Ma et al., 2005). Tel qu'illustré à la Figure 4, dans la grande majorité des cas, les nucléotides 2 à 8, qui constituent une région-clé du microARN appelée *seed*, sont parfaitement complémentaires au site de liaison sur l'ARNm (Lewis et al., 2003). Le mésappariement des nucléotides 9 à 11 a pour effet d'empêcher un clivage par Ago2, alors qu'un appariement complémentaire de la portion 3' est parfois observé, permettant ainsi de renforcer l'interaction du complexe miRNP avec l'ARNm ciblé, notamment lorsque la région *seed* n'est pas parfaitement appariée. Par ailleurs, la présence d'un A ou U en 5' de la séquence complémentaire au *seed*, et/ou d'un A en 3' est fréquemment observée. Bien que des exemples de liaison dans les régions 5'UTR et codantes des ARNm soient de plus en plus fréquents, la plupart des sites de liaison des microARN sont situés dans le 3'UTR des ARNm cibles, et sont conservés d'une espèce à l'autre. Il s'agit le plus souvent de régions peu structurées, à proximité d'autres sites de liaison de complexes miRNP et/ou de domaines riches en A et U, tel que les séquences *adenylate-uridylate-rich elements* (ARE). Ils doivent se situer à au moins 15 nt de la fin de la séquence codante et, dans le cas de longs 3'UTR, à proximité de la fin de la séquence codante ou de la queue poly(A). Finalement, lorsque plusieurs sites sont positionnés à proximité sur un même ARNm, il peut y avoir coopération de la répression (Grimson et al., 2007).

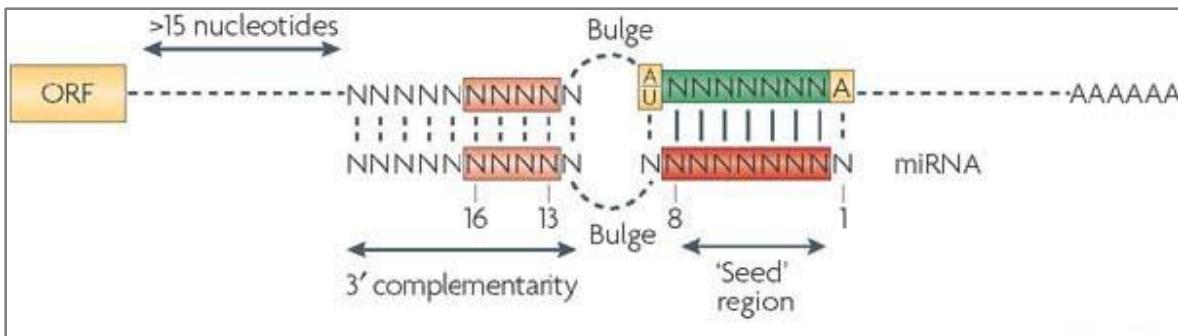


Figure 4: Interaction du microARN avec son ARNm cible.

La région critique de reconnaissance des microARN, la région *seed*, est composée des nt 2 à 8 à partir de l'extrémité 5' qui sont parfaitement complémentaires au site de liaison. Cette interaction est habituellement renforcée par une complémentarité supplémentaire de la portion 3'. Au niveau du site de liaison, un A ou U en 5' de la région complémentaire au *seed* et/ou un A en 3' sont des indices favorables quant à la possibilité de liaison du complexe miRNP. Les nt 9 à 11 ne sont pas complémentaires et forment un renflement (*bulge*) qui prévient un clivage par Ago2. Le site de liaison est majoritairement situé au niveau de la région 3'UTR des ARNm, à au moins 15 nt de la séquence codante. Figure tirée de Filipowicz et al. (2008).

1.1.3.2 Répression de la traduction de l'ARNm cible

La traduction des ARNm se divise principalement en 3 étapes, soit l'initiation, l'élongation et la terminaison. Bien que des études suggèrent que ces trois étapes peuvent être ciblées pour réprimer les ARNm, l'étape de l'initiation est privilégiée du fait qu'elle représente l'étape limitante de la traduction chez les mammifères. De plus, le fait que (i) l'utilisation d'une coiffe non-fonctionnelle diminue la répression par 2,5 fois (Humphreys et al., 2005), et que (ii) des ARNm qui possèdent un *internal ribosome entry site* (IRES) sont réfractaires à la répression par les microARN (Pillai et al., 2005) laissent croire que la répression par les microARN interfère avec le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction.

Outre Ago2, dont l'activité endonucléase n'est pas nécessaire pour la répression traductionnelle, le complexe miRNP contient d'autres facteurs nécessaires à la répression. Chez l'humain, les trois protéines de la famille de GW182 (TNRC6A/B/C) lient la protéine Ago par leur domaine en répétition de glycines et de tryptophanes (*GW repeat*) et sont essentielles à la répression traductionnelle (Eulalio et al., 2009; Eulalio et al., 2008). GW182 est essentielle à la fonction du complexe miRNP. Alors que son domaine N-

terminal permet son association à la protéine Ago2, le domaine C-terminal sert de plateforme pour le recrutement des complexes et des protéines effectrices nécessaires pour la répression et la déstabilisation des ARNm ciblés (Fabian and Sonenberg, 2012). Le rôle effecteur de GW182 est démontré par la levée de la répression suite à la dissociation des protéines Ago et GW182, mais aussi par le fait que l'attachement direct de GW182 à un ARNm est suffisant pour induire la répression de ce messager (Eulalio et al., 2008; Lazzaretti et al., 2009). La circularisation des ARNm, qui est permise par l'interaction entre le complexe d'initiation de la traduction eIF4F, liant la coiffe, et la protéine *Poly(A) binding protein 1* (PABP1), liant la queue poly(A), permet leur traduction active et prévient leur dégradation (Van Der Kelen et al., 2009). GW182, en interagissant avec PABP1 de manière compétitive, empêche sa liaison au complexe d'initiation eIF4F, permettant ainsi au complexe RISC de bloquer l'initiation de la traduction en inhibant la circularisation des ARNm (Zekri et al., 2009).

1.1.3.3 Dégradation de l'ARNm cible

Comme les siARN, les microARN peuvent mener à la dégradation des ARNm. Ce processus, qui requiert la présence d'un complexe miRNP sur un ARNm cible, est dépendant des protéines GW182 et Ago, qui vont permettre le recrutement de facteurs impliqués dans la déadénylation et l'enlèvement de la coiffe de l'ARNm (Zipprich et al., 2009). GW182 permet le recrutement des protéines du complexe déadénylase CCR4-NOT1 (*carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less 1*) et, grâce à son extrémité C-terminale, elle interagit avec la protéine PABP, permettant ainsi l'étape de déadénylation (Behm-Ansmant et al., 2006). Ce recrutement pourrait consolider le blocage de l'initiation de la traduction (Fabian et al., 2009). L'action du complexe miRNP peut aussi conduire à l'enlèvement de la coiffe opéré par les enzymes DCP1-DCP2, une étape qui serait subséquente à la déadénylation de l'ARNm cible (Behm-Ansmant et al., 2006; Rehwinkel et al., 2005). Ainsi, tel qu'illustré à la Figure 5, la répression d'un ARNm cible par le complexe miRNP peut se faire via la répression de sa traduction ou par sa déstabilisation selon un mécanisme impliquant la déadénylation, l'enlèvement de la coiffe et la dégradation subséquente par des exonucléases. De récents travaux chez la drosophile et le poisson-zèbre suggèrent que ces deux mécanismes pourraient être consécutifs, la répression

traductionnelle précédant la déstabilisation de l'ARNm par le complexe miRNP (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012).

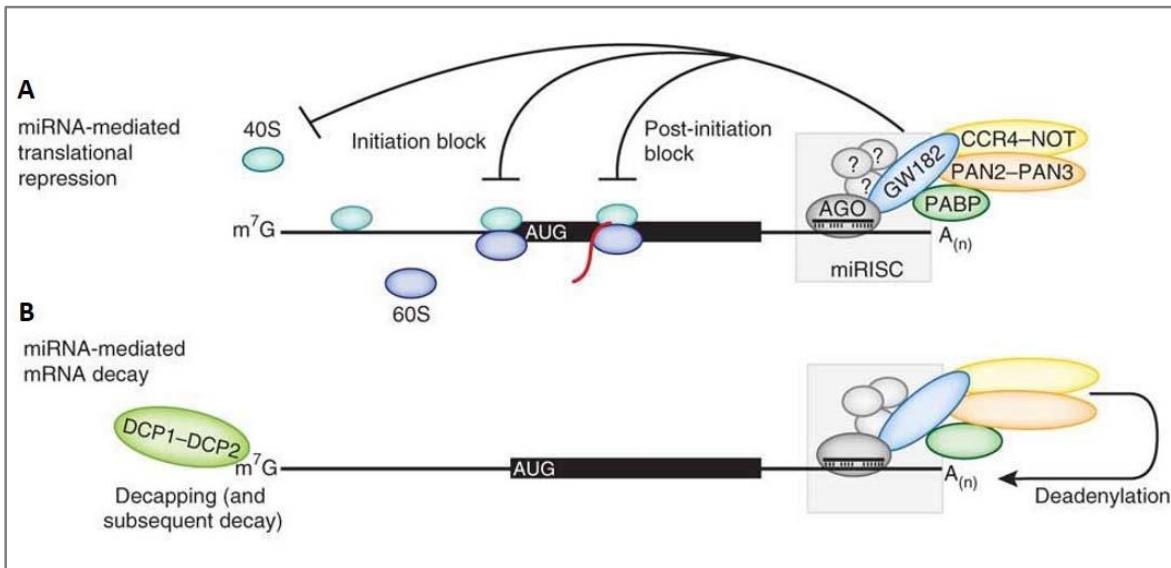


Figure 5: Représentation schématique de la répression traductionnelle et de la dégradation des ARNm cibles par les microARN.

(A) La traduction peut être inhibée durant ou après l'initiation. L'inhibition de l'initiation par le complexe miRNP (ou RISC) est provoquée par une interférence avec la reconnaissance de la coiffe et de eIF4F, ou le recrutement et la liaison des sous-unités ribosomales (40S ou 60S). La liaison de GW182 à la protéine *poly(A)-binding protein* (PABP) pourrait aussi empêcher la circularisation nécessaire à la traduction de l'ARNm. Le complexe RISC pourrait inhiber la traduction en empêchant l'elongation, via l'induction du ribosome *drop-off* ou en facilitant la dégradation de la chaîne peptidique nouvellement synthétisée. (B) Les microARN peuvent induire la dégradation de leur ARNm cible. Suite à l'interaction directe entre GW182 et PABP, le complexe RISC interagit avec le complexe de déadenylation CCR4-NOT1 pour faciliter le retrait de la queue poly(A). Ensuite, les enzymes du complexe DCP1-DCP2 retirent la coiffe m7G en 5'. Ces étapes induisent la déstabilisation de l'ARNm cible et sa dégradation. Figure tirée de Fabian et al. (2010).

1.1.3.4 Activation de la traduction

L'action des microARN peut aussi, dans un contexte bien précis, mener à l'activation de la traduction de l'ARNm cible. Suite à une privation en nutriments chez les cellules, miR-10a peut se lier au 5'UTR de plusieurs ARNm codants pour des protéines ribosomales et stimuler leur traduction (Orom et al., 2008). De la même façon, le microARN hépatique

miR-122 induit la traduction de l'ARN du virus de l'hépatite C en se liant à deux sites de son 5'UTR (Henke et al., 2008). Suite au recrutement de *Fragile X-related protein 1* (FXR1) par le RISC, la liaison de miR-369-3p au 3'UTR de l'ARNm du TNF- α active sa traduction dans des cellules qui ne se divisent pas, alors qu'une répression de la traduction est observée lorsque les cellules sont en prolifération (Vasudevan et al., 2007). Ces observations suggèrent que la régulation de la traduction par le complexe miRNP peut osciller entre l'activation et la répression au cours du cycle cellulaire.

1.1.3.5 Compartimentalisation de la voie des microARN

Ces dernières années, plusieurs études ont remis en question l'idée que l'action des microARN se limitait au cytoplasme. Les premières études visant à identifier les compartiments où opèrent les microARN dans la cellule ont identifié de petites structures cytoplasmiques, les corps de dégradation (*processing bodies*, *P-bodies* ou *GW-bodies*), comme étant leur site d'action. La richesse des *P-bodies* en enzymes qui effectuent le décoiffage (DCP-1/DCP-2), la déadénylation (CCR4-NOT-1) et la dégradation des ARNm (XRN1), tout comme la présence d'ARNm réprimés, de microARN et des protéines du complexe miRNP, telles que Ago et GW182, ont amené à penser qu'il s'agit des corps subcellulaires où les microARN exercent leur fonction (Eystathioy et al., 2002; Liu et al., 2005; Pillai et al., 2005; Sheth and Parker, 2003). D'autant plus que le degré de répression d'un ARNm corrèle avec sa présence dans les *P-bodies*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que ces corps de dégradation sont aussi impliqués dans le stockage des ARNm, puisque des ARNm qui s'y trouvent, tel que *Cationic Amino acid Transporter 1* (CAT-1), peuvent retourner vers les polysomes pour être traduits en protéines (Bhattacharyya et al., 2006). Les granules de stress, qui sont des structures cytoplasmiques contenant certaines composantes de la voie des microARN, dont des complexes effecteurs Ago2•microARN, ont également été proposées du fait de leur proximité avec les *P-bodies*, ce qui pourrait permettre l'échange de cargos ou de protéines entre les deux structures (Kedersha et al., 2005; Leung et al., 2006). Plus tard, il a été démontré que des complexes miRNP ne sont pas inclus dans les *P-bodies*, mais sont plutôt associés aux corps multivésiculaires, ce qui pourrait permettre leur transfert au sein des exosomes (Gibbings et al., 2009). Cette étude, qui démontre l'implication de la voie des endosomes dans la répression des ARNm, suggère que les endosomes et/ou les corps multivésiculaires sont des sites d'accumulation,

voire même d'action, du complexe miRNP. Le réticulum endoplasmique rugueux (REr) a également été démontré comme étant le site de nucléation et d'action du complexe miRNP. En effet, la liaison du complexe miRNP aux protéines TRBP ou PACT, qui interagissent avec les protéines membranaires du RE, lui permet de se retrouver au niveau de REr, où il est fonctionnel (Stalder et al., 2013). Enfin, l'iARN a également été montrée comme étant fonctionnelle dans le noyau, où les protéines Ago2, Dicer, TRBP et GW182 forme des complexes multiprotéiques (Gagnon et al., 2014). La localisation des composantes de la voie des microARN dans différentes structures et organelles de la cellule, ainsi que dans le noyau, pourrait expliquer les différents mécanismes de répression des ARNm par les microARN.

1.1.4 Régulation de la voie des microARN

1.1.4.1 Régulation au niveau transcriptionnel

De la même façon que les ARNm, également transcrits par l'ARN pol II, la biogenèse des microARN se retrouve sous le contrôle de facteurs de transcription. Ainsi, l'expression des microARN est modifiée en fonction des tissus et/ou des conditions environnementales. Par exemple, le suppresseur de tumeur p53 induit l'activation d'une famille de microARN (He et al., 2007), alors que le facteur oncogénique MYC peut activer ou réprimer plusieurs microARN impliqués dans l'apoptose et la survie cellulaire (Chang et al., 2008).

Des mécanismes épigénétiques peuvent également réguler la transcription de gènes de microARN. Par exemple, la méthylation d'un locus de microARN induit une diminution de son expression, qui a pour conséquence de déréguler les niveaux d'expression de leurs ARNm cibles (Kozaki and Inazawa, 2012).

1.1.4.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel

1.1.4.2.1 Régulation de la biogenèse des microARN par les protéines liant l'ARN

En se liant directement au microARN ou à d'autres co-facteurs, les protéines liant l'ARN (*RNA binding proteins*, RBP) peuvent influencer la biogenèse des microARN. La protéine Lin-28 est un répresseur post-transcriptionnel de la biogenèse du microARN let-7. Au niveau du noyau, Lin-28 empêche Drosha de cliver le pri-let-7, alors que dans le

cytoplasme, elle empêche le clivage de pré-let-7 par Dicer en induisant l'uridylation de son extrémité 3' (Heo et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Cependant, le microARN let-7, tout comme miR-125, est capable de réprimer l'expression de Lin-28, formant ainsi une boucle de rétroaction qui permet de réguler l'expression de let-7 indispensable à la différentiation des cellules souches neuronales (Rybak et al., 2008). En liant la boucle de pri-microARN et/ou de pré-microARN, d'autres protéines, telles que *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (hnRNPA1), *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) ou *TAR DNA Binding protein 43* (TDP-43), peuvent inhiber ou stimuler leur clivage et donc leur biogénèse (Guil and Caceres, 2007; Kawahara and Mieda-Sato, 2012; Trabucchi et al., 2011). Les hélicases p68 et p72 s'associent au complexe Microprocesseur et stimulent son activité, facilitant ainsi la maturation de nombreux microARN (Fukuda et al., 2007). Aussi, à la suite d'une cascade signalétique, l'hélicase p68 peut s'associer avec les protéines SMAD pour réguler les niveaux de miR-21 (Davis et al., 2008).

1.1.4.2.2 Régulation des ARNm par les protéines liant l'ARN

La liaison d'une RBP à proximité du site de liaison d'un complexe RISC peut favoriser ou défavoriser sa liaison à l'ARNm. C'est ainsi que des RBP liant le 3'UTR des transcrits sont impliquées dans la régulation de l'expression génique par les microARN. La protéine FMRP, issue de la famille *Fragile X mental retardation* (FMR), peut se lier à proximité du site de liaison de miR-125a sur l'ARNm codant pour la protéine *post-synaptic density protein 95* (PSD-95) et y stabiliser le RISC, alors que la déphosphorylation de FMRP induit la déstabilisation du RISC, et lève ainsi la répression du gène par miR-125a (Muddashetty et al., 2011). De manière similaire, la protéine *Hu antigen R* (HuR) peut faciliter la liaison et amplifier l'action du RISC (Kim et al., 2009), ou empêcher sa liaison et favoriser la traduction de l'ARNm (Bhattacharyya et al., 2006). Aussi, en s'oligomérisant, la protéine HuR peut dissocier le RISC d'un ARNm cible et le protéger d'une répression par les microARN (Kundu et al., 2012).

1.1.4.2.3 Modifications post-traductionnelles des protéines de la voie des microARN

Les modifications post-traductionnelles des protéines de la voie des microARN sont indispensables à leur régulation, leur stabilité, leur localisation et leurs interactions

protéiques. Ainsi, la phosphorylation de Drosha par la *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) permet sa localisation nucléaire (Tang et al., 2010), alors que la phosphorylation de DGCR8 par la kinase ERK augmente sa stabilité (Herbert et al., 2013). La déacétylation de DGCR8 stimule l'activité du Microprocesseur et augmente, de ce fait, son affinité pour les pri-microARN. Enfin, l'acétylation de Drosha augmente sa stabilité en empêchant son ubiquitination et sa dégradation subséquente par le protéasome (Tang et al., 2013).

Concernant Dicer et ses co-facteurs, la phosphorylation de TRBP au niveau de quatre sérines par la kinase ERK, stabilise la protéine TRBP, mais aussi indirectement Dicer à laquelle elle est liée, ce qui accélère la maturation des pré-microARN par le complexe Dicer•TRBP (Paroo et al., 2009). Par ailleurs, suite à sa synthèse, Dicer transite à l'intérieur du RE, où elle peut être glycosylée et où son interaction avec la protéine *cytoskeleton-linking endoplasmic reticulum (ER) membrane protein of 63 kDa* (CLIMP-63) la stabilise (Pepin et al., 2012). Concernant Ago2, l'hydroxylation d'une proline de son domaine PIWI augmente sa stabilité et permet sa localisation dans les *P-bodies* (Qi et al., 2008), alors que sa SUMOylation sur la lysine 402 déstabilise la protéine (Sahin et al., 2014). Selon la kinase et l'acide aminé visés, la phosphorylation de Ago peut induire sa localisation dans les P-bodies (Zeng et al., 2008), diminuer sa liaison à Dicer (Shen et al., 2013), augmenter la répression d'une cible (Horman et al., 2013), ou encore diminuer sa liaison aux petits ARN (Rudel et al., 2011). Enfin, les complexes impliqués dans la voie des microARN peuvent être dégradés par autophagie. En effet, la suppression des processus d'autophagie induit l'accumulation des protéines Ago2 et Dicer qui composent ces complexes, alors que l'activité des microARN endogènes est diminuée dans ces conditions. Ceci indique donc que les complexes RISC accumulés ne sont pas fonctionnels et que l'autophagie permettrait d'éliminer les complexes RISC non fonctionnels et le renouvellement de ceux-ci au sein de la cellule (Gibbings et al., 2012).

1.1.5 Les microARN circulants

Si on retrouve une majorité de microARN à l'intérieur des cellules où ils sont produits, on en retrouve également à l'extérieur des cellules, dans différents fluides biologiques tels que le sérum, le plasma, la salive, l'urine, le plasma séminal et le lait maternel (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Hanke et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Lawrie et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Park et al., 2009). Ces microARN, dits circulants, sont notamment

remarquables de par leur stabilité qui leur est conférée par les corps vesiculaires au sein desquels on les retrouve, ou leur incorporation au sein de complexes RNP, tel qu'illustré à la Figure 6.

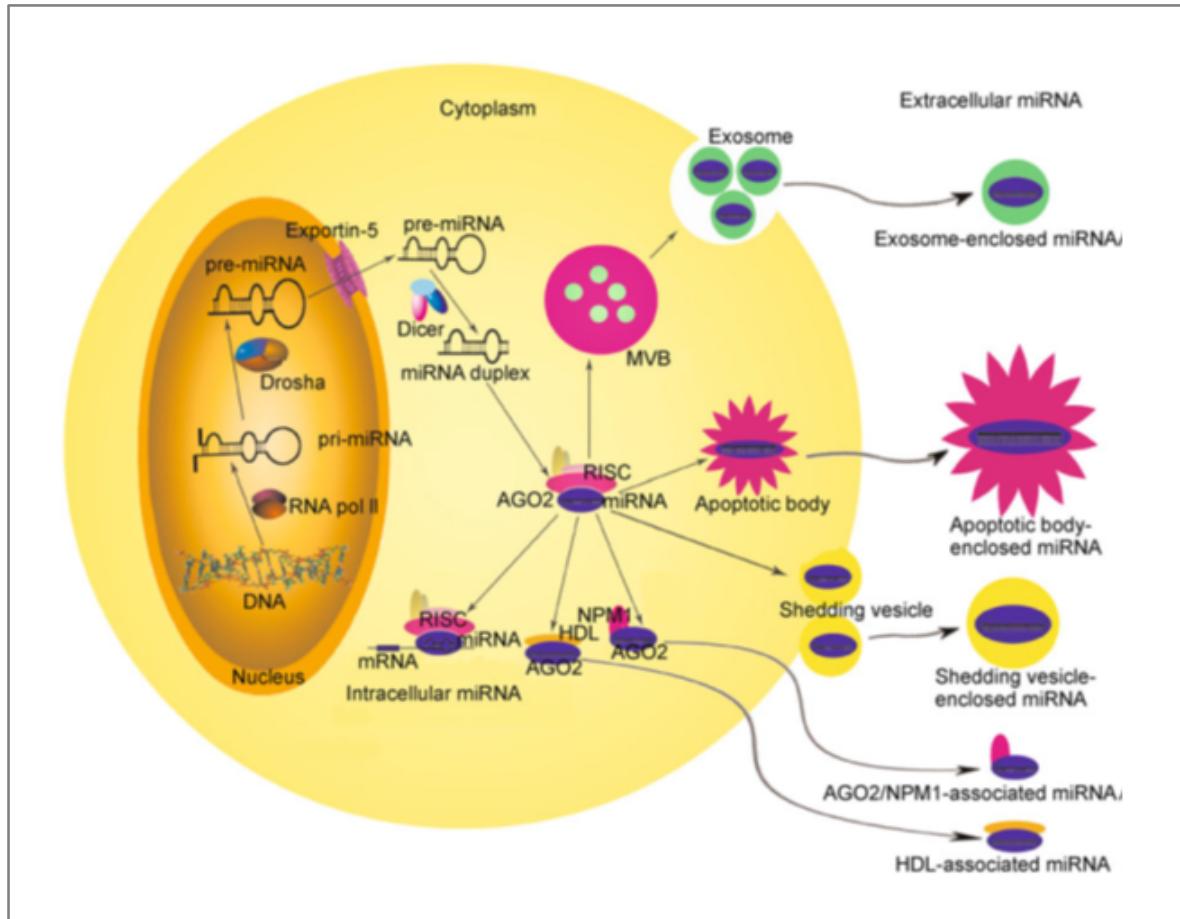


Figure 6: Les microARN circulants.

Suite à leur maturation à l'intérieur de la cellule, les microARN peuvent être transportés par différentes voies vers le milieu extracellulaire. Les microARN peuvent se retrouver à l'intérieur de vésicules membranaires, telles que les exosomes, les microparticules (MPs ou *shedding vesicles*) ou les corps apoptotiques, associés à des lipoprotéines, telles que les HDL (*High Density Lipoproteins*), ou encore sous la forme de complexes RNP avec d'autres RBP, telles que Ago2 ou Nucléophosmine 1 (NPM1). Figure tirée de Chen et al. (2012).

1.1.5.1 Les microARN circulants associés aux vésicules extracellulaires

On peut retrouver des microARN circulants dans différents types de vésicules extracellulaires, telles que les exosomes, les MPs ou les corps apoptotiques. Ces vésicules

diffèrent de par leur taille ou leur origine, tel que résumé dans le Tableau 1. Elles confèrent aux microARN une protection vis-à-vis des RNases présentes dans les différents fluides où on les retrouve et sont impliquées dans les communications intercellulaires grâce à leur capacité à livrer le matériel génétique qu'elles contiennent dans les cellules cibles.

Tableau 1: Caractéristiques des différents types de vésicules extra-cellulaires.

	Exosomes	Microparticules	Corps apoptotiques
Taille	30 - 100 nm	100 - 1 000 nm	1 000 - 4 000 nm
Sédimentation	100 000 g	20 000 g	16 000 g
Origine	Corps multivésiculaires	Membrane plasmique	Fragments cellulaires
Libération	Constitutive et/ou activation cellulaire	Activation cellulaire et début d'apoptose	Apoptose terminale
Marqueurs	CD 9, CD 63, CD 81, LAMP1	Antigènes de surface de la cellule d'origine, PS	Histones, PS

1.1.5.1.1 Les microARN dans les exosomes

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires (~ 30-100 nm de diamètre) d'origine endosomale qui sont sécrétées par la plupart des cellules. Issus du bourgeonnement interne de la membrane plasmique, les endosomes vont s'invaginer pour former des corps multivésiculaires dans lesquels les exosomes sont conservés comme vésicules intraluminales. Suite à une exocytose, les corps multivésiculaires vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur cargo d'exosomes dans le milieu extracellulaire (Thery et al., 2002).

En 2007, Valadi et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que les exosomes, issus de mastocytes humains et murins, contiennent des microARN qu'ils sont capables de livrer à une cellule réceptrice où ils sont fonctionnels (Valadi et al., 2007). Suite à cette étude pionnière, plusieurs groupes ont démontré la capacité des exosomes à participer aux communications intercellulaires via leur contenu en microARN. C'est ainsi que des exosomes de cellules dendritiques diminuent l'expression de gènes rapporteurs dans leur cellule cible (Montecalvo et al., 2012), et que la livraison de miR-150 par des exosomes d'une lignée monocytaire diminue les niveaux d'expression du facteur de transcription C-Myb et augmente la migration des cellules cibles endothéliales HMEC-1 (Zhang et al., 2010). De plus, des exosomes de cellules de cancer du sein, ainsi que ceux isolés à partir du sérum de patientes, contiennent les protéines Dicer, TRBP (et Ago 2) capables de cliver un

pré-microARN en microARN mature, contrairement aux exosomes issus de cellules saines (Melo et al., 2014). Les exosomes de cellules cancéreuses altèrent le transcriptome de leur cellule cible de manière dépendante à Dicer et induisent leur conversion vers un phénotype oncogénique (Melo et al., 2014), suggérant que la présence de la protéine Dicer dans les exosomes pourrait servir de biomarqueur pour la détection de cancer.

1.1.5.1.2 Les microARN dans les microparticules (MPs)

Les MPs sont des vésicules d'origine membranaire dont la taille est comprise entre 100 et 1000 nm de diamètre. Elles sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique suite à l'activation ou l'apoptose de nombreux types cellulaires, et expriment à leur surface des protéines et des récepteurs issus de leur cellule d'origine (Cocucci et al., 2009). La présence de microARN dans les MPs et leur capacité à jouer un rôle dans les communications intercellulaires ont été démontrés plus tardivement par rapport aux exosomes. En 2012, Diehl et ses collaborateurs démontrent que des MPs d'origines diverses telles que, plaquettes, lignée de monocytes (THP1) et human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), contiennent des microARN dont le profil diffère de celui de la cellule d'origine et que ces MPs peuvent servir de moyen de transport aux microARN dans la circulation (Diehl et al., 2012). En effet, des MPs de macrophages sont capables de délivrer leur contenu en microARN à différents types de cellules cibles, telles que des monocytes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales ou encore des fibroblastes. De plus, miR-223 contenu dans ces MPs est fonctionnellement actif et induit la différenciation des monocytes receveurs en macrophages (Ismail et al., 2013). Enfin, les MPs de cellules endothéliales sont également capables de réguler l'expression des gènes et induisent la réparation de l'endothélium via la livraison de miR-126 fonctionnel aux cellules réceptrices (Jansen et al., 2013).

1.1.5.1.3 Les microARN dans les corps apoptotiques

Une dernière classe de vésicules extracellulaires, les corps apoptotiques, contient des microARN fonctionnels capables de réguler l'expression génique de cellules cibles. Les corps apoptotiques sont des vésicules d'origine membranaire dont la taille est comprise entre 1 et 4 µm. Ils sont produits par les cellules qui subissent une mort cellulaire par

apoptose et sont généralement éliminés par les phagocytes professionnels (Savill et al., 1993).

En utilisant un modèle de souris athérosclérotiques, Zernecke et ses collaborateurs ont démontré que les corps apoptotiques de cellules endothéliales, riches en miR-126, sont internalisés par les cellules vasculaires voisines. MiR-126 régule alors l'expression génique des cellules réceptrices et induit le recrutement de cellules progénitrices de la moelle osseuse au niveau des plaques athérosclérotiques, réduisant ainsi la taille des plaques et la progression de la maladie (Zernecke et al., 2009).

Ainsi, les différents types de vésicules extracellulaires sont de véritables vecteurs capables de reprogrammer les cellules cibles suite à la livraison de leur contenu en matériel génétique, dont font partie les microARN.

1.1.5.2 Les microARN circulants associés aux protéines

Les microARN circulants ne sont pas exclusifs aux vésicules extracellulaires. En effet, plusieurs groupes ont démontré qu'une proportion non négligeable de microARN, si ce n'est supérieure à celle contenue dans les vésicules extracellulaires, se retrouve à l'extérieur des cellules sous la forme de complexes RNP, associés à Ago2, à NPM1 ou à des HDL (Arroyo et al., 2011; Tabet et al., 2014; Turchinovich et al., 2011; Vickers et al., 2011; Wang et al., 2010).

Dans le plasma, une majorité de microARN circulants semble ainsi se retrouver sous la forme de complexes Ago2•microARN (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011), alors que dans le milieu de culture de cellules, privées ou non de sérum, les microARN se retrouvent majoritairement associés à NPM1 ou Ago2, respectivement (Turchinovich et al., 2011; Wang et al., 2010). Par ailleurs, le répertoire de microARN associés à Ago1 et à Ago2 diffère très fortement dans le plasma, alors qu'il est similaire dans des cellules spécifiques, suggérant que les microARN plasmatiques sont exportés par des types cellulaires différents (Turchinovich and Burwinkel, 2012). Toutefois, la capacité de ces microARN à participer aux communications intercellulaires n'a toujours pas été démontrée à ce jour, à l'inverse des microARN associés aux HDL. En effet, des HDL purifiés à partir de plasma de sujets sains contiennent des microARN qui peuvent être internalisés dans des

cellules cibles pour y réguler l'expression des gènes (Vickers et al., 2011). De la même manière, les HDL sont capables de livrer miR-223 dans des cellules endothéliales, afin d'y diminuer l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, tel que l'*InterCellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) (Tabet et al., 2014).

1.1.6 Implications physiologiques et pathologiques des microARN

La régulation de l'expression d'un gène par les microARN n'induit pas sa suppression totale, mais plutôt une régulation fine via la diminution de son expression ou, plus rarement, une augmentation de son expression. Selon des prédictions issues de la bio-informatique, on estime qu'environ 60% des gènes codants chez l'humain sont sous le contrôle des microARN (Bartel, 2009). En effet, chaque microARN peut réguler plusieurs centaines de gènes, et un même gène peut être régulé par plusieurs microARN (Bartel, 2009). Ainsi, il n'est pas surprenant que la quasi-totalité des processus physiologiques et pathologiques étudiés à ce jour soient régulés, de près ou de loin, par les microARN. Au niveau du cycle cellulaire, les microARN de la famille de miR-26, fortement exprimés dans les cellules quiescentes, inhibent des gènes impliqués dans la transition G1/S (Zhu et al., 2012). MiR-21, surexprimé dans de nombreux cancers, possède un très fort potentiel oncogénique (Pan et al., 2010), et l'inhibition de la majorité de ses cibles, qui sont des suppresseurs de tumeurs, induit la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose ainsi que l'invasion (Buscaglia and Li, 2011). L'induction par le suppresseur de tumeur p53 des microARN de la famille miR-34, jouerait un rôle prépondérant dans la sénescence et l'apoptose (He et al., 2007).

Des expériences de délétion conditionnelle d'enzymes impliquées dans la biogenèse des microARN (DGCR8 et Dicer), ou de microARN spécifiques (*cluster* miR-290-295), ont démontré que les microARN sont impliqués dans l'embryogenèse et le développement des mammifères (Blakaj and Lin, 2008). Certains microARN, caractéristiques des cellules souches, participent au maintien de leur pluripotence (Marson et al., 2008), alors que d'autres favorisent leur différenciation (Melton et al., 2010). Les microARN peuvent aussi induire l'engagement vers un type cellulaire spécifique, comme cela a été étudié chez les cellules souches hématopoïétiques. Les cellules sanguines possèdent un répertoire de microARN qui leur est propre, et l'expression de certains microARN va engager les

progéniteurs vers une voie de différenciation spécifique. Ainsi, l'expression de miR-181 induit la différenciation des progéniteurs vers les cellules de la lignée lymphoïde (Chen et al., 2004), alors que la formation des cellules myéloïdes est induite par miR-223 (Fazi et al., 2005).

L'altération de l'expression des microARN, observée dans de nombreuses pathologies, reflète l'importance physiologique de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique par les microARN. Ainsi, la dérégulation des niveaux de microARN dans les cancers a très rapidement été mise en évidence (Calin et al., 2004; Di Leva et al., 2014), tout comme leur rôle critique pour le bon fonctionnement du cerveau, où l'altération de leur expression ou la mutation de leurs sites de liaison contribuent à la progression des maladies neurodégénératives (Marti et al., 2010; Mouradian, 2012; Schonrock et al., 2012). Les microARN participent également à la régulation du système cardiovasculaire et du métabolisme, où leur altération a été associée à différentes pathologies (Ono et al., 2011; Rottiers and Naar, 2012).

1.2 Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des éléments anucléés du sang dont la fonction principale est le maintien de l'hémostase. Elles sont également très importantes dans de nombreux processus physiopathologiques, tels que l'inflammation, la défense antimicrobienne de l'hôte, l'angiogenèse ou encore la croissance tumorale et les métastases. Comme mes travaux de thèse portent essentiellement sur les MPs, je me contenterai d'une description brève des plaquettes sanguines.

1.2.1 Origine et structure des plaquettes chez l'humain

1.2.1.1 Origine des plaquettes

Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse au cours de la dernière étape de développement de leurs cellules progénitrices, les mégacaryocytes (*megakaryocyte*, MK) (Humphrey, 1955), tel qu'illustré à la Figure 7. Les MK sont eux-mêmes issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) en différentes cellules progénitrices, qui perdent peu à peu leur pluripotence pour se

spécialiser vers la lignée MK (Visser et al., 1984). Les mégacaryoblastes précoces vont alors proliférer, puis arrêter leur multiplication, avant d'entamer plusieurs cycles d'endomitose, mécanisme dans lequel l'ADN est d'abord répliqué avant une mitose incomplète qui ne donne pas naissance à deux cellules filles (Briddell et al., 1989). Les mégacaryoblastes se différencient ensuite en MK qui acquièrent progressivement une polyploïdie, jusqu'à 128N, caractéristique des cellules MK matures (Tomer et al., 1988). Au cours de leur maturation, la taille des MK augmente énormément pour atteindre 100 µm. Le processus débute par une augmentation du volume de leur noyau, puis de leur cytoplasme.

Les ARNm présents dans le cytoplasme sont alors massivement traduits pour permettre la production, en quantité suffisante, des protéines qui deviendront plaquettaires. Toutefois, plusieurs facteurs et protéines présents dans les plaquettes sont directement prélevés du milieu extracellulaire par les plaquettes et/ou les MK via des transporteurs spécifiques, comme pour la sérotonine (Humphrey and Toh, 1954), ou via un mécanisme d'endocytose, comme pour le fibrinogène (Raslova et al., 2003). La synthèse et l'incorporation des protéines plaquettaires, tout comme la formation des granules denses et alpha, débutent dès les stades précoces de maturation des MK. Ainsi, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et des protéines présentes dans les granules alpha, telles que le facteur de von Willebrand (vWF) et le facteur plaquettaire 4 (*platelet factor 4*, PF4), sont synthétisées dès le stade diploïde et sont des marqueurs précoces de la différenciation en MK (Tomer, 2004). Dans un deuxième temps, un réseau complexe de membranes lipidiques se forme par invagination de la membrane plasmique. Ce réseau, appelé système de démarcation membranaire, constitue le réservoir nécessaire à la formation des membranes plaquettaires (Schulze et al., 2006). Les MK matures migrent ensuite dans des niches proches des vaisseaux médullaires, où ils produisent de longues extensions cytoplasmiques, appelées pré-pro-plaquettes qui pénètrent dans la circulation sanguine sous la forme de pro-plaquettes, où leur fragmentation mène à la libération des plaquettes (Hartwig and Italiano, 2003; Junt et al., 2007). Chez l'adulte, les cellules MK permettent la production de 10^{11} plaquettes par jour, dont la concentration physiologique moyenne est de $200\text{-}300 \times 10^9$ par litre de sang, et dont le renouvellement s'effectue tous les 8-9 jours (Hawker et al., 1980; Stenberg and Levin, 1989).

Le principal facteur de croissance permettant la différenciation des HSC en MK est une hormone appelée thrombopoïétine (TPO) (Bartley et al., 1994; de Sauvage et al., 1994). Cette hormone est produite de manière constitutive par le foie et son niveau plasmatique est directement régulé par les plaquettes, qui possèdent le récepteur *myeloproliferative leukemia virus oncogene* (cMPL) auquel la TPO peut se lier, et être dégradée. Ainsi, plus le nombre de plaquettes circulantes est élevé, plus la TPO est dégradée dans le plasma, ce qui permet la régulation directe du niveau de TPO en fonction de l'abondance plaquettaire (Scheding et al., 2002).

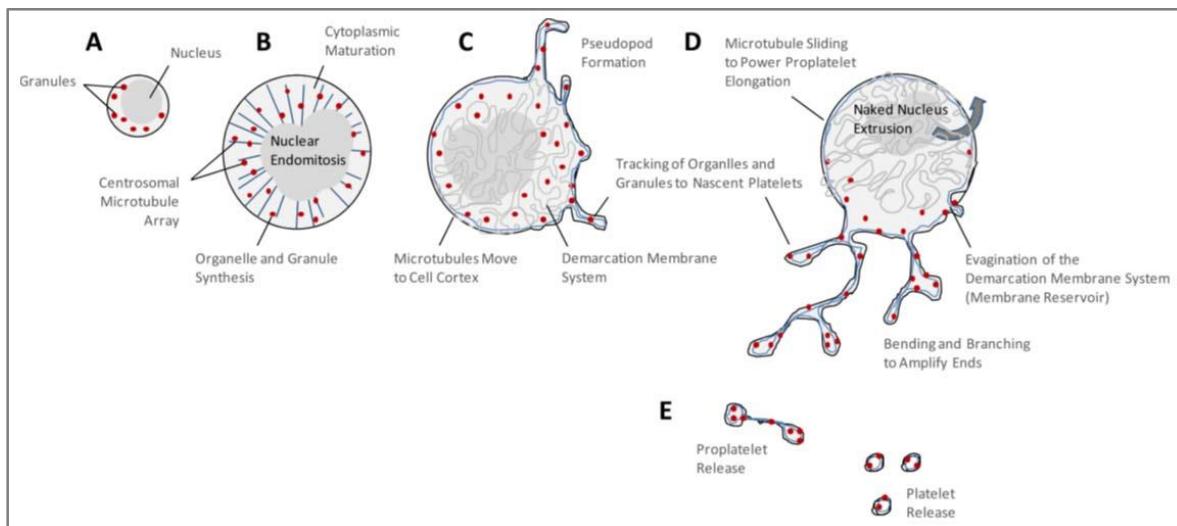


Figure 7: Production et libération des plaquettes des cellules MK.

(A-B) Les cellules MK immatures subissent plusieurs cycles d'endomitose nucléaire afin de supporter la synthèse d'organelles ainsi que la maturation et l'expansion cytoplasmique. (C) Les centrosomes se désassemblent et les microtubules migrent vers le cortex cellulaire. Un système de démarcation membranaire fournit le réservoir de membranes nécessaire à la croissance des pro-plaquettes. Les faisceaux de microtubules remplissent ensuite les pseudopodes formés par les MK. (D) Les microtubules s'allongent pour favoriser la formation de pro-plaquettes et transporter les organelles à leurs extrémités. La formation de pro-plaquettes continue à s'étendre à travers la cellule pendant que l'entortillement des microtubules amplifie l'extrémité des pro-plaquettes existantes. (E) Tout le cytoplasme des MK est converti en une masse de pro-plaquettes qui sont alors relâchées. Les mouvements des microtubules vont ensuite permettre la séparation des pro-plaquettes et la libération des plaquettes. Figure tirée de Thon and Italiano (2010).

1.2.1.2 Structure des plaquettes

Les plaquettes, dont la taille est comprise entre 2 et 4 μm , ont une forme discoïdale assurée par la présence d'un réseau périphérique de microtubules (White, 1968), tel qu'illustré à la Figure 8. Les plaquettes sont, par ailleurs, caractérisées par de nombreuses invaginations de leur membrane plasmique, appelées système canaliculaire ouvert (*open canalicular system*, OCS), qui permettent les échanges avec le plasma (Escolar and White, 1991). Le cytosquelette des plaquettes est également constitué d'actine et de protéines contractiles, telle que la myosine, qui permet le changement de forme subséquent à l'activation (Bearer et al., 2002).

Dépourvues de noyaux, les plaquettes contiennent cependant des organelles, telles que des lysosomes, des mitochondries et un réticulum endoplasmique appelé système tubulaire dense (*dense tubular system*, DTS). Ce dernier est impliqué dans le stockage du calcium intracellulaire et la production de lipides bioactifs, tel que le thromboxane A₂ (TXA₂) (Cutler et al., 1978; Gerrard et al., 1978). Les plaquettes contiennent aussi deux types de granules sécrétées lors de leur activation, soient les granules alpha et les granules denses. Les granules denses contiennent essentiellement de petites molécules non-protéiques, telles que des nucléotides (e.g., ATP, ADP, GTP, GDP), des amines (e.g., sérotonine, histamine) et des ions inorganiques (e.g., calcium, magnésium, pyrophosphate) (Rendu and Brohard-Bohn, 2001), alors que les granules alpha contiennent une grande diversité de protéines (Maynard et al., 2007). Parmi ces protéines, on retrouve notamment, des protéines impliquées dans l'adhésion plaquettaire (e.g., vWF, fibronectine, vitronectine, thrombospondine), des facteurs spécifiques des plaquettes (e.g., PF4), des facteurs de croissance ou mitogéniques (e.g., *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *interleukine 1 bêta* (IL-1 β), TGF- β), et des facteurs de coagulation (e.g., facteur V, fibrinogène). Il existe différentes sous-populations de granules alpha dont la sécrétion est sélective et dépend du stimulus utilisé pour l'activation plaquettaire (Italiano and Battinelli, 2009). Ces granules sont contenues dans des structures membranaires, et leur sécrétion permet l'exposition de nouvelles protéines à la surface des plaquettes, telles que la P-sélectine, qui est utilisée

comme marqueur de l'activation plaquettaire (McEver and Martin, 1984) et qui est impliquée dans la liaison des plaquettes aux leucocytes (McEver, 1991).

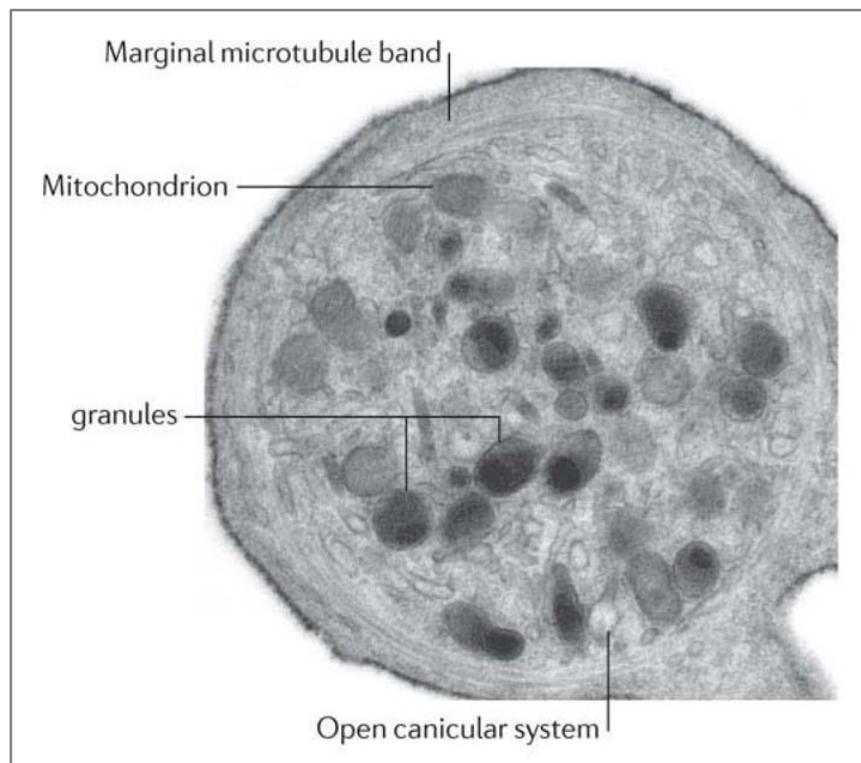


Figure 8: Structure d'une plaquette.

Morphologie d'une plaquette non activée par microscopie électronique. Un réseau de microtubule encercle le cytoplasme de la plaquette afin de maintenir sa forme discoïdale. On y retrouve également des organelles, telles que des mitochondries, des granules et un système canaliculaire ouvert. Figure tirée de Semple et al. (2011).

1.2.2 Fonction des plaquettes

Les plaquettes ont pour principale fonction de maintenir l'hémostase. Elles assurent le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire lors de lésions vasculaires ou endothéliales. Sous des conditions physiologiques normales, les plaquettes circulent à proximité de l'endothélium sans y adhérer grâce aux propriétés antiadhésives des cellules endothéliales non activées. Suite à une lésion, les plaquettes vont adhérer, recouvrir la surface lésée et former un bouchon hémostatique, permettant ainsi l'arrêt de l'hémorragie. Ce processus dépend de la capacité d'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale ainsi que de

leur capacité à subir des changements morphologiques et biochimiques rapides pour supporter l'agrégation et une activation locale de la cascade de coagulation.

1.2.2.1 Le recrutement des plaquettes

À la suite d'un dommage au niveau de la paroi vasculaire, les protéines de la matrice sous-endothéliale, très réactives aux plaquettes, telles que le collagène, le vWF, la fibronectine ou la laminine, vont être exposées à la circulation sanguine et immédiatement être engagées par des récepteurs spécifiques à la surface des plaquettes. La contribution des ligands et récepteurs spécifiques permettant l'adhésion des plaquettes dépend des conditions du flux sanguin. Lorsque les contraintes de forces de cisaillement sont importantes, comme dans les artéries ou dans le cas de sténose, le vWF est essentiel dans le recrutement des plaquettes (Savage et al., 1996). La fonction d'attachement du vWF sous-endothélial dépend de l'interaction de son domaine A1 avec la glycoprotéine Iba (GPIba) plaquettaire du complexe GPIb-V-IX (Ruggeri, 1999). Si le vWF circulant dans le plasma a une capacité de liaison à GPIba limitée, une fois immobilisé sur le collagène sous-endothélial, le vWF fournit une surface linéaire de domaines A1 qui vont faciliter la liaison de multiples récepteurs GPIba (Barg et al., 2007; Siedlecki et al., 1996). Cependant, la liaison entre le vWF et GPIba a un taux de dissociation rapide incapable de supporter l'adhésion stable des plaquettes, qui nécessite donc la contribution d'autres interactions ligands-récepteurs.

1.2.2.2 L'adhésion et l'activation des plaquettes

Une fois attachées au site de lésion, les plaquettes adhèrent de façon stable au collagène et à d'autres macromolécules de la matrice. La liaison des plaquettes au collagène se fait par la liaison avec la glycoprotéine VI (GPVI) (Moroi et al., 1996) et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Santoro, 1986), alors que la fibronectine et la laminine engagent les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$, respectivement (Ruggeri, 2009). La GPVI est le récepteur principal du collagène et son engagement va permettre le flux de calcium intracellulaire nécessaire à l'adhésion stable des plaquettes, à la réorganisation du cytosquelette, à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ et à la libération d'agonistes solubles par les plaquettes (Clemetson, 2012). Une fois bien adhérées, les plaquettes subissent une série complexe de changements biochimiques et morphologiques qui conduisent à la libération du contenu de leurs granules, riches en

agonistes plaquettaires, ainsi qu'à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$. L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ augmente son affinité pour ses ligands, tels que le vWF (Ruggeri et al., 1982) et le fibrinogène (Marguerie et al., 1979), dont la liaison va permettre l'agrégation des plaquettes (Holmback et al., 1996).

1.2.2.3 L'amplification de l'activation par les agonistes solubles

La génération et la libération d'agonistes plaquettaires solubles au niveau de la lésion du tissu sont indispensables à l'activation des plaquettes. Parmi ces agonistes, on retrouve le TXA₂, synthétisé à partir de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase (COX) et la thromboxane synthase, ainsi que l'ADP, qui est libéré par les granules denses des plaquettes (Semple et al., 2011). Ces agonistes endogènes peuvent agir de manière autocrine ou paracrine pour soutenir l'activation des plaquettes et la formation du thrombus en engageant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G, à savoir P2Y₁ (Jin et al., 1998) et P2Y₁₂ (Hollopeter et al., 2001) pour l'ADP ou les récepteurs TP α et TP β pour le thromboxane (Huang et al., 2004).

1.2.2.4 La cascade de la coagulation et la génération de thrombine

La cascade de la coagulation permet de stabiliser et de propager le clou plaquettaire en maintenant un environnement qui favorise l'agrégation, permettant ainsi la formation du réseau de fibrine. Cette cascade est une succession de réactions enzymatiques qui est initiée par le facteur tissulaire (*Tissue Factor*, TF) et se déroule en parallèle de l'activation plaquettaire (Maly et al., 2007). Le TF active le facteur VII, qui va ensuite activer les facteurs IX et X, permettant la génération de thrombine, l'activation plaquettaire et la formation d'un réseau de fibrine. La cascade de la coagulation permet ainsi une amplification à l'origine de la production massive et rapide d'une grande quantité de thrombine nécessaire à la formation du réseau de fibrine (Davie and Ratnoff, 1964). Les interactions entre les plaquettes et la cascade de la coagulation sont multiples. En effet, la cascade de la coagulation permet l'activation des plaquettes par la génération de thrombine, alors que certains éléments sécrétés par les plaquettes activées sont impliqués dans la cascade de la coagulation.

La thrombine est une protéase à sérine qui est un puissant agoniste plaquettaire. Chez l'humain, elle active les plaquettes en engageant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G, PAR1 et PAR4, qui sont activés suite à leur clivage par la thrombine (Brass, 2003). Dans le sang, la thrombine est présente sous sa forme inactive, la prothrombine. Le déclenchement de la cascade de la coagulation mène au clivage de la pro-thrombine, par le complexe pro-thrombinase, en thrombine, qui est la protéase effectrice de cette cascade (Steffel et al., 2006). La thrombine réalise alors la conversion, par protéolyse, du fibrinogène soluble en fibrine (Bailey et al., 1951), qui polymérise ensuite en un réseau insoluble et permet la formation d'un thrombus stable.

1.2.2.5 Contrôle de la croissance du thrombus et fibrinolyse

La formation d'un thrombus doit être localisée et contrôlée afin de ne pas propager la réponse hémostatique dans tout le vaisseau sanguin et ainsi provoquer son obstruction. La croissance du thrombus et sa propagation sont ainsi limitées par différents systèmes qui inhibent l'activation plaquettaire et la coagulation.

Tout d'abord, pour empêcher l'activation des plaquettes dans les régions distales, les cellules endothéliales non-activées sécrètent différentes molécules de manière constitutive, telles que la prostacycline (*prostaglandin I₂*, PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO), qui sont de puissants inhibiteurs de la fonction plaquettaire (Jones et al., 2012). Par ailleurs, pour empêcher une coagulation excessive au niveau de la lésion, des inhibiteurs de la coagulation sont activés par la cascade elle-même. C'est notamment le cas de la protéine C, activée par clivage protéolytique par la thrombine (Stearns-Kurosawa et al., 1996), qui va limiter la production de thrombine en clivant différents facteurs de la cascade de la coagulation (Lu et al., 1996). Enfin, la croissance du thrombus est limitée par la fibrinolyse, qui correspond à la lyse du réseau de fibrine par la plasmine (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005). Cette enzyme circule dans le plasma sous forme de plasminogène, et son activation protéolytique est réalisée par deux protéases qui sont le *tissue Plasminogen Activator* (tPA) et l'urokinase.

1.2.3 Transcriptome et microARN des plaquettes

Dépourvues de noyaux, les plaquettes n'ont, par conséquent, pas d'ADN génomique à transcrire en ARN. Néanmoins, les plaquettes ont un transcriptome important, directement hérité des MK, qui représente environ 30 % des gènes étudiés à ce jour chez l'humain (Rowley et al., 2011). De plus, les plaquettes contiennent des protéines et des ARN ribosomaux, des facteurs d'initiation de la traduction (Rosenwald et al., 2001), un spliceosome fonctionnel (Denis et al., 2005), un réticulum endoplasmique et des ribosomes leur permettant de synthétiser des protéines *de novo* à partir des ARNm qu'elles contiennent (Booyse and Rafelson, 1968; Kieffer et al., 1987; Warshaw et al., 1967). Ainsi, il n'est guère surprenant que la comparaison des analyses transcriptomiques et protéomiques des plaquettes démontrent que le transcriptome plaquettaire est un reflet fidèle de son protéome (McRedmond et al., 2004).

Par ailleurs, notre équipe a démontré que les plaquettes humaines contiennent une quantité abondante et diversifiée de microARN matures (Landry et al., 2009). Cette étude a également révélé la présence, dans les plaquettes, de plusieurs protéines cytoplasmiques de la voie des microARN, telles que Dicer, TRBP, Ago2 et FMRP, mais, surtout, que les protéines Ago2 et Dicer sont fonctionnelles *in vitro*. Suite à cette étude, la présence de microARN dans les plaquettes fut confirmée par d'autres équipes de recherche (Nagalla et al., 2011; Osman and Falker, 2011; Stratz et al., 2012) et le profil des microARN plaquettaires a corrélé avec leur réactivité (Nagalla et al., 2011) ainsi que diverses pathologies, telles que la thrombocytémie essentielle (Xu et al., 2012), ou les cardiopathies coronariennes (Sondermeijer et al., 2011).

Il est également intéressant de noter, qu'indépendamment de l'état d'activation des plaquettes, environ la moitié des microARN sont associés à la protéine Ago2, dont certains peuvent réguler la traduction d'ARNm plaquettaires (Corduan et al., 2015). Enfin, une autre étude de notre équipe a détecté la présence de plus de 500 microARN matures dans les plaquettes, grâce à une technique de séquençage de petits ARN (*small RNA-Seq*) (Ple et al., 2012a). Dans les plaquettes, les microARN portent, à leur extrémité 3', des modifications transcriptionnelles, tels que l'uridylation ou l'adénylation. On retrouve également de nombreux isomiRs, dont certains sont parfois présents en quantité plus

importante que le microARN de référence entré dans miRBase. Tout cela révèle l'existence d'un répertoire complexe et diversifié de microARN dans les plaquettes humaines.

1.2.4 Activation des plaquettes et libération de microparticules

L'activation des plaquettes induit une variété de réponses cellulaires, dont le changement de leur forme, la translocation des glycoprotéines membranaires, la sécrétion du contenu de leurs granules, ou encore la formation et la libération de microvésicules, incluant les exosomes et les MPs.

Les MPs, de taille hétérogène comprise entre 0.1 et 1 µm de diamètre, sont libérées par les plaquettes suite à leur activation, mais aussi au cours du vieillissement de la plaquette, au début de l'apoptose (Beyer and Pisetsky, 2010; Wolf, 1967). La libération de MPs fait suite à l'activation des plaquettes par des agonistes physiologiques, tels que la thrombine, le collagène, l'ADP et d'autres (Aatonen et al., 2014). Les MPs originent du bourgeonnement de la membrane, qui forme des protrusions qui vont ensuite se désolidariser pour libérer les MPs, tel qu'illustré à la Figure 9. Suite à l'activation, l'augmentation du calcium intracellulaire est une étape essentielle dans le processus de libération de MPs qui va affecter, de manière plus ou moins directe, l'activité d'enzymes responsables du maintien de la structure du cytosquelette et de l'architecture des lipides membranaires, telles que la calpaïne, la gelsoline, les flippases, les floppases et les scramblases (Fox et al., 1990; Piccin et al., 2007). Suite à l'action de la gelsoline, les microfilaments d'actine vont être accessibles pour un réarrangement du cytosquelette et la calpaïne va ensuite dégrader ces filaments ainsi que des protéines de liaison à l'actine pour permettre la libération de MPs (McLaughlin et al., 1993). Par ailleurs, l'augmentation de calcium intracellulaire inhibe les flippases, qui maintiennent la phosphatidylsérine (PS) à l'intérieur de la membrane plasmique, et active les floppases et scramblases, qui catalysent le mouvement de la PS vers l'extérieur et la redistribution non spécifique des phospholipides membranaires, respectivement, favorisant ainsi la libération de MPs (Zwaal et al., 1993).

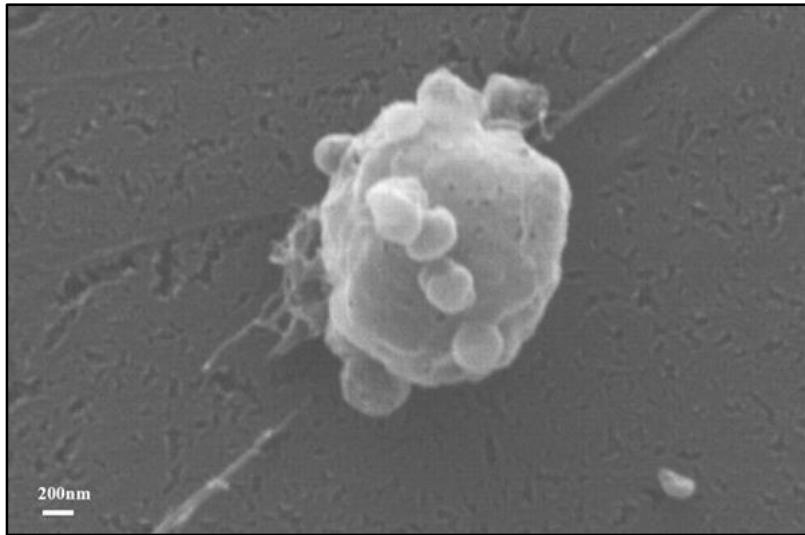


Figure 9: Libération de MPs par les plaquettes

Morphologie d'une plaquette activée par microscopie électronique. Les protrusions cytoplasmiques induites par l'activation se désolidarisent de la membrane plasmique pour permettre la libération de MPs par bourgeonnement. Figure tirée de Boilard et al. (2010).

1.2.5 Implications physiologiques et pathologiques des plaquettes

Bien que le maintien de l'hémostase soit la fonction primaire des plaquettes, ces dernières années, de nombreuses fonctions non-hémostatiques leurs ont été attribuées. Les plaquettes représentent le second sous-type cellulaire dans la circulation en terme d'abondance, ce qui, avec leur petite taille, leur permet d'exercer leur rôle de sentinelles dans le maintien de l'intégrité vasculaire et contre les infections (Ruggeri, 2009). En effet, les plaquettes sont les premières cellules, mais aussi les plus nombreuses, à arriver aux sites d'infections intravasculaires, où elles jouent un rôle central dans la reconnaissance d'invasion microbienne (Vieira-de-Abreu et al., 2012). Grâce à leurs nombreux récepteurs immunitaires, tels que les récepteurs Fc et les récepteurs *Toll like* (TLR), les plaquettes participent à la défense immunitaire de l'hôte suite à une infection par des bactéries, des parasites, des virus, ou des champignons (Semple et al., 2011). De plus, les plaquettes sont la principale source de CD40L circulant (Heeschen et al., 2003), un modulateur important de l'immunité adaptative, et activent ainsi plusieurs types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire, tels que les cellules dendritiques ou les lymphocytes T naïfs (Elzey et al., 2011).

Les plaquettes sont aussi grandement impliquées dans l'inflammation. Suite à leur activation, les plaquettes libèrent des substances bioactives qui altèrent les propriétés chimiotactiques et adhésives de l'endothélium et induisent ainsi le recrutement, l'activation et la transmigration des monocytes et autres leucocytes vers le site inflammatoire (Gawaz et al., 2005), un phénomène qui amplifie l'inflammation. Ainsi, en plus d'être impliquées dans la stimulation de l'athérogénèse (Lievens and von Hundelshausen, 2011; Massberg et al., 2002), les plaquettes contribuent également à l'athérothrombose en augmentant l'instabilité des plaques d'athérosclérose (Schonbeck and Libby, 2001). Les plaquettes sont également impliquées dans l'arthrite rhumatoïde, où leur activation par la GPVI amplifie l'inflammation (Boilard et al., 2010), le *Transfusion-related acute lung injury* (TRALI) où elles activent les neutrophiles et induisent la formation de *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) (Caudrillier et al., 2012), ou la septicémie (*sepsis*), où leur activation va contribuer au disfonctionnement de certains organes (Levi, 2005). Enfin, les plaquettes sont impliquées dans le cancer, où elles jouent un rôle clé dans la progression des tumeurs et des métastases (Gay and Felding-Habermann, 2011).

1.3 Les microparticules de plaquettes

Les MPs sont une classe de vésicules extracellulaires qui sont divisées en trois groupes (tel qu'illustré à la figure 10) en fonction de leur taille, de leur composition et du mécanisme menant à leur formation. N'ayant travaillé qu'avec des MPs, en particulier des MPs de plaquettes, je me contenterai d'introduire uniquement ces dernières dans la partie qui va suivre.

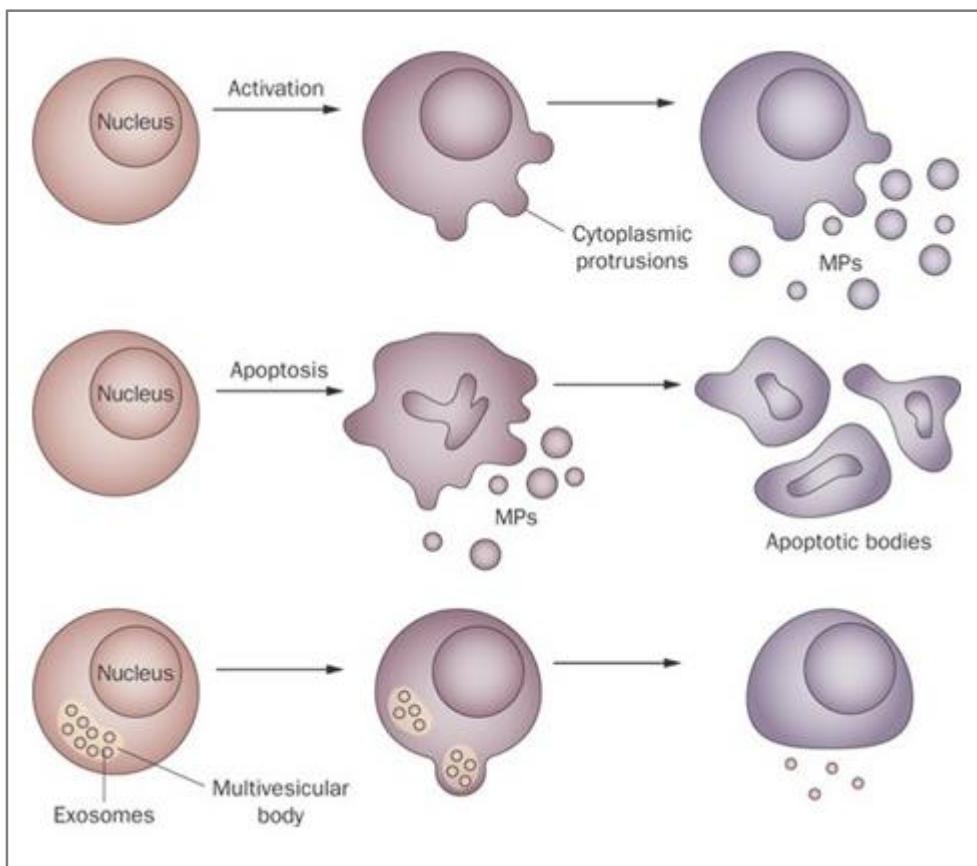


Figure 10: Formation et libération des différents types de vésicules extracellulaires.

Les microparticules ont une taille hétérogène comprise entre 0.1 et 1 µm, et sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique suite à l'activation ou l'apoptose des cellules. Les corps apoptotiques sont les plus grosses vésicules, avec une taille variant entre 1 et 4 µm de diamètre. Ils représentent le stade terminal des cellules apoptotiques et sont issus de la fragmentation de ces dernières. Les exosomes sont les plus petites vésicules extracellulaires avec une taille comprise entre 30 et 100 nm de diamètre. Ils sont formés par l'invagination des membranes endosomales et localisés dans les corps multivésiculaires, avant d'être libérés à l'extérieur de la cellule par exocytose suite à la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique de la cellule. Figure tirée Beyer and Pisetsky (2010).

1.3.1 Définition et généralités

Les MPs sont des vésicules extracellulaires dont la taille est comprise entre 100 et 1000 nm de diamètre et dont la composition dépend du stimulus et de la cellule d'origine. Elles sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique suite à l'activation ou l'apoptose de la plupart des cellules (Cocucci et al., 2009). Ainsi, les MPs expriment les mêmes

antigènes de surface que leur cellule d'origine, ce qui permet de déterminer leur provenance. Par ailleurs, bien que la phosphatidylsérine (PS) soit considérée comme un marqueur des MPs (Gyorgy et al., 2011a), plusieurs études ont également décrit l'existence de MPs n'exprimant pas la PS en surface (Connor et al., 2010), une caractéristique qui pourrait leur permettre une plus longue durée de vie dans la circulation.

1.3.2 Mécanismes de formation des microparticules

La formation des MPs implique deux mécanismes principaux: le réarrangement des phospholipides membranaires et le réarrangement du cytosquelette d'actine (Morel et al., 2011).

1.3.2.1 Le réarrangement des phospholipides membranaires

À l'état basal, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont situées essentiellement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, alors que la PS et la phosphatidyléthanolamine, sont situées essentiellement au niveau du feuillet interne (Zachowski, 1993). La migration passive des phospholipides d'un feuillet à un autre est lente et requiert différentes protéines (Zwaal and Schroit, 1997).

Dans les cellules quiescentes, l'asymétrie lipidique est maintenue par une translocase appelée flippase (Daleke and Huestis, 1985). Ainsi, lorsque la PS ou la phosphatidyléthanolamine apparaissent au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, la flippase les relocalise vers le feuillet interne. La flippase est inhibée par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Tilly et al., 1990) et, de ce fait, son activité est régulée lors de l'activation cellulaire ou l'apoptose, deux situations dans lesquelles la concentration de calcium intracellulaire augmente et où la PS est présente au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. La floppase, une autre translocase, est, quant à elle, impliquée dans le mouvement de la PS du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Connor et al., 1992). Elle est responsable de la rupture de l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique lorsque la cellule est activée ou devient apoptotique. Enfin, une troisième protéine appelée scramblase, également activée par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, permet le transport bidirectionnel des phospholipides membranaires (Zhou et al., 1997). L'action de la

scramblase induit une migration des phospholipides dans la direction opposée à leur gradient et donc, comme pour la flippase, compromet l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique des cellules activées ou apoptotiques.

L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, associée à l'activation cellulaire et/ou à l'apoptose, inhibe la flippase et active la floppase et la scramblase. Cela perturbe l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique et mène à l'expression de la PS au niveau du feuillet externe. Par ailleurs, l'expression de la PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique favorise le bourgeonnement de la membrane plasmique et donc la formation de MPs (Morel et al., 2011).

Si l'exposition de la PS à la surface de la membrane plasmique semble nécessaire à la formation des MPs, la composition des phospholipides membranaires est également importante. En effet, la quantité de phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) dans la membrane plasmique des plaquettes régule la formation des MPs. Une diminution de la quantité de PIP₂ induit une formation de MPs, alors qu'une augmentation de sa concentration inhibe la production de MPs par le collagène, la thrombine ou le calcium ionophore (O'Connell et al., 2005).

1.3.2.2 Le réarrangement du cytosquelette d'actine

En plus du réarrangement des phospholipides membranaires, la formation de MPs, nécessite également un réarrangement du cytosquelette d'actine. En effet, dans des plaquettes stimulées, le clivage de protéines assurant la liaison entre le cytosquelette membrinaire et la membrane plasmique induit la formation de MPs, alors que l'inhibition de la calpaïne, responsable du clivage de ces protéines de liaison en réponse à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, inhibe la production de MPs (Fox et al., 1990). Dans d'autres types cellulaires, le détachement du cytosquelette d'actine corticale de la membrane plasmique est également associé à la formation de MPs (Keller et al., 2002; Knowles et al., 1997).

Par ailleurs, la formation de MPs pendant les stades précoce de l'apoptose est associée à l'activation de la protéine Rho Kinase I (ROCK I), suite au clivage de son domaine inhibiteur par une caspase 3 activée (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001).

Dépourvue de son domaine inhibiteur, ROCK 1 n'est plus régulée et permet la phosphorylation des chaînes légères de la myosine, ce qui a pour effet la contraction des filaments d'actines, le détachement du cytosquelette de la membrane plasmique et donc la formation de MPs.

L'importance de la concentration en PIP₂ pour la formation de MPs est liée au fait que le PIP₂ renforce la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette. En effet, le PIP₂ lie de nombreuses protéines de liaison à l'actine, telles que la β -spectrine (Hyvonen et al., 1995), la moesine (Tsukita and Yonemura, 1999) et l' α -actinin (Fukami et al., 1992), assurant ainsi la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette. Ainsi, lors de l'activation cellulaire, la calpaïne clive les kinases responsables de la formation du PIP₂ (O'Connell et al., 2005). Ceci a pour effet de diminuer la concentration membranaire en PIP₂ et, par conséquent, la force d'interaction entre la membrane plasmique et le cytosquelette pour favoriser la formation de MPs.

1.3.3 Élimination des microparticules circulantes

L'exposition de PS à leur surface pourrait être un prérequis à l'élimination des MPs circulantes, une hypothèse qui est soutenue par le fait que le sang de sujets sains, qui ont un système d'élimination intact, contient des MPs qui sont majoritairement PS négatives (Laresche et al., 2014). De plus, l'exposition de PS pourrait être un signal d'élimination pour les phagocytes équipés de récepteurs spécifiques à la PS (Fadok et al., 1992).

La lactadhéchine, une glycoprotéine sécrétée par les macrophages, semble jouer un rôle important dans l'élimination des MPs circulantes (Dasgupta et al., 2009). En effet, elle augmente la phagocytose de MPs de plaquettes par les macrophages, de manière concentration dépendante. D'ailleurs, les souris déficientes en lactadhéchine ont un plus grand nombre de MPs circulantes suite à la diminution de leur phagocytose par les macrophages de la rate. En fait, la lactadhéchine servirait de pont entre la PS à la surface des MPs et les intégrines des macrophages afin de faciliter leur phagocytose. La β 2-glycoprotéine I, une protéine plasmatique, agit de la même manière et facilite ainsi la phagocytose de MPs de plaquettes par les macrophages (Abdel-Monem et al., 2010).

Les macrophages ne sont cependant pas les seules cellules impliquées dans l'élimination des MPs circulantes. Les cellules endothéliales sont également capables d'internaliser les MPs de plaquettes, par un mécanisme d'endocytose dépendant d'une glycoprotéine sécrétée par l'endothélium, *Developmental endothelial locus-1* (Del-1) (Dasgupta et al., 2012). En effet, les souris déficientes en Del-1 présentent un nombre plus important de MPs circulantes, alors que les cellules endothéliales du poumon et du foie de ces mêmes souris présentent un déficit d'internalisation de MPs, comparativement aux cellules de souris sauvages. De façon similaire à la lachthadérine pour les macrophages, Del-1 sert de pont entre la PS à la surface des MPs et les intégrines des cellules endothéliales, et facilite leur internalisation.

L'élimination de MPs d'origines différentes a également été étudiée. Les MPs de globules rouges sont ainsi éliminées par les cellules de Küpffer via un mécanisme impliquant les récepteurs *scavengers* (Willekens et al., 2005), alors que les MPs de cellules endothéliales et de différentes cellules tumorales sont éliminées par la rate et le foie ou la rate, respectivement (Al Faraj et al., 2012; Davila et al., 2008).

Les études réalisées chez la souris et le lapin démontrent que l'élimination des MPs circulantes est un phénomène rapide qui se déroule dans les 10 minutes suivant l'injection des MPs dans la circulation (Dasgupta et al., 2009; Dasgupta et al., 2012; Rand et al., 2006). Par ailleurs, une étude réalisée chez l'humain démontre que des MP transfusées à des patients thrombocytopéniques ont une durée de vie comprise entre 5 et 6 heures dans la circulation (Rank et al., 2011).

1.3.4 Microparticules et communications intercellulaires

Les MPs sont de véritables vecteurs pour l'échange intercellulaire d'informations et de signaux biologiques qui peut se faire de différentes manières, telles qu'illustrées à la Figure 11. Les MPs peuvent transférer des récepteurs à une cellule cible et ainsi induire des modifications phénotypiques et fonctionnelles qui vont rendre la cellule sensible à de nouveaux stimuli. Les MPs de plaquettes, qui contiennent des niveaux élevés de CXCR4, transfèrent ce récepteur de manière fonctionnelle à différents types cellulaires qui ne l'expriment pas, et contribuent ainsi à la propagation du VIH dans la mesure où CXCR4 lui

sert de corécepteur (Rozmyslowicz et al., 2003). Suite à ce transfert, les types cellulaires initialement insensibles au VIH peuvent ainsi être ciblés par le virus et jouer un rôle important dans la persistance et la propagation de l'infection.

Les MPs peuvent aussi transférer des protéines, telles que des cytokines, des chimiokines, ou des facteurs de croissance, et ainsi moduler l'activité et les propriétés des cellules cibles. Par exemple, suite au transfert de l'IL-1 β par les MPs, les cellules endothéliales produisent plus de molécules d'adhérences et de chimiokines, leur permettant de recruter des neutrophiles (Lindemann et al., 2001), alors que le transfert de *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) permet le recrutement de monocytes au niveau de l'endothélium, et contribue ainsi au développement de l'athérosclérose (Mause et al., 2005).

Les communications intercellulaires peuvent également se faire via la livraison d'acides nucléiques, et ainsi reprogrammer la cellule cible. En effet, le transfert d'ARNm fonctionnels a été récemment démontré (Risitano et al., 2012). Compte tenu de la richesse des plaquettes et de leurs MPs en microARN (Hulsmans and Holvoet, 2013; Landry et al., 2009), il ne serait pas surprenant qu'un tel transfert d'information génétique capable de réguler la cellule cible implique les microARN.

Par ailleurs, les MPs peuvent également transporter et transférer des lipides bioactifs, tel que l'acide arachidonique, qui vont activer les plaquettes et les cellules endothéliales adjacentes (Barry et al., 1997), et ainsi augmenter les interactions entre les monocytes et l'endothélium (Barry et al., 1998). Enfin, les MPs peuvent contenir des organelles, telles que les mitochondries, qui interagissent *in vivo* avec les neutrophiles et induisent leur adhésion sur l'endothélium (Boudreau et al., 2014).

Il est important de noter, et de garder à l'esprit, que les différentes voies utilisées par les MPs de plaquettes pour participer aux communications intercellulaires ne sont pas exclusives aux plaquettes, et que des MPs de diverses origines participent à ces échanges entre les cellules (Mause and Weber, 2010).

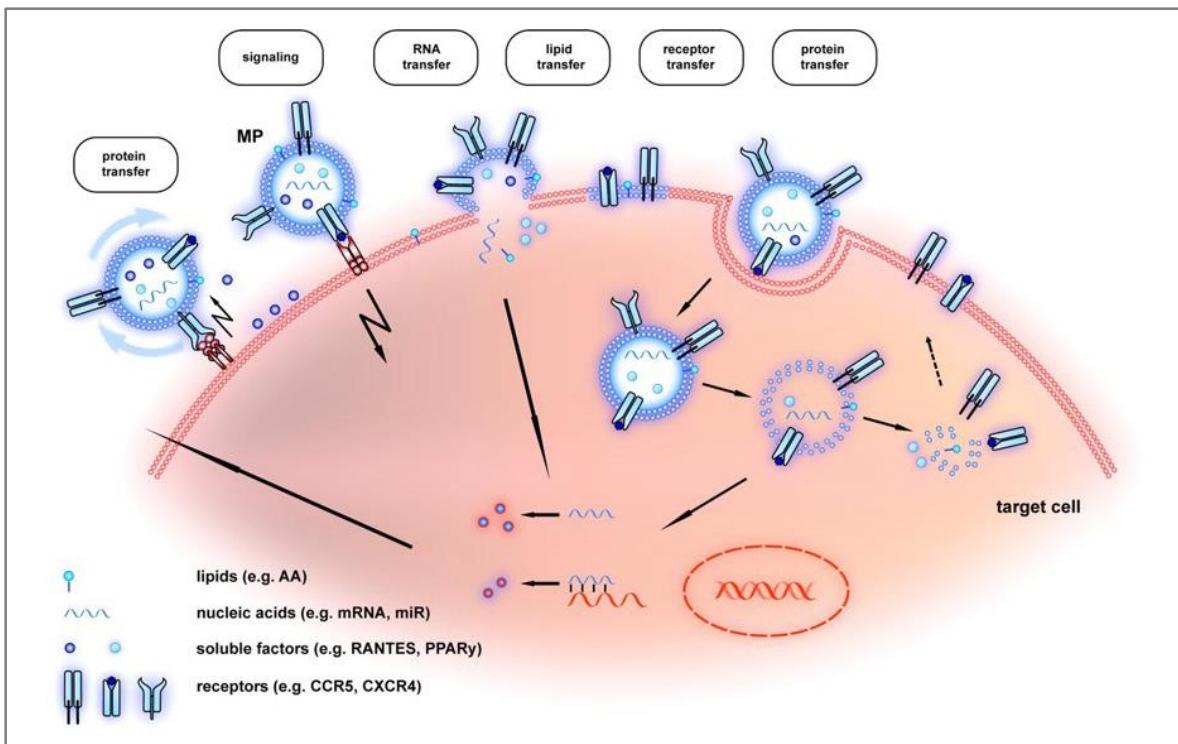


Figure 11: Les différentes voies et constituants moléculaires utilisés par les MPs lors des communications intercellulaires.

Les médiateurs solubles libérés par les MPs peuvent être délivrés à la cellule cible à la suite d'interactions stables ou transitoires, alors que les molécules associées aux membranes peuvent induire des réponses spécifiques dans la cellule cible. Les MPs peuvent aussi transférer des récepteurs et des composants membranaires ou cytosoliques à la cellule cible suite à une fusion membranaire ou à leur internalisation. Le contenu internalisé par la cellule cible peut induire sa reprogrammation, alors que les composants des MPs associés aux membranes peuvent être partiellement recyclés et présentés à la membrane de la cellule cible. Figure tirée de Mause and Weber (2010).

1.3.5 Implications physiologiques et pathologiques des microparticules

Initialement considérées comme des débris cellulaires dépourvues d'activité, les MPs sont maintenant reconnues pour leurs effets physiologiques et pathologiques.

Les plaquettes sont des acteurs majeurs de la cascade de coagulation et la présence de MPs de plaquettes, qui représentent le sous-type de MPs le plus abondant dans la circulation (Berckmans et al., 2001), fournit une surface membranaire supplémentaire ayant des

propriétés procoagulantes. Ces propriétés sont dues à la présence de PS à la surface des MPs qui permet l'assemblage des différents composants de la cascade de coagulation, mais aussi l'expression en surface du TF, qui est un puissant activateur de la cascade de coagulation (Muller et al., 2003).

Les MPs transportent et livrent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, et sont ainsi impliquées dans la régulation de nombreux processus inflammatoires, notamment au niveau de l'endothélium. Le transport et le transfert d'Acide Arachidonique (AA) aux cellules endothéliales par les MPs induit l'expression de COX-2 et la production de prostaglandines, ainsi que l'activation des cellules endothéliales, qui expriment alors des molécules d'adhésion, telles que ICAM-1 (Barry et al., 1999; Barry et al., 1997). Les MPs induisent également l'expression de récepteurs à ICAM-1 à la surface des monocytes et favorisent ainsi l'adhésion des monocytes sur l'endothélium (Barry et al., 1998), évènement primaire de plusieurs syndromes inflammatoires vasculaires (Mantovani and Dejana, 1989). L'arrêt et la diapédèse des monocytes, ainsi que des neutrophiles, à travers l'endothélium sont également favorisés par les MPs via la libération de molécules pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β ou RANTES (Lindemann et al., 2001; Mause et al., 2005). Enfin, les MPs induisent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales et les monocytes, et contribuent ainsi à l'inflammation de l'endothélium (MacKenzie et al., 2001). À l'inverse, les MPs peuvent favoriser la réparation de l'endothélium en améliorant la capacité des *early outgrowth cells* (EOC) à restaurer l'intégrité de l'endothélium après une lésion (Mause et al., 2010). En effet, les MPs accélèrent le recrutement des EOC ainsi que leur migration, leur différenciation et leur libération de facteurs pro-angiogéniques.

Les MPs sont impliquées dans les maladies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose. De fortes concentrations de MPs circulantes sont détectées dans le sang de patients atteints de maladies cardiovasculaires, et plusieurs études indiquent que les MPs sont impliquées dans différentes étapes de l'athérosclérose (Boulanger et al., 2006). Par exemple, les MPs expriment à leur surface des molécules d'adhésion qu'elles transfèrent aux cellules endothéliales, ce qui permet le recrutement des monocytes au niveau de la plaque et contribue au développement de la lésion (Rautou et al., 2011a). En effet, ces monocytes migrent ensuite à l'intérieur de la plaque d'athérome, où ils se différencient en

macrophages avant de se transformer en cellules spumeuses suite à la phagocytose de LDL oxydés (Moore and Tabas, 2011).

Les MPs de plaquettes permettent aussi la dissémination des tumeurs en favorisant la formation de métastases (Janowska-Wieczorek et al., 2005). Chez différentes lignées cancéreuses, les MPs induisent une phosphorylation de plusieurs kinases, l'expression de métalloprotéinases matricielles et de facteurs angiogéniques, stimulent leur prolifération et invasion, alors que l'injection de MPs *in vivo* induit une augmentation significative du nombre de métastases. Les MPs adhèrent fermement à des cellules de cancer de la prostate et augmentent leur adhésion aux cellules endothéliales et aux composants de la matrice extracellulaire afin de favoriser leur invasion. Par ailleurs, les cellules cancéreuses exposées aux MPs présentent une augmentation de l'expression de gènes associés à la progression tumorale et une diminution de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Varon et al., 2012). L'expression en surface de molécules d'adhésion (P-sélectine, $\alpha_{IIb}\beta_{III}$) et de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, PDGF) permet aux MPs d'augmenter l'angiogenèse des cellules endothéliales et des cellules tumorales, tandis que l'expression de PS et de TF active la coagulation et la thrombose, permettant ainsi la progression du cancer (Falanga et al., 2012).

Les MPs sont également impliquées dans l'immunité et peuvent activer la réponse immunitaire. En collaboration avec les lymphocytes T CD4, les MPs activent les cellules B et facilitent la formation de centres germinatifs grâce au CD40L qu'elles exposent (Sprague et al., 2008). Par ailleurs, les MPs sont impliquées dans des maladies auto-immunes. En effet, une quantité accrue de MPs est détectée dans différents fluides de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, de lupus érythémateux, de sclérose en plaque ou du syndrome antiphospholipides, comparé aux fluides de personnes saines (Sellam et al., 2009). Dans l'arthrite rhumatoïde, via l'IL-1 β qu'elles transportent, les MPs stimulent les synoviocytes à produire des cytokines pro-inflammatoires (Boilard et al., 2010), alors que les MPs du liquide synovial de patients expriment des auto-anticorps et sont recouvertes de complexes immuns (Cloutier et al., 2013). Ces MPs stimulent la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires par les neutrophiles, suggérant que les auto-anticorps présents à leur surface sont accessibles et reconnus par des auto-anticorps présent chez les patients atteints

d'une maladie auto-immune. Ce processus pourrait donc induire ou maintenir une inflammation.

1.4 Les cellules endothéliales

1.4.1 Définition et origine

1.4.1.1 Définition et généralités

Les cellules endothéliales forment le revêtement interne des vaisseaux sanguins et fournissent une barrière anticoagulante entre la paroi vasculaire et le sang. Chez un adulte, on estime que l'endothélium, qui est formé d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse tout le système vasculaire, contient environ 1×10^{13} cellules et forme un « organe » de presque 1 kg (Sumpio et al., 2002). Les cellules endothéliales jouent plusieurs rôles essentiels qui ont pour but de contrôler les fonctions vasculaires. Si elles étaient considérées à la base comme une barrière passive, elles sont aujourd’hui reconnues comme un tissu complexe remplissant diverses fonctions, capable de s’adapter à des besoins spécifiques en fonction des conditions environnementales. En effet, elles participent à tous les aspects de l’homéostasie vasculaire, mais aussi à différents processus physiologiques et pathologiques tels que la thrombose, l’inflammation ou le remodelage de la paroi vasculaire (Sumpio et al., 2002). Dans la circulation, les cellules endothéliales réagissent à des stimuli physiques et chimiques afin de réguler l’hémostase ainsi que les réponses immunitaires et inflammatoires. Elles sont également essentielles à l’angiogenèse et la vasculogenèse. Leur lésion, activation ou dysfonction est un marqueur de divers états pathologiques, tels que l’athérosclérose ou la thrombose (Michiels, 2003).

1.4.1.2 Origine des cellules endothéliales

La différenciation des cellules mésodermiques en angioblastes, puis en cellules endothéliales était vu comme une série d’événements qui se déroulait uniquement pendant le développement embryonnaire. Plus tard, il a été découvert que des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ d’adultes pouvaient se différencier *ex vivo* en cellules endothéliales (Asahara et al., 1997); de telles cellules ont été identifiées dans la circulation (Shi et al., 1998). Ainsi, les cellules progénitrices endothéliales circulantes étaient définies comme des cellules positives pour un marqueur de cellules souches hématopoïétiques, tel

que CD34, et un marqueur endothérial tel que VEGFR2. Comme CD34 se retrouve également à la surface de cellules endothéliales matures, d'autres études ont utilisé un marqueur de cellules souches hématopoïétiques plus immature, CD133 (promininne 1), suite à la démonstration que des cellules CD133⁺ pouvaient se différencier en cellules endothéliales *in vitro* (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000). De plus, CD133 est exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques, mais pas sur les cellules endothéliales matures ni les cellules monocytiques (Handgretinger et al., 2003). Ainsi, il existe aujourd'hui un consensus selon lequel les cellules CD133^{+/VEGFR2⁺, qui proviennent de la moelle osseuse, représentent une population ayant des capacités de cellules progénitrices endothéliales (Urbich and Dimmeler, 2004). Cependant, l'origine des cellules endothéliales est controversée et toujours matière à débats, tel qu'illustré à la Figure 12. En effet, des cellules myéloïdes peuvent se différencier (ou trans-différencier) en lignée endothéliale (Schmeisser et al., 2001; Urbich et al., 2003), tout comme des cellules souches mésenchymateuses (Jackson et al., 2001; Reyes et al., 2002), ou même cardiaques (Beltrami et al., 2003), démontrant ainsi la pluralité de l'origine des cellules progénitrices endothéliales.}

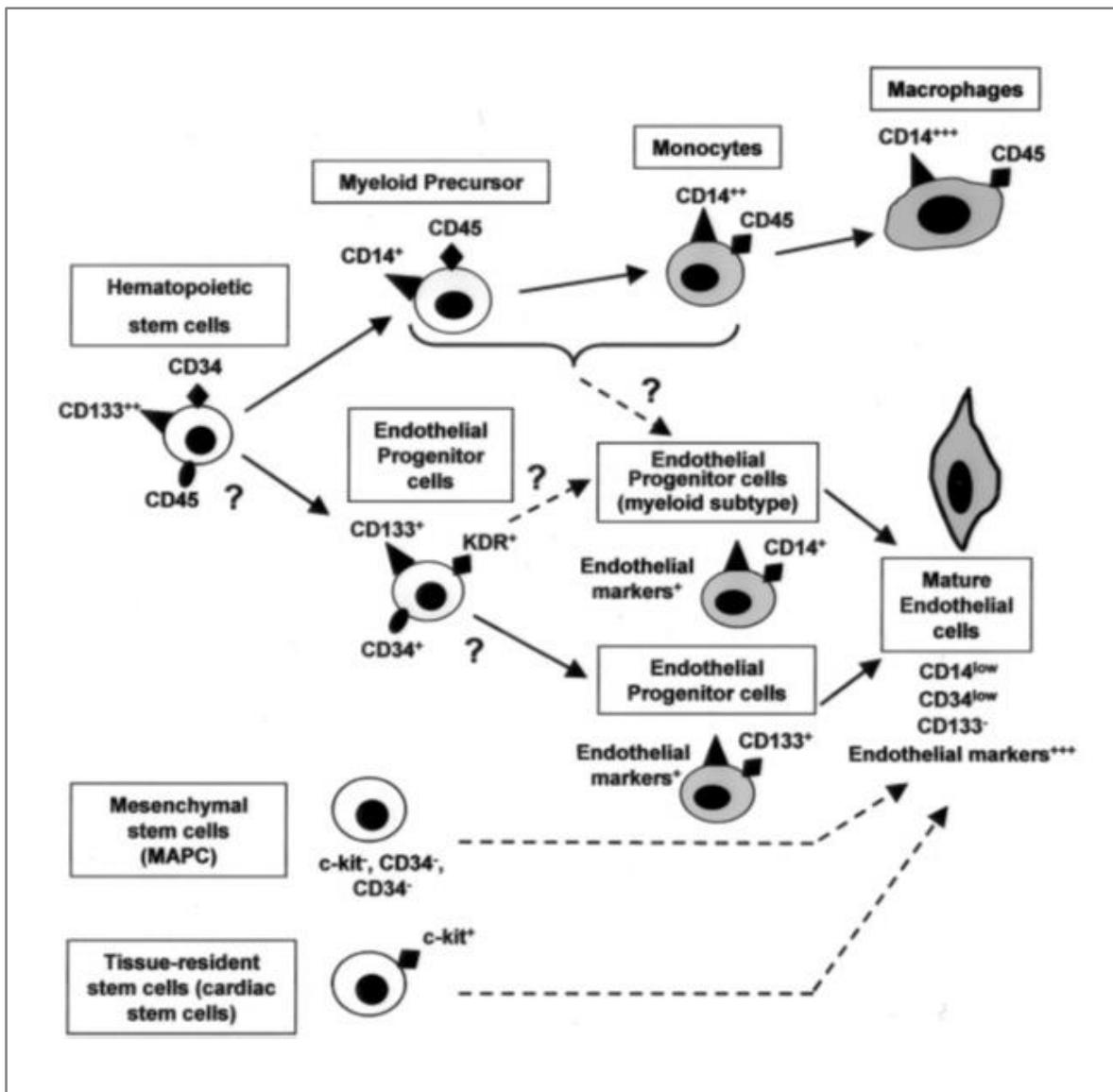


Figure 12: Origine des cellules progénitrices endothéliales.

Les cellules progénitrices endothéliales pourraient provenir d'origines différentes. Elles peuvent provenir des cellules souches hématopoïétiques, qui se différencient en précurseurs myéloïdes ou en progéniteurs de cellules endothéliales, mais aussi possiblement de cellules souches mésenchymateuses ou résidentes, comme des cellules souches cardiaques. Figure tirée de Urbich and Dimmeler (2004).

1.4.2 Fonctions de l'endothélium

1.4.2.1 La barrière endothéliale

La paroi des vaisseaux sanguins forme une barrière sélective pour le transport de molécules entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales offrent une surface importante pour ces échanges, avec une aire totale chez l'humain estimée à $\sim 350 \text{ m}^2$ (Baldwin and Thurston, 2001; Pries et al., 2000). L'endothélium est une monocouche continue de cellules attachées les unes aux autres par différents types de structures adhésives, ou jonctions cellulaires. Ces structures complexes sont formées par des molécules adhésives transmembranaires liées à un réseau de protéines du cytosquelette et du cytoplasme. Trois types de jonctions ont été décrites dans les cellules endothéliales: les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence et les jonctions *gap* (Dejana, 1997; Dejana et al., 1995; Schnittler, 1998). Ces structures adhésives sont étroitement régulées afin de contrôler la perméabilité vasculaire vis-à-vis des cellules sanguines circulantes, mais également pour contrôler le mouvement des fluides et protéines du plasma. La perte de cette fonction de barrière est associée à la formation d'œdèmes et à différentes situations physiopathologiques (Komarova and Malik, 2010).

1.4.2.2 Coagulation et fibrinolyse

Les cellules endothéliales sont des cellules dynamiques qui, sous conditions basales, sont impliquées dans le maintien d'une interface non thrombogénique entre le sang et les tissus. Ceci est notamment essentiel à la relaxation des vaisseaux sanguins et au maintien d'une bonne pression sanguine (Sumpio et al., 2002). Pour cela, les cellules endothéliales produisent et libèrent du PGI₂ et du NO qui vont tous deux inhiber l'activation des plaquettes circulantes et permettre la vasodilatation. Ces médiateurs sont aussi libérés en réponse à des stimuli chimiques, tels que la thrombine ou l'ADP, ou suite à des changements des forces hémodynamiques, liés à une modification de la pression sanguine ou du flux sanguin (Cines et al., 1998). Les cellules endothéliales produisent aussi des ectonucléotidases, dont CD39, qui vont déphosphoryler l'ADP en AMP puis en adénosine afin d'inhiber l'activation plaquettaire dans des conditions basales (Marcus et al., 1997). En revanche, suite à une lésion de la paroi vasculaire, les cellules endothéliales vont mobiliser le vWF, pour permettre la liaison des plaquettes et l'arrêt du saignement (Jaffe et al., 1973; Sporn et al., 1986). Une fois l'hémorragie arrêtée, les cellules endothéliales participent à la

fibrinolyse, via la libération du tPA et d'urokinase qui vont activer le plasminogène en sa forme active, la plasmine. Elles empêchent ainsi une coagulation excessive au niveau de la lésion et la propagation de la réaction hémostatique dans tout le vaisseau sanguin, qui pourrait conduire à son obstruction (Rijken et al., 1980).

1.4.2.3 La réaction inflammatoire

Les cellules endothéliales sont également essentielles à la réponse inflammatoire, qui est une réponse localisée déclenchée par une lésion du tissu, et qui vise à détruire ou diluer l'agent responsable de la lésion ainsi que le tissu endommagé. L'inflammation est donc protectrice, mais elle a besoin d'être finement contrôlée afin d'éviter des situations pathologiques. Les cellules endothéliales sont, avec les leucocytes et autres nombreux médiateurs telles que les cytokines et chimiokines inflammatoires (Nathan, 2002), les acteurs majeurs de la réaction inflammatoire. Elles coordonnent le recrutement des cellules inflammatoires appropriées au niveau de la lésion ou de l'infection, et elles produisent puis libèrent des cytokines et des facteurs de croissance qui vont servir de signaux de communication pour les leucocytes. Grâce à leur expression en surface de molécules d'adhésion, les cellules endothéliales vont permettre l'attachement des leucocytes à l'endothélium, puis leur transmigration vers le site inflammatoire dans un processus séquentiel (Muller, 2003).

La réponse aux cytokines par les cellules endothéliales est la première étape de la réaction inflammatoire. Les cytokines sont des petites protéines sécrétées par les cellules. Elles agissent comme messagers de la réponse inflammatoire ou immunitaire permettant la communication entre les leucocytes, mais aussi avec les cellules endothéliales ou les fibroblastes. Suite à leur stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance, les cellules endothéliales en produisent puis en libèrent à leur tour (Krishnaswamy et al., 1999; Mantovani et al., 1997). D'une manière générale, les cytokines vont induire un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales. Cela va se traduire par une activation plaquettaire et une adhésion des neutrophiles (Bussolino et al., 1990), la libération de cytokines et de chimiokines, ainsi que l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) qui vont servir de signaux pour le recrutement et l'extravasation des leucocytes au niveau du site inflammatoire (Collins et al., 1995).

La migration des leucocytes du système vasculaire au site inflammatoire est un évènement clé dans l'inflammation. Les molécules d'adhésion impliquées dans ce processus appartiennent à trois familles de gènes: les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines (Ig). Les sélectines initient l'attachement des leucocytes sur l'endothélium. Elles sont exprimées à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales (Ebnet and Vestweber, 1999). La L-sélectine est exprimée par la plupart des leucocytes (Finger et al., 1996), alors que la E-sélectine est spécifique des cellules endothéliales (Bevilacqua et al., 1989). La P-sélectine, quant à elle, est présente sur les cellules endothéliales et les plaquettes (McEver et al., 1989). Les leucocytes « roulent » ensuite le long du vaisseau sanguin où ils captent des facteurs d'activation, tels que des chimiokines, qui conduisent à l'activation de leurs intégrines. L'activation des cellules endothéliales déclenche également la synthèse de *Platelet-activating factor* (PAF), qui est reconnu par plusieurs récepteurs transmembranaires des leucocytes et participe ainsi au déclenchement de l'adhésion ferme de ces derniers sur l'endothélium (Prescott et al., 2001). Les intégrines se lient ensuite aux Ig à la surface des cellules endothéliales et permettent ainsi l'adhésion ferme des leucocytes sur l'endothélium, un pré-requis pour leur migration à travers la barrière endothéliale. Cette migration des leucocytes dépend de leurs intégrines $\beta 2$ (Mac-1 et LFA-1) et de leurs ligands sur les cellules endothéliales, à savoir ICAM-1 et PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (Newman et al., 1990), une Ig concentrée au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales qui va « guider » les leucocytes à travers ces jonctions.

1.4.2.4 Angiogenèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins durant l'embryogénèse a lieu via deux processus, la vasculogenèse et l'angiogenèse. À l'inverse de la vasculogenèse, l'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'autres vaisseaux préexistants (Flamme et al., 1997; Risau, 1997). Chez les adultes, le taux de prolifération des cellules endothéliales est très lent et la croissance de nouveaux vaisseaux à seulement lieu durant la reproduction, la réparation des blessures et la régénération de tissus (Liekens et al., 2001). Par ailleurs, la néoangiogenèse est indispensable à la croissance des tumeurs et métastases (Saaristo et al., 2000). La construction de ce nouveau réseau vasculaire requiert différentes étapes séquentielles, incluant la libération de protéases par

l'endothélium activé, la dégradation des structures membranaires, la migration des cellules endothéliales dans l'espace interstitiel, la prolifération des cellules endothéliales et la différenciation en vaisseaux sanguins matures (Carmeliet, 2000). Les cellules endothéliales sont centrales à ces processus qui sont étroitement régulées par de nombreux facteurs angiogéniques et de nombreuses interactions.

1.4.3 Interactions entre les microparticules de plaquettes et l'endothélium

Les MPs de plaquettes, très abondantes dans la circulation (Berckmans et al., 2001), peuvent interagir avec les cellules endothéliales grâce à l'expression en surface de plusieurs molécules d'adhésion à l'endothélium, telles que les glycoprotéines GPIIb/IIIa et GPIb, ou encore la P-sélectine (Abrams et al., 1990; George et al., 1986). Si le mécanisme d'internalisation des MPs par les cellules endothéliales (endocytose dépendante de Del-1) n'a été élucidé que récemment (Dasgupta et al., 2012), plusieurs études préalables ont fait état d'interactions entre les MPs et l'endothélium.

Les MPs transportent et transfèrent des lipides bioactifs, tel que l'acide arachidonique, et induisent ainsi l'expression de COX-2, la production de prostaglandines et l'activation des cellules endothéliales qui expriment alors des molécules d'adhésion, telle que ICAM-1, afin de favoriser l'adhésion des monocytes (Barry et al., 1997; Barry et al., 1998). Les MPs sont aussi capables de « rouler » sur les cellules endothéliales via des interactions transitoires impliquant la P-sélectine, GPIb ou encore GPIIb/IIIa. Ainsi, elles délivrent leur contenu en RANTES et favorisent le recrutement des monocytes sur l'endothélium (Mause et al., 2005).

Les MPs peuvent induire l'angiogenèse *in vitro*. Elles stimulent la croissance de cellules progénitrices endothéliales et augmentent, de manière dose dépendante, la prolifération, la survie, la migration et la formation de tubes par les cellules endothéliales HUVEC, via des mécanismes qui semblent impliquer des composants lipidiques des MPs (Kim et al., 2004). *In vivo*, en utilisant des EOC, qui ont des caractéristiques phénotypiques de cellules endothéliales et qui sont recrutées aux sites de lésion pour accélérer la réparation de l'endothélium (Hirschi et al., 2008), Mause et ses collaborateurs ont montré que les MPs

augmentent la capacité vasoregénératrice des EOC à la suite d'une lésion vasculaire (Mause et al., 2010). En effet, les MPs augmentent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et à la paroi vasculaire endommagée, tout en accélérant la réorganisation de leur cytosquelette et leur migration. Par ailleurs, les MPs modifient le sécrétome des EOC vers un profil plus pro-angiogénique et amplifient la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales matures, alors que l'injection de EOC préalablement traitées avec des MPs accélère la réparation de l'endothélium (Mause et al., 2010).

Chez des patients atteints de diabète de type I, l'internalisation des MPs par les cellules endothéliales HUVEC augmente les interactions entre les plaquettes et les cellules endothéliales de manière proportionnelle à la sévérité de la maladie (Terrisse et al., 2010). L'internalisation des MPs induit la production d'espèces réactives de l'oxygène nécessaires à l'expression de vWF à la surface des cellules endothéliales, et donc à l'interaction subséquente entre les plaquettes et l'endothélium. De la même manière, les MPs peuvent augmenter le recrutement plaquettaire au niveau d'une lésion de l'endothélium en se liant à la matrice sous-endothéliale et en agissant comme un substrat pour la liaison des plaquettes (Merten et al., 1999).

Par ailleurs, la capacité des cellules endothéliales à internaliser ou à interagir avec les MPs, ajoutée à la richesse de ces dernières en microARN, permet d'envisager que les MP soient capables de réguler l'expression des gènes des cellules endothéliales via leur contenu en microARN.

1.4.4 Implications physiologiques et pathologiques des cellules endothéliales

Les très nombreuses fonctions des cellules endothéliales les rendent indispensables à l'homéostasie. Ainsi, une stimulation inappropriée, une réponse incontrôlée, ou simplement une dysfonction des cellules endothéliales sont des événements communs à de nombreux processus pathologiques, notamment aux maladies cardiovasculaires. Une dysfonction endothéliale est caractérisée par une réduction de la vasodilatation, un état pro-inflammatoire et des propriétés pro-thrombotiques (Hadi et al., 2005).

Une dysfonction endothéliale précède le développement de l'athérosclérose. Dans ces conditions, le phénotype endothérial devient pro-inflammatoire et pro-thrombotique suite à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, et à la libération de cytokines, qui vont permettre le recrutement et l'activation des leucocytes circulants (Landmesser et al., 2004). La réduction de la libération de NO par l'endothélium est l'une des causes de ce changement phénotypique (Napoli et al., 2006). Ceci va induire l'activation des plaquettes circulantes, qui vont alors adhérer à l'endothélium inflammé afin d'augmenter le recrutement, l'activation et la transmigration des leucocytes (Kaplan and Jackson, 2011). Les cellules endothéliales peuvent aussi contribuer à l'athérogenèse. En effet, elles libèrent des médiateurs pro-inflammatoires, telles que les endothélines 1 et 4, qui vont contribuer au recrutement des monocytes circulants et à l'activation des macrophages (Cunningham et al., 1997), à la migration des cellules de muscles lisses (Best and Lerman, 2000), à la prolifération des fibroblastes et à la biosynthèse de matrice (Best and Lerman, 2000), et à l'augmentation de l'adhérence des plaquettes (Halim et al., 1995). Une dysfonction endothéliale peut aussi induire une instabilité des plaques d'athérome, et empirir les conséquences des ruptures de plaques suite à la perte des propriétés anti-agrégantes, anti-thrombotiques et des capacités à induire la fibrinolyse (Behrendt and Ganz, 2002).

Une dysfonction de l'endothélium peut également être associée à un accident vasculaire cérébral. La production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*, ROS) par la NADPH oxydase et de superoxydes par la NO synthase, sont des dysfonctions endothéliales qui entraînent une activation des plaquettes et des leucocytes circulants, et qui sont associées à des accidents vasculaires cérébraux (Cosentino et al., 2001). De la même manière, des dommages de l'endothélium sont observés dans l'hypertension, qui est communément associée à une diminution de la production de facteurs vasodilatateurs (tel que le NO) et à une augmentation de la production de ROS et donc du stress oxydatif (Park et al., 2001).

Une diminution de la vasodilatation de l'endothélium est fréquemment observée dans le diabète, une maladie qui est souvent associée à d'autres facteurs de risques cardiovasculaires, tels que l'hypertension, l'obésité et la dyslipidémie (Versari et al., 2009). De plus, le régime alimentaire des diabétiques, souvent riche, peut mener à des anomalies

vasculaires. Un régime riche en protéines, lipides ou glucose est associé à la production de ROS et donc à un effet néfaste sur des fonctions endothéliales, dont la vasodilatation (Mohanty et al., 2002; Mohanty et al., 2000; Vogel et al., 1997). Par ailleurs, l'insuline joue un rôle critique dans le maintien des fonctions de l'endothélium grâce à sa capacité à stimuler la libération de NO et donc la vasodilatation (Xu and Zou, 2009).

Si des cellules endothéliales saines permettent la réparation vasculaire et inhibent l'invasion tumorale et les métastases, une dysfonction de l'endothélium induit les effets opposés. Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le cancer, où l'angiogenèse est indispensable à la prolifération et à la propagation métastatique des cellules cancéreuses (Saaristo et al., 2000). Des cellules endothéliales activées, dont la fonction est altérée, libèrent des facteurs qui induisent des signaux pro-inflammatoires et favorisent l'invasion des cellules cancéreuses (Frances et al., 2013).

L'endothélium est également impliqué dans les infections bactériennes ou virales. Par exemple, la perte de la fonction de barrière endothéliale est centrale dans la pathogenèse associée à des infections virales. Cette perte de fonction peut être causée par l'infection virale elle-même, qui endommage l'endothélium, ou par une réponse immunitaire dérégulée, qui va conduire à une activation excessive de l'endothélium (Rajendran et al., 2013).

1.5 Les macrophages

1.5.1 Définition et origine

1.5.1.1 Définition et généralités

Les macrophages dérivent de précurseurs myéloïdes présents dans la moelle osseuse et des monocytes parents du sang périphérique, qui représentent environ 10 % des leucocytes circulants (Auffray et al., 2009). Chez l'humain, ils ont un diamètre d'environ 21 µm (Krombach et al., 1997) qui est variable en fonction du tissu. Les macrophages expriment une variété de récepteurs opsoniques et non opsoniques, de TLR et de récepteurs senseurs qui peuvent être présents à leur surface, ou dans des compartiments cytosoliques ou vésiculaires. Ils expriment également des molécules régulatrices, des lectines et des

récepteurs *scavengers*. Enfin, ils sécrètent une variété d'enzymes antibactériennes et protéolytiques, de chimiokines et de cytokines immunomodulatrices ou pro-inflammatoires, et génèrent des métabolites de l'acide arachidonique et des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote (Gordon and Martinez, 2010).

Les macrophages sont des cellules multifonctionnelles du système immunitaire inné. Ils jouent un rôle important dans le retour à l'homéostasie des tissus de l'hôte suite à une lésion ou une infection. Ils accomplissent leur tâche en détectant et en phagocytant les particules étrangères, et en initiant, lorsque nécessaire, la réponse inflammatoire. La grande diversité de fonctions remplies par les macrophages fait que leur phénotype d'activation peut être très variable et dépend du milieu où ils se trouvent (Gordon and Taylor, 2005).

1.5.1.2 Origine des macrophages

Les monocytes parents des macrophages se développent à partir des HSC de la moelle osseuse, tel qu'illustré à la Figure 13. Les principaux points de contrôle permettent la séparation des précurseurs lymphoïdes et myéloïdes, puis des cellules responsables de la génération de monocytes des autres cellules myéloïdes. Les monocytes sont ensuite libérés dans la circulation, et suite à leur recrutement au niveau des tissus, ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques selon le contexte (Imhof and Aurrand-Lions, 2004). Cette différenciation est sous le contrôle du *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF, ou CSF-1) et du facteur de transcription PU-1. Le récepteur du M-CSF est exprimé à la surface de tous les précurseurs de monocytes, sur les macrophages et sur les cellules dendritiques dérivées de monocytes. Ce récepteur possède deux ligands, le M-CSF ou l'IL-34, dont la liaison va activer le régulateur clé de la lignée myéloïde, PU-1. Ce dernier augmente l'expression des gènes nécessaires au développement des monocytes et inhibe les facteurs de transcription nécessaires au développement des autres lignées cellulaires (Auffray et al., 2009). D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans le sort des monocytes. C'est notamment le cas des facteurs de transcription MafB, c-Maf et *IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8* (ICSBP/IRF-8), qui peuvent influencer la différenciation des monocytes (Gemelli et al., 2006; Hegde et al., 1999; Tamura et al., 2000). Aussi, *Krueppel-like factor 4* (KLF4) peut restaurer la

différenciation des monocytes de précurseurs PU-1^{-/-}, alors qu'une déficience en KLF4 induit les précurseurs myéloïdes vers la formation de granulocytes (Feinberg et al., 2007).

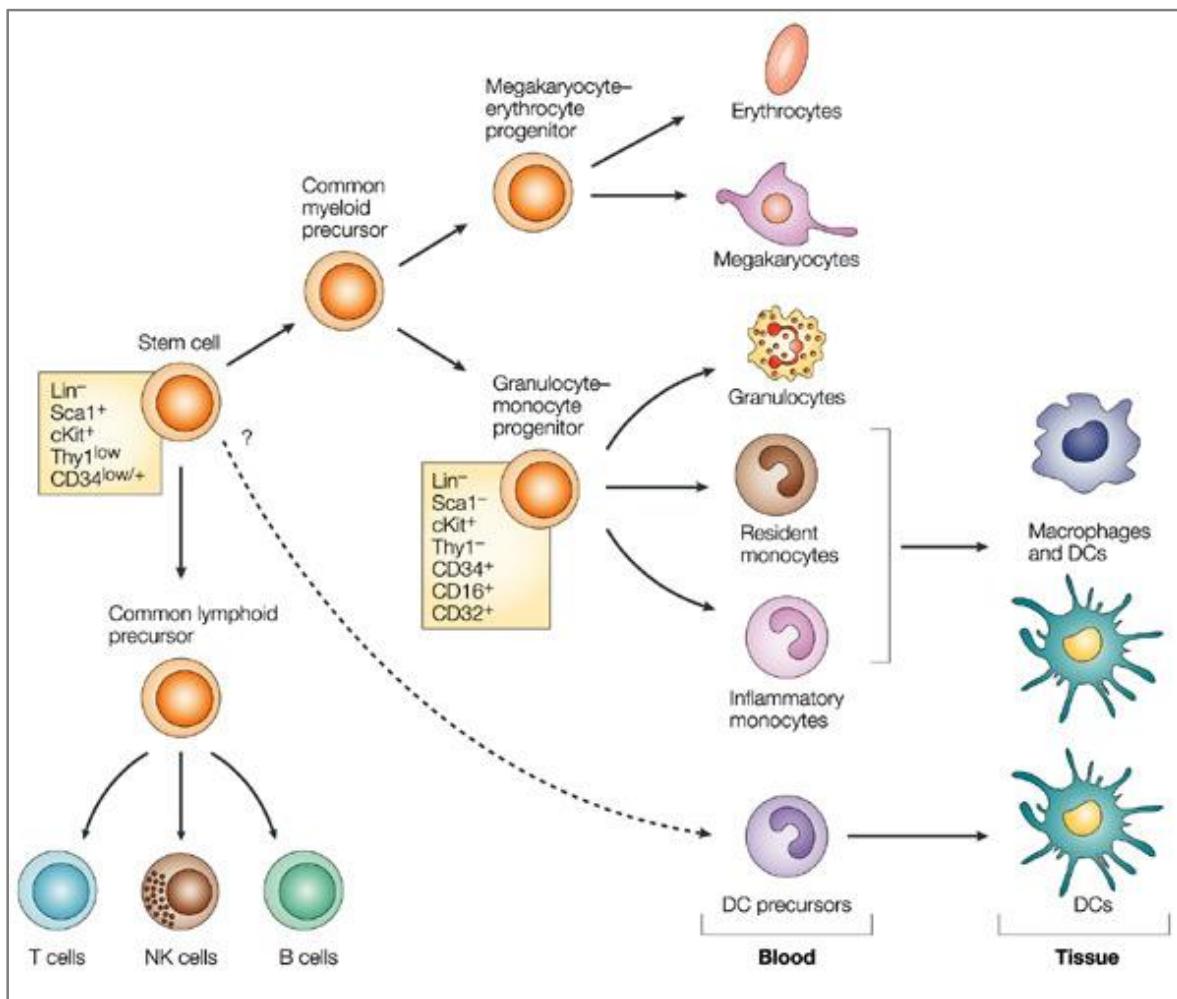


Figure 13: Origine des macrophages.

Les cellules souches de la moelle osseuse se différencient en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes communs. Ces derniers vont alors se différencier en précurseurs de granulocytes et monocytes. Les précurseurs de monocytes vont ensuite se différencier en monocytes résidents ou inflammatoires, qui vont alors quitter la moelle osseuse pour se retrouver dans la circulation. Enfin, les monocytes recrutés au niveau des tissus périphériques se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques, selon les stimuli auxquels ils sont exposés. Figure tirée de Imhof and Aurrand-Lions (2004).

1.5.2 Polarisation des macrophages

Les macrophages peuvent être divisés en différents groupes fonctionnels selon les stimuli qu'ils rencontrent lors de leur activation, tel qu'illustré à la Figure 14. On parle alors de polarisation fonctionnelle des macrophages, que je vais simplifier dans le paragraphe suivant car, dans la réalité, les macrophages sont activés à différents degrés et présentent donc un éventail varié des caractéristiques suivantes (Benoit et al., 2008).

Les macrophages M1 sont obtenus par la voie classique d'activation, c'est-à-dire par stimulation avec l'interféron gamma (IFN- γ), à laquelle peut s'ajouter un contact avec des produits microbiens, tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou des cytokines, comme le TNF et le *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor* (GM-CSF). Les M1 sécrètent un niveau élevé d'IL-2 et d'IL-23, et un faible niveau d'IL-10. Ce sont des producteurs efficaces d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote, de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et de chimiokines (CXCL8, CCL2, CCL5). Ces macrophages participent à la réponse Th1 et contrôlent la résistance aux pathogènes intracellulaires et aux tumeurs (Mantovani et al., 2007).

Les macrophages M2, obtenus par des voies alternatives d'activation, sont divisés en trois sous-groupes selon les stimuli rencontrés: M2a, M2b et M2c. Les macrophages M2a sont obtenus en réponse à un contact avec IL-4 ou IL-13. Les macrophages M2b sont produits en réponse à la stimulation avec des complexes immuns ou des agonistes des TLR. Enfin, les macrophages M2c sont obtenus en réponse à des hormones glucocorticoïdes ou à l'IL-10. Les macrophages M2 sécrètent un faible niveau d'IL-2 et d'IL-23, et un niveau élevé d'IL-10. Ils participent à la réponse de type Th2, contribuent à l'encapsulation des parasites intracellulaires, à la progression des tumeurs, à la réparation et au remodelage tissulaire, et possèdent des fonctions immunitaires régulatrices (Mantovani et al., 2007).

1.5.3 Fonction des macrophages

La première fonction des macrophages est de maintenir l'homéostasie. Ceci comprend la défense de l'hôte contre les invasions étrangères, l'élimination des débris apoptotiques et nécrotiques, ainsi que le remodelage du tissu suite à une lésion. Pour remplir sa fonction, le

macrophage dispose de quatre fonctions innées: la perception de l'environnement, la chimiотaxie, la phagocytose et la réparation des tissus, et la présentation d'antigènes.

1.5.3.1 La perception de l'environnement

Les macrophages utilisent leurs récepteurs senseurs, qui peuvent être présents à leur surface ou dans des compartiments cytosoliques ou vésiculaires, afin de percevoir leur environnement local. Lorsqu'ils se lient à un ligand, ces récepteurs génèrent des signaux qui dirigent la réponse du macrophage. De plus, ces récepteurs, à l'inverse de ceux des lymphocytes B ou T, reconnaissent des motifs moléculaires communs à plusieurs espèces. Ils peuvent être classés en deux groupes: les récepteurs exogènes, qui permettent la reconnaissance des pathogènes et des signaux de danger, et les récepteurs endogènes pour les lipides et les protéines du soi modifiés, ou pour les débris cellulaires apoptotiques/nécrotiques.

La famille des TLR est un groupe de senseurs de pathogènes qui comprend 14 membres (Kumar et al., 2011). Présents en surface, les TLR2 et TLR4 vont lier l'acide lipotéiochoïque (LTA) et le LPS, respectivement. Les TLR3 et TLR9, qui sont intracellulaires, vont lier des oligonucléotides dérivés de virus et de bactéries, respectivement. Ces récepteurs vont induire des signalisations pro-inflammatoires, avec notamment l'expression de cytokines, telles que IL-6, IL-12 ou TNF- α (Trinchieri and Sher, 2007). Par opposition aux TLR, dectin-1 et MRC1 induisent des réponses anti-inflammatoires. Dectin-1 reconnaît les polysaccharides de β -glucane des champignons et bactéries, et signale l'inhibition de TNF- α et/ou de l'IL-12 ainsi que l'induction d'IL-10. MRC1 se lie aux polysaccharides de fucose et de mannose sur les champignons, bactéries ou virus, et inhibe la sécrétion d'IL-12 (Taylor et al., 2005). Par ailleurs, les macrophages possèdent des récepteurs *scavengers* (SRA, CD36) qui reconnaissent des ligands exogènes (ex. composants des parois bactériennes) et endogènes (ex. LDL oxydés), et permettent leur élimination (Bottcher et al., 2006; Chen et al., 2011). Enfin, les macrophages expriment en surface des récepteurs Fc, tels que les récepteurs Fc γ CD16, CD32 et CD64, ou le récepteur Fc ϵ CD23. Ces récepteurs lient des anticorps circulants, eux-mêmes liés à des antigènes étrangers, et permettent leur phagocytose par les macrophages (Varin and Gordon, 2009).

Ainsi, les macrophages utilisent leur capacité de senseurs afin de faciliter l'élimination des pathogènes, des protéines et lipides du soi modifiés, ainsi que les débris cellulaires apoptotiques et nécrotiques.

1.5.3.2 La chimiотaxie

Suite à la détection d'un antigène issu d'une invasion étrangère potentiellement dangereuse, les macrophages stimulent l'expansion des cellules T activées et sécrètent des chimiokines qui permettent le recrutement des cellules effectrices appropriées pour aider à la neutralisation et à l'élimination de la molécule étrangère.

Les macrophages M1 jouent un rôle prépondérant dans la défense anti-bactérienne. Ils soutiennent les réponses de type Th1 via la sécrétion de CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 ou encore CXCL11, qui sont toutes de puissantes chimiokines permettant le recrutement des monocytes/macrophages, des lymphocytes Th1 et des cellules *natural killer* (Mantovani et al., 2004). Les macrophages M1 sécrètent aussi CXCL8, permettant ainsi le recrutement des neutrophiles qui sont cruciaux dans la résolution de plusieurs types d'infections aigues (Benoit et al., 2008). Les macrophages M2, impliqués dans la défense contre les infections par des parasites et des champignons, sécrètent les chimiokines CCL17 et CCL22 qui attirent les lymphocytes Th2 et les *natural killer* (Benoit et al., 2008). Enfin, les M2 peuvent aussi recruter des éosinophiles et des basophiles suite à la sécrétion de CCL24 (Mantovani et al., 2004).

1.5.3.3 La phagocytose et la réparation des tissus

Les macrophages tissulaires ont pour fonction d'enlever et de détruire les particules, débris, cellules apoptotiques et pathogènes (bactéries, parasites) présents dans les tissus, rôle qu'ils jouent grâce à leur grande capacité de phagocytose. En effet, l'élimination par la phagocytose de matériel redondant et endommagé est essentielle au retour du tissu à l'homéostasie après un évènement perturbateur (Schrijvers et al., 2007). Pour cela, les macrophages possèdent une grande variété de récepteurs, tels que les récepteurs opsoniques (récepteurs Fc et du complément), impliqués dans la phagocytose des bactéries opsonisées par des anticorps ou par le complément, mais aussi les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptors*), dont les récepteurs *scavengers*, le

récepteur mannose, et les intégrines (Aderem and Underhill, 1999). Les cellules apoptotiques sont reconnues grâce à l'expression de la PS à leur surface, qui peut être liée par différents récepteurs, dont les récepteurs *scavengers* (Aderem and Underhill, 1999). Ainsi, les macrophages identifient leur cible qui sera ensuite séquestrée dans les phagosomes. Ces derniers fusionnent ensuite avec les lysosomes qui contiennent des molécules très réactives et toxiques qui permettent la destruction du contenu des phagosomes (Stuart and Ezekowitz, 2005). L'activité de phagocytose des macrophages est importante dans le développement, le remodelage tissulaire, la réponse immune et l'inflammation.

Par ailleurs, le retour à l'homéostasie du tissu de l'hôte nécessite également la réparation et le remodelage de l'environnement local. Cette tâche est principalement réalisée par les macrophages M2 qui soutiennent le remodelage de la matrice extra-cellulaire, la croissance cellulaire, la production de collagène et l'angiogenèse (Varin and Gordon, 2009).

1.5.3.4 La présentation d'antigènes

La phagocytose et la destruction subséquente de matériel étranger par les macrophages permet la génération de séquences peptidiques antigéniques pour la présentation aux lymphocytes T via les récepteurs du CMH. Les macrophages, tout comme les cellules dendritiques et les cellules B, sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. La présentation d'antigènes est le processus par lequel les antigènes ou protéines internalisées sont coupés en peptides, puis liés au CMH et présentés aux lymphocytes à la surface des cellules. Les macrophages sont experts dans ce domaine grâce à un haut niveau constitutif de pinocytose et de fusion vésiculaire avec les lysosomes (Swanson, 1989), ainsi que grâce à leur grande quantité de protéases lysosomales (Delamarre et al., 2005). La présentation des antigènes requiert l'interaction entre des molécules d'adhésion présentes à la surface du lymphocyte (LFA-1) et des récepteurs d'adhésion (ICAM-1) présents sur les cellules présentatrices d'antigènes. La zone de contact entre les deux cellules est alors enrichie en récepteurs des cellules T (*T cell receptor*, TCR) et en complexes CMH-peptide pour former la synapse immunologique. S'ensuit alors un dialogue entre les deux cellules grâce à la signalisation du TCR. Dans le cas des macrophages, la présentation des antigènes aux lymphocytes T effecteurs (Th1) permet de les activer. En retour, les lymphocytes

activent les macrophages, leur conférant la capacité de détruire les pathogènes intracellulaires de façon efficace. Les lymphocytes Th1 activés stimulent également les lymphocytes B, étape essentielle et préalable à la production d'anticorps, en plus de la réponse cytotoxique (Brodsky et al., 1999).

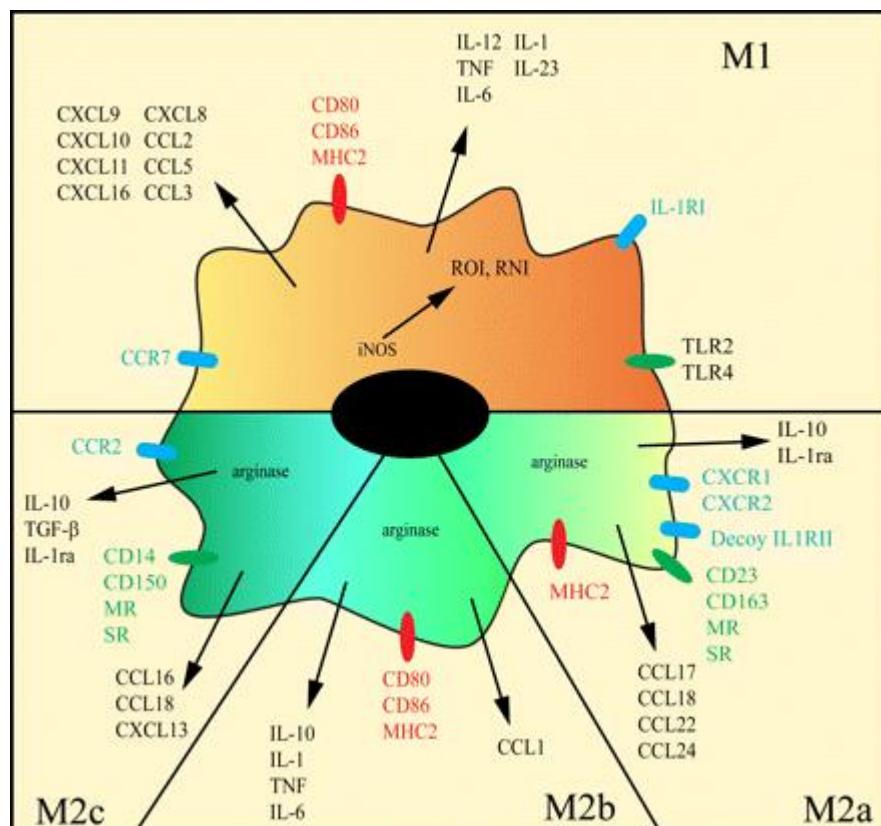


Figure 14: Polarisation des macrophages.

Les macrophages M1 obtenus par la voie classique d'activation sont induits par l'IFN- γ et des produits microbiens. Leur répertoire inflammatoire est caractérisé par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et la libération d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote. Les macrophages M2, activés de façon alternative, couvrent un continuum d'états fonctionnels classifiés en trois catégories: les M2a induits par IL-4/IL-13, les M2b induits par les complexes immuns et des agonistes des TLR, et les M2c induits par IL-10 et les hormones glucocorticoïdes. Figure tirée de Benoit et al. (2008).

1.5.4 Interactions entre les microparticules de plaquettes et les monocytes/macrophages

Barry et ses collaborateurs sont les premiers à avoir étudié les effets de l'interaction entre les MPs et les monocytes (Barry et al., 1998). L'exposition aux MPs augmente l'expression de molécules d'adhésion à la surface des monocytes et leur adhésion aux cellules endothéliales, de manière dose dépendante, avec une adhésion maximale après 24 h d'exposition. Ainsi, les MP sont capables de moduler des propriétés des monocytes impliquées dans différents contextes inflammatoires, tel que l'athérosclérose, où les macrophages peuvent phagocytter des MPs de plaquettes suite à la rupture des nouveaux vaisseaux formés dans les plaques (Schrijvers et al., 2007). Les macrophages interagissent avec les MPs circulantes et permettent leur élimination via un mécanisme de phagocytose dépendant de la lachadérine (Dasgupta et al., 2009) ou de la β 2-glycoprotéine 1 (Abdel-Monem et al., 2010). La rate, qui représente le plus grand filtre de la circulation (Mebius and Kraal, 2005) et contient différents types de macrophages résidents (Davies et al., 2013), semble être le site d'interactions entre les MPs circulantes et les macrophages, dans la mesure où les souris splénectomisées montrent plus de MPs circulantes que les souris de type sauvage (Dasgupta et al., 2009). Par ailleurs, les MPs de plaquettes peuvent altérer la fonction des macrophages. Suite à une co-incubation avec des MPs, la réponse inflammatoire des macrophages est régulée à la baisse (Sadallah et al., 2011). En effet, en présence de MPs, les macrophages sécrètent moins de TNF- α ou d'IL-10 suite à leur stimulation avec du LPS ou du zymosan, alors que le profil de sécrétion est inchangé en l'absence de stimuli. Enfin, les MPs de plaquettes induisent la différenciation des monocytes en macrophages (Vasina et al., 2011). L'exposition des monocytes aux MPs induit une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, telles que CD11b, CD14 ou CD31, ainsi que des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4. De plus, les cellules exposées aux MPs consomment des LDL oxydés, libèrent des métalloprotéinases matricielles, et présentent une augmentation d'expression des récepteurs aux LDL oxydés (CD36 et CD68) et de la libération de cytokines (Vasina et al., 2011). Ainsi, l'interaction entre les MPs et les monocytes exerce un rôle immuno-modulateur en induisant leur différenciation en phagocytes professionnels résidents.

1.5.5 Implications physiologiques et pathologiques des macrophages

Les macrophages jouent un rôle important dans le développement de nombreux tissus, si ce n'est tous, en régulant leur excroissance, leur organisation et leur remodelage. De plus, les macrophages sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie et remplissent de nombreuses fonctions immunologiques. Ainsi, une dérégulation des macrophages ou de leurs fonctions est souvent associée au développement, au maintien ou à une aggravation des pathologies auxquelles ils sont associés.

Les macrophages sont des agents clés de plusieurs maladies chroniques, telle que l'athérosclérose, qui est caractérisée par une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales, l'accumulation de LDL et la formation de cellules spumeuses dans l'espace sous-endothélial, la migration et la prolifération de cellules de muscles lisses, la production de tissus conjonctifs et la néovascularisation. La rupture de plaque est le point culminant de cette maladie, qui peut aboutir à une thrombose, un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (Lusis, 2000; Ross, 1999). Les macrophages représentent la principale sous-population de leucocytes dans les plaques, où ils se différencient à partir des monocytes recrutés dans la circulation. Ils phagocytent alors de grandes quantités de LDL oxydés et deviennent des cellules spumeuses. Dans les plaques, les macrophages et les cellules spumeuses subissent une mort cellulaire. Ils contribuent ainsi au dépôt d'une masse croissante de lipides extracellulaires formant un corps lipidique, et induisent l'amincissement du cap fibreux en libérant de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et métalloprotéinases matricielles, caractéristiques d'une plaque instable prête à rompre (Moore and Tabas, 2011). De plus, la déficience de ces macrophages dans l'élimination des cellules apoptotiques participe à la progression de la maladie via la formation et l'accroissement de corps nécrotiques dans la plaque et la susceptibilité à l'athérothrombose (Tabas, 2010).

Les macrophages sont également impliqués dans le cancer, où ils peuvent avoir un rôle protecteur ou amplificateur, selon le sous-type de macrophages impliqué (Nardin and Abastado, 2008). À l'inverse, les tumeurs peuvent influencer le phénotype des macrophages et les faire passer d'un phénotype anti-tumoral, potentiellement hostile, vers un phénotype soutenant la malignité (Pollard, 2009). Un rôle protecteur a été décrit pour les

macrophages M1, qui activent des mécanismes d'élimination de tumeurs et amplifient les réponses de type Th1, fournissant ainsi une boucle de régulation positive dans les réponses anti-tumorales (Biswas and Mantovani, 2010). En revanche, les macrophages M2 soutiennent la croissance tumorale; d'ailleurs ces macrophages représentent la majorité des macrophages associés aux tumeurs (Qian and Pollard, 2010). Ainsi, dans la plupart des cas, les macrophages soutiennent la progression et la malignité des tumeurs (Condeelis and Pollard, 2006; Mantovani et al., 2006). La densité de macrophages dans les tumeurs humaines corrèle avec un faible pronostique dans plus de 80 % des cas (Bingle et al., 2002). Les macrophages synthétisent des cytokines pro-inflammatoires qui engagent d'autres cellules immunitaires pour soutenir l'inflammation chronique qui permet l'initiation et la propagation de la tumeur (Balkwill and Mantovani, 2012). Dans les tumeurs établies, les macrophages stimulent la migration et l'invasion des cellules tumorales, ainsi que la réponse angiogénique nécessaire à la croissance tumorale. Tous cela permet aux cellules tumorales de devenir métastatiques, facilitant leur évasion dans les systèmes circulatoires et lymphatiques (Hanahan and Coussens, 2012; Qian and Pollard, 2010). Les macrophages modulent le micro-environnement tumoral. Ils expriment des protéases, telles que les métalloprotéinases matricielles, qui clivent la matrice extracellulaire, permettant ainsi le passage des cellules tumorales pour la libération de facteurs de croissance qui soutiennent l'invasion tumorale et les métastases (Kessenbrock et al., 2010; Mason and Joyce, 2011). Les macrophages jouent également un rôle important dans l'angiogenèse tumorale, nécessaire à la transition vers un état malin (Qian and Pollard, 2010), via la sécrétion de nombreuses molécules angiogéniques, telles que des membres de la famille VEGF, TNf- α , IL-1 β , IL-8 ou PDGF (Murdoch et al., 2008; Stockmann et al., 2008).

Les macrophages sont aussi impliqués dans les maladies auto-immunes, comme l'arthrite rhumatoïde, où le M-CSF est produit de manière constitutive par les fibroblastes synoviaux pour permettre le recrutement des monocytes et macrophages (Hamilton, 2008). Des souris mutantes présentant une perte de fonction pour CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*, M-CSF) sont résistantes à l'arthrite induite par le collagène, alors que l'administration de M-CSF dans des souris sauvages aggrave la maladie (Campbell et al., 2000). Par ailleurs,

l’ablation des macrophages inhibe la progression de l’arthrite rhumatoïde (Hamilton, 2008), démontrant leur implication dans la progression de la maladie.

Enfin, les macrophages sont extrêmement importants dans les infections virales. Dans les hépatites B et C, les macrophages du foie (cellules de Kupffer) sont impliqués dans la reconnaissance virale, la composition en cytokines et autres médiateurs solubles du foie infecté, l’inflammation chronique et, enfin, les complications associées à l’infection (cirrhose, fibrose ou carcinome hépatocellulaire) (Heydtmann, 2009). Les macrophages sont parmi les premières cellules infectées lors de la primo-infection par le Virus de l’Immunodéficience Humaine (VIH-1), et participent activement à la réPLICATION virale (Aquaro et al., 2002). De plus, les macrophages sont des réservoirs de l’infection et possèdent des caractéristiques favorisant la dissémination du virus. Ils sont naturellement résistants aux effets cytopathiques du virus et persistent après l’infection. Ils peuvent également archiver des virions après leur synthèse et les transmettre aux cellules environnantes, en plus de sécréter des chimiokines qui permettent le recrutement des lymphocytes T dans les tissus infectés (Carter and Ehrlich, 2008). Enfin, la capacité des macrophages à traverser la barrière entre le sang et les tissus, fait de ces cellules de puissants agents de transmission du virus à tous les tissus et organes, dont le cerveau, où ils représentent la majorité des cellules infectées par le virus (Perno et al., 2006). Enfin, suite à une infection par le virus Ebola, les macrophages sécrètent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que du TF. De plus, la suppression des réponses interféron les empêche d’inhiber la réPLICATION virale. Ceci a pour conséquences, une augmentation de la perméabilité endothéliale, le recrutement de cellules cibles supplémentaires, mais aussi la dissémination d’une importante coagulation intravasculaire (Ansari, 2014). De plus, les nombreux médiateurs libérés par les macrophages infectés induisent l’apoptose des lymphocytes, induisant ainsi une lymphopénie et la détérioration du système immunitaire (Bray and Geisbert, 2005).

1.6 Raisonnement, hypothèse et objectifs de recherche

1.6.1 Raisonnement

Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse à partir de leurs cellules progénitrices, les MK. Bien que dépourvues d'ADN génomique, les plaquettes contiennent des ARNm qu'elles sont capables de traduire en protéines. De plus, notre équipe a démontré que les plaquettes contiennent une quantité abondante et diversifiée de microARN, suggérant un rôle biologique possiblement important pour ces derniers.

Les microARN sont de petits ARN non-codants de 19 à 24 nt de long impliqués, de manière séquence-spécifique, dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Prédits pour réguler ~60 % des gènes chez l'humain, les microARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Découverts à l'intérieur des cellules, les microARN ont récemment été détectés dans différents fluides biologiques, et sont présents en quantité importante dans la circulation sanguine, où ils servent de biomarqueurs ou participent aux communications intercellulaires. Les microARN extracellulaires circulent dans les fluides corporels sous une forme intègre, malgré une activité ribonucléasique élevée, indiquant qu'ils sont, en quelque sorte, protégés d'une éventuelle dégradation. Il y a au moins deux possibilités pour expliquer la remarquable stabilité des microARN circulants: (i) ils sont protégés sous la forme de complexes RNP, ou (ii) ils sont protégés à l'intérieur de vésicules d'origine membranaire, tel que les MPs, les exosomes et/ou les corps apoptotiques.

Les MPs sont de petites vésicules dérivées des membranes cellulaires et produites durant l'activation cellulaire, ou au début de l'apoptose, qui ont un diamètre compris entre 0.1 et 1 μm . Elles présentent à leur surface la plupart des protéines membranaires de leurs cellules d'origine et contiennent du matériel génétique issu de ces dernières. D'ailleurs, les MPs dérivés des plaquettes représentent le sous-type de MPs le plus abondant dans la circulation.

1.6.2 Hypothèse

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que, suite à un stimulus, les plaquettes sont capables de libérer leur contenu en microARN dans les MPs, qui peuvent ensuite être internalisées par

des cellules réceptrices et y livrer des microARN d'origine plaquettaire capables de réguler l'expression de leurs gènes et leurs fonctions.

1.6.3 Objectifs

Les objectifs de ma thèse consistent à (i) déterminer la capacité des microARN de MPs de plaquettes à réguler l'expression des gènes de cellules HUVEC réceptrices, et (ii) étudier la capacité des MPs de plaquettes à reprogrammer l'expression génique et la fonction de macrophages primaires humains.

Chapitre 2: Les plaquettes activées peuvent délivrer des complexes régulateurs d'ARNm Ago2•microARN dans les cellules endothéliales via les microparticules

Titre court: Régulation génique des cellules endothéliales par miR-223 plaquettaire

2.1 Résumé

Les plaquettes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'hémostase et dans la thrombose. Suite à leur activation, les plaquettes libèrent des microparticules (MPs) qui contiennent du matériel génétique qu'elles peuvent transmettre à une cellule réceptrice pour y induire des effets biologiques. Les plaquettes contiennent une quantité abondante et diversifiée de microARN, et leurs MPs représentent le sous-type de MPs le plus abondant dans la circulation. Dans cette étude, nous démontrons que les plaquettes activées à la thrombine libèrent préférentiellement leur contenu en miR-223 dans des MPs. Ces MPs sont internalisées par les cellules HUVEC, conduisant à l'accumulation de miR-223 plaquettaire. Les MPs contiennent des complexes Ago2•miR-223 fonctionnels capables de réguler l'expression d'un gène rapporteur dans les HUVEC. De plus, miR-223 des MPs régule l'expression de deux gènes endogènes dans les HUVEC, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine. Nos résultats appuient un scénario dans lequel les MPs peuvent agir comme des transporteurs intercellulaires de complexes Ago2•microARN capables de réguler l'expression des gènes des cellules endothéliales, et possiblement d'autres cellules réceptrices du système circulatoire.

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

Benoit Laffont, Aurélie Corduan, Hélène Plé, Anne-Claire Duchez, Nathalie Cloutier, Éric Boilard and Patrick Provost*

CHUQ Research Center/CHUL, 2705 Blvd Laurier, Quebec, QC, G1V 4G2, Canada, and Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec, QC, G1V 0A6, Canada

Short title: Endothelial gene regulation by platelet miR-223

* Corresponding author: Dr. Patrick Provost
CHUQ Research Center/CHUL
2705 Blvd Laurier, Room T1-49
Quebec, QC G1V 4G2
Canada
Phone: 1 418 656 4141 (ext. 48842)
Fax: 1 418 654 2765
E-mail: patrick.provost@crchul.ulaval.ca

KEY POINTS

- Activated platelets release microRNA miR-223 preferentially through microparticles (MPs) that can be internalized by endothelial cells;
- Platelet MP-derived Ago2•microRNA complexes are functional and can regulate endogenous gene expression in recipient endothelial cells.

2.2 Abstract

Platelets play a crucial role in the maintenance of hemostasis as well as in thrombosis. Upon activation, platelets release small membrane-bound microparticles (MPs) containing bioactive proteins and genetic materials from their parental cells, that may be transferred to, and exert potent biological effects in, recipient cells of the circulatory system. Platelets have been shown to contain an abundant and diverse array of microRNAs, and platelet-derived MPs are the most abundant microvesicles in the circulation. Here we demonstrate that human platelets activated with thrombin preferentially release their miR-223 content in MPs. These MPs can be internalized by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), leading to the accumulation of platelet-derived miR-223. Platelet MPs contain functional Ago2•miR-223 complexes that are capable of regulating expression of a reporter gene in recipient HUVEC. Moreover, we demonstrate a role for platelet MP-derived miR-223 in the regulation of two endogenous endothelial genes, both at the messenger RNA (mRNA) and protein levels. Our results support a scenario by which platelet MPs may act as intercellular carriers of functional Ago2•microRNA complexes that may exert heterotypic regulation of gene expression in endothelial cells, and possibly other recipient cells of the circulatory system.

2.3 Introduction

Platelets are discoid, anucleate cytoplasmic fragments released by bone marrow megakaryocyte precursor cells into the circulation, where they play a central role in the maintenance of hemostasis as well as in thrombosis (Michelson, 2003). Platelets are recruited to, and are activated at, sites of damaged vessel walls or atherosclerotic plaques, adjacent to the endothelial lining.

We reported that human platelets contain an abundant and diverse array of microRNAs (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a) that may be involved in regulating platelet messenger RNAs (mRNAs) (Landry et al., 2009), protein synthesis (Kondkar et al., 2010) and reactivity (Nagalla et al., 2011). MicroRNAs are 19 to 24-nucleotide (nt) non-coding RNAs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001) generated by the ribonuclease III Dicer (Provost et al., 2002) and incorporated into effector Argonaute 2 (Ago2) complexes (Meister et al., 2004). The biological role of microRNAs is linked mainly to their ability to act in concert and mediate sequence-specific regulation (mainly repression) (Pillai et al., 2005) of mRNA translation through recognition of specific binding sites usually located in the 3' untranslated region (UTR). Predicted to regulate ~60% of the genes in human (Bartel, 2009), microRNAs may be implicated in the regulation of every cellular process, and changes in their expression and/or function have been associated with human genetic diseases (Chang and Mendell, 2007; Kloosterman and Plasterk, 2006).

Whereas the majority of microRNAs are found intracellularly, a number of microRNAs have also been detected outside of cells, in various body fluids, such as serum or plasma (Chen et al., 2008). Circulating microRNAs may be found in exosomes (Valadi et al., 2007), shedding vesicles (Cocucci et al., 2009), and apoptotic bodies (Zernecke et al., 2009), as well as in vesicle-free ribonucleoprotein complexes, in association with Ago2 (Arroyo et al., 2011) or high-density lipoproteins (HDL) (Vickers et al., 2011).

Activated platelets may also release microparticles (MPs), small extracellular vesicles ranging from 0.1 to 1 µm in diameter shed from the cytoplasmic membrane. The MPs derived from platelets are the most abundant cell-derived MP subtype in the circulation (Berckmans et al., 2001) and may contribute to inflammatory diseases, such as arthritis

(Boilard et al., 2010) and atherosclerosis (Rautou et al., 2011b). In addition to share the surface markers of their parental cells, MPs carry a broad variety of cytoplasmic components, including proteins, DNA and RNA (Cocucci et al., 2009). These small lipid vesicles may thus act as intercellular carriers and deliver bioactive proteins and RNAs to recipient cells, including mRNAs (Risitano et al., 2012) and small mRNA regulatory microRNAs (Diehl et al., 2012). MPs may thus play an important role as a cargo of genetic information from one cell type to another across the circulatory system (Cocucci et al., 2009), including the endothelial cells that line the inner surface of the vasculature.

The relative abundance and diversity of platelet microRNAs (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a), the propensity of platelets to release MPs upon activation (Boilard et al., 2010), the microRNA content of platelet-derived MPs (Hunter et al., 2008) and the relatively high level of circulating microRNAs originating from platelets (Willeit et al., 2013) prompted us to investigate the possible intercellular transfer of platelet microRNAs via MPs and assess their capacity for heterotypic regulation of gene expression in recipient endothelial cells.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Platelet purification, activation and microparticle (MP) isolation

Platelets were isolated from venous blood, as previously described (Landry et al., 2009), harvested by centrifugation at 1,000 g for 10 min and resuspended at 10^8 platelets/ml in Hepes-Tyrode buffer (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 5 mM monohydrate D-glucose, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4). Platelet activation and MP release was induced upon incubation with 0.1 U/ml thrombin (Sigma Aldrich) for 15 or 60 min at 37°C with gentle agitation. Platelet activation was stopped by addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 20 mM final), and platelets were pelleted by centrifugation at 3,200 g for 10 min. The supernatant was centrifuged again to prepare a platelet-free releasate, which was used for MP isolation. MPs were harvested by centrifugation at 20,000 g for 90 min at 18°C, and either resuspended in Hepes-Tyrode buffer for cell co-incubations or its RNA extracted by addition of TRIzol (Invitrogen). The supernatant fraction was collected, snap-frozen and stored at -80°C until analyses.

2.4.2 Flow cytometry

Platelets and the MP fractions were analyzed by flow cytometry to determine their activation status and origin, respectively. Platelets were labeled with CD62P-R-phycerythrin (PE) and CD41a-anti-allophycocyanin (APC) (BD Biosciences), and MPs with CD41a-APC (BD Biosciences). Approximately 10% of unstimulated expressed CD62P at their surface, suggesting that our freshly isolated platelets were minimally activated, as compared to ~98% of the platelets activated with thrombin (Supplementary Figure S1).

MPs (1 µl) were diluted in 100 µl of phosphate buffered saline (PBS) and incubated in the presence of APC-conjugated mouse IgG (isotype) or APC-conjugated anti-human CD41a (BD Biosciences) for 30 min. Then, the samples were diluted to 500 µl in PBS and analyzed cytofluorometrically using a forward-scattered (FSC) light coupled to a photomultiplier tube (PMT) option (FSC-PMT) (BD Biosciences) mounted on a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Canto II SORP FACS Canto II equipped with PMT option (BD Biosciences). The cytometer was calibrated before all data acquisitions using BD cytometer Setup and Tracking beads (BD Biosciences).

2.4.3 Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (AllCells) were cultured in Endothelial Growth Medium (EGM) supplemented with bovine brain extract (Cedarlane) and maintained at 37°C under 5% CO₂. For all experiments, HUVEC were used between passages 2 to 6. For transfection, 5x10⁵ cells were transfected by nucleofection on a Nucleofector II apparatus (Amaxa Biosystems) using the AMAXA HUVEC Nucleofector kit (Lonza). Twenty-four hours later, the culture medium was changed and MPs were added for up to 48 h of co-incubation.

2.4.4 Production of labeled MP and HUVEC-MP co-incubation assays

Isolated human platelets (10⁸ platelets/ml in Hepes-Tyrode buffer) were incubated with 1 µM CellTracker™ Orange CMTMR (5-(and-6)-(((4-Chloromethyl) Benzoyl) Amino) Tetramethylrhodamine) (Invitrogen) for 15 minutes at 37°C in darkness, prior to platelet

activation with 0.1 U/ml thrombin. The labeled platelet-derived MPs were recovered by centrifugation, resuspended in Hepes-Tyrode buffer, and counted by flow cytometry. HUVEC were incubated with fluorescent MPs at a ratio of 1:100 (HUVEC:MPs) for up to 48 h at 37°C under 5% CO₂. MP internalization were evaluated by confocal microscopy analysis with a spinning disc confocal microscope using a ×63 objective (Quorum Spinning Disc Wave FX, Quorum Technologies). Up to 24 images, corresponding to as many 0.5 μm-thick layers, were acquired using the Volocity software (PerkinElmer). Single representative images of the central layers are shown.

2.4.5 RNA extraction, microRNA quantification and gene expression studies

Total RNA was extracted from platelet-derived MPs and HUVEC using TRIzol reagent (Invitrogen), and from the supernatant fraction using miRVana PARIS kit (Ambion). Reverse transcription reactions were performed with 1 μg total RNA using HiFlex miSCRIPT RTII kit (Qiagen) after DNase I treatment (Invitrogen). Mature miR-223 and two selected mRNAs were detected by quantitative PCR (qPCR) using miScript Primer Assay kit and SYBR Green (Qiagen). Small nuclear RNA U6 (RNU6) (for miR-223) and GAPDH (for mRNAs) were used as reference genes for relative quantitation using the 2^{-ΔΔCt} method (Schaefer et al., 2010). The sequence of the oligonucleotides used for qPCR quantitation of selected endothelial mRNAs are provided in Supplementary Table S1.

2.4.6 Immunoprecipitation and functional assay of Ago2•microRNA complexes

MPs derived from activated platelets were lysed in RNA immunoprecipitation (RIP) lysis buffer, and the lysates cleared by centrifugation prior to immunoprecipitation using protein G-agarose beads (Roche) conjugated with anti-Ago2 antibody (clone 2E12-1C9, Abnova) or isotypic IgG control (anti-FLAG; Sigma-Aldrich), as described previously (Landry et al., 2009; Perron et al., 2011). Ago2-associated miR-223 was isolated by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, reverse transcribed with the miScript II RT kit (Qiagen), and analyzed by qPCR using hsa-miR-223 miScript Primer Assay (Qiagen).

Ago2•miR-223 function was evaluated in RNA-induced silencing complex (RISC) activity assays, as previously described (Landry et al., 2009).

2.4.7 Reporter gene activity assays

Reporter gene activity assays were performed essentially as described previously (Pepin et al., 2012; Ple et al., 2012a; Ple et al., 2012b). A miR-223 reporter construct was created by inserting a sequence complementary to hsa-miR-223 in the Xba1 site of pRL-CMV vector (Promega), downstream of the Renilla luciferase (Rluc) reporter gene. pRL-CMV-3'UTR Ephrin A1 (EFNA1) and pRL-CMV-3'UTR F-box and WD-40 domain protein 7 (FBXW7) constructs were engineered by amplifying and cloning their 3'UTR element downstream of the Rluc reporter gene in pRL-CMV vector. All the constructs were verified by DNA sequencing. pGL4.51 vector (Promega) expressing Firefly luciferase (Fluc) was used as a normalization control. Both pRL-CMV and pGL4.51 constructs were co-transfected in HUVEC 24 h prior to incubation with MPs for up to 48 h. Rluc and Fluc activities were measured with Dual Glo luciferase reagents (Promega) using a luminometer (Dynex Technologies).

2.4.8 Western blot analysis

Protein extracts were analyzed by 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE and immunoblotting using anti-Ago2 (Abnova), anti-EFNA1 (Abcam), anti-FBXW7 (Invitrogen) and anti-β-actin (AC-40; Sigma) antibodies, followed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection and densitometric analyses, as described previously (Landry et al., 2009; Pepin et al., 2012).

Blood collection from healthy volunteers (adult Caucasians of both sexes from the immediate region of Quebec city) was approved by our institutional human ethics committee. The participants provided their written informed consent to participate in this study in accordance with the Declaration of Helsinki, as approved by our institutional human ethics committee.

2.5 Results

2.5.1 Activated platelets release MPs that contain miR-223

Flow cytometry analyses of MPs purified from resting or thrombin-activated platelets unveiled a predominant population of MPs approximately 100 to 400 nm in diameter

which, together with platelet glycoprotein CD41a surface expression (Figure 1A), confirmed the platelet origin of these microparticles (Cloutier et al., 2013).

The number of MPs released from platelets significantly increased by 2.1 fold as early as 15 min after stimulation with thrombin (Figure 1B). This increase reached up to 7.3 fold after 60 min. Knowing that platelets can release microRNAs (Hunter et al., 2008; Willeit et al., 2013) and that microvesicles may contain microRNAs (Cocucci et al., 2009), we assessed whether activated platelets release miR-223, one of the most abundant platelet microRNA (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a), either directly into the supernatant or through MPs. Little or no changes were observed in supernatant microRNA levels (Figure 1C). However, we observed a significant ~60-fold increase in MP miR-223 levels 60 min after platelet activation with thrombin, as compared to baseline (Figure 1C), suggesting that thrombin-activated platelets may preferentially release miR-223 through MPs.

2.5.2 Platelet-derived MPs contain functional Ago2•miR-223 effector complexes

MicroRNAs are known to guide effector complexes containing Ago proteins, such as Ago2 (Meister et al., 2004), for the regulation of specific mRNAs through translational repression, mRNA destabilization or a combination of the two (Bartel, 2009). Immunoblot analysis of platelet-derived MP protein extracts revealed the presence of Ago2 proteins (Figure 2A, lane 2) which, together with the presence of MP miR-223, prompted us to verify if Ago2 and miR-223 exist in MPs in the form of a complex.

With the aim to subsequently study the role of platelet-derived MP microRNAs in regulating endothelial cell gene expression, we selected a microRNA that is highly abundant in platelets, while being expressed at very low levels in endothelial cells, i.e. miR-223 (Diehl et al., 2012; Hunter et al., 2008; Landry et al., 2009; Voellenkle et al., 2012). Ago2 immunoprecipitation (IP) followed by qPCR detection of miR-223 unveiled the existence of an Ago2•miR-223 complex in MPs released from thrombin-activated platelets (Figure 2B). The levels of miR-223 associated with MP Ago2 proteins were enriched by more than 300 fold compared to an isotypic control IgG (anti-FLAG antibody) (Supplementary Figure S2).

To determine whether MP Ago2•miR-223 complexes are functional, we performed RISC activity assays in which MP or platelet protein extracts were incubated in the presence of a ³²P-labeled RNA sensor bearing a sequence complementary to hsa-miR-223. We observed the cleavage of the RNA sensor into a 39-nt RNA product (Figure 2C), supporting the functionality of Ago2•miR-223 complexes present in MPs released from activated platelets. Together, these results suggest that platelet-derived MPs can participate to intercellular communication by delivering functional Ago2•microRNA complexes to recipient cells.

2.5.3 Platelet-derived MPs are internalized by HUVEC

First, we used confocal fluorescence microscopy to determine if platelet-derived MPs could be internalized by HUVEC. We observed the presence of well-defined punctate signals in the cytoplasm of HUVEC exposed to fluorescently labeled platelet-derived MPs for 1 h (Figure 3A, 2nd upper panel), which is consistent with the internalization of platelet-derived MPs by HUVEC. The fluorescent signal persisted for at least 24 h, raising the issue as to whether this is due to the continuous uptake of MPs or the stability of MPs in HUVEC. To verify that possibility, we coincubated HUVEC with labeled MPs for 3 h, to allow MP internalization, before washing the cells, changing the medium and prolonging the incubation period to 48 h. We observed that the cytoplasmic punctate staining of HUVEC, conferred by the fluorescent MPs, persisted for 48 h in the absence of exogenous MPs (Figure 3B, upper panels). We noticed that the fluorescence seemed to have diffused over time (Figures 3A and 3B), which is in accordance with the release of the MP content in the HUVEC cytoplasm.

2.5.4 Platelet-derived MPs can deliver functional Ago2•miR-223 effector complexes to HUVEC

Knowing that platelet-derived MPs contain an appreciable amount of microRNAs (Diehl et al., 2012; Hunter et al., 2008), we wanted to determine if MPs could deliver their microRNA content to HUVEC after their internalization. Focusing on miR-223, which is highly abundant in platelets (Landry et al., 2009) but weakly expressed in HUVEC (Voellenkle et al., 2012), we observed a 22-fold increase in HUVEC miR-223 levels as early as 1 h after incubation with platelet-derived MPs (Figure 4A). This significant

enrichment in HUVEC miR-223 levels persisted for up to 48 h, compared to HUVEC incubated without MPs. The marked increase and persistence of elevated miR-223 levels in HUVEC may provide the conditions and time window necessary for platelet-derived Ago2•miR-223 to regulate HUVEC gene expression.

To verify this, we transiently transfected HUVEC with a reporter gene construct, in which Rluc was placed under the control of a miR-223 binding site, prior to incubation with platelet-derived MPs. We observed a significant 44% decrease in HUVEC reporter gene activity induced by coincubation with MPs (Figure 4B). These results indicate that platelet MP-derived Ago2•miR-223 complexes can target specific mRNAs and exert gene regulatory effects in recipient endothelial cells.

2.5.5 Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the mRNA level

To investigate whether MP miR-223 derived from platelets can regulate endogenous HUVEC gene expression, we searched for potential endothelial mRNA targets of platelet miR-223, and identified two mRNA candidates: (i) FBXW7, an onco-suppressor protein and validated mRNA target of miR-223 (Moberg et al., 2001), and (ii) EFNA1, a glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored receptor tyrosine kinase ligand (Hirai et al., 1987). FBXW7 and EFNA1 mRNAs harbor four and one conserved miR-223 binding sites in their 3'UTR, respectively (Supplementary Figure S3) (Xu et al., 2010).

Using a reporter gene-based assay in HUVEC, we observed a significant 47% and 31% downregulation of Rluc reporter gene activity induced upon coincubation with MPs and conferred by the 3'UTR of FBXW7 (Figure 5A, left panel) and EFNA1 (Figure 5A, right panel) mRNAs, respectively. These results indicate that platelet-derived MPs can modulate gene expression through regulatory elements located in the 3'UTR of two selected endothelial mRNAs.

We observed a significant downregulation of endogenous FBXW7 and EFNA1 mRNA levels that reached a maximum of 51% (Figure 5B, left panel) and 28% (Figure 5B, right panel), respectively, within 6 h of exposure to MPs. To ascertain that these effects are mediated by platelet MP-derived miR-223, we transiently transfected HUVEC, with a

vector expressing a mRNA bearing a sequence complementary to miR-223 and acting as a miR-223 sponge, prior to incubation with MPs. As shown in Figure 5C, the miR-223 sponge neutralized the downregulatory effects induced by platelet MPs on the endogenous FBXW7 (Figure 5C, left panel) and EFNA1 (Figure 5C, right panel) mRNA levels, and even enhanced EFNA1 mRNA levels above baseline. This latter observation may be due to the sequestration of endothelial miR-223, which may regulate endogenous FBXW7 expression to a greater extent than EFNA1. These findings support a role for platelet MP-derived miR-223 in regulating FBXW7 and EFNA1 expression at the mRNA level.

2.5.6 Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the protein level

The mRNA regulatory effects of platelet MP-derived miR-223 could be translated at the protein levels, as we observed a marked decrease in HUVEC FBXW7 protein levels as early as 18 h after exposure to platelet-derived MPs (Figure 6A, left panel). This effect persisted for up to 48 h, suggesting that platelet MP-derived miR-223 may influence endothelial gene expression for extended periods of time. HUVEC EFNA1 protein levels were also decreased by platelet-derived MPs, but only after 96 h of coincubation (Figure 6A, right panel), which is probably due to a slower turnover of cellular EFNA1 proteins compared to FBXW7.

Together, these results are consistent with a scenario by which activated platelets may deliver, through the release of MPs, mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to other cells of the cardiovascular system and regulate expression of endogenous genes in recipient cells, such as endothelial cells (Figure 6B).

2.6 Discussion

Although recent studies tend to support a mRNA regulatory role for platelet microRNAs (Kondkar et al., 2010) and Ago2•microRNA complexes (Landry et al., 2009) in platelet biology (Kondkar et al., 2010; Nagalla et al., 2011), the definite proof is still being sought, because of the challenge and intrinsic limitations associated to working with primary human platelets, including their relative refractoriness to transfection (Landry et al., 2009). The propensity of platelets to release MPs upon activation (Boilard et al., 2010), the

microRNA content of circulating MPs derived from platelets (Hunter et al., 2008), and the ability of MPs to transfer their content to recipient cells (Cocucci et al., 2009) made it tempting to investigate a possible role of platelet microRNAs outside of platelets.

The pool of circulating microRNAs is composed of vesicle-associated as well as protein-bound microRNAs that originate from different cell types, including platelets (Willeit et al., 2013), from which the most abundant MP subtype in the circulation derive (Berckmans et al., 2001). In the present study, we found that thrombin-activated platelets release a majority of their miR-223 content in MPs, whereas minute amounts seem to be released directly into the supernatant. These findings are supported by Diehl et al. (Diehl et al., 2012), who reported that a prominent amount of plasma microRNAs is associated to MPs. The increase in MP miR-223 levels correlated with, but was proportionally superior to, the number of MPs released by thrombin-activated platelets (~60-fold versus 7.3-fold). These results suggest that thrombin may induce the release of platelet MPs enriched in miR-223, compared to MPs produced spontaneously by resting platelets. However, MPs may not have the monopoly of intercellular microRNA transfer, as circulating microRNAs may also be delivered to target cells via HDL. Vickers et al. (Vickers et al., 2011) reported that miR-223 complexed with HDL can be efficiently transferred to co-cultured hepatocytes, and influence expression of miR-223 targets in recipient cells. Our results suggest that activated platelets may not contribute, to a significant extent, to the pool of vesicle-free forms of circulating microRNAs that are either associated with Ago2 or HDL (Arroyo et al., 2011; Vickers et al., 2011).

Platelets may also release microvesicles smaller than MPs, called exosomes (40 to 100 nm in diameter) (Heijnen et al., 1999), that may not have sedimented with MPs upon centrifugation at 20,000 g. Although miR-223 of exosomal origin could have contributed to the miR-223 signal detected in the supernatant fraction, its overall contribution to the pool of miR-223 released from activated platelets is almost negligible compared to MPs. The caveat has to be taken into account that the profile and mode of microRNA release from platelets may depend on the nature of the agonist(s), stimulatory and/or shear conditions.

Released upon activation or apoptosis of almost every blood cell types (Mause and Weber, 2010), MPs have been associated to a variety of pathologies, including arthritis (Boilard et

al., 2010) and atherosclerosis (Rautou et al., 2011b) as well as tumor progression, angiogenesis and metastasis (Rak, 2010). This may be explained by the ability of MPs to enhance vascular permeability (Cloutier et al., 2012), to promote inflammation (Boilard et al., 2010; Cloutier et al., 2013), and to act as a procoagulant (Owens and Mackman, 2011). Although cytokines may account for most of these biological effects (Mause and Weber, 2010; Rautou et al., 2011b), it would not be prudent to dismiss a possible role for bioactive molecules other than cytokines, such as microRNAs, in MP-mediated effects in the circulatory system.

MPs and other vesicles, such as exosomes and even apoptotic bodies, can act as carriers and mediate the horizontal transfer of proteins and RNAs between cells. For instance, mRNAs contained in murine mast cell-derived exosomes may be transferred to human mast cells and induce mouse protein expression (Valadi et al., 2007). Platelet-like particles were also shown to transfer their mRNA content to recipient vascular cells (Risitano et al., 2012). Similarly, Zernecke et al. (Zernecke et al., 2009) demonstrated that miR-126 derived from endothelial apoptotic bodies could be efficiently delivered to neighboring endothelial cells and have an atheroprotective role in mouse. Our study demonstrating a role for platelet MPs in miR-223 delivery to recipient cells of endothelial origin, where it can modulate expression of endogenous genes, highlights the relative complexity, efficiency and functional importance of intercellular communications across the circulatory system. Even more so, considering the diversity of platelet microRNA sequences, (Ple et al., 2012a) as well as the number of cell types capable of exchanging, i.e. releasing, internalizing and integrating, genetic materials (or information) through different modes of intercellular transfer. In that context, a microvesicular carrier harboring specific surface proteins may confer a certain degree of specificity and provide a means of delivering platelet microRNAs to specific cells. In view of our findings, it may be reasonable to speculate that MPs released by activated platelets may communicate this “information” and modulate, indeed adapt, the responsiveness of the vasculature accordingly. The abundance of circulating MPs may underlie their relative importance in mediating normal regulatory functions and cell-to-cell communications/coordinations, whose dysfunction may contribute to pathophysiological conditions (Boilard et al., 2010).

MPs of various origins contain microRNAs and can be internalized by recipient cells (Diehl et al., 2012; Hunter et al., 2008; Ismail et al., 2013). In this study, we report the internalization by HUVEC of platelet MP-derived miR-223 that maintains its functionality and regulates endothelial expression of two of its validated mRNA targets, i.e. FBXW7 and EFNA1. EFNA1 is a marker of liver cancer (Iida et al., 2005), whereas FBXW7 was unveiled as a general tumor suppressor in human cancer (Calhoun et al., 2003). Both genes are (down)regulated by miR-223 at the mRNA and protein levels. Mechanistically, MP-derived miR-223 may regulate FBXW7 and EFNA1 gene expression, either through mRNA destabilization, inhibition of mRNA translation initiation, or both (Bartel, 2009). The fact that downregulation of mRNA levels preceded that of protein levels militates in favor of miR-223-mediated destabilization of these two endothelial mRNAs.

Although our results support the involvement of platelet-derived Ago2•microRNA complexes in regulating endothelial mRNA translation, we cannot exclude the possibility that MP microRNAs, free of Ago2 proteins, may integrate the microRNA machinery of endothelial cells to mediate their mRNA regulatory effects. As well, whether platelet-derived microRNAs can mediate epigenetic effects in recipient cells should also be considered.

MiR-223 may be implicated in cell proliferation (Wu et al., 2012), in osteoclast, erythroid or megakaryocyte differentiation (Sugatani and Hruska, 2007; Yuan et al., 2009) and in cancer (Li et al., 2011). Therefore, the delivery of platelet miR-223 to other cell types via MPs may have important implications that can only be magnified by the plurality of microRNA targets and the diversity of the microRNA population released through MPs. Such intercellular exchanges of microRNAs mediated by platelet-derived MPs may contribute to the gene expression programming of recipient cells and to the conditioning of the circulatory system under specific health and disease conditions associated with platelet activation.

The *in vivo* relevance of this process has gained support from a recent study performed by Gidlöf et al. (Gidlöf et al., 2013), in which the authors reported the (down)regulation of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) gene expression in cultured HMEC-1 cells exposed to a microRNA (i.e., miR-320b) that is released upon platelet activation and found

to be depleted in platelet-containing thrombi aspirated from STEMI patients. The process that we documented may be manipulated and eventually lead to the development of new therapeutic modalities aimed to improve the circulatory function of cardiovascular patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant No. 286777 from the Canadian Blood Services/Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Blood Utilization and Conservation Initiative via Health Canada (to P.P.).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

P.P. conceived and coordinated the project; B.L. led the project; B.L., E.B. and P.P. designed and planned the experiments; B.L., A.C., H.P., A-C.D. and N.C. performed the experiments and analyzed the data; all the authors commented/edited on the manuscript; B.L. and P.P. wrote the manuscript.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts or competing financial interests.

2.7 Figures and legends

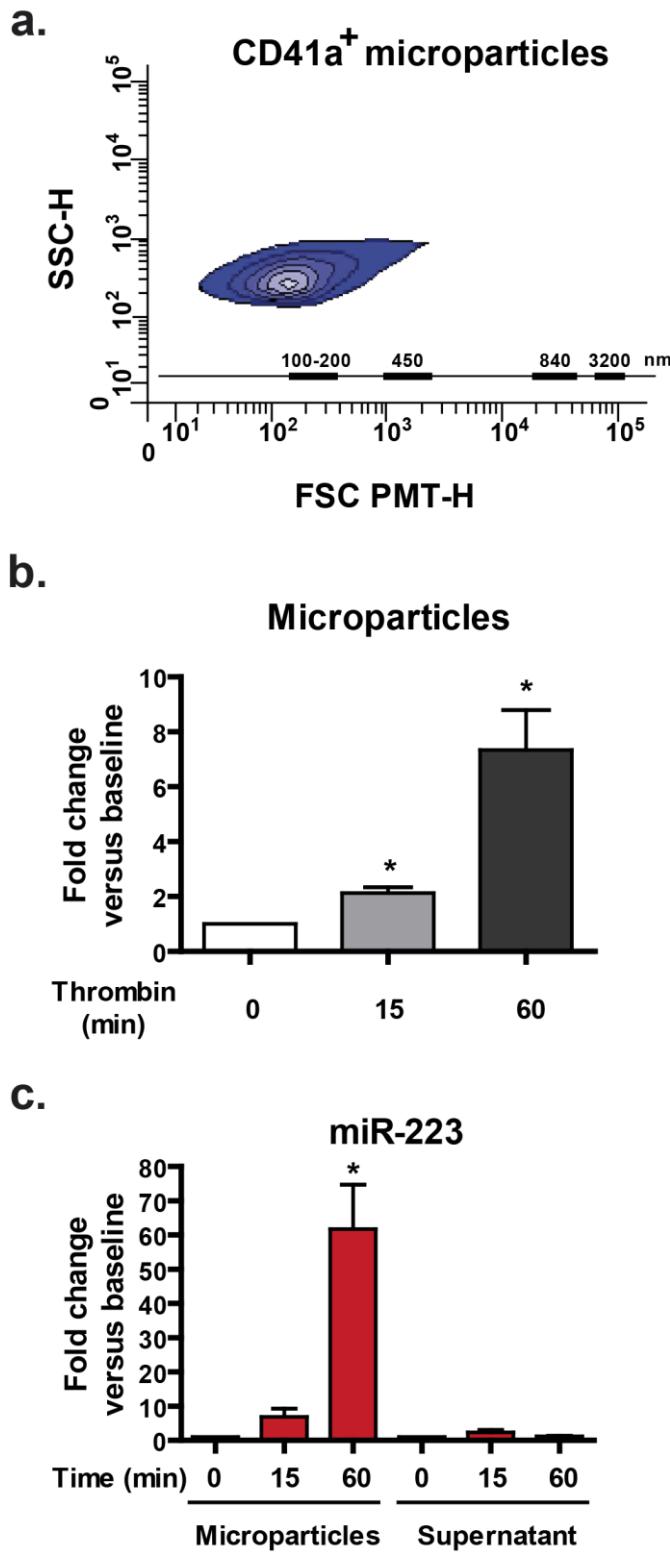


Figure 1: Activated platelets release MPs that contain miR-223.

(A-C) Human platelets were activated with thrombin (0.1 U/ml) for 15 or 60 min, and the MPs released were isolated by ultracentrifugation. (A) Representative flow cytometry analyses of the MP population derived from platelets activated with thrombin for 60 min. Because of the size heterogeneity of MPs (Beyer and Pisetsky, 2010), fluorescent Sky Blue microspheres, ranging from 90 nm to 3,200 nm in diameter (Spherotech), were used to calibrate our FACS and estimate the size of MPs. The CD41a+ events were portrayed as FSC and side-scattered light (SSC) PMT graph using the BD FACSDiva software. SSC, Side-scattered light. (B) MPs were counted by flow cytometry by a forward-scattered light (FSC) coupled to a photomultiplier tube. Results are expressed as the mean (\pm standard error of the mean; SEM) fold changes versus unstimulated platelets, used as a reference ($n = 3$ experiments). (C) The MP and supernatant fractions of thrombin-activated platelets were isolated and analyzed for their content in miR-223 by qPCR. Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using RNU6 as a reference (Schaefer et al., 2010), and expressed as the mean (\pm SEM) fold changes versus unstimulated platelets ($n = 3$ experiments). Similar results were obtained by monitoring 4 additional microRNAs (data not shown). * $p < 0.05$ versus baseline (Student's t test).

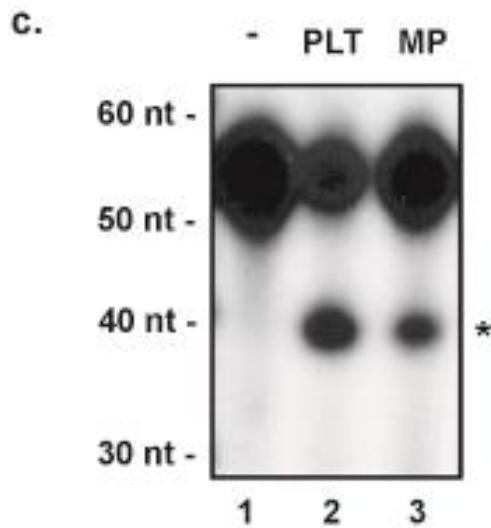
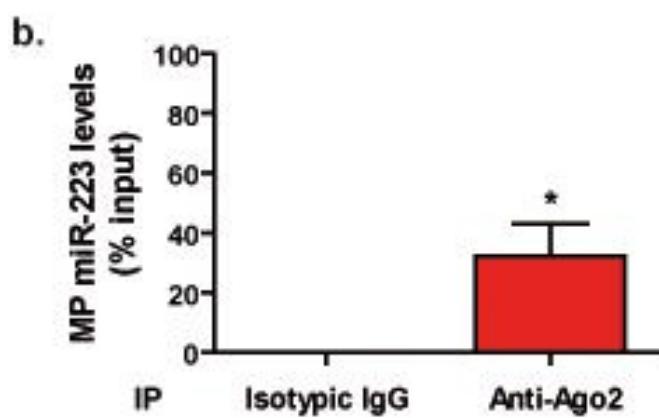
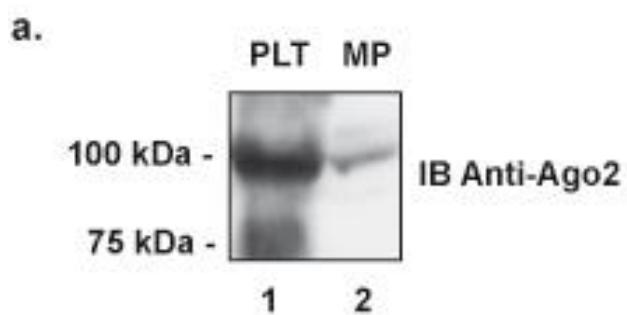


Figure 2: Platelet-derived MPs contain functional Ago2•miR-223 effector complexes.
(A-C) Human platelets (PLT) were activated with thrombin (0.1 U/ml) for 60 min, and the MP fraction was isolated by ultracentrifugation. Unstimulated platelets served as control (Landry et al., 2009). A) The presence of Argonaute 2 (Ago2) was assessed by immunoblot (IB) analysis using an anti-Ago2 antibody. (B) Protein extracts derived from the MP fraction were subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-Ago2 antibody, followed by quantitative miR-223 detection by qPCR. Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using RNU6 as a reference, and expressed as a percentage of the input (mean \pm SEM; n = 4 experiments). * p < 0.05 versus normal isotypic IgG, which was used as an IP control (Student's t test). (C) The supernatant (S100) (50 µg proteins) fraction of protein extracts derived from platelets (PLT) or the MP fraction of thrombin-activated platelets were subjected to RNA target cleavage assays, using a 5' end, ^{32}P -labeled miR-223 RNA sensor. RNA was isolated by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, separated by denaturing 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)/7 M urea and visualized by autoradiography (n = 2 experiments). * indicates the 39-nt RNA product expected from Ago2-mediated endonucleolytic cleavage of the sensor. -, uncleaved ^{32}P -labeled miR-223 RNA sensor.

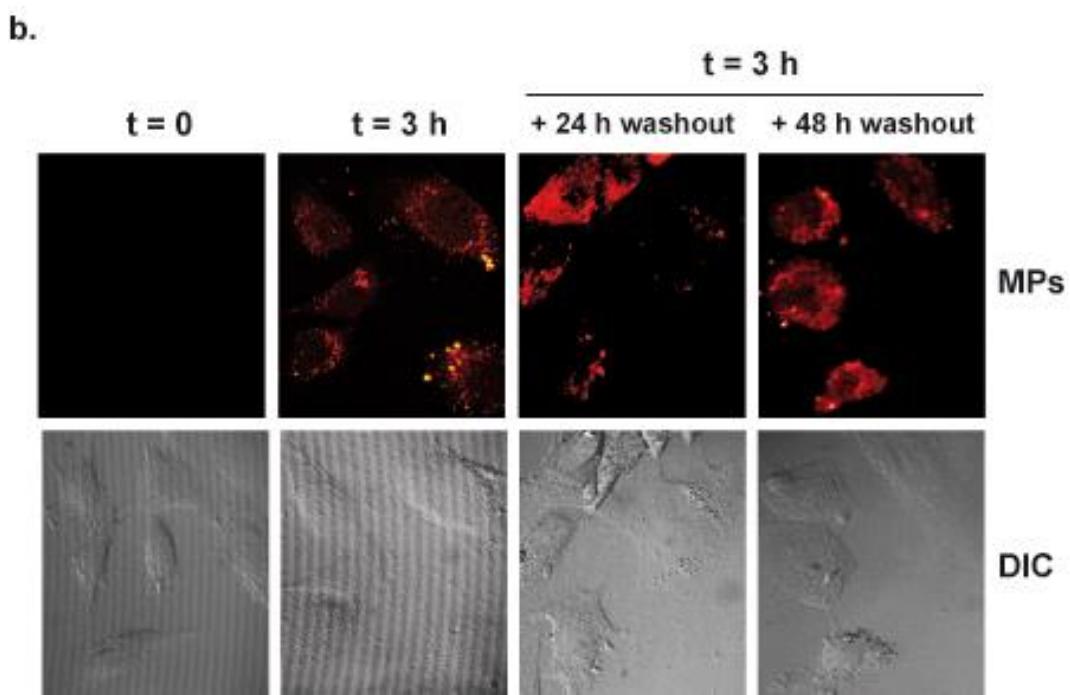
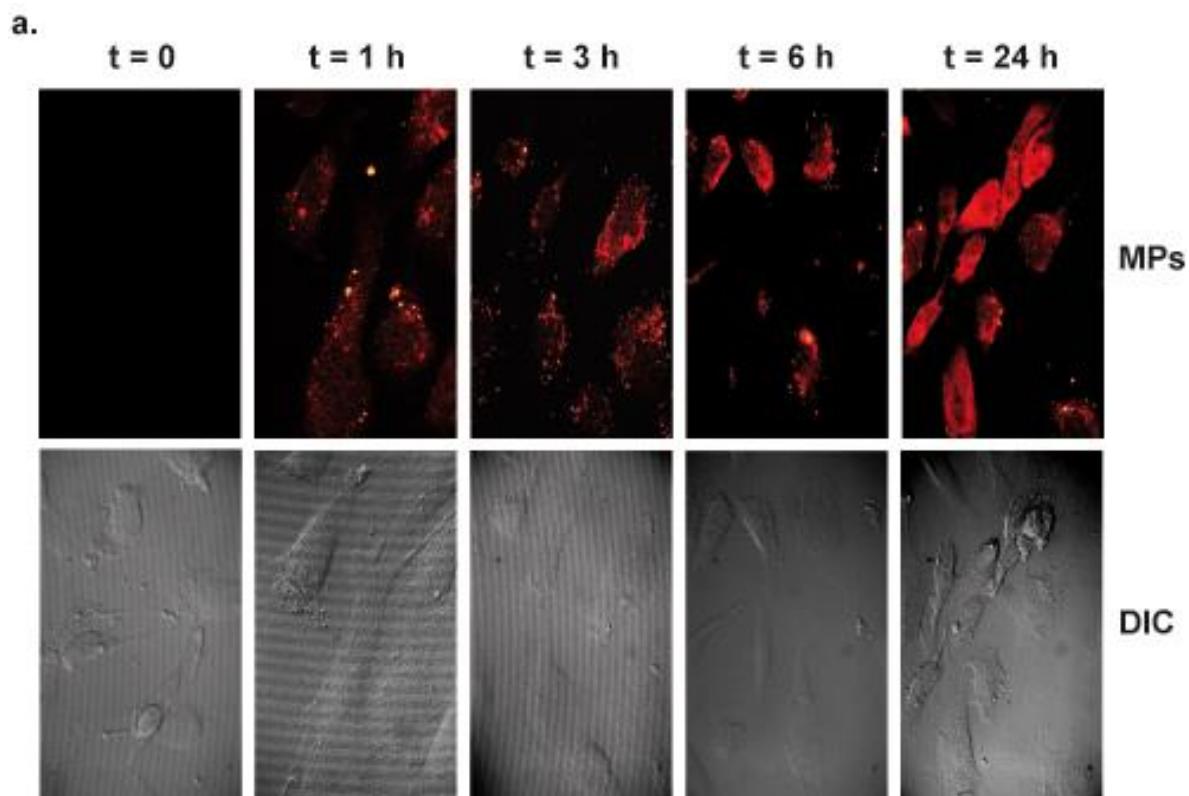


Figure 3: Platelet-derived MPs are internalized by HUVEC.

(A-B) HUVEC were incubated, for the indicated periods of time (t), with fluorescently labeled MPs, at a HUVEC:MPs ratio of 1:100, and MP uptake was visualized by confocal microscopy ($\times 63$ objective) (upper panels). Cell morphology was visualized using differential interference contrast (DIC) (lower panels). (B) HUVEC were incubated with fluorescently labeled MPs for 3 h, and MP uptake was visualized by confocal microscopy after a 24 or 48-h washout period (upper panels). The images are representative of three independent experiments.

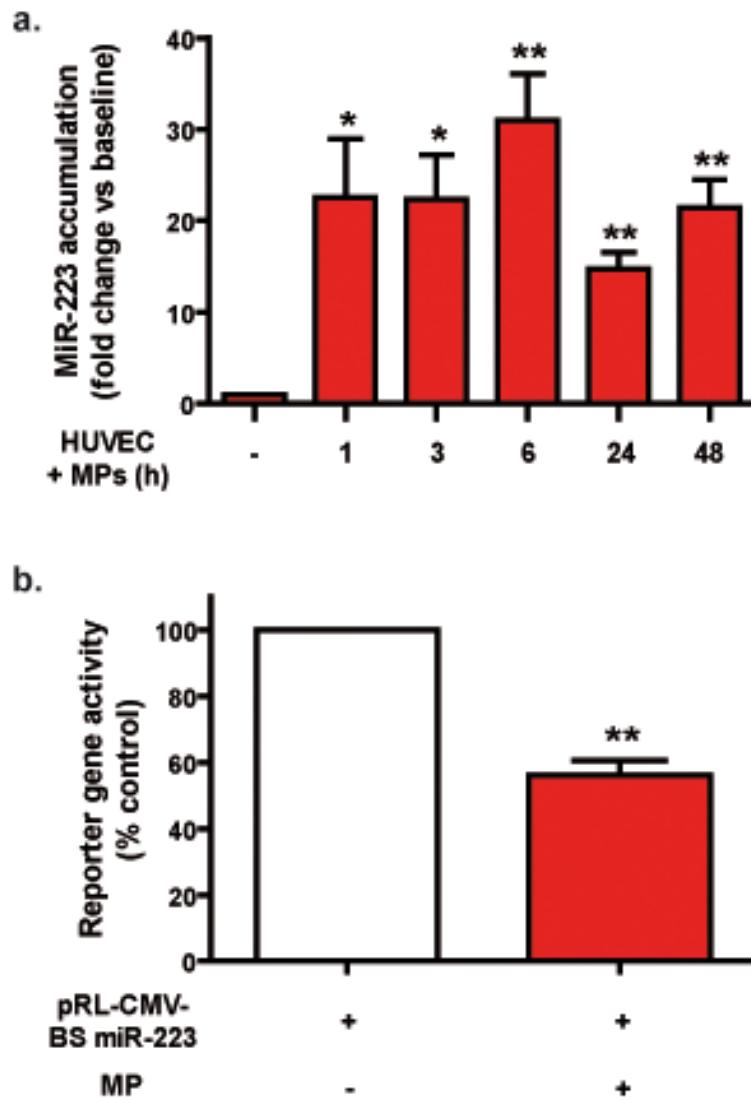


Figure 4: Platelet-derived MPs can deliver functional Ago2•microRNA effector complexes to HUVEC.

(A) HUVEC were incubated with platelet-derived MPs for up to 48 h, and miR-223 accumulation in HUVEC was quantitated by qPCR. Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using RNU6 as a reference, and expressed as the mean (\pm SEM) fold changes versus baseline ($n = 5$ experiments). (B) HUVEC transiently expressing a Rluc reporter gene, harboring a binding site complementary to miR-223 (pRL-CMV-BS miR-223), were incubated (or not; control) with MPs derived from thrombin-activated platelets for 48 h prior to luciferase activity measurements. Results were normalized on Fluc activity, and expressed as mean (\pm SEM) percentage of control ($n = 4$ experiments). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus baseline or control (Student's t test).

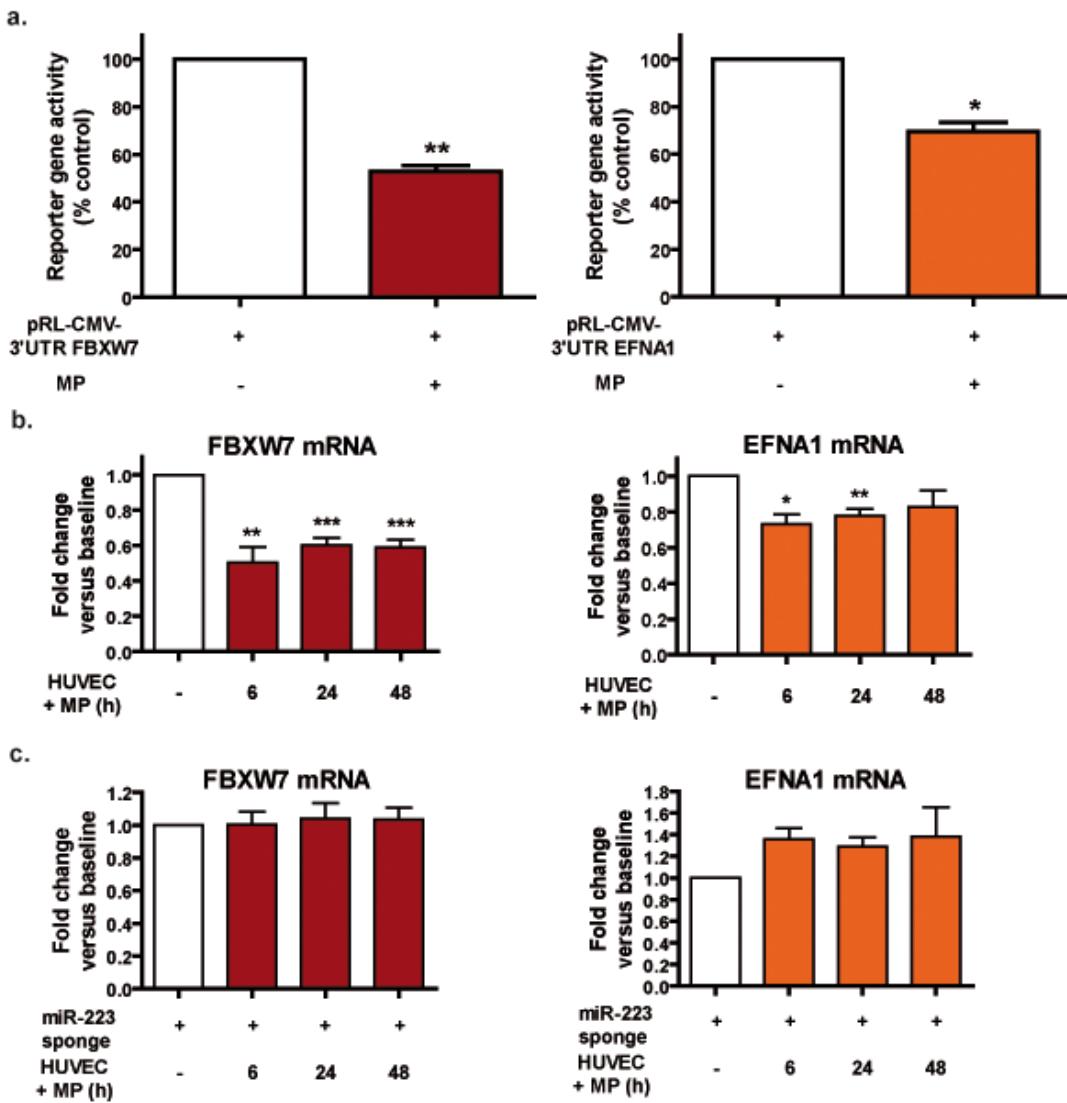


Figure 5: Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the mRNA level.

(A) HUVEC transiently expressing a Rluc reporter gene, harboring the 3'UTR of FBXW7 (pRL-CMV-3'UTR FBXW7) (left panel) or EFNA1 mRNA (pRL-CMV-3'UTR EFNA1) (right panel), were incubated (or not; control) with MPs derived from thrombin-activated platelets for 48 h prior to luciferase activity measurements. Results were normalized on Fluc activity, and expressed as mean (\pm SEM) percentage of control (n = 3 experiments). (B-C) HUVEC transiently expressing a miR-223 sponge (pRL-CMV-BS miR-223 vector) (C), or not (B), were incubated with platelet-derived MPs for up to 48 h, and FBXW7 (left panels) and EFNA1 (right panels) mRNA levels were quantitated by qPCR. Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using GAPDH mRNA as a reference, and expressed as mean (\pm SEM) fold changes versus baseline (n = 5 experiments). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.0001 versus control or baseline (Student's t test).

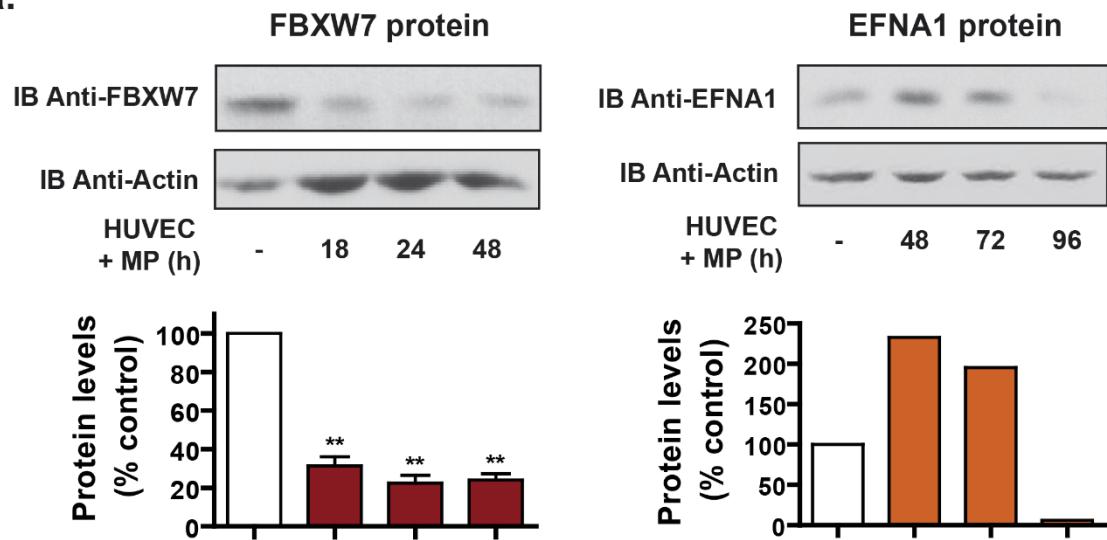
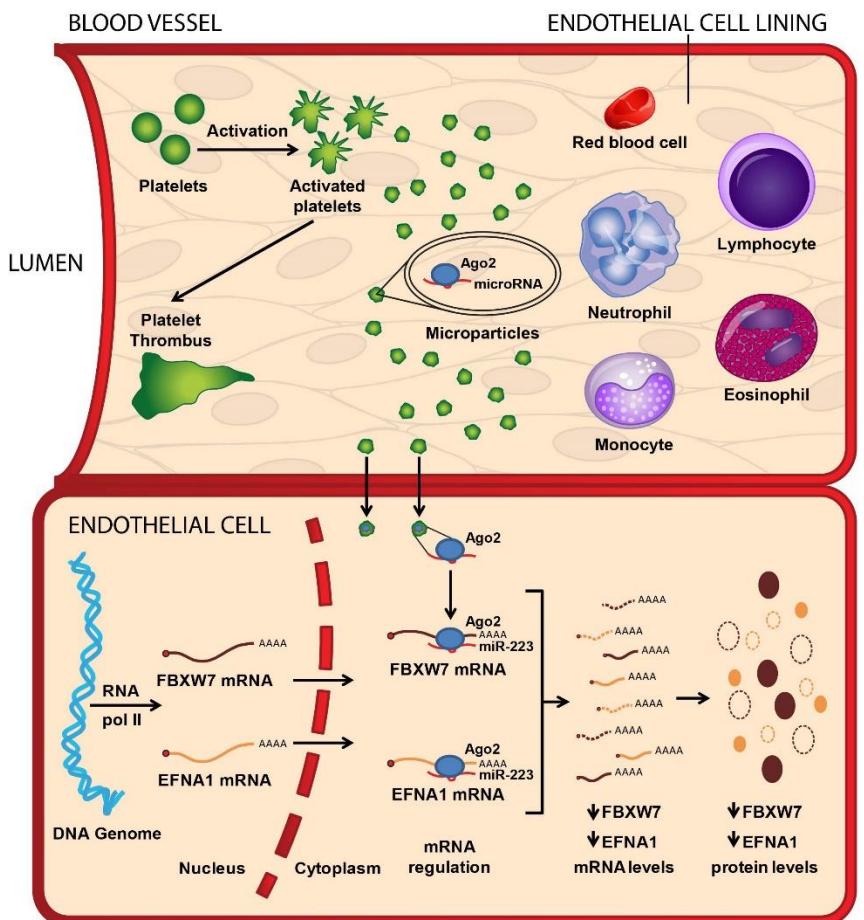
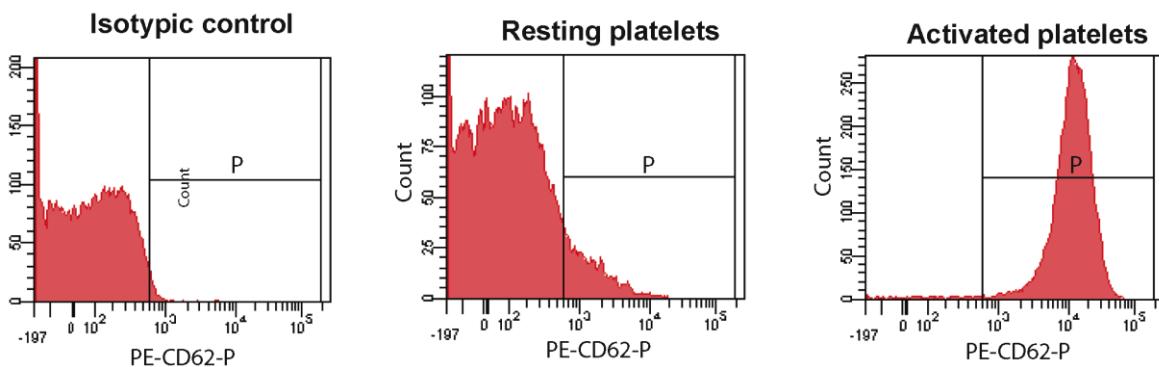
a.**b.**

Figure 6: Platelet MP-derived miR-223 can regulate HUVEC gene expression at the protein level.

(A) Protein extracts prepared from HUVEC, incubated or not with MPs derived from thrombin-activated platelets for up to 48 h or 96 h, were analyzed by immunoblotting (IB) using anti-FBXW7 (left upper panel; n = 3 experiments), anti-EFNA1 (right upper panel; n = 1 experiment) or anti-actin (lower panels) antibody, which was used as a loading control. The data were analyzed by densitometry and expressed as a percentage of control. (B) Proposed model for the intercellular transfer of functional Ago2•microRNA complexes between activated platelets and endothelial cells through the release of MPs. RNA pol II, RNA polymerase II.

2.8 Supplementary figures and tables



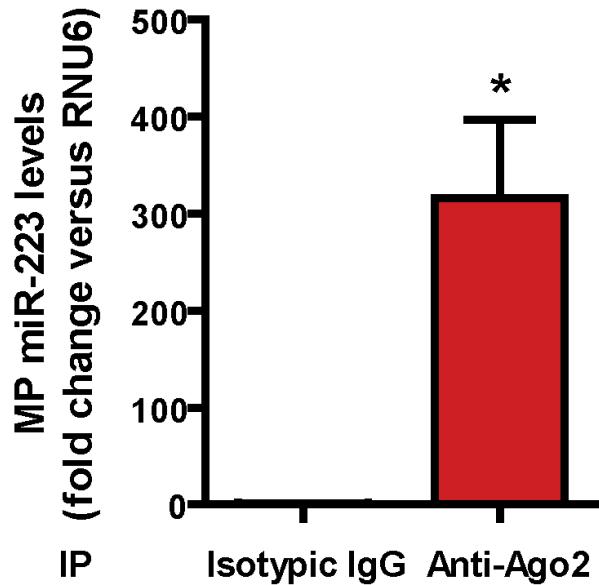
Samples	% Parent (P)	PE-mean
IgG	1.4	1,735
Resting platelets	10.1	2,228
Activated platelets	97.8	13,323

Supplementary Figure S1: Flow cytometry measurement of platelet CD62p (P-selectin) surface expression, a marker of platelet activation.

Representative flow cytometry analysis of freshly isolated platelets, either unstimulated (resting; center panel) or stimulated for 15 min with 0.1 U/ml of thrombin (activated; right panel). Platelets were incubated with R-phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD62 (center and right panels) or isotypic mouse IgG (left panel) antibody (BD Biosciences) for 30 min prior to analysis.

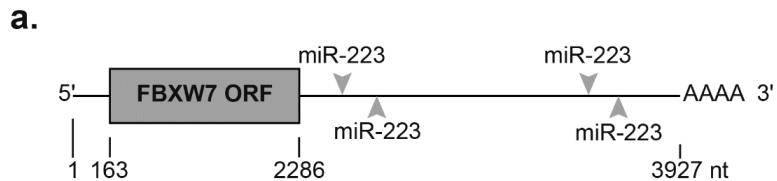
Supplementary Table S1: Sequence of the oligonucleotides used for qPCR quantitation of selected endothelial mRNAs.

Name	DNA oligonucleotide sequence (5' - - > 3')
GAPDH forward	5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3'
GAPDH reverse	5'-CTCGCTCCTGG AAGATGG-3'
EFNA1 forward	5'-TTCAAATCCCAAGTCCG-3'
EFNA1 reverse	5'-GTACTCCTCATGCTCCACC-3'
FBXW7 forward	5'-AAACCAAGAAGAACAAAGAGGA-3'
FBXW7 reverse	5'-TGTTGTTTTGTATAGAATGGG-3'

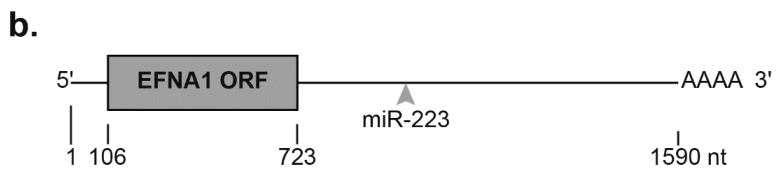


Supplementary Figure S2: Detection of platelet MP-derived miR-223 association to Ago2 proteins.

Protein extracts derived from the MP fraction of thrombin-activated platelets were subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-Ago2 antibody, followed by quantitative miR-223 detection by qPCR. The results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using RNU6 as a reference, and expressed as a fold change versus RNU6 ($n = 4$ experiments). * $p < 0.05$ versus normal isotypic IgG (anti-FLAG antibody), which was used as an IP control (Student's t test).



Binding Site Position	mRNA:microRNA base pairing
190	FBXW7 5'... gacaaaccuuAACUGACA ... 3' miR-223 3' cauaaacuguUUCACUGu 5' (base pairing:)
379	FBXW7 5'... ucUUUuacc-ACUGACAG ... 3' miR-223 3' auAAAcuguuUGACUGU 5' (base pairing:)
1145	FBXW7 5'... uacaucguaaAACUGACA ... 3' miR-223 3' cauaaacuguUUCACUGu 5' (base pairing:)
1261	FBXW7 5'... ugcucugaguAACUGACA ... 3' miR-223 3' cauaaacuguUUCACUGu 5' (base pairing:)



Binding Site Position	mRNA:microRNA base pairing
386	EFNA1 5'... accccauaaaCUGUUUGACUGu... 3' miR-223 3' aggatgcccaGATGAAGTGACT 5' (base pairing: ::)

Supplementary Figure S3: Identification of potential miR-223 binding sites in the 3'UTR of two selected endothelial cell mRNAs.

(A-B) Upper panels, Schematic representation of human FBXW7 (A) and EFNA1 (B) mRNAs with their putative miR-223 binding sites predicted by at least 2 bioinformatic programs among miRanda, TargetScan and PicTar. Lower panels, Topology of the interaction between hsa-miR-223 and its putative binding site, as predicted by TargetScan.

Chapitre 3: Les microparticules de plaquettes reprogramment l'expression des gènes et la fonction des macrophages

Titre court: Les microparticules de plaquettes reprogramment la fonction des macrophages

3.1 Résumé

Les MPs de plaquettes représentent le sous-type de MPs le plus abondant dans la circulation, et peuvent participer aux communications intercellulaires via la livraison de molécules bioactives, telles que des cytokines, des protéines, des lipides et de l'ARN. Nous démontrons dans cet article, que les MPs de plaquettes peuvent être internalisées par les macrophages primaires humains et y livrer miR-126-3p fonctionnel. L'augmentation des niveaux de miR-126-3p dans les macrophages n'est pas empêchée par l'actinomycine D, suggérant que l'enrichissement n'est pas dû à la transcription du gène du microARN. Les MPs diminuent, de manière dose dépendante, l'expression de quatre ARNm qui sont des cibles prédictes de miR-126-3p, dont deux ont été confirmées au niveau de la protéine. L'effet des MPs sur l'expression des ARNm est annulé par l'utilisation d'une éponge à miR-126-3p, démontrant l'implication de miR-126-3p. Les analyses, par biopuces, du transcriptome complet de macrophages exposés à des MPs, ont révélé une expression différentielle de 66 microARN et 653 ARN supplémentaires. Plus spécifiquement, les MPs induisent une régulation à la hausse de 34 microARN et une régulation à la baisse connexe de 367 ARNs, dont les ARNm qui codent pour les cytokines/chimiokines CCL4, CSF1 et TNF. Ces changements sont accompagnés par une diminution de la sécrétion de ces cytokines/chimiokines par les macrophages, ainsi que par une augmentation de leur capacité de phagocytose. Ces découvertes démontrent que les MPs de plaquettes peuvent modifier le transcriptome des macrophages, et reprogrammer leur fonction vers un phénotype phagocytaire.

Mots clés • Plaquettes / microparticules / macrophages / microARN / régulation génique

Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function

Benoit Laffont[#], Aurélie Corduan[#], Matthieu Rousseau, Anne-Claire Duchez, Chan Ho C. Lee, Eric Boilard and Patrick Provost*

CHUQ Research Center/CHUL, 2705 Blvd Laurier, Quebec, QC, G1V 4G2, Canada,
Department of Microbiology-Infectiology and Immunology and Faculty of Medicine,
Université Laval, Quebec, QC, G1V 0A6, Canada

The first two authors contributed equally to this work and should be considered as co-first
authors

Running title: Platelet MPs reprogram macrophage function

* Corresponding author: Dr. Patrick Provost
CHUQ Research Center/CHUL
2705 Blvd Laurier, Room T1-65
Quebec, QC G1V 4G2
Canada
Phone: 1 418 525 4444 (ext. 48842)
E-mail: patrick.provost@crchudequebec.ulaval.ca

EXTRA TABLE

What is known about this topic?

- Platelet microparticles represent the most abundant microparticles subtype in the circulation
- Circulating platelet microparticles are cleared from the circulation by macrophages

What does this paper add?

- Platelet microparticles can deliver functional miR-126-3p to regulate primary human macrophage gene expression, both at the mRNA and protein levels
- Platelet microparticles reprogram macrophage function by decreasing cytokine/chemokine secretion and increasing their phagocytic capacity

3.2 Abstract

Platelet microparticles (MPs) represent the most abundant MPs subtype in the circulation, and can mediate intercellular communication through delivery of bioactives molecules, such as cytokines, proteins, lipids and RNAs. Here, we show that platelet MPs can be internalized by primary human macrophages and deliver functional miR-126-3p. The increase in macrophage miR-126-3p levels was not prevented by actinomycin D, suggesting that it was not due to de novo gene transcription. Platelet MPs dose-dependently downregulated expression of four predicted mRNA targets of miR-126-3p, two of which were confirmed also at the protein level. The mRNA downregulatory effects of platelet MPs were abrogated by expression of a neutralizing miR-126-3p sponge, implying the involvement of miR-126-3p. Transcriptome-wide, microarray analyses revealed that as many as 66 microRNAs and 653 additional RNAs were significantly and differentially expressed in macrophages upon exposure to platelet MPs. More specifically, platelet MPs induced an upregulation of 34 microRNAs and a concomitant downregulation of 367 RNAs, including mRNAs encoding for cytokines/chemokines CCL4, CSF1 and TNF. These changes were associated with reduced CCL4, CSF1 and TNF cytokine/chemokine release by macrophages, and accompanied by a marked increase in their phagocytic capacity. These findings demonstrate that platelet MPs can modify the transcriptome of macrophages, and reprogram their function towards a phagocytic phenotype.

Keywords • Platelet / microparticle / macrophage / microRNA / gene regulation

3.3 Introduction

Platelets are anucleate elements of the blood that play a central role in hemostasis and thrombosis (Michelson, 2003). Like numerous cell types, platelets release extracellular vesicles, known as microparticles (MPs), by budding of the plasma membrane upon activation. Platelet MPs (0.1 to 1 μm in diameter) harbor surface markers from their parental cells (Cocucci et al., 2009), represent the most abundant cell-derived MP subtype in the circulation (Arraud et al., 2014; Berckmans et al., 2001) and participate in inflammation (Boilard et al., 2010). Reflecting a balance between MP generation and clearance, the level of circulating MPs is increased in a variety of cardiovascular diseases; MPs are now considered as surrogate biomarkers of vascular disorders and thrombotic risk (Owens and Mackman, 2011; Rautou et al., 2011a).

During platelet activation or apoptosis, phosphatidylserine (PS) exposure is thought to facilitate removal of MPs from the circulation by acting as an “eat me” signal for professional phagocytes, such as macrophages through $\beta 2$ -glycoprotein 1 or lactadherin-dependent phagocytosis (Abdel-Monem et al., 2010; Dasgupta et al., 2009). This MP clearance by macrophages seems to take place mainly in the spleen, as splenectomized mice exhibit higher levels of circulating MPs than control mice. PS exposure on MPs may also support opsonization by the complement component C3b, allowing binding of opsonized MPs to complement receptor 1 (CR1) on erythrocytes, which are then phagocytosed by resident macrophages in the spleen (Flaumenhaft, 2006).

Platelet MPs contain lipids, nucleic acids and proteins that can be transported and transferred to target cells (Aatonen et al., 2012; Loyer et al., 2014; Mause and Weber, 2010). Playing an essential role in normal physiological functions, such as hemostasis and immunology (Aatonen et al., 2012; Owens and Mackman, 2011), platelet MPs are also associated with a plethora of pathological conditions, such as cancer, cardiovascular diseases, cerebrovascular diseases, hematologic diseases, type 2 diabetes, and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, which attests of their biological significance as well as of the importance of intercellular communications in biology. For instance, platelet MPs were shown to induce differentiation of CD4 $^{+}$ T cells into T regulatory cells (Sadallah et

al., 2014), and they also induce monocytes differentiation into macrophages (Vasina et al., 2011).

Despite lacking a nucleus, platelets contain a complex transcriptome (Bray et al., 2013) and gene expression machinery that comprise a large pool of messenger RNAs (mRNAs) (Rowley et al., 2011; Schubert et al., 2014), a dynamic and regulated proteome (Warshaw et al., 1967), as well as a broad array of microRNAs (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a), which are 19 to 24-nucleotide (nt) non-coding RNA species that mediate sequence-specific post-transcriptional regulation of gene expression (Bartel, 2009). Recently, we (Laffont et al., 2013b) and others (Gidlöf et al., 2013) have shown that platelet MPs can act as a vehicle to transfer genetic information to recipient endothelial cells and regulate gene expression. More recently, our group demonstrated that platelet MPs can deliver their cargo of nucleic acids, transcription factors and mitochondria to neutrophils through a new mode of platelet MP internalization involving the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA (Duchez et al., 2015).

The relative abundance of platelet MPs in the circulation (Arraud et al., 2014; Berckmans et al., 2001), their rich content in microRNAs (Laffont et al., 2013b), the potential of platelet MPs to interact with numerous cell types of the circulatory system, the crosstalk between platelets and macrophages (Schrijvers et al., 2007), the capacity of the monocytic cell line THP-1 to internalize platelet MPs (Abdel-Monem et al., 2010) and that of splenic macrophages to mediate clearance of platelet MPs (Dasgupta et al., 2009), and the capacity of microvesicular microRNAs to mediate cell-cell communications (Hulsmans and Holvoet, 2013; Laffont et al., 2013b) prompted us to investigate if platelet MPs can regulate gene expression at least in part, through the delivery of functional microRNAs, and influence the phenotype of primary human macrophages.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Isolation of platelet-derived microparticles

Blood collection from healthy volunteers (adult caucasians of both sexes from the immediate region of Quebec City) was approved by our institutional Human Ethics committee (i.e. Comité d'éthique de la recherche du CHUQ – Centre Hospitalier de

l'Université Laval). The participants provided their written informed consent to participate in this study, as approved by our institutional Human Ethics committee. Platelets were isolated from venous blood collected from healthy donors, harvested by centrifugation at 1,000 g for 10 min and resuspended at 10^8 platelets/ml in Hepes-Tyrode buffer (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 5 mM monohydrate D-glucose, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4), as previously described (Landry et al., 2009). Platelet activation and MP release was induced by incubation with thrombin (0.1 U/ml; Sigma Aldrich) for 60 min at 37°C under gentle agitation. Platelet activation was stopped by addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 20 mM final), and platelets were discarded by centrifugation at 3,200 g for 10 min. The supernatant was filtered through 0.8 µm pore filters (Corning) in order to avoid platelet contamination, and platelet MPs were harvested by centrifugation at 20,000 g for 90 min at 18°C, and resuspended in Hepes-Tyrode buffer for cell coincubations. Platelet MPs derived from 4 healthy blood donors were pooled, and several different pools of MPs were used in coincubation assays. Platelet MPs were analyzed by flow cytometry to determine their origin, number and size, as previously described (Laffont et al., 2013b; Rousseau et al., 2015).

3.4.2 Primary human macrophages

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare), and monocytes were isolated as previously described (Gobeil et al., 2012). Briefly, monocytes were separated from other PBMCs by adhesion for 2 h at 37°C in 150- by 20-mm tissue culture dishes. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), monocytes were differentiated into macrophages by incubation in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Hyclone), 0.1 mM sodium pyruvate (Wisent bioproducts), 10 IU penicillin, 10 µg/ml streptomycin, 0.2 mM glutamine (Wisent bioproducts) and 25 ng/ml of Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF, Shenandoah Biotechnology Inc.) for 7 days. Macrophages were recovered by cell scraping following incubation with Accutase (Sigma) or Trypsin/EDTA (Wisent bioproducts). Macrophages were allowed to rest in the same medium, but lacking M-CSF, for at least 24 h before co-culture with platelet MPs.

For transfection, 7×10^5 cells were transfected by nucleofection using a Nucleofector II apparatus (Amaxa Biosystems) using the AMAXA Human Macrophage Nucleofector kit (Lonza). Twenty-four (24) h later, the culture medium was changed and platelet MPs were added to the cells for 48 h of coincubation.

3.4.3 Macrophage coincubation with platelet MPs

Isolated human platelets (10^8 platelets/ml in Hepes-Tyrode buffer) were fluorescently labeled by incubation with 1 μM CellTracker™ Orange CMTMR (5-(and-6)-((4-Chloromethyl)Benzoyl)Amino)Tetramethylrhodamine) or 1 μM CellTracker™ Red CMPTX dye (Invitrogen) for 15 min at 37°C in darkness, prior to platelet activation with 0.1 U/ml thrombin. The fluorescent MPs were recovered by centrifugation, resuspended in Hepes-Tyrode buffer, and counted by flow cytometry. Macrophages were incubated with fluorescent platelet MPs at a ratio of 1:100 for up to 6 h at 37°C under 5% CO₂. Macrophages were fixed and labeled with an anti-CD14 (mouse polyclonal, Acris antibodies, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 h at room temperature. Cells were washed three times with PBS and labeled with secondary anti-goat antibody conjugated with Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch). Nuclei were stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342 (Invitrogen). Internalization of platelet MPs was confirmed by confocal microscopy with a Quorum Spinning Disc Wave FX microscope (Quorum Technologies) using a $\times 63$ objective. Macrophages were also analyzed by flow cytometry to determine the percentage of apoptotic cells upon incubation in absence and presence of platelet MPs for up to 72 h, by using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) and following the manufacturer's protocol.

3.4.4 Gene expression analysis

Total RNA was extracted from primary human macrophages using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription reactions were performed with 1 μg total RNA using miSCRIPT RT II kit (Qiagen) after DNase I treatment (New England Biolabs). MicroRNAs and mRNAs were detected by quantitative PCR (qPCR) with SYBR Green (Qiagen) using miScript Primer Assay kit (Qiagen) for microRNA detection or designed primers (Integrated DNA technologies) for mRNA detection. Small nuclear RNA U6 (RNU6) or miR-125b (for microRNAs) and GAPDH (for mRNAs) were used as reference genes for

relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The sequences or references of the oligonucleotides used for qPCR quantitation are provided in Table S1.

3.4.5 Constructs and reporter gene activity assays

Reporter gene activity assays were performed as previously described (Laffont et al., 2013b). A miR-126-3p reporter construct (or sponge) was created by inserting a sequence complementary to hsa-miR-126-3p in the Xba1 site of pRL-CMV vector (Promega), downstream of the Renilla luciferase (Rluc) reporter gene. The constructs were verified by DNA sequencing. pGL4.51 vector (Promega) expressing the Firefly luciferase (Fluc) gene was used as a normalization control. The pRL-CMV and pGL4.51 constructs were co-transfected in primary human macrophages 24 h prior to incubation with platelet MPs for 48 h. Rluc and Fluc activities were measured with Dual Glo luciferase reagents (Promega) using a luminometer (Dynex Technologies).

3.4.6 Western blotting

Protein extracts prepared from primary macrophages were analyzed by 12% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS)-PAGE and immunoblotting using anti-ATF3 (Santa Cruz), anti-ATP1B1 (Santa Cruz), and anti-tubulin (Sigma) antibodies, followed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection and densitometric analyses, as described previously (Pepin et al., 2012).

3.4.7 Microarray analyses

Primary macrophages from 12 healthy donors were incubated (MPs) or not (Naive) with platelet-derived MPs for 48 h, and total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). Three pools of RNA from 4 donors each were constituted prior to comparative analysis of microRNA and mRNA levels by microarray profiling using GeneChip® miRNA 3.0 and GeneChip® Human Transcriptome 2.0 arrays (Affymetrix), respectively. Data were analyzed with the Partek Genomics Suite 6.6 software (Partek Inc.). Samples from the same conditions were grouped and compared with each other by a one-way analysis of variance (ANOVA), to obtain a relative difference in fold-change and their significance (p-value), followed by a false discovery rate correction (q-value). RNAs were defined as differentially expressed according to the following criteria: (i) an expression level higher than the

background threshold (5.8 log2), (ii) a p-value lower than 0.05, and (iii) a fold-change higher or lower than 1.5. Similarly, microRNAs were defined as differentially expressed according to the following criteria: (i) an expression level higher than the background threshold (1.3 log2), (ii) a p-value lower than 0.05, and (iii) a fold-change higher or lower than 1.5. The correlation between differentially expressed microRNAs and their putative mRNA targets was determined using Partek Genomics Suite 6.6 software (Partek Inc.) and the MicroCosm Targets Version 5 algorithm available at <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>. Targets of miR-126-3p were selected according to the Pearson coefficient and the associated p-value. The pathways in which- the selected mRNAs are involved were identified using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool (Ingenuity Systems).

3.4.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Macrophages were coincubated or not with platelet MPs for 48 h in 35-mm tissue culture dishes. The culture media were collected and cleared by centrifugation prior to detection of secreted CCL4 (eBioscience), CSF1 (Sigma) and TNF (eBioscience) proteins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

3.4.9 Phagocytosis assay

Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled latex beads (2 μm in diameter; Polysciences) were added to macrophages, labeled with orange cell tracker (Invitrogen), that were pre-incubated or not with platelet MPs for 48 h. Phagocytosis of the beads was monitored 2 h later by confocal microscopy using a $\times 63$ objective.

3.4.10 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM using at least 3 independent experiments and analyzed by Student's t-test or one-way ANOVA. A p value ≤ 0.05 was considered as significant. The statistical analyses were performed using Prism software package version 5.00 (GraphPad Software).

3.5 Results

3.5.1 Platelet MPs are internalized by primary human macrophages

MPs isolated from activated human platelets were counted and characterized by flow cytometry using the platelet glycoprotein CD41a surface antigen marker, revealing a MP population ranging from ~100 to 800 nm in diameter (Figure S1). Fluorescently labeled platelet MPs were internalized by primary human macrophages less than 1 h after coincubation, as confocal microscopy imaging revealed well defined red dots, corresponding to labeled MPs, in the cytoplasm of macrophages (Figure 1A, 2nd panels). We observed a gradual diffusion of the fluorescence in the cytoplasm 3 h and 6 h after coincubation (Figure 1A, 3rd and 4th panels). After 2 h of coincubation, an average of 26 platelet MPs (or 71 to 90% of all platelet MPs associated to the macrophages) were found inside each macrophage, whereas 7 platelet MPs were detected on their surface (or 10 to 29% of all platelet MPs associated to the macrophages) (Figure 1B). These observations are consistent with the internalization of platelet MPs and release of their content in primary human macrophages.

3.5.2 Platelet MPs deliver functional miR-126-3p to primary human macrophages

We have shown previously that platelet MPs can mediate the transfer of microRNAs that are functional in actively dividing cultured human endothelial cells (HUVEC) (Laffont et al., 2013b). Since microRNA function may be diametrically opposed in dividing vs non-dividing cells, whereby microRNAs inhibit mRNA translation in dividing cells but enhance mRNA translation in non-dividing ones (Vasudevan et al., 2007), we deemed it important to transpose and validate this concept, and document the functionality of platelet MP-derived microRNAs in non-dividing, primary human macrophages. To this end, we first monitored a miRNA species that is (i) present in platelet MPs, and (ii) the most enriched in human platelets compared to primary macrophages, i.e. miR-126-3p. Although both platelets and macrophages are cells from the myeloid lineage (Rees, 2010) and exhibit closely related microRNA transcriptomes, they differ in that platelets are enriched (by ~13 fold) in miR-126-3p (data not shown) and are a major contributor to the level of circulating miR-126 (Zampetaki et al., 2012).

qPCR analyses unveiled a ~4.5 fold enrichment of miR-126-3p in macrophages exposed to platelet MPs for 48 h (Figure 2A). Platelet-derived miR-126-3p proved to be functional in macrophages transiently transfected 48 h earlier with a reporter gene construct, in which Rluc was placed under the control of a miR-126-3p binding site, as a significant 23% decrease in Rluc activity was observed (Figure 2B). The relatively weak regulatory effect may be related to experimental limitations in transfection efficiency and the large amount of transfected DNA necessary to obtain reliable and reproducible luciferase measurements.

Since (i) we could not identify a microRNA that was unique to platelets (i.e. present in platelets, but absent in macrophages), and (ii) platelet MPs modulated the miR-126-3p content of macrophages, we verified the contribution of de novo transcription to the observed enrichment in macrophage miR-126-3p levels. Pre-treatment of macrophages with the transcription inhibitor Actinomycin D, prior to coincubation with platelet MPs, had no effect on the degree of enrichment in miR-126-3p (8.3-fold increase with Actinomycin D vs 8-fold increase without it) (Figure 2C, left panel). Monitored as a control, the level of small RNA RNU6 in macrophages was reduced by ~10 fold by pretreatment with Actinomycin D (Figure 2C, right panel), thereby attesting of the efficiency of the drug to inhibit small RNA transcription. These results demonstrate that the observed miR-126-3p enrichment in macrophages exposed to platelet MPs is mainly due to the internalization of platelet MPs, rather than an increase in macrophage gene transcription.

3.5.3 Platelet MPs-derived miR-126-3p can regulate macrophage gene expression

To investigate whether platelet MP-derived miR-126-3p is functional in regulating endogenous macrophage gene expression, we searched for and identified, by bioinformatics predictions, four mRNA candidates of miR-126-3p, i.e. ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14. qPCR analyses revealed a significant down-regulation of endogenous ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 mRNA levels, after a 48-h exposure to an increasing quantity of platelet MPs (Figure 3A). At a ratio of 100 platelet MPs per macrophage, their respective mRNA levels reached 35%, 41%, 40% and 46% of their baseline value. The mRNA regulatory role of platelet MP-derived miR-126-3p was confirmed by transiently

transfected macrophages with a vector expressing an RNA bearing a sequence complementary to miR-126-3p and acting as a miR-126-3p sponge, prior to incubation with platelet MPs. The miR-126-3p sponge neutralized the downregulatory effects induced by platelet MPs on the endogenous ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 mRNA levels (Figure 3B), whereas the empty vector, control sponge, did not (Figure 3C).

The relative specificity of the miR-126-3p sponge was validated by monitoring 5 additional mRNAs that are devoid of predicted binding sites for miR-126-3p. As shown in Figure S3, the level of MTOR, MMP9, HIPK3, RNF38 and CCD71 mRNAs, in macrophages coincubated with platelet MPs, was not affected by the miR-126-3p sponge, thereby validating our microRNA sponge, neutralization strategy. These results support a role for platelet MP-derived miR-126-3p in regulating ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 expression at the mRNA level.

To verify if these mRNA regulatory effects are reflected at the protein level, we monitored the level of ATF3 and ATP1B1 proteins by Western blot analysis of macrophages coincubated, or not, with platelet MPs for up to 72 h. As shown in Figure 4A and 4B, we observed a marked decrease of ATF3 and ATP1B1 protein levels in macrophages as early as 24 h after coincubation, and this effect persisted for up to 72 h. These data suggest that the gene regulatory effects induced by platelet MP-derived microRNAs in primary human macrophages may be relatively rapid and long-lasting.

3.5.4 Platelet MPs modify the transcriptome of primary human macrophages

Since platelet MPs contain a plethora of bioactive molecules that can potentially be transmitted to targeted cells (Aatonen et al., 2012; Mause and Weber, 2010), we examined whether they could influence their microRNA and mRNA transcriptomes by performing comparative microarray profiling analyses. A total of 66 microRNAs were significantly and differentially expressed in macrophages upon exposure to platelet MPs, 34 of which were up-regulated (Figure 5A), consistent with an enrichment in macrophage microRNAs via MPs. Thirty-two macrophage microRNAs were down-regulated by platelet MPs (Figure 5A), possibly through indirect effects (e.g., microRNA gene transcription and/or altered

stabilization/destabilization/degradation) mediated by platelet MP cargo components, such as cytokines. Together, the modulated microRNAs accounted for ~12% of the 544 microRNAs expressed above background level in macrophages. The microRNAs that vary the most are listed in Tables S2 (up-regulated) and S3 (down-regulated).

Similarly, as many as 653 different RNAs were found to be significantly and differentially modulated in macrophages by platelet MPs; 367 RNAs were down-regulated (Figure 5B), consistent with the mRNA-regulatory effects of microRNAs, whereas 286 RNAs were up-regulated (Figure 5B), possibly through indirect effects. The RNAs that vary the most are listed in Tables S4 (down-regulated) and S5 (up-regulated). To evaluate the possible effects of platelet MP-derived microRNAs on the macrophage transcriptome, we have performed correlative analyses between significantly altered microRNAs and mRNAs. Eighty-one predicted relationships were unveiled between 8 up-regulated microRNAs and 71 down-regulated mRNAs, suggesting that platelet MP-derived microRNAs, such as miR-126-3p, can induce significant changes in the macrophage mRNA transcriptome (Table S6). We observed an inverse and significant correlation between the level of miR-126-3p and that of its mRNA targets ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 that we characterized, in agreement with macrophage mRNA regulation by platelet miR-126-3p.

3.5.5 Platelet MPs inhibit cytokine/chemokine release by primary human macrophages

Further analysis of our microarray and Ingenuity Pathways Analysis data revealed changes in the mRNA level of certain cytokine/chemokines induced by platelet MPs (Table 1), some of them well-attested to participate in chemotaxis (Verschoor et al., 2012). qPCR analyses confirmed the significant downregulation of endogenous mRNAs encoding for important cytokines or chemokines, such as CCL4, CSF1 or TNF, whose levels in macrophages were decreased by 51%, 41% and 47%, respectively, after a 48-h coincubation with platelet MPs (Figure 6A). These effects were not abrogated by a miR-126-3p sponge RNA (Figure S4), suggesting that the platelet MP-induced downregulation in the level of CCL4, CSF1 and TNF mRNAs, which do not harbor predicted binding sites for miR-126-3p in their 3'UTR, may not be mediated by miR-126-3p and possibly involve other microRNAs.

These mRNA downregulatory effects of platelet MPs correlated with a markedly reduced level of CCL4, CSF1 and TNF protein secretion in the incubation medium by macrophages that reached 67%, 89% and 71%, respectively (Figure 6B). These findings indicate that platelet MPs may diminish pro-inflammatory cytokine/chemokine secretion by primary human macrophages. These inhibitory effects were not due to macrophage apoptosis, as no difference in surface Annexin V labeling was observed in macrophages incubated or not with platelet MPs for up to 72 h (Figure S4).

3.5.6 Platelet MPs enhance the phagocytic capacity of primary human macrophages

Macrophages' primary function is phagocytosis, which can take place at the vascular endothelium when macrophages are present in an atherosclerotic plaque and in the mononuclear phagocyte system of the spleen and lymph nodes in charge of the continuous elimination of diverse blood components. In that context, it is relevant to note that our Ingenuity Pathways Analysis data revealed that some of the macrophage mRNAs altered by platelet MPs are involved in phagosome formation (Table S7 and Figure S5) and in caveolae-mediated endocytosis signaling (Table S7 and Figure S6). The mRNA level of three of these macrophage genes (MRC1, FCGR3A/B and FCGR2A), which are positive regulators of phagocytosis, were confirmed to be up-regulated by platelet MPs by qPCR (Figure S8).

These results prompted us to assess if platelet MPs influenced the phagocytic capacity of primary human macrophages by using FITC-labeled latex micro-beads, which are commonly used in phagocytosis assays involving professional phagocytes, such as macrophages (Lasbury et al., 2003; Seyrantepe et al., 2010). Confocal microscopy analysis unveiled a marked increase in the phagocytic capacity of macrophages upon a 48-h exposure to platelet MPs (Figure 7A, center panel), compared to macrophages that were never exposed to MPs (Figure 7A, upper panel). As a control, beads phagocytosis was abrogated by pre-treatment of the macrophages with the phagocytosis inhibitor cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, either in the absence (Figure S9) or presence of platelet MPs (Figure 7A, lower panel). The increased phagocytic capacity of macrophages induced by platelet MPs was confirmed quantitatively (Figure 7B). Together,

these results suggest that platelet MPs may modify macrophage gene expression and reprogram its function towards a phagocytic phenotype.

3.6 Discussion

Cell–cell communications have proven to be more complex than previously thought, since the discovery that extracellular vesicles may shuttle biochemical and genetic information between different cell types and in several pathophysiological settings (Hulsmans and Holvoet, 2013). After describing the role of platelet MPs in the transfer of functional microRNAs to actively dividing HUVEC, we now demonstrate that platelet MPs can modify the microRNA and mRNA transcriptomes of primary human macrophages and reprogram innate macrophage functions toward a phagocytic phenotype.

Both platelets and macrophages are cells from the myeloid lineage (Rees, 2010) and exhibit closely related microRNA transcriptomes. Therefore, changes in the transcriptome of macrophages, upon uptake of genetic materials derived from platelets, were not expected to be pronounced; miR-126-3p being the most notable exception. The ~4.5-fold increase in macrophage miR-126-3p levels, observed upon coincubation with platelet MPs, could be explained by (i) the internalization of platelet MPs, and (ii) de novo transcription of the macrophage miR-126-3p gene. This latter possibility, which could potentially be induced by platelet MP recognition or derived signaling molecules or transcription factors (Ray et al., 2008), was excluded by the results of our actinomycin D experiments, thereby supporting a miR-126-3p transfer from platelet MP to macrophage.

The biological effects exerted by platelet MPs may (i) be determined by their content in bioactive molecules, such as lipid mediators, proteins, cytokines and multiple classes of RNAs, including microRNAs, which may vary according to the stimulus used, and (ii) depend on the nature and biology of the recipient cells, more specifically on the transcriptome and proteins at work in these cells. This context prompted us to use a microRNA sponge strategy, which validated the specific role and contribution of miR-126-3p in regulating expression of four endogenous macrophage mRNAs. When interpreting the relatively mild effects observed with the miR-126-3p sponge, the caveat has to be taken into account that this approach is based on the sequestration of a specific microRNA and

does not preclude other microRNAs or factors from acting in concert to regulate the mRNA targets of miR-126-3p. We cannot exclude the possibility that the lipids, proteins and cytokines brought by platelet MPs may also modulate the level and function of recipient macrophage microRNAs and mRNAs. Component-specific strategies, similar to those that we have used to study platelet MP-derived miR-126-3p, will definitely have to be used to decipher the relative role and contribution of the other platelet MP components in modifying the recipient cell transcriptome and function.

The gene regulatory effects induced by platelet MPs, some of which may be attributed to microRNAs, may be determined by the relative enrichment in specific microRNAs, such as miR-126-3p, and the relative abundance of their mRNA targets (ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 mRNAs for miR-126-3p) in recipient macrophages. For example, an abundant mRNA transcript is less likely to be regulated by a weakly enriched microRNA. Conversely, an abundant platelet MP-derived microRNA may not exert gene regulatory effects if its mRNA targets are not expressed in the recipient cell, or mediate strong regulatory effects if its mRNA targets are present at very low levels. Based on these principles, we might expect platelet MPs and derived microRNAs to mediate cell-type specific responses that may vary in health and disease, which remains to be determined.

Searching for mRNAs targeted by upregulated microRNAs using the *in silico* prediction algorithms in Partek Genomics Suite 6.6 software (i.e. TargetScan 5.2), we identified numerous inverse correlations suggestive of a possible effect of platelet-delivered microRNAs on the macrophage mRNA transcriptome. Further experimental validation is required to substantiate the putative miRNA–target mRNA interactions that we identified through bioinformatic predictions which, notably, do not take into account the mRNA targets that are not destabilized by microRNAs.

Macrophages may be reprogrammed by platelet MPs in health and disease. Platelets MPs are the most abundant microvesicle subtype in the circulation (Arraud et al., 2014) and are thought to participate to hemostatic functions (Owens and Mackman, 2011). As platelet MPs are constantly internalized by macrophages in the mononuclear phagocyte system, platelet MPs may thus impact macrophage functions in the spleen and lymph nodes (Dasgupta et al., 2009). Platelet MPs and macrophages may also interact under

inflammatory conditions, such as atherosclerosis, in which they play an important role (Ross, 1999). Our results are of particular interest in that context, owing to the fact that one of the most significant and relevant pathway of macrophages altered by platelet MPs is atherosclerosis signaling, with down-regulation of 7 mRNAs (CSF1, CXCR4, LPL, PLB1, TNF, TNFSF14, TNFRSF12A) and up-regulation of 4 RNAs (ALOX15B, PLA2G4C, ALOX5, IL36B) (Table S7). The markedly reduced secretion of three primary pro-inflammatory cytokines/chemokines, i.e. CCL4, CSF1 and TNF, upon exposure of macrophages to platelet MPs might be beneficial and limit atherosclerosis progression, as the three of them are associated with exacerbation of the disease (Branen et al., 2004; Irvine et al., 2009; Ohta et al., 2005; Reape and Groot, 1999). Moreover, functional delivery of miR-126-3p to macrophages may also be beneficial, since miR-126-3p was shown to induce atheroprotective effects in an atherosclerosis mouse model (Zernecke et al., 2009). Indeed, miR-126-3p has been shown to induce CXCL12 production by endothelial cells through CXCR4 and ERK1/2 phosphorylation, allowing progenitor cell recruitment and limiting plaque progression and atherosclerosis development. Hematopoietic overexpression of miR-126 has been reported to increase neovascularization and promote vascular integrity by mobilizing vasculogenic hematopoietic progenitor cells (Bijkerk et al., 2014). Using microRNA mimics and antagonists, Schober et al. (Schober et al., 2014) demonstrated that miR-126 passenger (or -5p) strand, but not its guide (or -3p) strand, contributes to the proliferative reserve in endothelial cells and promotes endothelial repair, which likely explains the beneficial effects of miR-126-5p administration on limiting atherosclerosis. Whether the beneficial effects of miR-126 involve modulation of macrophage function warrant further investigations using specific mouse models and/or activated macrophages.

The primary role of macrophages in the maintenance of homeostasis involves four basic innate functions: sensing, chemotaxis, phagocytosis, and adaptative stimulation (Gordon and Taylor, 2005). Our micro-array results demonstrated that several cytokines/chemokines mRNAs, i.e. CCL4, CSF1 and TNF, were downregulated in macrophages exposed to MPs, which correlated well with a concomitant decrease in cytokine/chemokine secretion – we cannot exclude the possibility that other cytokines may be regulated differently by platelet MPs. Our results are supported by Sadallah and colleagues, who also observed a decrease

of TNF secretion by macrophages exposed to MPs (Sadallah et al., 2011). MPs may thus impact the environment of their clearance site by influencing the recruitment, and modulating the function, of appropriate effector cells, under both healthy and pathophysiological conditions. It remains to be seen whether the macrophages exposed to platelet MPs under inflammatory conditions react differently.

The phagocytic function of macrophages, which mediates the elimination of apoptotic cells/bodies, cell debris and particles, also plays an important role in the return to homeostasis after a disruptive event (Stuart and Ezekowitz, 2005). The gain in phagocytic function induced by platelet MPs might be beneficial for the maintenance of blood quality, and influence blood vessel function and disease development. Although TNF has been reported to activate macrophages (Rees, 2010), it was also shown to inhibit apoptotic cell phagocytosis by macrophages (Feng et al., 2011; Michlewski et al., 2009), thereby supporting the increased phagocytic capacity of macrophages exposed to platelet MPs. Interestingly, Vasina and colleagues (Vasina et al., 2011) observed that MPs induce monocyte differentiation into M2 resident macrophages with an increase in phagocytosis capacity. In agreement with their results, we also observed by micro-array an up-regulation of the IL-10 mRNA, a M2 macrophage marker (Rayner et al., 2011).

The pronounced increase in the phagocytic capacity of the macrophages induced by platelet MPs might not be directly related to the delivery of platelet miR-126-3p, as none of the affected genes involved in phagocytosis is a direct target of miR-126-3p. However, some of the mRNA targets of miR-126-3p may be involved indirectly in the observed phenotype. For instance, ATF3 is an important transcription factor that may influence expression of several genes, some of which may be involved in phagocytosis. In addition, RAI14 is an actin-binding protein that may participate to phagocytosis, a process in which the actin cytoskeleton plays a predominant role. The possible contribution of the other platelet MP-derived microRNAs and regulated genes to the observed phenotype is very likely.

The biological importance and significance of our findings *in vivo*, as well as whether the effects on cytokine/chemokine release and phagocytosis induced by platelet MPs and microRNAs are direct, through cargo delivery, or indirect, through a signaling cascade, deserve further investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Dr. Lise-Andrée Gobeil for advices in preparing primary macrophages and Dr. Maria Fernandes for access and use of confocal microscopy. B.L. was supported by a PhD studentship from the Canadian Blood Services. E.B is recipient of a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) New Investigator Award. This work was supported by Grant No. 327364 from the Canadian Blood Services/CIHR Blood Utilization and Conservation Initiative via Health Canada (to E.B and P.P.). The views expressed herein do not necessarily represent the view of the federal government.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

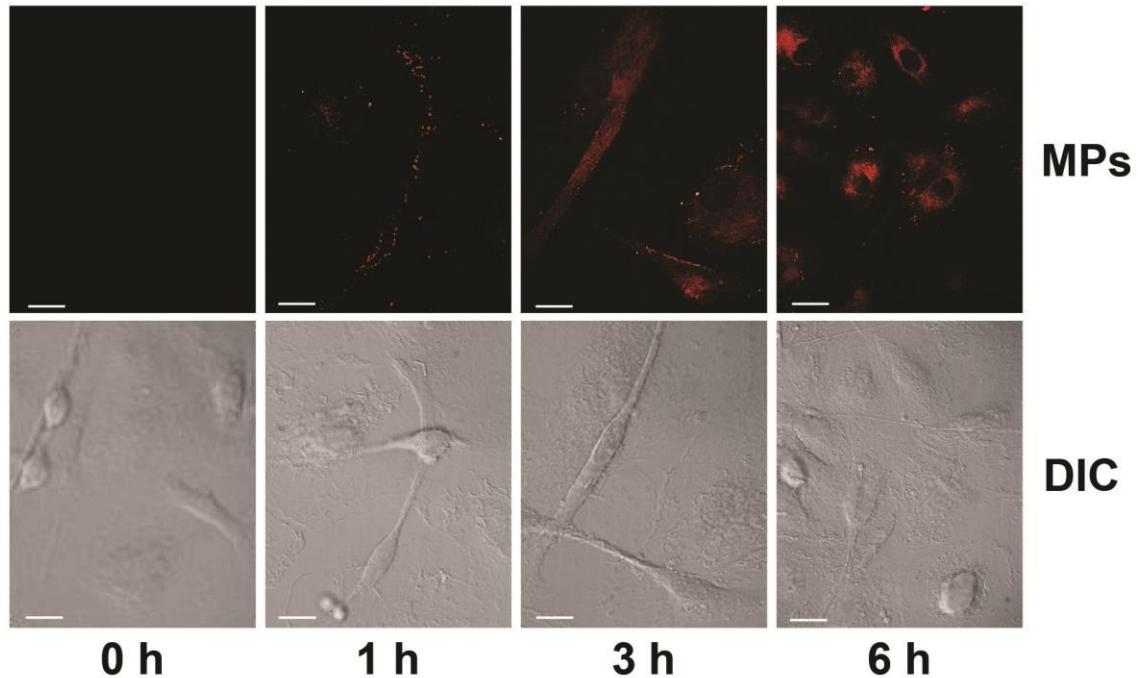
P. Provost conceived and coordinated the project; E. Boilard provided new analytical tool, expertise, guidance and advices; B. Laffont and A. Corduan co-led the project, designed and planned the experiments; B. Laffont, A. Corduan, M. Rousseau, A. C. Duchez and C. H. C. Lee performed the experiments and analyzed the data; B. Laffont and A. Corduan wrote the first draft of the manuscript; all the authors commented/edited the manuscript; P. Provost finalized the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts or competing financial interests.

3.7 Figures and legends

A



B

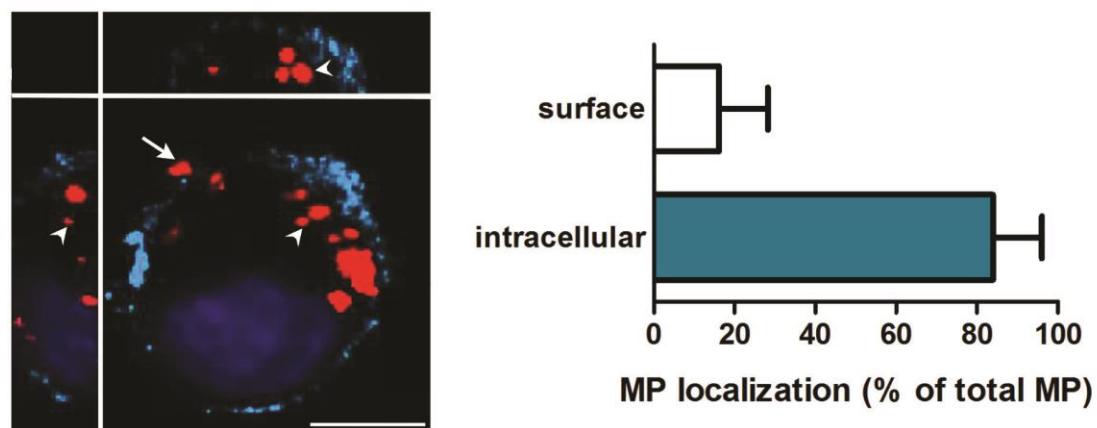


Figure 1: Platelet MPs are internalized by primary human macrophages.

(A) Primary macrophages were incubated, for the indicated periods of time, with a pool of fluorescently labeled platelet MPs, at a macrophage:MP ratio of 1:100, and MP uptake was visualized by confocal microscopy ($\times 63$ objective) (upper panels). Cell morphology was visualized using differential interference contrast (DIC) (lower panels) ($n = 3$ individual donors). (B) (Left panel) Representative confocal microscopy analysis of primary macrophages (blue) coincubated with fluorescently labeled platelet MPs (red) for 2 h. Macrophage nuclei are in cyan. MP uptake was visualized by confocal microscopy ($\times 63$ objective). The left and upper quadrants represent side views. MPs were found in the cytoplasm (arrow heads) or at the surface (white arrows) of macrophages. (Right panel) Bar graph showing the percentage of total MPs detected either on the surface or inside macrophages. Internalized and adhered MPs were counted on 90 macrophages per experiment ($n = 3$ individual donors). Scale bar: 10 μm . Data were expressed as mean \pm SEM.

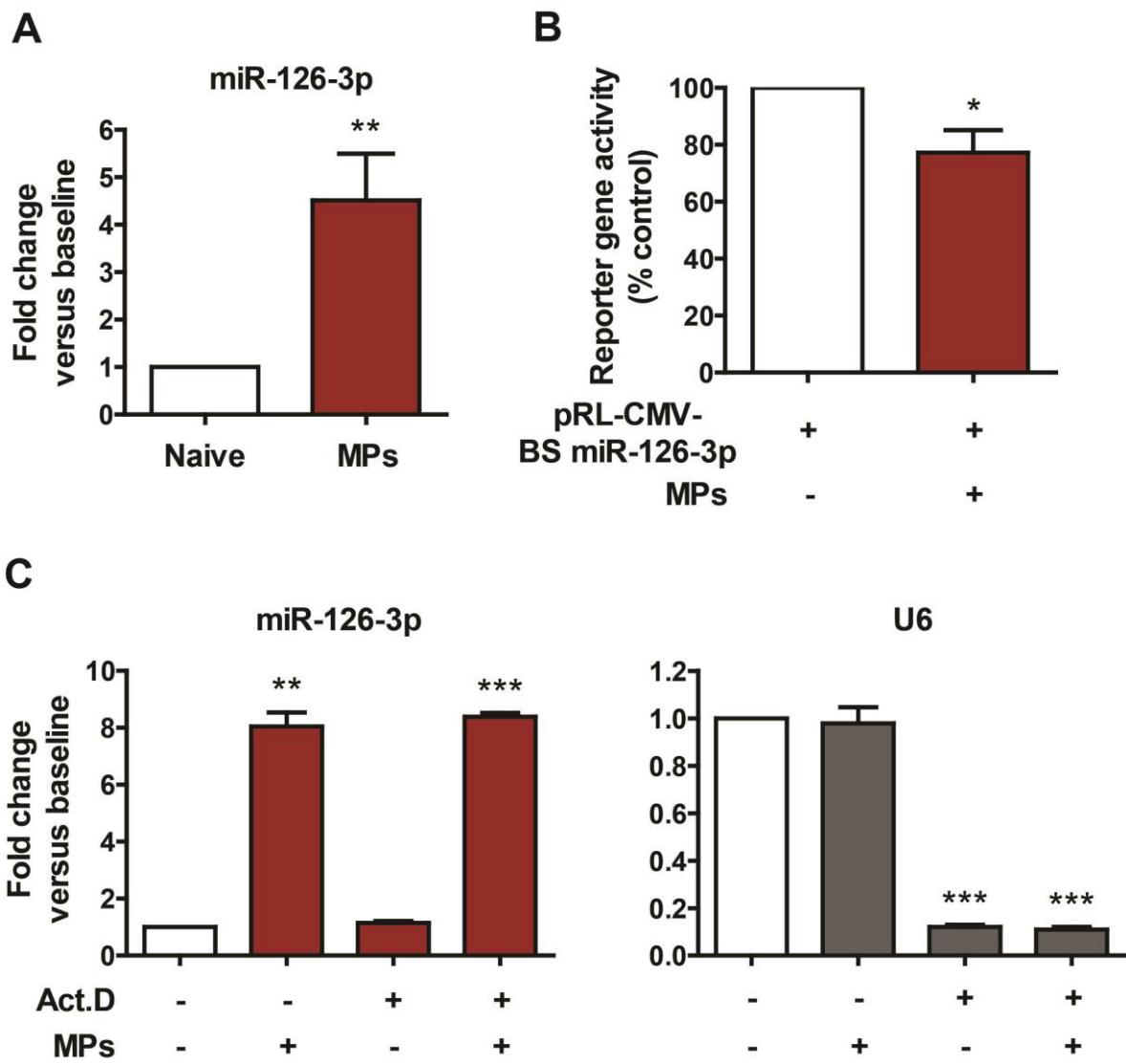


Figure 2: Platelet MPs deliver functional miR-126-3p to primary human macrophages.

(A) Macrophages were incubated (MPs) or not (Naive) with a pool of platelet MPs for 48 h (macrophage:MP ratio of 1:100), and accumulation of platelet miR-126-3p in macrophages was quantitated by qPCR ($n = 8$ individual donors). Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using RNA U6 (RNU6) as a reference (Schaefer et al., 2010). (B) Macrophages transiently expressing a Rluc reporter gene, harboring a binding site complementary to miR-126-3p (pRL-CMV-BS miR-126-3p), were incubated or not with a pool of platelet MPs for 48 h (macrophage:MP ratio of 1:100) prior to Rluc/Fluc activity measurements. Results were normalized on Fluc activity, and expressed as mean \pm SEM percentage of control ($n = 5$ individual donors). (C) Macrophages were pre-treated (+) or not (-) for 1 h with actinomycin D (Act. D, 3 μ g/ml final) prior to exposure (MPs) or not (Naive) to a pool of platelet MPs for 6 h (macrophage:MP ratio of 1:100), and miR-126-3p accumulation in macrophages was assessed by qPCR ($n = 3$ individual donors; left panel). Small RNA RNU6 was quantitated by qPCR as a control (right panel). Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using miR-125b as a reference. Macrophage miR-125b levels were found not to be affected by exposure to platelet MPs and/or treatment with actinomycin D (Figure S2), and was thus used as a normalization control. qPCR data were expressed as mean \pm SEM fold changes versus baseline. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control or baseline (Student's t test).

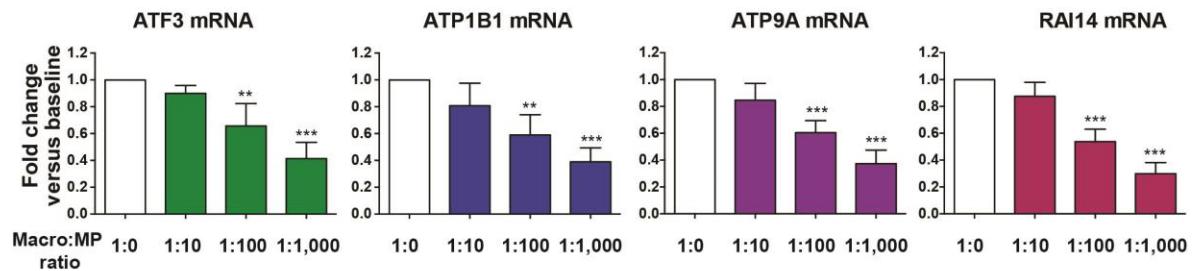
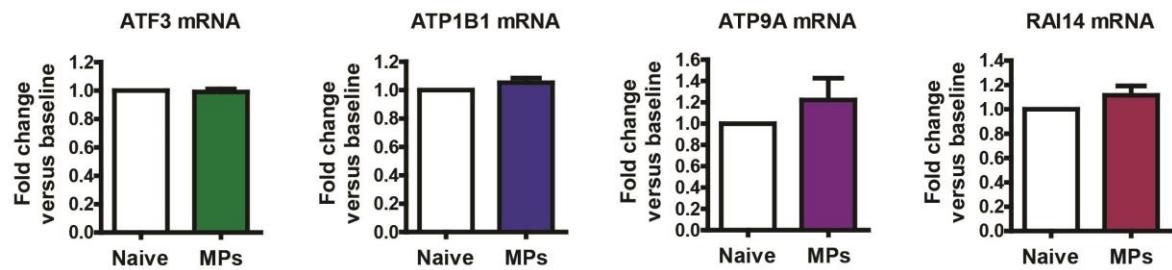
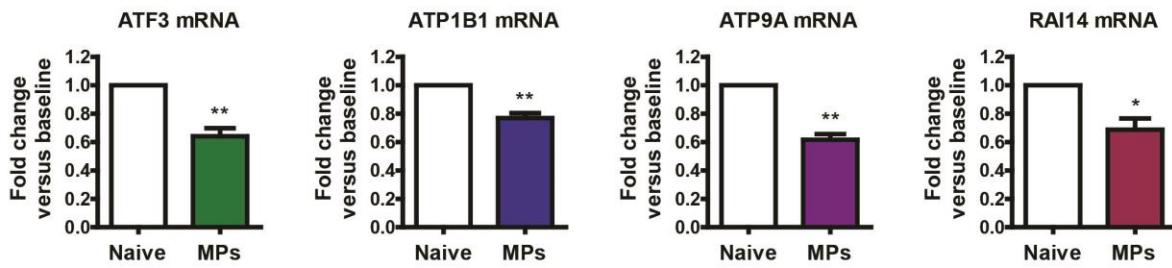
A**miR-126-3p****B****miR-126-3p sponge****C****Control sponge**

Figure 3: Platelet MP-derived miR-126-3p can regulate macrophage gene expression at the mRNA level.

(A-C) Primary macrophages were exposed (MPs) or not (Naive) to a pool of platelet MPs for 48 h. (A) The level of ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 mRNAs in macrophages coincubated with platelet MPs at different macrophage:MP ratios (1:10; 1:100 and 1:1,000) were quantitated by qPCR ($n = 4$ individual donors). (B) Macrophages transiently expressing a miR-126-3p sponge (pRL-CMV-BS miR-126-3p vector) were incubated (MPs) or not (Naive) with a pool of platelet MPs (macrophage:MP ratio of 1:100), and ATF3, ATP1B1, ATP9A and RAI14 mRNA levels were quantitated by qPCR ($n = 4$ individual donors). (C) As a control, macrophages were transfected with pRL-CMV vector without miR-126-3p BS, and ATF1B1, ATP9A and RAI14 mRNA levels were quantitated by qPCR ($n = 4$ individual donors). qPCR data were normalized by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using GAPDH mRNA as a reference, and expressed as mean \pm SEM fold changes versus baseline. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control or baseline by one-way ANOVA (panel A) or Student's t test.

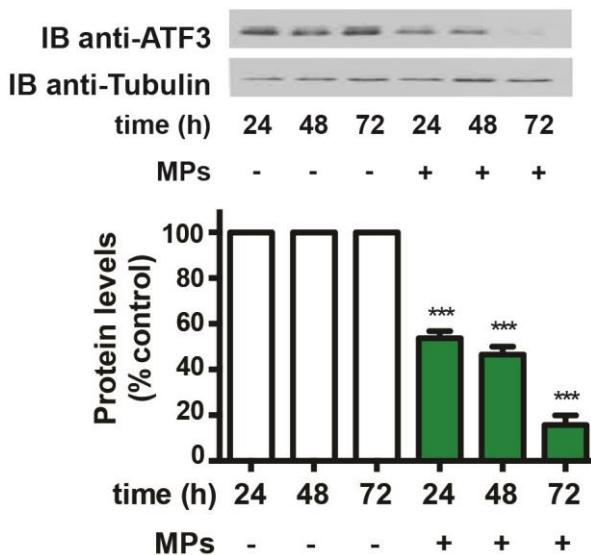
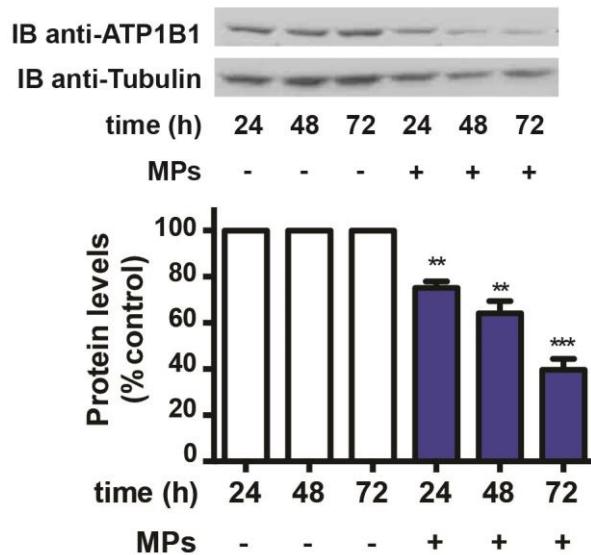
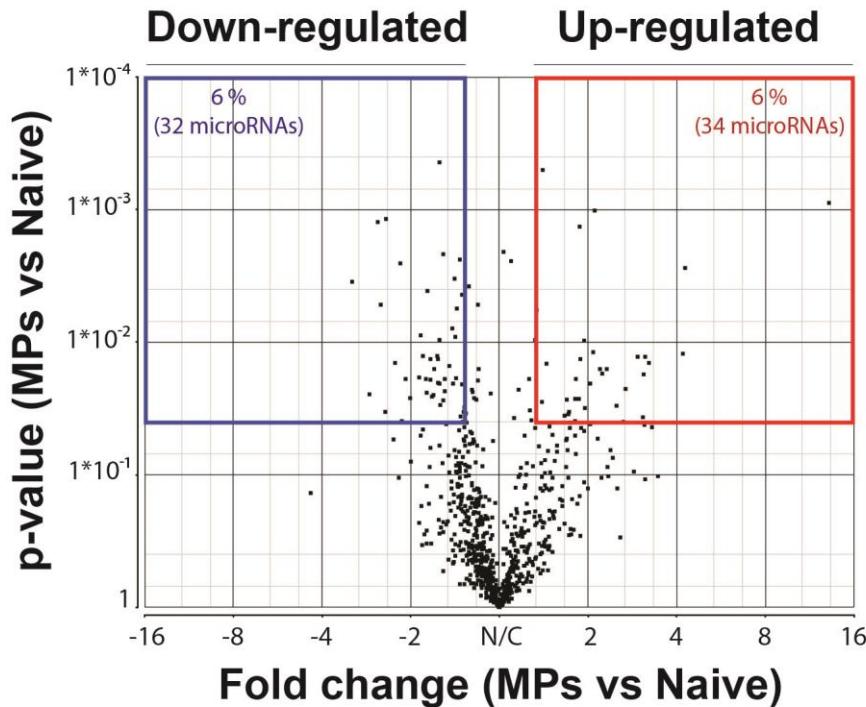
A**B**

Figure 4: Platelet MPs can regulate macrophage gene expression at the protein level.
(A-B) Protein extracts prepared from primary macrophages, incubated (+) or not (-) with a pool of platelet MPs for up to 72 h (macrophage:MP ratio of 1:100), were analyzed by immunoblotting (IB) using anti-ATF3 (A) or anti-ATP1B1 (B). Anti-tubulin antibody was used as a control. The intensity of the bands was analyzed by densitometry, normalized on tubulin and expressed as a percentage of control (n = 4 individual donors). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 versus baseline (Student's t test).

A MicroRNAs



B RNAs

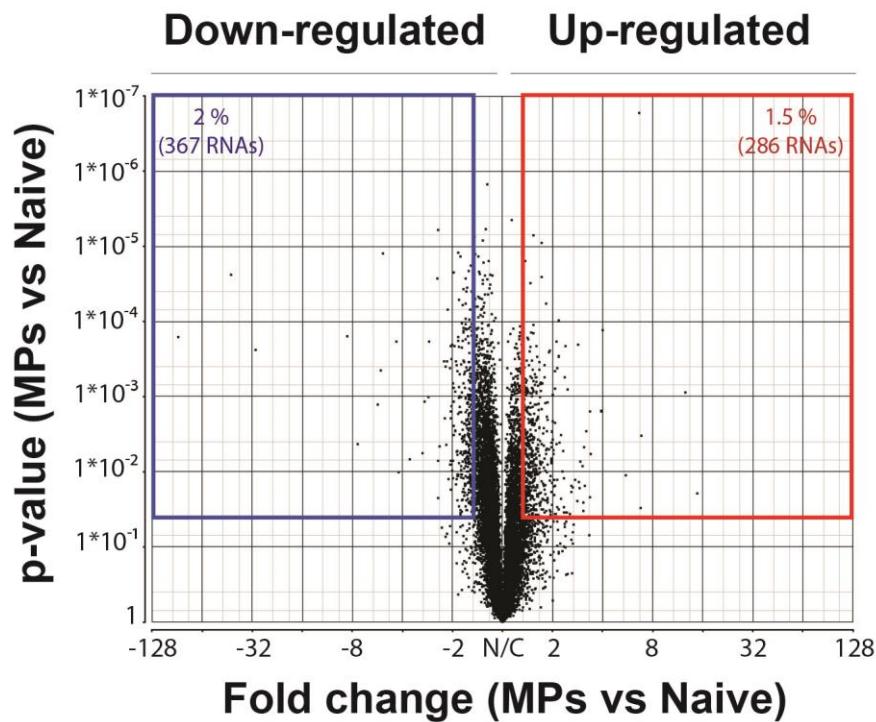


Figure 5: Platelet MPs modify the microRNA and mRNA transcriptomes of recipient primary human macrophages.

(A-B) Primary macrophages derived from 12 healthy donors were co-cultured (MP) or not (Naive) with a pool of platelet-derived MPs for 48 h (macrophage:MP ratio of 1:100). Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen), and the RNA from 4 donors were pooled together to constitute 3 pools. The microRNA and mRNA profile of each pool was determined by microarray analysis on GeneChip® miRNA 3.0 Array (Affymetrix) (A) or GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix) (B), respectively. Volcano plots display microRNAs (A) and RNAs (B) with changes (x-axis) as well as statistical significance (y-axis) between MPs and Naive conditions. Only referenced microRNAs (544 in total; A) and RNAs (18,707 in total; B) with levels above the background are represented. The term “RNA” designates coding transcripts, such as mRNAs, as well as non-coding transcripts other than microRNAs. Colored rectangles indicate RNA species with high statistical significance ($p < 0.05$) and changes (fold-change < -1.5 in blue and > 1.5 in red) between the MPs and Naive conditions.

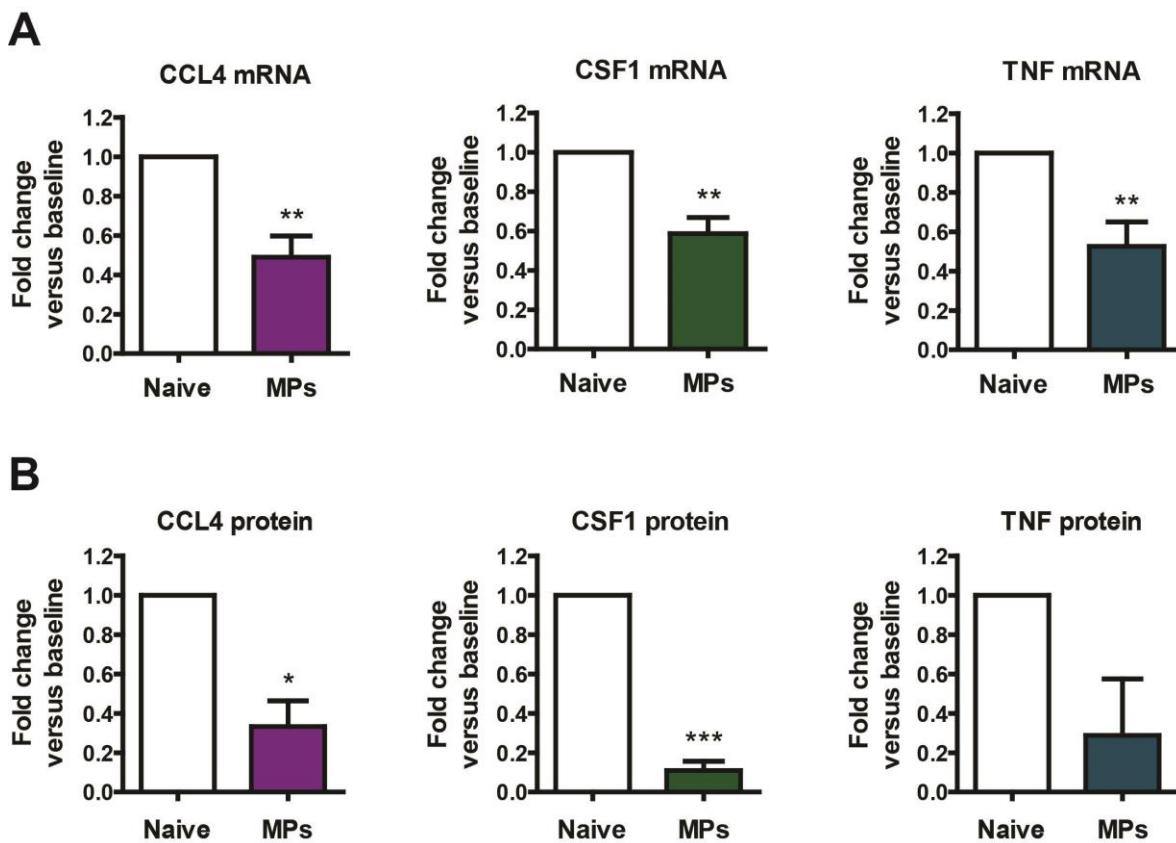


Figure 6: Platelet MPs inhibit cytokine/chemokine release by primary human macrophages.

(A-B) Primary macrophages were exposed (MPs) or not (Naive) to a pool of platelet MPs for 48 h (macrophage:MP ratio of 1:100) prior to extensive washing and total RNA extraction. (A) The mRNA level of the cytokines CCL4, CSF1 and TNF in primary macrophages was quantitated by qPCR ($n = 8$ individual donors). Results were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using GAPDH mRNA as a reference (Schaefer et al., 2010). (B) The level of CCL4, CSF1 and TNF proteins, secreted in the medium by the primary macrophages, was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay ($n = 4$ individual donors). Data are expressed as mean \pm SEM fold changes versus baseline. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control or baseline (Student's t test).

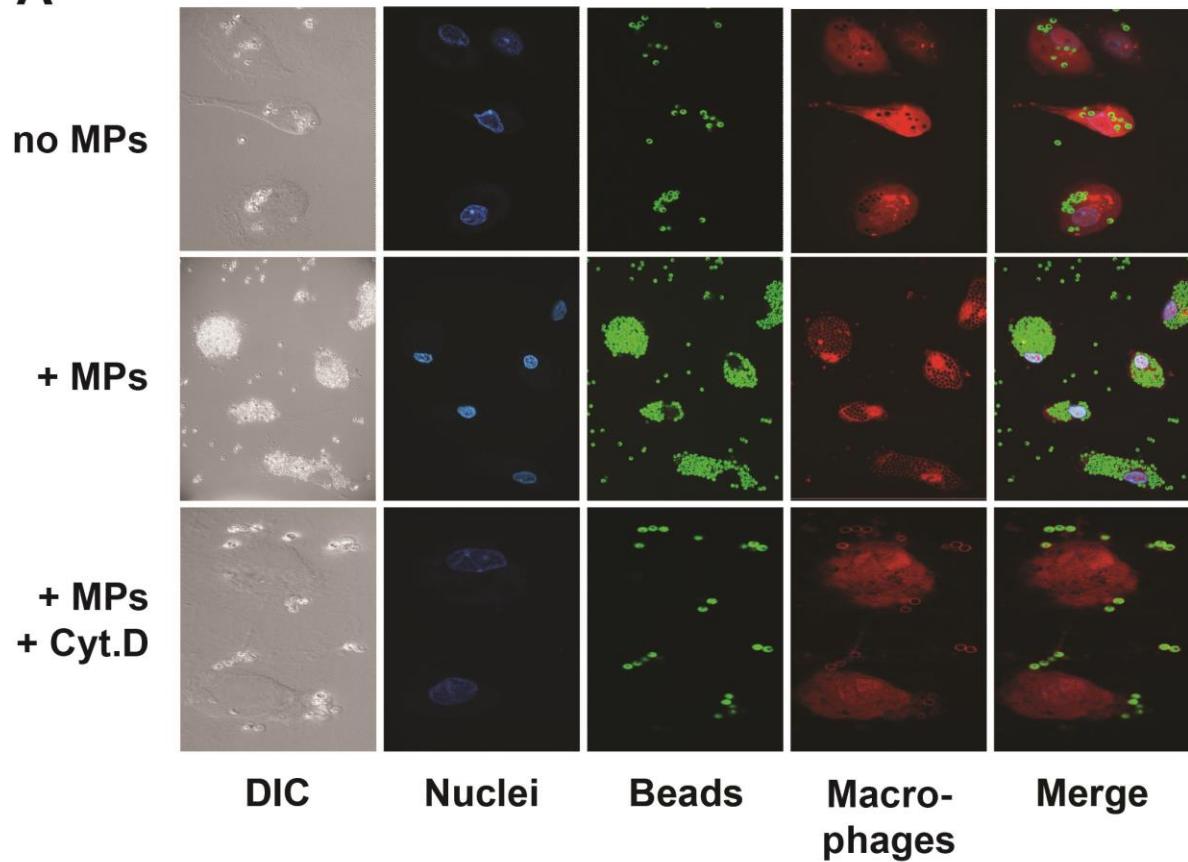
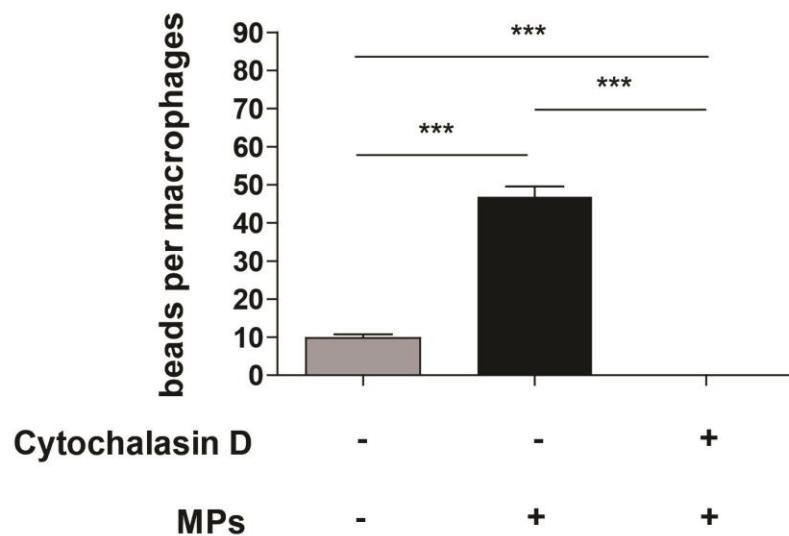
A**B**

Figure 7: Platelet MPs enhance the phagocytic capacity of primary human macrophages.

(A-B) After 48 h of co-culture with a pool of platelet MPs at a macrophage:MP ratio of 1:100 (A, middle and lower panels), or not (A, upper panel), labeled primary macrophages were exposed to fluorescently labeled latex microbeads (2 μ m in diameter) for 2 h ($n = 3$ individual donors). As a control, macrophages were pre-treated with cytochalasin D (Cyt.D, 5 μ M; Sigma) for 1 h prior to addition of the beads (lower panel). (A) Bead phagocytosis was assessed by confocal microscopy ($\times 63$ objective). Nuclei were stained with DAPI. DIC, differential interference contrast. Scale bar: 10 μ m. (B) The enhanced phagocytic capacity of macrophages induced by platelet MPs was quantitated by counting the number of beads inside 30 different macrophages per donor, per condition. Data are expressed as fold changes versus baseline. Mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ versus control or baseline by one-way ANOVA.

TABLES

Table 1. Platelet MPs modify cytokine/chemokine mRNA expression by primary human macrophages.

Primary human macrophages were exposed (MPs) or not (Naive) to a pool of platelet MPs for 48 h, and the expression changes in cytokine mRNA levels were determined by microarray analysis (n = 3 pools).

Gene Symbol	Description	Fold Change (MPs vs Naive)	p-value (MPs vs Naive)
TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-5.41	4.48E-04
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	-2.45	2.67E-05
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	-2.44	5.99E-06
TNF	tumor necrosis factor	-2.06	1.57E-03
TNFSF8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	-2.05	1.74E-02
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	-1.98	1.24E-02
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	-1.54	6.15E-04
TNFSF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	-1.54	2.76E-03
C5	complement component 5	-1.53	1.60E-03
IL10	interleukin 10	1.65	1.05E-02
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	1.84	2.89E-03
IL36B	interleukin 36, beta	1.86	2.23E-02

The fold-changes and p-values were determined with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.05.

3.8 Supplementary figures and tables

Supplementary Table S1: Sequences of the oligonucleotides used for qPCR quantification of selected macrophage mRNAs and microRNAs.

Gene name	DNA oligonucleotide sequences (5' → 3')
GAPDH forward	5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3'
GAPDH reverse	5'-CTCGCTCCTGG AAGATGG-3'
ATF3 forward	5'-GTTTGGAGGATTTGCTAACCTGAC-3'
ATF3 reverse	5'-CTTATTCTTCTCGTCGCCTCT-3'
ATP1B1 forward	5'-TGGAACTCAGAGAAGAAGGAGTTT-3'
ATP1B1 reverse	5'-TCTGGATCTGAGGAATCTGTGTTA-3'
ATP9A forward	5'-CTGTCTTCCTCCGTGTTACT-3'
ATP9A reverse	5'-GCCCTTGAGAAGATCCTGTAGA-3'
RAI14 forward	5'-TACCCAGTTGAGTGATGTCTCTTC-3'
RAI14 reverse	5'-AGAGAAGATCTGTTGGTCAGCTT-3'
CSF1 forward	5'-CACTAATTGGGTCCCAGAAGAA-3'
CSF1 reverse	5'-AGTGGAGAAGATGCTGAGAGGA-3'
CCL4 forward	5'-CTCATGCTAGTAGCTGCCCTTG-3'
CCL4 reverse	5'-CACAGACTTGCTTGCTTCTTG-3'
TNF forward	5'-ACCTCTCTAATGCCCTTG-3'
TNF reverse	5'-AGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA-3'
ID	Qiagen catalog number
miR-126-3p	MS00003430
miR-125b	MS00006629
U6	MS00033740

GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ATF3, Activating transcription factor 3; ATP1B1, Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1; ATP9A, ATPase class II type 9A; RAI14, retinoic acid induced 14; CSF1, colony-stimulating factor 1; CCL4, chemokine (C-C motif) ligand 4; TNF, tumor necrosis factor.

Supplementary Table S2: List of the microRNAs up-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.

MicroRNAs	Fold-Change (MPs vs Naive)	p-value (MPs vs Naive)	q-value (MPs vs Naive)
hsa-miR-126-3p	13.15	8.94E-04	1.61E-02
hsa-miR-1231	4.27	2.74E-03	2.19E-02
hsa-miR-3197	4.19	1.22E-02	3.61E-02
hsa-miR-1909	3.30	4.37E-02	4.59E-02
hsa-miR-3195	3.22	1.44E-02	3.61E-02
hsa-miR-4758-5p	3.12	1.28E-02	3.61E-02
hsa-miR-4485	3.11	4.22E-02	4.54E-02
hsa-miR-4492	3.09	1.75E-02	3.61E-02
hsa-miR-4505	3.07	3.70E-02	4.44E-02
hsa-miR-4634	2.95	1.28E-02	3.61E-02
hsa-miR-4507	2.68	2.25E-02	3.79E-02
hsa-miR-128	2.64	4.00E-02	4.54E-02
hsa-miR-4508	2.50	3.01E-02	4.02E-02
hsa-miR-199b-3p	2.31	1.59E-02	3.61E-02
hsa-miR-125b	2.24	1.73E-02	3.61E-02
hsa-miR-25-star	2.20	1.60E-02	3.61E-02
hsa-miR-26b	2.10	1.02E-03	1.61E-02
hsa-miR-4734	2.08	1.20E-02	3.61E-02
hsa-miR-3648	2.03	2.04E-02	3.61E-02
hsa-miR-4674	2.03	4.14E-02	4.54E-02
hsa-miR-3178	1.94	4.69E-02	4.69E-02
hsa-miR-4286	1.89	4.46E-02	4.59E-02
hsa-miR-1228-star	1.88	1.35E-02	3.61E-02
hsa-miR-3135b	1.88	1.34E-03	1.61E-02
hsa-miR-4695-5p	1.87	2.68E-02	3.79E-02
hsa-miR-4488	1.82	1.88E-02	3.61E-02
hsa-miR-139-5p	1.81	2.66E-02	3.79E-02
hsa-miR-223	1.81	3.95E-02	4.54E-02
hsa-miR-130a	1.75	4.03E-02	4.54E-02
hsa-miR-3940-5p	1.73	4.46E-02	4.59E-02
hsa-miR-4707-5p	1.72	3.33E-02	4.25E-02
hsa-miR-663	1.72	3.49E-02	4.33E-02
hsa-miR-202	1.69	2.70E-02	3.79E-02
hsa-miR-4539	1.66	3.58E-02	4.37E-02

The fold-changes, p-values and q-values (False Discovery Rate) were determined with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.05 .

Supplementary Table S3: List of the microRNAs downregulated in macrophages exposed to platelet MPs.

MicroRNAs	Fold-Change (MPs vs Naive)	p-value (MPs vs Naive)	q-value (MPs vs Naive)
hsa-miR-138-1-star	-3.16	3.52E-03	2.53E-02
hsa-miR-671-5p	-2.76	2.47E-02	3.79E-02
hsa-miR-17-star	-2.59	1.23E-03	1.61E-02
hsa-miR-1275	-2.54	5.22E-03	3.13E-02
hsa-miR-365-star	-2.44	3.37E-02	4.25E-02
hsa-miR-629-star	-2.42	1.17E-03	1.61E-02
hsa-miR-1301	-2.26	1.43E-02	3.61E-02
hsa-miR-339-5p	-2.17	2.55E-03	2.19E-02
hsa-miR-766	-2.15	3.95E-02	4.54E-02
hsa-miR-1271	-2.08	1.90E-02	3.61E-02
hsa-miR-769-3p	-2.01	2.64E-02	3.79E-02
hsa-miR-2110	-1.87	1.83E-02	3.61E-02
hsa-miR-23a-star	-1.85	8.86E-03	3.61E-02
hsa-miR-27a-star	-1.82	1.27E-02	3.61E-02
hsa-miR-491-5p	-1.81	4.58E-02	4.64E-02
hsa-miR-4717-3p	-1.77	1.90E-02	3.61E-02
hsa-miR-3157-3p	-1.76	2.39E-02	3.79E-02
hsa-miR-345	-1.75	4.08E-03	2.67E-02
hsa-miR-574-5p	-1.71	1.93E-02	3.61E-02
hsa-miR-1307	-1.71	1.34E-02	3.61E-02
hsa-miR-214	-1.69	2.58E-02	3.79E-02
hsa-miR-423-5p	-1.67	1.60E-02	3.61E-02
hsa-miR-744	-1.63	1.28E-02	3.61E-02
hsa-miR-210	-1.61	2.03E-02	3.61E-02
hsa-miR-574-3p	-1.60	9.58E-03	3.61E-02
hsa-miR-197	-1.60	4.42E-04	1.61E-02
hsa-miR-4298	-1.59	2.06E-02	3.61E-02
hsa-miR-1272	-1.59	2.98E-02	4.02E-02
hsa-miR-423-3p	-1.56	2.18E-03	2.19E-02
hsa-miR-378-star	-1.55	2.74E-02	3.79E-02
hsa-miR-34a-star	-1.54	2.36E-02	3.79E-02
hsa-miR-505-star	-1.52	4.16E-02	4.54E-02

The fold-changes, p-values and q-values (False Discovery Rate) were determined with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.05 .

Supplementary Table S4: List of the top 20 RNAs down-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.

Gene Symbol	Description	Fold-Change (MPs vs Naive)	p-value (MPs vs Naive)	q-value (MPs vs Naive)
MT1H	metallothionein 1H	-88.96	1.63E-04	1.63E-03
MT1G	metallothionein 1G	-42.62	2.38E-05	9.52E-04
MT1X	metallothionein 1X	-30.40	2.39E-04	1.81E-03
MT1CP	metallothionein 1C, pseudogene	-8.62	1.56E-04	1.62E-03
MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)	-7.42	4.29E-03	6.09E-03
MT1F	metallothionein 1F	-5.63	1.29E-03	3.35E-03
TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-5.41	4.48E-04	2.33E-03
TIMP4	TIMP metallopeptidase inhibitor 4	-5.25	1.26E-05	8.68E-04
MT2A	metallothionein 2A	-4.34	1.84E-04	1.69E-03
CCNA1	cyclin A1	-3.61	6.83E-03	7.97E-03
MT1E	metallothionein 1E	-3.03	5.68E-03	7.18E-03
LOC400958	ncRNA, uncharacterized	-2.92	1.16E-03	3.33E-03
EPDR1	ependymin related 1	-2.80	1.00E-03	3.12E-03
SH3RF2	SH3 domain containing ring finger 2	-2.77	1.87E-04	1.69E-03
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	-2.45	2.67E-05	9.52E-04
SHC4	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	-2.44	7.10E-03	8.23E-03
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	-2.44	5.99E-06	8.68E-04
ANO5	anoctamin 5	-2.39	4.57E-03	6.32E-03
ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B	-2.23	3.43E-04	2.11E-03
MNAT1	MNAT CDK- activating kinase assembly factor 1	-2.22	1.96E-03	4.13E-03

The fold-changes, p-values and q-values (False Discovery Rate) were determined with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.01.

Supplementary Table S5: List of the top 20 RNAs up-regulated in macrophages exposed to platelet MPs.

Gene Symbol	Description	Fold-Change (MPs vs Naive)	p-value (MPs vs Naive)	q-value (MPs vs.Naive)
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	12.52	8.81E-04	3.10E-03
CPLX3	complexin 3	6.84	3.33E-03	5.28E-03
NPPC	natriuretic peptide C	6.61	1.66E-07	9.46E-05
MS4A14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14	4.01	1.31E-04	1.60E-03
CHRM4	cholinergic receptor, muscarinic 4	3.93	1.54E-03	3.69E-03
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	3.91	1.56E-03	3.71E-03
VNN2	vanin 2	3.41	5.79E-03	7.25E-03
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	3.34	1.58E-03	3.72E-03
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	3.18	2.87E-03	4.82E-03
DNAJC5B	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 beta	3.09	4.76E-03	6.49E-03
SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	3.02	8.52E-03	9.01E-03
MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	2.95	7.35E-03	8.29E-03
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.84	2.01E-04	1.71E-03
LMAN1L	lectin, mannose-binding, 1 like	2.46	8.09E-04	2.99E-03
NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	2.39	2.13E-04	1.71E-03
LOC100129961	CCNT2 antisense RNA 1	2.37	5.50E-04	2.51E-03
OLR1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	2.31	5.32E-03	7.00E-03
HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd	2.28	9.93E-03	9.95E-03
PYHIN1	pyrin and HIN domain family, member 1	2.26	3.22E-03	5.20E-03
GCFC1-AS1	PAXBP1 antisense RNA 1	2.20	4.05E-03	5.85E-03

The fold-changes, p-values and q-values (False Discovery Rate) were determined with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.01.

Supplementary Table S6: Correlation between the microRNAs that are up-regulated by platelet MPs and their putative mRNA targets in primary human macrophages.

MicroRNA ID	microRNA p-value	microRNA fold change	Gene Symbol	mRNA p-value	mRNA fold change	Pearson correlation coefficient	p-value (Pearson correlation)
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	DUSP5	4.98E-04	-1.70	-0.99	5.14E-05
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	KIAA1279	3.48E-04	-1.60	-0.99	2.53E-04
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	CEP290	4.30E-03	-1.65	-0.98	4.90E-04
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	NOB1	1.20E-06	-1.50	-0.98	6.18E-04
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	ADAM15	2.16E-03	-1.58	-0.98	8.44E-04
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	CEP290	4.30E-03	-1.65	-0.98	8.91E-04
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	ATF3	9.14E-05	-1.67	-0.98	8.95E-04
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	TMEM44	4.28E-03	-1.61	-0.97	1.39E-03
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	CCNA2	5.91E-03	-1.56	-0.96	1.82E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	SSBP4	3.84E-03	-1.54	-0.96	2.07E-03
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	RAI14	2.27E-03	-1.71	-0.96	2.85E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	TNFSF14	2.76E-03	-1.54	-0.95	4.10E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	GALNT14	1.18E-02	-1.63	-0.95	4.30E-03
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	PPA1	9.39E-05	-1.58	-0.94	5.40E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	HDDC3	2.66E-03	-1.61	-0.94	5.85E-03
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	IGFBP6	3.90E-03	-1.54	-0.94	6.10E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	DOT1L	5.02E-04	-1.53	-0.93	6.28E-03
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	COPZ2	4.58E-03	-1.52	-0.93	6.42E-03
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	PCSK6	3.99E-02	-1.51	-0.93	6.66E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	LAT	2.61E-03	-1.57	-0.93	7.55E-03
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	AKAP5	3.21E-02	-1.65	-0.93	7.86E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	ABLIM3	1.24E-02	-1.89	-0.93	7.90E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	COPZ2	4.58E-03	-1.52	-0.92	8.33E-03
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	MICAL3	4.00E-03	-1.66	-0.92	8.37E-03
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	TCEAL8	8.51E-03	-1.52	-0.92	9.10E-03
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	TRAPPCL2	4.69E-04	-1.69	-0.92	9.21E-03
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	CSRP2	2.14E-02	-1.52	-0.92	9.43E-03
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	MRPL48	2.79E-03	-1.60	-0.92	1.03E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	HIVEP3	8.18E-04	-1.55	-0.91	1.06E-02
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	SLC25A12	2.63E-03	-1.50	-0.91	1.22E-02
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	DNAJC12	5.61E-03	-1.57	-0.91	1.31E-02
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	LEO1	4.74E-03	-1.51	-0.91	1.31E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	ZNF35	3.46E-04	-1.58	-0.90	1.34E-02

hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	THOP1	4.62E-03	-1.59	-0.90	1.35E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	SPATA20	2.50E-02	-1.59	-0.90	1.49E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	MYL9	1.08E-02	-1.75	-0.90	1.50E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	KIAA1279	3.48E-04	-1.60	-0.90	1.51E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	LILRA6	4.43E-04	-1.59	-0.90	1.54E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	CSF1	2.67E-05	-2.45	-0.89	1.62E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	VIT	9.95E-04	-1.81	-0.89	1.63E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	ATP1B4	4.07E-03	-1.52	-0.89	1.66E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	PLEKHJ1	1.34E-04	-1.72	-0.89	1.71E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	USP2	2.61E-03	-1.53	-0.89	1.73E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	SLC27A4	3.54E-05	-1.64	-0.89	1.88E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	ATF3	9.14E-05	-1.67	-0.88	1.93E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	TUBB6	3.40E-02	-1.52	-0.88	1.99E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	TCL1B	2.45E-03	-1.89	-0.88	2.04E-02
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	LONRF1	4.34E-03	-1.57	-0.88	2.12E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	PPA1	9.39E-05	-1.58	-0.88	2.18E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	MVK	1.35E-03	-1.50	-0.88	2.20E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	UCP2	4.46E-03	-1.50	-0.88	2.22E-02
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	PPFIBP1	6.72E-03	-1.54	-0.87	2.27E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	BCL7C	1.23E-03	-1.63	-0.87	2.31E-02
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	PRPS1	3.18E-03	-1.82	-0.87	2.34E-02
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	ATP1B1	8.38E-03	-1.67	-0.87	2.43E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	SSBP4	3.84E-03	-1.54	-0.87	2.50E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	NES	1.55E-04	-1.53	-0.86	2.90E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	THOP1	4.62E-03	-1.59	-0.86	2.92E-02
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	ATP9A	1.21E-02	-1.63	-0.86	2.95E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	SCG5	3.48E-04	-1.70	-0.85	3.04E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	HPCAL1	1.83E-04	-1.73	-0.85	3.04E-02
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	PDLIM2	6.67E-04	-1.71	-0.85	3.05E-02
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	MTMR1	7.73E-03	-1.65	-0.85	3.07E-02
hsa-miR-130a	4.03E-02	1.75	C5	1.60E-03	-1.53	-0.85	3.12E-02
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	MTMR1	7.73E-03	-1.65	-0.85	3.13E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	TRIM54	4.05E-04	-1.57	-0.85	3.22E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	SRP68	4.03E-05	-1.54	-0.85	3.29E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	PPP5C	1.21E-05	-1.85	-0.85	3.35E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	TNF	2.81E-03	-1.93	-0.85	3.40E-02
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	C17orf75	2.03E-04	-2.01	-0.84	3.46E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	NES	1.55E-04	-1.53	-0.84	3.57E-02
hsa-miR-26b	1.02E-03	2.10	CCRL1	1.88E-02	-1.68	-0.84	3.57E-02
hsa-miR-125b	1.73E-02	2.24	XKRX	1.70E-03	-1.60	-0.84	3.58E-02

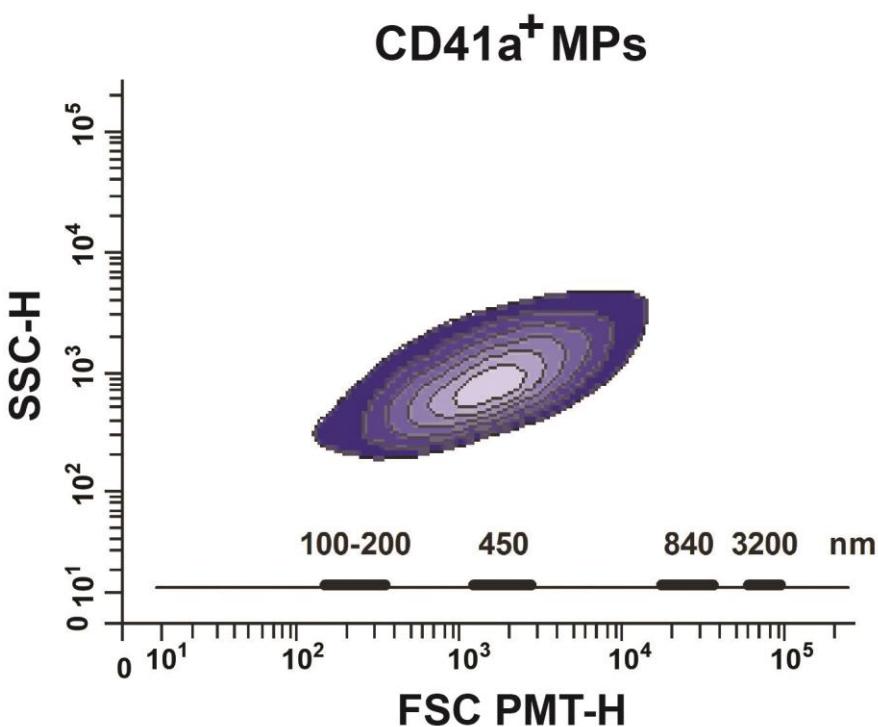
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	PXMP2	6.53E-03	-1.61	-0.84	3.73E-02
hsa-miR-202	2.70E-02	1.69	LGALS1	1.57E-04	-1.62	-0.83	3.96E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	TRAP1	4.57E-03	-1.60	-0.83	4.05E-02
hsa-miR-126	8.94E-04	13.15	MAOB	3.67E-02	-1.55	-0.83	4.13E-02
hsa-miR-139-5p	2.66E-02	1.81	NUP210	2.41E-03	-1.66	-0.83	4.17E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	SPATA20	2.50E-02	-1.59	-0.82	4.34E-02
hsa-miR-223	3.95E-02	1.81	NUP205	2.37E-03	-1.60	-0.82	4.64E-02
hsa-miR-663	3.49E-02	1.72	ECE1	4.99E-04	-1.81	-0.82	4.76E-02

The correlation between microRNA and mRNA data was calculated with the Partek Genomics Suite 6.6 software. The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.05 . Only microRNA-mRNA pairs with a negative Pearson correlation coefficient and a p-value < 0.05 are displayed.

Supplementary Table S7: List of the top 20 canonical signaling pathways of primary human macrophages altered by platelet MPs.

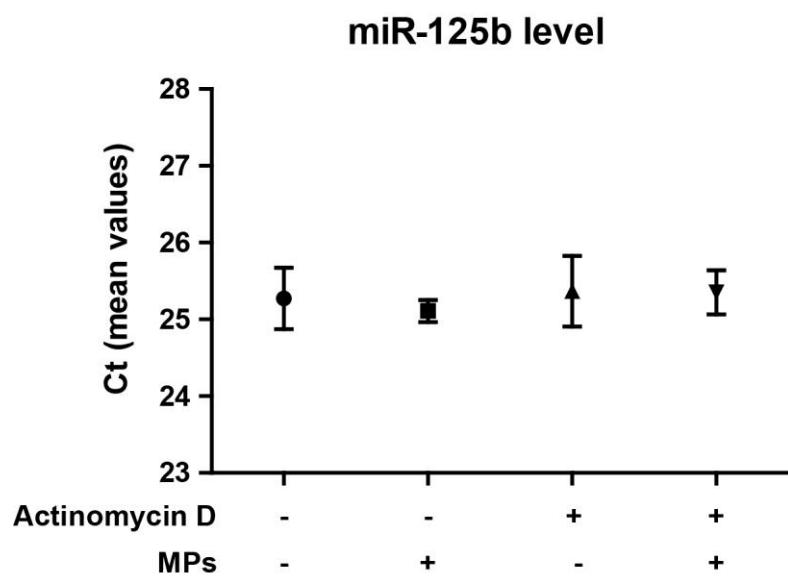
Ingenuity Canonical Pathways	p-value	z-score	Molecules
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	2.34E-04	-1.89	CCNA1,CCND2,NQO2,ALDH18A1,NQO1,ALDH1A1,TNF,CCND1,ALDH5A1,MDM2,CCNA2,ALDH1B1,CDK6
Fatty Acid α-oxidation	8.71E-04		ALDH1A1,PTGS2,ALDH2,ALDH1B1
Phagosome formation	1.05E-03		TLR4,TLR8,MRC1,TLR7,PRKCA,ITGA3,RHOD,RHOF,FCGR2A,FCGR3A/FCGR3B
Atherosclerosis Signaling	1.12E-03		PLA2G4C,CXCR4,TNF,TNFSF14,CSF1,ALOX15B,LPL,IL36B,TNFRSF12A,PLB1,ALOX5
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	1.29E-03	1.34	CCNA1,ITGA3,CCND1,PXN,CCNA2,CDK6,CDK1
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1.55E-03		ITGAM,ITGA3,CSF3R,FPR2,C5,IL36B,HRH1,CCL1,FPR1,CDH5,CXCR4,TNF,CCL4
Eicosanoid Signaling	2.63E-03	1.00	PLA2G4C,LTB4R,PTGS2,FPR2,ALOX15B,PLB1,A,LOX5
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	3.09E-03		TLR4,TLR8,TLR7,TNF,CSF1,IL10,IL36B,CD86
Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I	3.31E-03		RRM2,AK9,RRM2B,CMPK2
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	3.31E-03		TLR4,TLR8,TLR7,TNF,IL10,IL36B,CCL4,CD86
IL-8 Signaling	3.89E-03	-0.58	ITGAM,GNB4,CCND2,VEGFA,RHOD,MYL9,IRAK3,PRKCA,CCND1,PTGS2,PLD2,RHOF,IKBKE
TREM1 Signaling	4.79E-03	1.89	TLR4,TLR8,TLR7,TNF,IL10,CD86,NLRC4
Histamine Degradation	4.90E-03		ALDH1A1,ALDH2,ALDH1B1
Estrogen-mediated S-phase Entry	5.50E-03	-2.00	CCNA1,CCND1,CCNA2,CDK1
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	5.62E-03		FLNB,ITGAM,PRKCA,ITGA3,CD55,DYRK3,FLOT2
RhoGDI Signaling	6.17E-03	1.00	GNB4,ARHGAP6,GNA11,PRKCA,ITGA3,PPP1R12A,RHOD,GRIP1,MYL9,ARPC5L,RHOF,CDH5
Ubiquinol-10 Biosynthesis (Eukaryotic)	6.31E-03		COQ3,COQ2,MICAL3
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	6.76E-03		TLR7,VEGFA,C5,IL36B,DAAM1,IRAK3,FZD4,TLR4,TLR8,PRKCA,FZD1,TNF,CCND1,CSF1,IL10,IKBKE,FCGR3A/FCGR3B
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	8.32E-03		HMGCS1,DHCR24,MVK,CYP51A1
Cyclins and Cell Cycle Regulation	8.71E-03		CCNA1,CCND2,CCND1,CCNA2,CDK6,HDAC9,C,DK1

The pathways significantly altered by platelet MPs were identified with the Ingenuity Pathways Analysis software (Qiagen). The threshold criteria applied for the inclusion of the genes were as follows: (i) an expression value above the background, (ii) a fold change < -1.5 or > 1.5 between the MPs and Naive conditions, and (iii) a p-value < 0.05 . A negative and a positive z-score indicate predicted pathway inhibition or activation, respectively. The absence of a z-score indicate pathways where no prediction can currently be made.



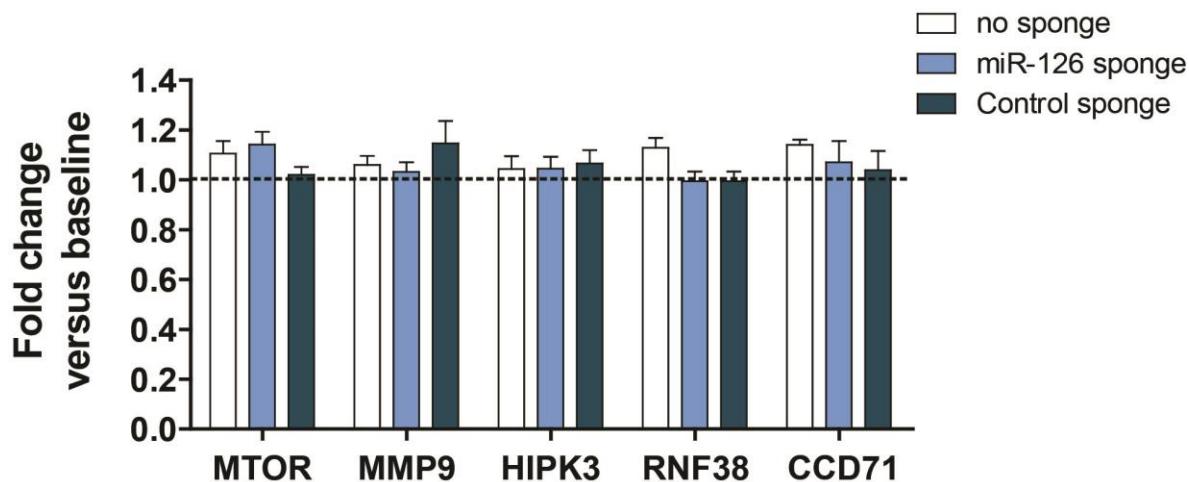
Supplementary Figure S1. Characterization of platelet MPs isolated from thrombin-activated platelets by flow cytometry.

Representative flow cytometry analyses of the platelet MPs that were coincubated with primary human macrophages. MPs (1 μ l) isolated from platelets activated with thrombin for 60 min were diluted in 100 μ l of phosphate buffered saline (PBS) and incubated in the presence of APC-conjugated mouse IgG (isotype) or APC-conjugated anti-human CD41a (BD Biosciences) for 30 min. Then, the samples were diluted to 500 μ l in PBS and analyzed cytofluorometrically using a forward-scattered (FSC) light coupled to a photomultiplier tube (PMT) option (FSC-PMT) (BD Biosciences) mounted on a fluorescence-activated cell sorting (FACS) FACS Canto II equipped with PMT option (BD Biosciences). The flow cytometer was calibrated before all data acquisitions using BD cytometer Setup and Tracking beads (BD Biosciences). Because of the size heterogeneity of MPs, fluorescent Sky Blue microspheres (ranging from 90 nm to 3,200 nm in diameter; Spherotech) were used to calibrate our FACS and estimate the size of MPs. The CD41a⁺ events were portrayed as FSC and side-scattered light (SSC) PMT graph using the BD FACSDiva software. SSC, Side-scattered light.



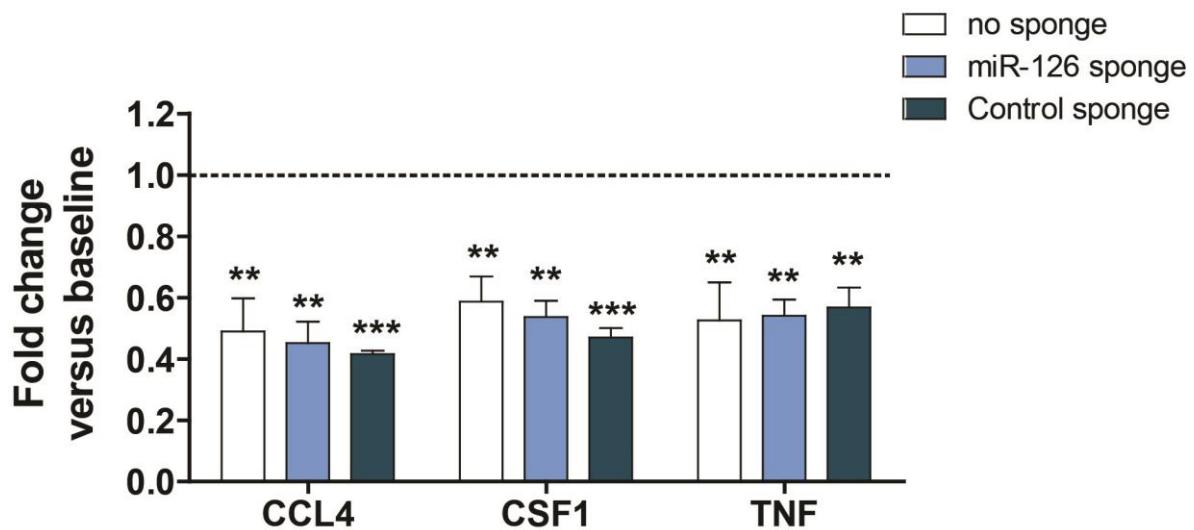
Supplementary Figure S2. Macrophage miR-125b levels are not affected by exposure to platelet MPs and/or treatment with actinomycin D.

Macrophages were pre-treated (+) or not (-) for 1 h with actinomycin D (3 µg/ml final) prior to exposure (+) or not (-) to a pool of platelet MPs (at a macrophage:MP ratio of 1:100) for 6 h, and miR-125b level in macrophages was assessed by qPCR (n = 3 individual donors). qPCR data were expressed as mean Ct values.



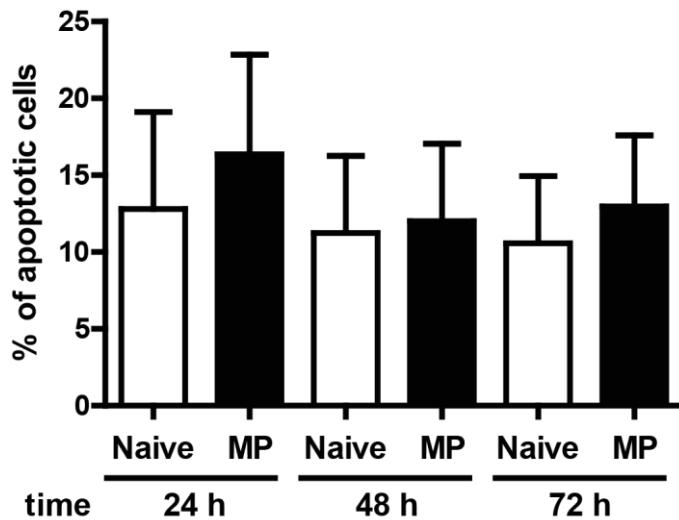
Supplementary Figure S3: The level of 5 different mRNAs, that are devoid of predicted binding sites for miR-126-3p, was not affected by the miR-126-3p sponge.

Macrophages transiently expressing a miR-126 sponge (pRL-CMV-BS miR-126-3p vector), a control sponge (pRL-CMV vector without miR-126-3p BS) or no sponge, were incubated or not with platelet MPs for 48 h. After total RNA extraction, the level of MTOR, MMP9, HIPK3, RNF38, CCD71 mRNAs, which are devoid of predicted binding sites for miR-126-3p, in primary macrophages was quantitated by qPCR ($n = 4-8$ individual donors). qPCR data were normalized by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using GAPDH mRNA as a reference, and expressed as fold changes versus baseline (Naive condition). Mean \pm SEM. p value not significant versus baseline by one-way ANOVA.



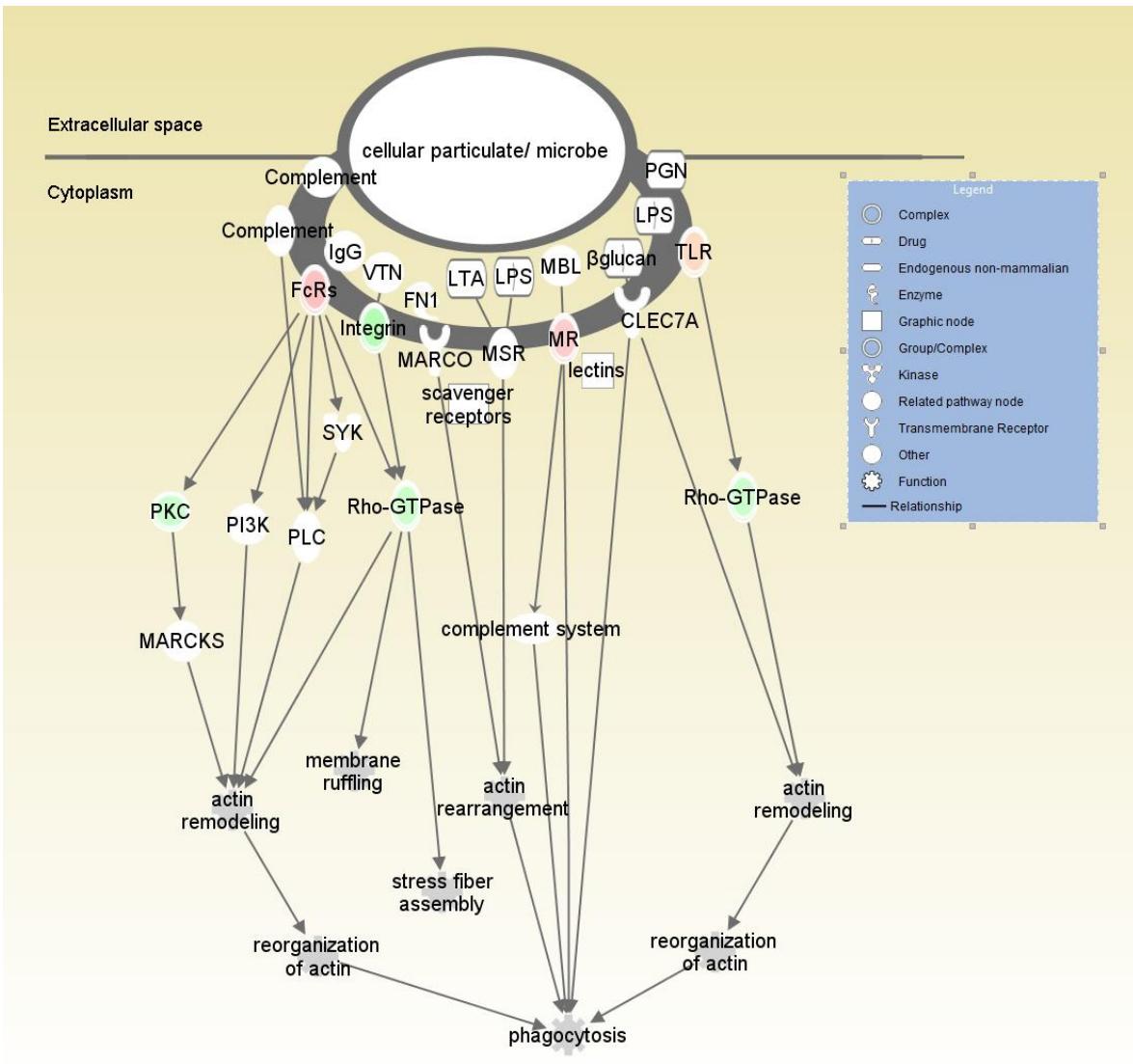
Supplementary Figure S4: Platelet MP-induced downregulation of CCL4, CSF1 and TNF mRNA levels may not be mediated by miR-126-3p.

Macrophages transiently expressing a miR-126 sponge (pRL-CMV-BS miR-126-3p vector), a control sponge (pRL-CMV vector without miR-126-3p BS) or no sponge, were incubated or not with platelet MPs for 48 h. After total RNA extraction, the level of CCL4, CSF1 and TNF mRNAs, which are devoid of predicted binding sites for miR-126-3p, in primary macrophages was quantitated by qPCR ($n = 4-8$ individual donors). qPCR data were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using GAPDH mRNA as a reference, and expressed as fold changes versus baseline (Naive condition). Mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ versus baseline by one-way ANOVA.



Supplementary Figure S5: Platelet MPs do not induce apoptosis of recipient primary human macrophages.

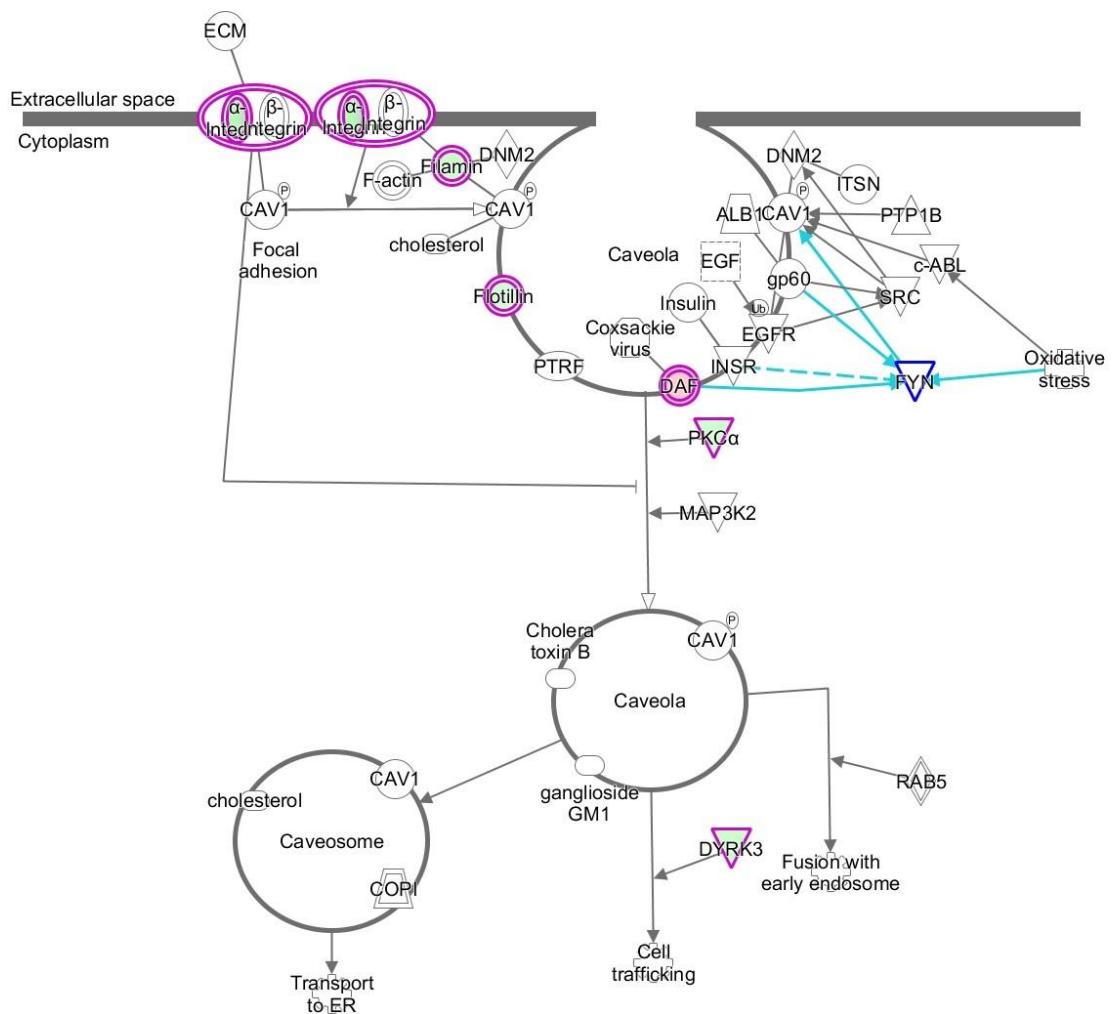
Macrophages were co-cultured (MPs) or not (Naive) with platelet MPs for up to 72 h prior to flow cytometry analysis of the percentage of apoptotic cells by using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) and following the manufacturer's protocol. Results were expressed as mean \pm SEM ($n = 3$). p value not significant versus baseline by one-way ANOVA.



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Supplementary Figure S6. Several mRNAs altered by platelet MPs are involved in phagosome formation.

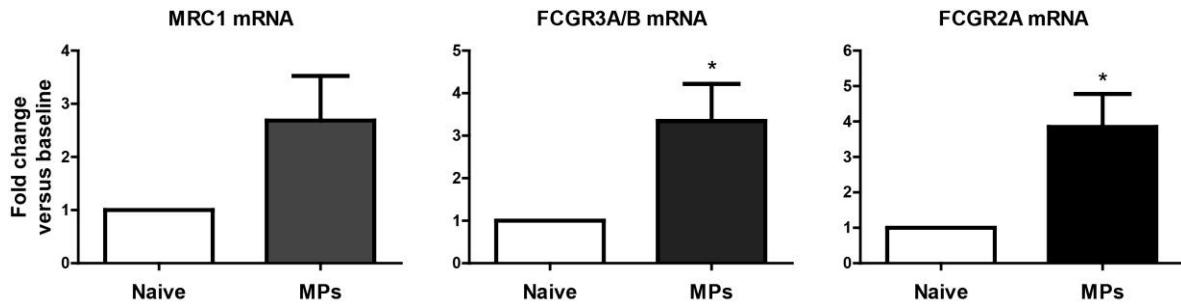
The primary human macrophage mRNAs involved in phagosome formation and altered by platelet MPs are: TLR4 (TLR), TLR8 (TLR), MRC1 (MR), TLR7 (TLR), PRKCA (PKC), ITGA3 (Integrin), RHOD (Rho-GTPase), RHOF (Rho-GTPase), FCGR2A (FcRs), FCGR3A/FCGR3B (FcRs). Up- (in red) and down- (in green) regulated genes, as well as the cellular functions affected (in grey), are depicted in color. Color intensity reflects the extent of variation. The pathway was designed using the Ingenuity Pathways Analysis software (Qiagen).



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

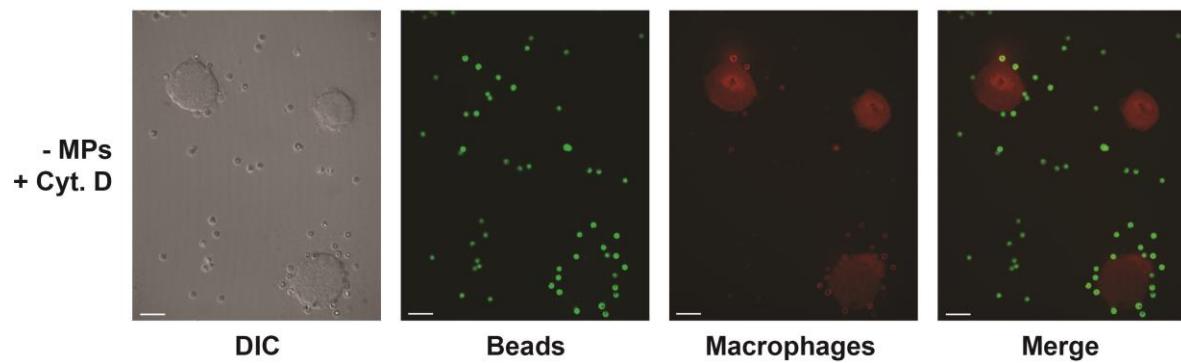
Supplementary Figure S7. Several mRNAs altered by platelet MPs are involved in caveolae-mediated endocytosis signaling.

The primary human macrophage mRNAs involved in caveolae-mediated endocytosis signaling and altered by platelet MPs are (in red): Filamin B (FLNB), integrin alpha M, complement component 3 receptor 3 subunit (ITGAM), protein kinase C, alpha (PRKCA), ITGA3 (integrin alpha-3), decay-accelerating factor (DAF or CD55), Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3) and Flotillin-2 (FLOT2). Up- (in red) and down- (in green) regulated genes, as well as the signaling pathways affected by up- (purple) or down- (blue) regulated genes, are depicted in color. Color intensity reflects the extent of variation. The pathway was designed using the Ingenuity Pathways Analysis software (Qiagen).



Supplementary Figure S8. The mRNA level of three macrophage genes, which are positive regulators of phagocytosis, were confirmed to be up-regulated by platelet MPs.

Macrophages were incubated or not with platelet MPs for 48 h at a macrophage:MP ratio of 1:100. After total RNA extraction, the level of MRC1, FCGR3A/B and FCGR2A mRNAs in primary human macrophages was quantitated by qPCR ($n = 8$ individual donors). qPCR data were normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using GAPDH mRNA as a reference, and expressed as fold changes versus baseline (Naive condition). Mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ versus baseline by Student's t test.



Supplementary Figure S9. The phagocytosis of latex microbeads by primary human macrophages is blocked by Cytochalasin D.

Macrophages that were not exposed to platelet MPs were pre-treated with cytochalasin D (Cyt. D, 5 μ M; Sigma) for 1 h prior to incubation with fluorescently labeled latex microbeads (2 μ m in diameter) for 2 h at 37°C ($n = 3$ individual donors). Bead phagocytosis was assessed by confocal microscopy ($\times 63$ objective). DIC, differential interference contrast.

Chapitre 4: Discussion générale

4.1 Mise en contexte

Bien que les plaquettes soient très riches en microARN et que des études aient suggéré un rôle pour ces microARN dans la régulation des ARNm et de la biologie des plaquettes (Corduan et al., 2015; Kondkar et al., 2010; Nagalla et al., 2011), le rôle intra-plaquettaire des microARN est difficile à étudier du fait de certaines limitations techniques associées à l'étude des plaquettes, notamment leur très faible efficacité de transfection (Hong et al., 2011; Landry et al., 2009). Ainsi, la capacité des plaquettes à libérer des MPs suite à leur activation (Boilard et al., 2010), le contenu en microARN des MPs de plaquettes (Diehl et al., 2012; Hunter et al., 2008) et la capacité des MPs à participer aux communications intercellulaires (Cocucci et al., 2009) nous ont amené à étudier un possible rôle extra-plaquettaire des microARN. Durant mes travaux de thèse, j'ai ainsi démontré que les plaquettes activées à la thrombine libèrent des MPs capables de réguler l'expression des gènes de cellules endothéliales (HUVEC) et de macrophages primaires humains via leur contenu en microARN, mais aussi de reprogrammer le transcriptome et les fonctions des macrophages au sein desquelles elles sont internalisées.

4.2 Choix du modèle d'étude

Les microARN circulants ne sont pas exclusifs aux MPs. Les exosomes et les corps apoptotiques en contiennent et participent aux communications intercellulaires via leur contenu en microARN et autres biomolécules (Valadi et al., 2007; Zernecke et al., 2009). Les plaquettes sont également capables de libérer des exosomes suite à leur stimulation par différents agonistes (Aatonen et al., 2014; Heijnen et al., 1999). Cependant, si les exosomes sont connus pour leur richesse en petits ARN, notamment en microARN (Gallo et al., 2012; Valadi et al., 2007), le contenu en microARN des exosomes de plaquettes n'a toujours pas été élucidé. Une autre classe de microARN circulants a été décrite, à savoir les microARN associés à des protéines, telles que Ago2 (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011) ou les HDL (Vickers et al., 2011). S'il existe un débat quant à savoir si la majorité des microARN circulants sont sous forme de complexes RNP ou associées aux vésicules extracellulaires, il n'y a, à ce jour, aucune étude faisant état d'un transfert fonctionnel de

microARN impliquant des complexes RNP, à l'exception des HDL (Tabet et al., 2014; Vickers et al., 2011). Pour savoir sous quelle forme les plaquettes libèrent leur contenu en microARN suite à leur activation, nous avons analysé, par qPCR, le contenu en microARN des MPs de plaquettes ainsi que du surnageant des MPs qui contient le reste du matériel qui est moins dense, dont les éventuels exosomes et complexes RNP. Ainsi, nous avons observé un enrichissement bien plus important en microARN associés aux MPs comparativement au surnageant, suggérant que des microARN plaquettaires sont libérés sous la forme de MPs.

Nous avons étudié des MPs produites par des plaquettes stimulées à la thrombine, un agoniste plaquettaire physiologique impliqué dans l'activation plaquettaire et la cascade de coagulation (Brass, 2003). À la suite de tests préliminaires réalisés au laboratoire, nous avons observé que, pour une même durée de stimulation, la thrombine induit la libération d'un plus grand nombre de MPs que deux autres agonistes plaquettaires physiologiques, soit le collagène et l'ADP. De plus, le contenu des MPs en microARN est supérieur lorsque les plaquettes ont été stimulées à la thrombine plutôt qu'avec du collagène ou encore de l'ADP, justifiant ainsi notre choix pour l'étude du rôle extra-plaquettaire des microARN. Ce dernier point est d'ailleurs très intéressant, car une étude récente a démontré qu'un exosome issu de différentes sources (plasma, fluide séminal et différents types cellulaires) contient moins d'une molécule d'un microARN donné (Chevillet et al., 2014). Ce résultat est très surprenant, mais aussi très intéressant, quand on sait que les exosomes représentent la classe de vésicules extracellulaires où le transfert intercellulaire de microARN fonctionnels a été le mieux étudié (Melo et al., 2014; Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2012; Squadrito et al., 2014; Valadi et al., 2007; Zhang et al., 2010). La caractérisation et la quantification de nos MPs ont été réalisées par cytométrie en flux en utilisant un cytomètre capable de détecter des vésicules aussi petites que 100 nm de diamètre (Cloutier et al., 2013). La taille des MPs a été déterminée à l'aide d'une échelle réalisée suite à l'utilisation de billes de différents diamètres, compris entre 90 et 3200 nm, alors que la concentration de MPs a été déterminée par l'ajout de billes fluorescentes (de concentration connue), dans l'échantillon de MPs (de volume connu), qui servent de standard interne pour déterminer le volume acquis lors de l'analyse de l'échantillon (Cloutier et al., 2013; Rousseau et al., 2015). L'utilisation seule de la cytométrie de flux ne

permet toutefois pas une caractérisation complète des MPs, selon un article publié par la société internationale des vésicules extracellulaires (*International Society of Extracellular Vesicles, ISEV*) (Lotvall et al., 2014). En effet, les MPs peuvent être étudiées par microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy, TEM*) (Gyorgy et al., 2011b) ou cryo-TEM (Arraud et al., 2014). Ces approches permettent de déterminer l'origine grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des billes d'or, et même la taille et la concentration pour la cryo-TEM, mais suite à un travail plus fastidieux qu'avec la cytométrie. Des méthodes basées sur le mouvement brownien des MPs sont également utilisées pour leur étude. La *Nanoparticle tracking analysis* (NTA) (Dragovic et al., 2011) ou la *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Lawrie et al., 2009) sont capables de déterminer la taille des MPs, de même que l'origine pour la NTA. En revanche, elles ne sont pas conçues pour déterminer la concentration des MPs. Ainsi, bien qu'il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus par cytométrie, l'utilisation d'un cytomètre de flux adapté à l'étude des MPs (Rousseau et al., 2015) et qui nous permet de caractériser (ou confirmer) l'origine des MPs ainsi que leur taille et concentration, conjuguée à l'utilisation d'un protocole d'isolation de MPs reconnu par la communauté scientifique (Boilard et al., 2010; Boudreau et al., 2014; Cloutier et al., 2013), nous assurent de la qualité des échantillons de MPs utilisés pour mes études.

4.3 Internalisation des MPs de plaquettes

Au cours de mes études, la co-incubation des MPs avec des cellules endothéliales HUVEC ou des macrophages primaires humains s'est toujours traduite par une internalisation des MPs dans les cellules cibles, et cela, sans stimulation ou autre traitement préalable des cellules. Différents mécanismes d'internalisation des MPs de plaquettes circulantes ont déjà été caractérisés. Les cellules endothéliales internalisent les MPs par un mécanisme d'endocytose dépendant de la protéine Del-1 (Dasgupta et al., 2012), alors que les macrophages le font par un mécanisme de phagocytose dépendant de la lactadhérine (Dasgupta et al., 2009) ou de la β 2-glycoprotéine 1 (Abdel-Monem et al., 2010). Ces trois protéines ont en commun la capacité de se lier aux MPs et de servir de pont entre la PS exprimée à la surface des MPs et les intégrines des cellules cibles. Elles sont toutes trois sécrétées par les cellules endothéliales ou macrophages et se retrouvent ainsi dans le

plasma. À l'exception de la β 2-glycoprotéine 1, qui peut se lier à la surface des plaquettes au repos (Shi et al., 2006), il serait surprenant de retrouver Del-1 ou la lactadéchine à la surface des MPs qui sont produites et isolées à partir de plaquettes purifiées et lavées qui, dans un état inactivé, ne lient pas ces protéines (Dasgupta et al., 2012; Shi et al., 2008). De plus, l'inhibition des différents mécanismes d'internalisation cités ci-dessus réduit, mais n'empêche jamais, l'internalisation des MPs par ces deux types cellulaires. Ceci démontre que les interactions et l'internalisation des MPs par les cellules cibles se font par le biais de mécanismes différents. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs d'endocytose ou de phagocytose, voire même des anticorps bloquants, afin d'essayer de diminuer ou de bloquer l'internalisation des MPs. En effet, le mécanisme d'interaction ou d'internalisation des MPs peut avoir une influence importante sur le devenir des MPs et de leur cargo. Les interactions peuvent simplement impliquer (i) une liaison entre récepteurs à la surface des deux protagonistes afin d'induire un transfert de récepteur(s) et/ou de la signalisation, (ii) une fusion entre les membranes de la cellule et de la MP, qui se traduit par une libération non spécifique du contenu de la MP dans la cellule cible, ou (iii) une internalisation des MPs par phagocytose ou endocytose (Cocucci et al., 2009). Dans ce dernier cas, le cargo des MPs peut être libéré dans le cytoplasme de la cellule suite à la fusion de la membrane de la MP avec celle de l'endosome ou du phagosome, ou bien dégradé par les lysosomes (Cocucci et al., 2009).

La localisation des MPs suite à leur internalisation dans les cellules cibles est également un aspect important qu'il serait intéressant d'étudier plus en profondeur. En effet, les MPs de plaquettes représentent une source importante de matériel biologique, dont la participation aux communications intercellulaires dépend du devenir de la MP qui le transporte jusqu'à la cellule cible. Les MPs contiennent des cytokines et chimiokines, des lipides bioactifs, des facteurs de croissance, de transcription ou de la coagulation, des enzymes actives, des molécules d'adhésion, des protéines et des acides nucléiques, dont les microARN (Aatonen et al., 2012; Cocucci et al., 2009; Mause and Weber, 2010; Ratajczak et al., 2006). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si, par exemple, les MPs internalisées peuvent se rendre au noyau de la cellule cible, où leur cargo de facteurs de transcription pourrait exercer un effet sur l'expression des gènes. Dans le cas des microARN, la voie des microARN a été montrée comme étant fonctionnelle au niveau des *P-bodies* (Krol et al., 2010), du REr

(Stalder et al., 2013), de la voie des endosomes (Gibbings et al., 2009) ou même du noyau (Gagnon et al., 2014). Ainsi, l'utilisation de marqueurs spécifiques de ces régions permettrait de faire des études de colocalisation avec les MPs internalisées, et donc d'expliquer, du moins en partie, comment les microARN de MPs peuvent réguler l'expression des gènes des cellules cibles. En effet, si nous avons mis en évidence l'existence de complexes Ago2•microARN fonctionnels dans les MPs, il est fort probable que les microARN de MPs, associés ou pas à une protéine Ago, intègrent la voie endogène des microARN de la cellule cible pour assurer leur fonction. Les résultats que j'ai obtenu, où j'observe une diminution du niveau des ARNm cibles et des protéines correspondantes, supportent un scénario selon lequel les microARN de MPs induisent une diminution de la traduction des ARNm cibles qui s'accompagnent de leur déstabilisation. Or, dans la voie des microARN, la protéine Ago2 ne peut cliver l'ARNm cible du fait d'une complémentarité imparfaite entre le microARN et l'ARNm cible ni même induire une quelconque déstabilisation de l'ARNm cible par elle-même. Ainsi, il est fort probable que les microARN, les protéines Ago ou les complexes Ago2•microARN des MPs s'associent avec leurs partenaires de la voie endogène des microARN, telle que la protéine GW182 (Eulalio et al., 2009; Eulalio et al., 2008), pour exercer leur effet régulateur sur l'expression des gènes.

4.4 Transfert des microARN par les MPs de plaquettes

L'internalisation des MPs dans leurs cellules cibles s'accompagne d'un enrichissement en microARN, miR-223 dans les HUVEC et miR-126-3p dans les macrophages, qui suggère que les MPs sont capables de livrer leur cargo de microARN à leur cellule réceptrice. J'ai démontré la preuve de concept du transfert de microARN fonctionnels de MPs vers une cellule cible en étudiant le transfert de miR-223 aux cellules HUVEC. Nous avons sélectionné miR-223, car il est très abondant dans les plaquettes (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a) et très faiblement exprimé dans les HUVEC (Voellenkle et al., 2012), ce qui a facilité l'appréciation du transfert de microARN. Nous avons, par ailleurs, confirmé par qPCR que les MPs de plaquettes stimulées à la thrombine présentent un profil de microARN très similaire à celui des plaquettes et contiennent donc une quantité importante de miR-223. L'enrichissement important en miR-223, que j'ai observé dans des HUVEC

exposées aux MPs, démontre que les MPs sont capables de livrer leur contenu en miR-223 dans les HUVEC. La transcription du gène codant pour miR-223 dans les HUVEC (exposées à des MPs) pourrait aussi expliquer l'enrichissement en miR-223 observé, quoiqu'il a été démontré que ce microARN n'est pas transcrit dans les cellules HUVEC (Tabet et al., 2014). Ceci étant dit, l'induction de la transcription du gène codant pour miR-223 suite à l'internalisation des MPs, est une possibilité qui mérite d'être étudiée.

L'origine myéloïde commune des macrophages et des plaquettes rend l'analyse du transfert de microARN plus difficile, car le profil des microARN plaquettaires (et donc des MPs) est très similaire à celui des macrophages. Il est alors plus difficile de différencier les microARN délivrés par les MPs de ceux qui sont nouvellement synthétisés suite à l'internalisation de ces dernières par les macrophages. L'analyse par biopuce à ARN a démontré un enrichissement important en miR-126-3p dans les macrophages exposés aux MPs. La confirmation de ce résultat par qPCR, en présence ou non d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, démontre que l'enrichissement en miR-126-3p observé est bien relié à un transfert de ce microARN aux macrophages et non à une augmentation de la transcription du microARN. L'analyse des niveaux de pri-miR-126 et pre-miR-126 aurait également pu écarter l'hypothèse de la transcription *de novo*. Une autre option intéressante aurait été de transfecter les plaquettes avec un ARN exogène, non présent chez l'humain, avant de stimuler ces dernières pour produire des MPs qui contiennent cet ARN. Bien que cela ne soit pas impossible, la très faible efficacité de transfection des plaquettes représente une limitation non négligeable. Je crois que le développement de nouvelles techniques devrait permettre de s'affranchir de ces limitations dans un avenir rapproché, tel qu'en atteste la mise au point d'un système de transfection des exosomes (*Exo-Fect Exosome Transfection kit*) par la compagnie *System Biosciences* (Momen-Heravi et al., 2014).

4.5 Fonctionnalité des microARN de MPs

Les microARN fonctionnent en complexe avec une protéine Ago (Bartel, 2009). La présence de la protéine Ago2, mais aussi de complexes effecteurs Ago2•microARN, dont Ago2•miR-223, fonctionnels dans les MPs suggère que les microARN transférés par les MPs peuvent également être fonctionnels dans les cellules réceptrices. J'ai pu démontrer

cela en utilisant un système de gènes rapporteurs et en étudiant l'effet des microARN de MPs sur l'expression de gènes endogènes des cellules réceptrices utilisées, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. Initialement, j'ai choisi d'étudier des cibles validées de miR-223 dont les niveaux d'expression sont élevés dans les HUVEC, considérant que l'effet régulateur des microARN dépend de l'abondance relative de leurs ARNm cibles (Pasquinelli, 2012). EFNA1 et FBXW7 sont tous deux ciblés par miR-223 (Li et al., 2012; Vickers et al., 2011), et l'internalisation des MPs par les HUVEC se traduit par une diminution des niveaux d'ARNm et de protéines de ces deux gènes dans les HUVEC. Le rôle de miR-223 dans les HUVEC a été confirmé par l'utilisation d'une éponge à miR-223, une approche expérimentale développée par l'équipe du Dr. Philip Sharp (Ebert et al., 2007), qui permet de séquestrer un microARN spécifique et d'inhiber son action. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la diminution du niveau d'ARNm est plus marquée et durable pour FBXW7 que pour EFNA1, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le premier possède quatre sites de liaison pour miR-223 dans son 3'UTR contre seulement un pour EFNA1. En effet, un effet coopératif est possible lorsque plusieurs sites de liaison d'un même microARN ou de plusieurs microARN différents sont situés à proximité les uns des autres au niveau du 3'UTR de leur cible (Bartel, 2009). Ainsi, la présence de sites de liaison pour d'autres microARN provenant des MPs pourrait être une autre explication. Enfin, la diminution du niveau des ARNm et des protéines correspondantes supporte un scénario dans lequel les microARN de MPs intègrent la voie endogène des microARN de la cellule cible et induisent une diminution de la traduction des ARNm cibles, qui s'accompagnent d'une baisse du niveau des ARNm cibles.

Pour les macrophages, l'analyse comparative de leur transcriptome par biopuce à ARN a permis d'identifier plusieurs ARNm qui sont des cibles prédictes, par des algorithmes bio-informatiques, de miR-126-3p et dont les niveaux sont régulés à la baisse suite à l'exposition aux MPs. Quatre cibles ont été sélectionnées et la validation des résultats par qPCR et immunobuvardage a démontré la capacité de miR-126-3p issu des MPs à réguler l'expression des gènes des macrophages au niveau de l'ARNm et de la protéine. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique des macrophages exposés aux MPs a révélé d'autres ARNm dont les niveaux d'expression sont régulés à la baisse. Connaissant la diversité et la richesse en microARN des plaquettes (Landry et al., 2009; Ple et al., 2012a), et sachant que

chaque microARN peut réguler de nombreux ARNm cibles pendant que chaque ARNm peut être régulé par plusieurs microARN, il est difficile d'établir la proportion des ARNm régulés à la baisse imputable aux microARN. Cependant, cela présenterait un grand intérêt afin d'approfondir notre compréhension sur la régulation exercée par les microARN plaquettaires (et leur contribution relative) au sein du macrophage et sur leur éventuelle implication dans la reprogrammation de ses fonctions. Ceci étant dit, si certains des ARNm régulés à la baisse dans le macrophage sont des cibles potentielles d'autres microARN plaquettaires, l'identification de l'ensemble des ARNm endogènes régulés par les microARN de MPs nécessiterait l'identification de l'ensemble des microARN délivrés par les MPs et l'établissement de corrélations entre les niveaux d'expressions des microARN et des ARNm. Cela reposerait alors sur des prédictions bio-informatiques et nécessiterait donc une validation expérimentale approfondie qui représente un travail énorme à l'échelle du transcriptome. L'utilisation de souris déficientes en un microARN donné, ou en un regroupement (*cluster*) de plusieurs microARN, représente une option intéressante pour valider l'implication d'un microARN dans la régulation de l'expression des gènes, mais ne permet l'étude que d'un seul microARN à la fois, ce qui minimise les chances d'observer des effets significatifs.

Deux autres groupes de recherche ont confirmé que les MPs de plaquettes peuvent effectivement participer aux communications intercellulaires via leur contenu en microARN. Une première étude a démontré que les MPs peuvent, via leur contenu en microARN, réguler l'expression des gènes de cellules endothéliales HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cell-1*) suite à leur internalisation (Gidlof et al., 2013). Le transfert de microARN par les MPs a été démontré en transfectant des plaquettes avec un microARN exogène de *C. elegans*, cel-miR-39, puis en activant les plaquettes transfectées pour produire des MPs contenant cel-miR-39. Le microARN exogène a ainsi été détecté dans les cellules endothéliales réceptrices à la suite d'une co-incubation de ces dernières avec les MPs, alors que le miR-320 endogène contenu dans les MPs régule à la baisse l'expression de l'ARNm et de la protéine ICAM-1 des cellules endothéliales HMEC-1. Une deuxième étude a montré que l'incubation de cellules endothéliales HUVEC avec des MPs de plaquettes, riches en miR-223, permet la livraison de miR-223 qui va alors cibler le récepteur de l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) et induire l'apoptose des cellules (Pan

et al., 2014). Cette dernière observation est intéressante, dans la mesure où nous n'avons pas remarqué l'induction d'apoptose dans les cellules endothéliales HUVEC exposées aux MPs (Laffont et al., 2013a). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les MPs utilisées dans cette étude proviennent de plasma riche en plaquettes stimulé à la TPO ou à la thrombine avant une séparation des vésicules à 100 000 g. Ainsi, le culot de vésicules utilisé contient non seulement des MPs de plaquettes, mais aussi très certainement des exosomes de plaquettes, divers facteurs plasmatiques et probablement aussi des vésicules extracellulaires d'origine non-plaquettaire, qui sont autant de facteurs pouvant potentiellement induire les effets observés.

4.6 Effets de l'internalisation des MPs sur le transcriptome des macrophages primaires humains

L'analyse du transcriptome des macrophages a permis d'apprécier les changements d'expression des microARN et autres ARN, dont les ARNm, induit par l'exposition de ces cellules aux MPs de plaquettes. Soixante-six microARN et plus de 400 ARN codants ou non codants (autres que des microARN) présentent une expression différentielle dans les macrophages exposés aux MPs. Compte tenu de la grande diversité de molécules bioactives potentiellement transmissible par les MPs de plaquettes (Aatonen et al., 2012; Mause and Weber, 2010), il est bien évident que toutes ces modifications ne sont pas strictement imputables aux microARN de MPs. À l'inverse, il est fort probable que parmi les 277 ARN régulés à la baisse, il y en ait plus que les quatre ARNm analysés dont l'expression différentielle soit liée aux microARN. En effet, l'origine commune des macrophages et des plaquettes (donc des MPs) fait en sorte que leurs profils d'expression en microARN sont très similaires. Ainsi, l'apport de microARN similaires par les MPs peut induire une augmentation rapide du niveau de certains microARN au sein du macrophage, et une régulation accrue de l'expression des ARNm cibles. De plus, sachant que l'effet régulateur des microARN dépend en partie de l'abondance relative de leurs ARNm cibles, il est attendu que les microARN plaquettaires exercent un effet global marqué sur le transcriptome des macrophages qui expriment de nombreuses cibles endogènes. Cependant, tel que discuté plus tôt, l'étude de la proportion de ces changements imputables aux microARN nécessiterait un travail important de bio-informatique qui devrait ensuite être

validé expérimentalement. La richesse du contenu des MPs peut également fournir d'autres éléments de réponse par rapport à la diminution d'expression des ARN dans les macrophages. En effet, les cytokines et autres molécules bioactives des MPs peuvent activer et/ou inhiber des voies de signalisation afin d'induire une diminution de la transcription ou une déstabilisation des ARN dans le macrophage. Une autre explication pourrait impliquer une élimination des ARN par exocytose (Gibbings et al., 2009), compte tenu du fait que les exosomes libérés dans ces conditions contiennent différentes population d'ARN (Valadi et al., 2007).

Parmi les ARN de macrophages dont l'expression est modifiée par les MPs, 157 sont régulés à la hausse. Bien que, dans de très rares cas, les microARN peuvent, de concert avec des RBP, permettre la stabilisation, voire même une augmentation de la traduction, de leurs ARNm cibles (Krol et al., 2010), il est peu probable que les microARN de MPs soient directement impliqués, à moins qu'ils modulent l'activation de la transcription des gènes concernés. Par ailleurs, il est difficile de discuter d'un transfert direct d'ARNm par les MPs compte tenu de l'absence d'études sur le contenu en ARNm des MPs de plaquettes. Cette hypothèse ne peut toutefois pas être complètement écartée, étant donné la diversité d'ARNm présents dans les plaquettes (Rowley et al., 2011), malgré que les ARNm n'y soient pas très abondant dans les plaquettes. Une des explications les plus plausibles serait une augmentation de la transcription de ces gènes dans les macrophages exposés aux MPs. Cette transcription pourrait découler de l'activation de voies de signalisation ou bien d'un transfert immédiat de molécules bioactives, tels que des facteurs de transcription, par les MPs.

Concernant les microARN, 34 sont régulés à la hausse dans les macrophages exposés aux MPs. Si, compte tenu de la richesse des MPs en microARN, il est tentant de penser que ces changements sont dus à la livraison du contenu en microARN des MPs, cela demande confirmation, comme nous l'avons fait pour miR-126-3p. De plus, il serait intéressant de connaître le profil d'expression en microARN des MPs afin de pouvoir le comparer à celui des macrophages et d'avoir une idée plus précise quant aux probabilités que ces changements soient liés au transfert des microARN par les MPs. Cependant, compte tenu du profil d'expression semblable des microARN de macrophages et de plaquettes, et du fait

que les MPs sont capables d'induire l'activation de nombreuses voies de signalisation dans leurs cellules cibles, il est très difficile d'écartier l'idée selon laquelle une proportion de ces changements d'expression de microARN soit lié à une augmentation de leur transcription dans les macrophages. L'utilisation de MPs de souris déficiente en un microARN donné serait ici un excellent moyen de valider le transfert du microARN en question. De la même manière, une diminution de la transcription induite par les MPs peut expliquer les 32 microARN régulés à la baisse dans les macrophages. Cette diminution peut également être due à une déstabilisation des microARN induite par le cargo des MPs, à leur élimination par exocytose (Gibbings et al., 2009), voire même à leur libération au sein de MPs produites par les macrophages exposés aux MPs. Dans tous les cas de figure, la transcription des ARN dans les macrophages receveurs pourrait expliquer bon nombre de modifications observées. Ainsi, il serait intéressant de procéder à une analyse transcriptomique de macrophages traités avec un inhibiteur de la transcription, comme l'actinomycine D. Cependant, cette drogue est vraiment nocive pour les cellules et pourrait induire un changement global du transcriptome qui serait difficile de distinguer des effets induits par l'internalisation des MPs. De la même manière, la richesse des MPs fait qu'il serait intéressant d'étudier la contribution des autres composants de leur cargo dans la modification du transcriptome et la reprogrammation des fonctions du macrophages. Toutefois, le fait que les MPs et les macrophages partagent de nombreux composants en communs, associé à la complexité du contenu des MPs, rendent ces études plutôt complexes et les résultats difficiles à interpréter.

4.7 Effets de l'internalisation des MPs sur les fonctions des macrophages primaires humains

Les macrophages ont pour fonction première de maintenir l'homéostasie. Pour cela, ils disposent de quatre fonctions innées: la perception de l'environnement, la chimiotaxie, la phagocytose, et la présentation d'antigènes (Rees, 2010). Dans notre étude nous avons observé que le profil d'expression et de sécrétion des cytokines et chimiokines, ainsi que la capacité de phagocytose des macrophages, étaient modifiés suite à l'exposition aux MPs de plaquettes. Notre analyse comparative du transcriptome des macrophages a démontré une diminution de l'expression des ARNm codants pour les cytokines et chimiokines CCL4,

CSF1 et TNF. Si les prédictions bioinformatiques ne nous ont pas permis d'identifier des sites de liaison de microARN au sein de leurs 3'UTR, cette diminution n'en demeure pas moins intéressante, d'autant qu'elle corrèle avec les niveaux de sécrétion des protéines codantes par les macrophages exposées aux MPs. Compte tenu de l'importance d'une régulation fine de la sécrétion de ces médiateurs, ces changements pourraient avoir d'importantes répercussions physiologiques. En effet, CCL4 est un puissant chimioattractant qui joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire en recrutant des leucocytes aux sites inflammatoires (Maurer and von Stebut, 2004). CSF1 (ou M-CSF) est très importante dans la biologie des macrophages. Elle est impliquée dans la différenciation, la prolifération, la migration et la survie des macrophages (Verschoor et al., 2012). Quant au TNF, c'est un médiateur central de nombreuses activités biologiques, dont l'inflammation, la réponse immunitaire, la tumorigénèse, l'organogénèse et bien d'autres (Pfeffer, 2003). Cependant, afin d'avoir une vue plus globale, il serait intéressant de compléter notre étude par une caractérisation complète du sécrétome des macrophages exposées aux MPs via l'utilisation de puces de détection de cytokines et de chimiokines, ou de kits ELISA. De la même manière, il serait intéressant de comparer le sécrétome des macrophages activés avant leur exposition aux MPs. Une étude a d'ailleurs démontré que l'état d'activation des macrophages exposées aux MPs a une influence sur la sécrétion de TNF- α et d'IL-10, qui est alors diminuée (Sadallah et al., 2011). De plus, selon les molécules utilisées pour activer les macrophages, cela permettrait de se rapprocher de certaines conditions physio-pathologiques et même d'évaluer les conséquences d'une telle interaction en utilisant des modèles animaux appropriés. Afin d'évaluer d'éventuelles conséquences de l'internalisation de MPs par les macrophages sur l'état d'activation des cellules environnantes, il serait intéressant d'utiliser le surnageant des macrophages exposés aux MPs pour la culture d'autres types cellulaires afin d'observer les effets sur leur activation, différenciation, survie ou autres modifications phénotypiques qu'il pourrait engendrer.

L'analyse de nos résultats de transcriptomiques, à l'aide de l'outil *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), nous a permis d'identifier des variations d'expression de plusieurs ARNm codants pour des protéines impliquées dans la phagocytose. Suite à cela, nous avons observé une augmentation accrue de la capacité de phagocytose des macrophages exposés

préalablement aux MPs en utilisant des billes de latex, couramment utilisées pour des essais de phagocytose *in vitro* (Lasbury et al., 2003; Seyrantepe et al., 2010). Si rien n'indique que ces modifications proviennent d'un transfert des microARN de MPs, elles n'en sont pas pour autant intéressantes, compte tenu de l'importance de la fonction de phagocytose des macrophages dans le maintien de l'homéostasie. En effet, la phagocytose permet aux macrophages d'éliminer les particules, débris, cellules apoptotiques et pathogènes (bactéries, parasites) présents dans les tissus. Elle s'avère donc essentielle au retour du tissu à l'homéostasie après un évènement perturbateur (Aderem and Underhill, 1999; Stuart and Ezekowitz, 2005). Ainsi, les MPs pourraient agir comme des médiateurs signalétiques indiquant aux macrophages la tâche à accomplir selon le contexte, homéostatique ou inflammatoire. Cela pourrait notamment être le cas au niveau de la rate, où les macrophages sont impliqués dans l'élimination des MPs circulantes (Dasgupta et al., 2009). Pour se rapprocher au plus près de conditions pathophysiologiques, il serait intéressant d'étudier la capacité de phagocytose des macrophages en utilisant des pathogènes, des cellules apoptotiques, des lipoprotéines de basse densité (LDL), voire même des MPs de plaquettes, afin de voir si la phagocytose de ces dernières peut être exacerbée à la suite d'une exposition préalable.

Par ailleurs, notre analyse IPA indique que les voies de signalisation les plus touchées dans les macrophages exposées aux MPs sont impliquées dans l'athérosclérose, avec une prédiction d'effets athéromodulateurs. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique dans laquelle les plaquettes et les macrophages jouent un rôle majeur (Kaplan and Jackson, 2011; Moore and Tabas, 2011). La diminution de sécrétion des cytokines et chimiokines observée dans les macrophages exposés aux MPs irait dans le sens des résultats de l'analyse IPA, dans la mesure où CCL4, CSF1 et TNF sont toutes associées à une progression de la maladie et un phénotype pro-athérogénique des macrophages (Branen et al., 2004; Irvine et al., 2009; Ohta et al., 2005; Reape and Groot, 1999). De la même manière, l'augmentation de la capacité de phagocytose pourrait être bénéfique pour les macrophages qui sont chargés d'éliminer les nombreuses cellules apoptotiques des plaques d'athérosclérose. Cependant, cela pourrait aussi avoir un effet pervers, en augmentant la phagocytose de LDL oxydés par les macrophages, et donc la formation de cellules spumeuses qui affaiblit la plaque et la rend plus vulnérable à la rupture (Moore and Tabas,

2011; Schrijvers et al., 2007). Ceci étant dit, notre modèle d'étude de macrophages non activés ne nous permet pas de spéculer davantage sur ces résultats, qui nécessitent au minimum l'utilisation de macrophages activés *in vitro* de façon similaire à la condition d'athérosclérose, voire même l'utilisation d'un modèle animal spécifique de la maladie.

4.8 Pertinence *in vivo*

Si nos deux études ont été réalisées *in vitro*, la pertinence *in vivo* des communications intercellulaires impliquant des ARN contenus dans les vésicules extra-cellulaires a été démontrée dans plusieurs études. Valadi et ses collaborateurs ont été les premiers à avoir montré un tel transfert chez la souris (Valadi et al., 2007). En incubant des exosomes de mastocytes murins contenant des ARNm et des microARN, en présence de mastocytes humains, ils ont observé un transfert fonctionnel des microARN et des ARNm, qui ont ensuite été traduits en protéines. Des exosomes de cellules dendritiques de souris sont également capables de réguler l'expression des gènes de cellules dendritiques réceptrices via leur contenu en microARN (Montecalvo et al., 2012). Une autre étude chez la souris a montré un effet pro-angiogénique des MPs de cellules endothéliales impliquant un transfert fonctionnel d'ARNm (Deregibus et al., 2007). Chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde, l'activation des plaquettes s'accompagne d'une libération du contenu en microARN dans les MPs, qui sont ensuite capables de réguler l'expression de ICAM-1 dans les cellules endothéliales (Gidlof et al., 2013). Les MPs circulantes et leur cargo de microARN ou autres molécules bioactives sont d'ailleurs utilisés comme biomarqueurs dans de nombreux contextes physiopathologiques, notamment dans les maladies cardiovasculaires qui sont associées avec des niveaux élevés de MPs circulantes (Amabile et al., 2010; Boulanger et al., 2001; Mallat et al., 2000; Morel et al., 2004). Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si ces modifications résultent d'une augmentation du taux de formation et de libération de MPs, d'une diminution de leur captation ou élimination, ou d'une combinaison des deux.

Un autre aspect important des communications intercellulaires concerne le devenir des MPs circulantes. Si, suite à leur injection, leur élimination est relativement rapide (Dasgupta et al., 2009; Dasgupta et al., 2012; Rand et al., 2006; Rank et al., 2011), leur destination est

pour le moins incertaine, même si des études suggèrent que la rate, le foie, les poumons et les reins pourraient constituer des sites d'élimination des MPs via les macrophages et cellules endothéliales de ces tissus (Rautou and Mackman, 2012). Cependant, nos analyses par cytométrie de flux des macrophages de différents tissus de souris injectées avec des MPs fluorescentes ne nous ont pas permises de retrouver nos MPs, pas plus que l'analyse des tissus complets en utilisant un système d'imagerie (Xenogen). Compte tenu de la grande capacité d'interaction des MPs de plaquettes avec de nombreux types cellulaires, le devenir des MPs injectées dans la circulation représente une inconnue importante qu'il serait important de résoudre afin de mieux appréhender les éventuels impacts des communications intercellulaires impliquant ces dernières. L'utilisation de souris transgéniques dont les plaquettes (et donc les MPs) expriment la luciférase ou encore l'utilisation de MPs radiomarquées pourrait offrir une plus grande sensibilité de détection, et donc une éventuelle réponse quant au devenir des MPs *in vivo*.

Chapitre 5: Conclusion

Mes travaux de thèse démontrent que les microARN de plaquettes, via les MPs, sont capables de participer aux communications intercellulaires en régulant l'expression des gènes de cellules cibles dans lesquelles elles sont internalisées. Compte tenu du rôle important des MPs dans le maintien des fonctions des systèmes sanguins et circulatoires, ainsi que dans les pathologies de ces systèmes associées à une dérégulation de leur biogénèse, mais aussi de la grande diversité des types cellulaires avec lesquelles les plaquettes et leurs MPs peuvent interagir, ces communications intercellulaires pourraient permettre le développement de stratégies thérapeutiques. En effet, il est possible d'imaginer, dans un avenir rapproché, le développement d'approches thérapeutiques basées sur l'administration de vésicules enrichies en matériel génétique, tels que des ARN thérapeutiques ou des complexes effecteurs Ago2•microARN, capables de réguler l'expression géniques des différents types de cellules au sein de l'organisme. Ceci pourrait permettre de corriger des anomalies génétiques ou de rétablir une fonction normale, et ainsi de recouvrir la santé.

Chapitre 6: Bibliographie

- Aatonen, M., Gronholm, M., and Siljander, P.R. (2012). Platelet-derived microvesicles: multitalented participants in intercellular communication. *Seminars in thrombosis and hemostasis* *38*, 102-113.
- Aatonen, M.T., Ohman, T., Nyman, T.A., Laitinen, S., Gronholm, M., and Siljander, P.R. (2014). Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* *3*.
- Abdel-Monem, H., Dasgupta, S.K., Le, A., Prakasam, A., and Thiagarajan, P. (2010). Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I. *Thrombosis and haemostasis* *104*, 335-341.
- Abrams, C.S., Ellison, N., Budzynski, A.Z., and Shattil, S.J. (1990). Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* *75*, 128-138.
- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* *17*, 593-623.
- Al Faraj, A., Gazeau, F., Wilhelm, C., Devue, C., Guerin, C.L., Pechoux, C., Paradis, V., Clement, O., Boulanger, C.M., and Rautou, P.E. (2012). Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice. *Radiology* *263*, 169-178.
- Amabile, N., Rautou, P.E., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2010). Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Seminars in thrombosis and hemostasis* *36*, 907-916.
- Ansari, A.A. (2014). Clinical features and pathobiology of Ebolavirus infection. *Journal of autoimmunity* *55*, 1-9.
- Aquaro, S., Calio, R., Balzarini, J., Bellocchi, M.C., Garaci, E., and Perno, C.F. (2002). Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral research* *55*, 209-225.
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J.M., Mornet, S., and Brisson, A.R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *12*, 614-627.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 5003-5008.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* *275*, 964-967.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* *27*, 669-692.

- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & development* 22, 2773-2785.
- Bailey, K., Bettelheim, F.R., Lorand, L., and Middlebrook, W.R. (1951). Action of thrombin in the clotting of fibrinogen. *Nature* 167, 233-234.
- Baldwin, A.L., and Thurston, G. (2001). Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Critical reviews in biomedical engineering* 29, 247-278.
- Balkwill, F.R., and Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology* 22, 33-40.
- Barg, A., Ossig, R., Goerge, T., Schneider, M.F., Schillers, H., Oberleithner, H., and Schneider, S.W. (2007). Soluble plasma-derived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. *Thrombosis and haemostasis* 97, 514-526.
- Barry, O.P., Kazanietz, M.G., Pratico, D., and FitzGerald, G.A. (1999). Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 7545-7556.
- Barry, O.P., Pratico, D., Lawson, J.A., and FitzGerald, G.A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* 99, 2118-2127.
- Barry, O.P., Pratico, D., Savani, R.C., and FitzGerald, G.A. (1998). Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation* 102, 136-144.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., Swift, S., *et al.* (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77, 1117-1124.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233-237.
- Bearer, E.L., Prakash, J.M., and Li, Z. (2002). Actin dynamics in platelets. *International review of cytology* 217, 137-182.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20, 1885-1898.
- Behrendt, D., and Ganz, P. (2002). Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *The American journal of cardiology* 90, 40L-48L.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.

- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology* 181, 3733-3739.
- Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Boing, A.N., Romijn, F.P., Hack, C.E., and Sturk, A. (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thrombosis and haemostasis* 85, 639-646.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 28, 328-336.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Best, P.J., and Lerman, A. (2000). Endothelin in cardiovascular disease: from atherosclerosis to heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology* 35, S61-63.
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Jr., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165.
- Beyer, C., and Pisetsky, D.S. (2010). The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology* 6, 21-29.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Bijkerk, R., van Solingen, C., de Boer, H.C., van der Pol, P., Khairoun, M., de Bruin, R.G., van Oeveren-Rietdijk, A.M., Lievers, E., Schlagwein, N., van Gijlswijk, D.J., et al. (2014). Hematopoietic microRNA-126 protects against renal ischemia/reperfusion injury by promoting vascular integrity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25, 1710-1722.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* 196, 254-265.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 11, 889-896.
- Blakaj, A., and Lin, H. (2008). Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs. *The Journal of biological chemistry* 283, 9505-9508.
- Boillard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., et al. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580-583.
- Booyse, F.M., and Rafelson, M.E., Jr. (1968). Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochimica et biophysica acta* 166, 689-697.
- Bottcher, A., Gaip, U.S., Furnrohr, B.G., Herrmann, M., Girkontaite, I., Kalden, J.R., and Voll, R.E. (2006). Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis and rheumatism* 54, 927-938.

- Boudreau, L.H., Duchez, A.C., Cloutier, N., Soulet, D., Martin, N., Bollinger, J., Pare, A., Rousseau, M., Naika, G.S., Levesque, T., *et al.* (2014). Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* *124*, 2173-2183.
- Boulanger, C.M., Amabile, N., and Tedgui, A. (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* *48*, 180-186.
- Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* *104*, 2649-2652.
- Branen, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., and Jovinge, S. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *24*, 2137-2142.
- Brass, L.F. (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest* *124*, 18S-25S.
- Bray, M., and Geisbert, T.W. (2005). Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *The international journal of biochemistry & cell biology* *37*, 1560-1566.
- Bray, P.F., McKenzie, S.E., Edelstein, L.C., Nagalla, S., Delgrossio, K., Ertel, A., Kupper, J., Jing, Y., Londin, E., Loher, P., *et al.* (2013). The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC genomics* *14*, 1.
- Briddell, R.A., Brandt, J.E., Stranava, J.E., Srour, E.F., and Hoffman, R. (1989). Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* *74*, 145-151.
- Brodsky, F.M., Lem, L., Solache, A., and Bennett, E.M. (1999). Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunological reviews* *168*, 199-215.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., *et al.* (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome research* *20*, 1398-1410.
- Buscaglia, L.E., and Li, Y. (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer* *30*, 371-380.
- Bussolino, F., Camussi, G., Tetta, C., Garbarino, G., Bosia, A., and Baglioni, C. (1990). Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1. *Journal of lipid mediators* *2 Suppl*, S15-22.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* *10*, 1957-1966.
- Calhoun, E.S., Jones, J.B., Ashfaq, R., Adsay, V., Baker, S.J., Valentine, V., Hempen, P.M., Hilgers, W., Yeo, C.J., Hruban, R.H., *et al.* (2003). BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *The American journal of pathology* *163*, 1255-1260.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., *et al.* (2004). Human microRNA genes are

frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 2999-3004.

Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., and Hamilton, J.A. (2000). The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *Journal of leukocyte biology* *68*, 144-150.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* *6*, 389-395.

Carter, C.A., and Ehrlich, L.S. (2008). Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annual review of microbiology* *62*, 425-443.

Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., and Looney, M.R. (2012). Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* *122*, 2661-2671.

Cesarman-Maus, G., and Hajjar, K.A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* *129*, 307-321.

Chang, T.C., and Mendell, J.T. (2007). microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *8*, 215-239.

Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics* *40*, 43-50.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584-589.

Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* *303*, 83-86.

Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* *18*, 997-1006.

Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., et al. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell research* *20*, 1128-1137.

Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C.Y. (2012). Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* *3*, 28-37.

Chen, X.W., Shen, Y., Sun, C.Y., Wu, F.X., Chen, Y., and Yang, C.D. (2011). Anti-class a scavenger receptor autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients impair phagocytic clearance of apoptotic cells by macrophages in vitro. *Arthritis research & therapy* *13*, R9.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.

- Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Galichotte, E.N., *et al.* (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 14888-14893.
- Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., *et al.* (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development* *24*, 992-1009.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., *et al.* (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* *328*, 1694-1698.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., *et al.* (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* *91*, 3527-3561.
- Clemetson, K.J. (2012). Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research* *129*, 220-224.
- Cloutier, N., Pare, A., Farndale, R.W., Schumacher, H.R., Nigrovic, P.A., Lacroix, S., and Boilard, E. (2012). Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* *120*, 1334-1343.
- Cloutier, N., Tan, S., Boudreau, L.H., Cramb, C., Subbaiah, R., Lahey, L., Albert, A., Shnayder, R., Gobezie, R., Nigrovic, P.A., *et al.* (2013). The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* *5*, 235-249.
- Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology* *19*, 43-51.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology* *3*, 339-345.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *9*, 899-909.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* *124*, 263-266.
- Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D., and Joseph, J.E. (2010). The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis* *103*, 1044-1052.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., and Schroit, A.J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *The Journal of biological chemistry* *267*, 19412-19417.

- Corduan, A., Ple, H., Laffont, B., Wallon, T., Plante, I., Landry, P., and Provost, P. (2015). Dissociation of SERPINE1 mRNA from the translational repressor proteins Ago2 and TIA-1 upon platelet activation. *Thrombosis and haemostasis* 113.
- Cosentino, F., Rubattu, S., Savoia, C., Venturelli, V., Pagannone, E., and Volpe, M. (2001). Endothelial dysfunction and stroke. *Journal of cardiovascular pharmacology* 38 Suppl 2, S75-78.
- Cunningham, M.E., Huribal, M., Bala, R.J., and McMillen, M.A. (1997). Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Critical care medicine* 25, 958-964.
- Cutler, L., Rodan, G., and Feinstein, M.B. (1978). Cytochemical localization of adenylyl cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochimica et biophysica acta* 542, 357-371.
- Daleke, D.L., and Huestis, W.H. (1985). Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 24, 5406-5416.
- Dasgupta, S.K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R.V., Langlois, K., Nagata, S., Rumbaut, R.E., and Thiagarajan, P. (2009). Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113, 1332-1339.
- Dasgupta, S.K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R.E., and Thiagarajan, P. (2012). Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* 125, 1664-1672.
- Davie, E.W., and Ratnoff, O.D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 145, 1310-1312.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 14, 986-995.
- Davila, M., Amirkhosravi, A., Coll, E., Desai, H., Robles, L., Colon, J., Baker, C.H., and Francis, J.L. (2008). Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6, 1517-1524.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56-61.
- de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.J., *et al.* (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533-538.
- Dejana, E. (1997). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 100, S7-10.
- Dejana, E., Corada, M., and Lampugnani, M.G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 910-918.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.

- Denis, M.M., Tolley, N.D., Bunting, M., Schwertz, H., Jiang, H., Lindemann, S., Yost, C.C., Rubner, F.J., Albertine, K.H., Swoboda, K.J., *et al.* (2005). Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122, 379-391.
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440-2448.
- Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. Annual review of pathology 9, 287-314.
- Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J.B., *et al.* (2012). Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular research* 93, 633-644.
- Djuranic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W., Harris, A.L., Dobson, P.J., *et al.* (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7, 780-788.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326, 544-550.
- Duchez, A.C., Boudreau, L.H., Bollinger, J., Belleannee, C., Cloutier, N., Laffont, B., Mendoza-Villarroel, R.E., Levesque, T., Rollet-Labelle, E., Rousseau, M., *et al.* (2015). Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E3564-3573.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods* 4, 721-726.
- Ebnet, K., and Vestweber, D. (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochemistry and cell biology* 112, 1-23.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elkayam, E., Kuhn, C.D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150, 100-110.
- Elzey, B.D., Ratliff, T.L., Sowa, J.M., and Crist, S.A. (2011). Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thrombosis research* 127, 180-183.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell* 32, 519-528.

- Esclar, G., and White, J.G. (1991). The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood cells* *17*, 467-485; discussion 486-495.
- Eulalio, A., Helms, S., Fritzsch, C., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *Rna* *15*, 1067-1077.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology* *15*, 346-353.
- Eystathioy, T., Chan, E.K., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular biology of the cell* *13*, 1338-1351.
- Fabian, M.R., Mathonet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Molecular cell* *35*, 868-880.
- Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* *19*, 586-593.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* *79*, 351-379.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology* *148*, 2207-2216.
- Falanga, A., Tartari, C.J., and Marchetti, M. (2012). Microparticles in tumor progression. *Thrombosis research* *129 Suppl 1*, S132-136.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* *123*, 819-831.
- Feinberg, M.W., Wara, A.K., Cao, Z., Lebedeva, M.A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., Hirai, H., Katz, J.P., Haspel, R.L., Gray, S., *et al.* (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO journal* *26*, 4138-4148.
- Feng, X., Deng, T., Zhang, Y., Su, S., Wei, C., and Han, D. (2011). Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by regulating the production of tumour necrosis factor alpha and growth arrest-specific gene 6. *Immunology* *132*, 287-295.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* *9*, 102-114.
- Finger, E.B., Puri, K.D., Alon, R., Lawrence, M.B., von Andrian, U.H., and Springer, T.A. (1996). Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* *379*, 266-269.

- Finnegan, E.F., and Pasquinelli, A.E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *48*, 51-68.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Flamme, I., Frolich, T., and Risau, W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *Journal of cellular physiology* *173*, 206-210.
- Flaumenhaft, R. (2006). Formation and fate of platelet microparticles. *Blood cells, molecules & diseases* *36*, 182-187.
- Fox, J.E., Austin, C.D., Boyles, J.K., and Steffen, P.K. (1990). Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *The Journal of cell biology* *111*, 483-493.
- Frances, J.W., Drosu, N.C., Gibson, W.J., Chitalia, V.C., and Edelman, E.R. (2013). Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* *133*, 1334-1344.
- Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., and Takenawa, T. (1992). Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* *359*, 150-152.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Miura, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., et al. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature cell biology* *9*, 604-611.
- Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.H., Xu, J., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2012). Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* *151*, 533-546.
- Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B.A., and Corey, D.R. (2014). RNAi Factors Are Present and Active in Human Cell Nuclei. *Cell reports* *6*, 211-221.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G.G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one* *7*, e30679.
- Gawaz, M., Langer, H., and May, A.E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* *115*, 3378-3384.
- Gay, L.J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature reviews Cancer* *11*, 123-134.
- Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., et al. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* *95*, 3106-3112.
- Gemelli, C., Montanari, M., Tenedini, E., Zanocco Marani, T., Vignudelli, T., Siena, M., Zini, R., Salati, S., Tagliafico, E., Manfredini, R., et al. (2006). Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell death and differentiation* *13*, 1686-1696.

- George, J.N., Pickett, E.B., Saucerman, S., McEver, R.P., Kunicki, T.J., Kieffer, N., and Newman, P.J. (1986). Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *The Journal of clinical investigation* *78*, 340-348.
- Gerrard, J.M., White, J.G., and Peterson, D.A. (1978). The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thrombosis and haemostasis* *40*, 224-231.
- Gibbings, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature cell biology* *14*, 1314-1321.
- Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* *11*, 1143-1149.
- Gidlof, O., van der Brug, M., Ohman, J., Gilje, P., Olde, B., Wahlestedt, C., and Erlinge, D. (2013). Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood* *121*, 3908-3917, S3901-3926.
- Gobeil, L.A., Lodge, R., and Tremblay, M.J. (2012). Differential HIV-1 endocytosis and susceptibility to virus infection in human macrophages correlate with cell activation status. *J Virol* *86*, 10399-10407.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* *32*, 593-604.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* *5*, 953-964.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* *27*, 91-105.
- Guil, S., and Caceres, J.F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature structural & molecular biology* *14*, 591-596.
- Gyorgy, B., Modos, K., Pallinger, E., Paloczi, K., Pasztoi, M., Misjak, P., Deli, M.A., Sipos, A., Szalai, A., Voszka, I., *et al.* (2011a). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* *117*, e39-48.
- Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., *et al.* (2011b). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *68*, 2667-2688.

- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 509-524.
- Hadi, H.A., Carr, C.S., and Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular health and risk management* *1*, 183-198.
- Halim, A., Kanayama, N., el Maradny, E., Maehara, K., Hirano, M., Kobayashi, T., and Terao, T. (1995). Endothelin-1 evoked an increase and oscillations in cytosolic calcium concentration in adherent single human platelets and increased GMP-140 (P-selectin) in platelet suspension. *Thrombosis research* *80*, 105-112.
- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews Immunology* *8*, 533-544.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* *18*, 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887-901.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* *136*, 75-84.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* *21*, 309-322.
- Handgretinger, R., Gordon, P.R., Leimig, T., Chen, X., Buhring, H.J., Niethammer, D., and Kuci, S. (2003). Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* *996*, 141-151.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., and Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* *28*, 655-661.
- Hartwig, J., and Italiano, J., Jr. (2003). The birth of the platelet. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *1*, 1580-1586.
- Hawker, R.J., Hawker, L.M., and Wilkinson, A.R. (1980). Indium (111In)-labelled human platelets: optimal method. *Clinical science* *58*, 243-248.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* *447*, 1130-1134.
- Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., van den Brand, M.J., Boersma, E., Zeiher, A.M., Simoons, M.L., and Investigators, C.S. (2003). Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* *348*, 1104-1111.
- Hegde, S.P., Zhao, J., Ashmun, R.A., and Shapiro, L.H. (1999). c-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood* *94*, 1578-1589.

- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* *94*, 3791-3799.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* *27*, 3300-3310.
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Molecular cell* *32*, 276-284.
- Herbert, K.M., Pimienta, G., DeGregorio, S.J., Alexandrov, A., and Steitz, J.A. (2013). Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a pro-growth miRNA profile. *Cell reports* *5*, 1070-1081.
- Heydtmann, M. (2009). Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Journal of virology* *83*, 2796-2802.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., and Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* *238*, 1717-1720.
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A., and Yoder, M.C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *28*, 1584-1595.
- Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., et al. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* *409*, 202-207.
- Holmback, K., Danton, M.J., Suh, T.T., Daugherty, C.C., and Degen, J.L. (1996). Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *The EMBO journal* *15*, 5760-5771.
- Hong, W., Kondkar, A.A., Nagalla, S., Bergmeier, W., Jin, Y., Herman, J.H., and Bray, P.F. (2011). Transfection of human platelets with short interfering RNA. *Clinical and translational science* *4*, 180-182.
- Horman, S.R., Janas, M.M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I.J., Sever, M.J., Morrissey, D.V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., et al. (2013). Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Molecular cell* *50*, 356-367.
- Huang, J.S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., and Le Breton, G.C. (2004). Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cellular signalling* *16*, 521-533.
- Hulsmans, M., and Holvoet, P. (2013). MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular research* *100*, 7-18.
- Humphrey, J.H. (1955). Origin of blood platelets. *Nature* *176*, 38.
- Humphrey, J.H., and Toh, C.C. (1954). Absorption of serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine by dog platelets. *The Journal of physiology* *124*, 300-304.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16961-16966.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., *et al.* (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one* *3*, e3694.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* *293*, 834-838.

Hyvonen, M., Macias, M.J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., and Wilmanns, M. (1995). Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *The EMBO journal* *14*, 4676-4685.

Iida, H., Honda, M., Kawai, H.F., Yamashita, T., Shirota, Y., Wang, B.C., Miao, H., and Kaneko, S. (2005). Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of {alpha}-fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut* *54*, 843-851.

Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews Immunology* *4*, 432-444.

Irvine, K.M., Andrews, M.R., Fernandez-Rojo, M.A., Schroder, K., Burns, C.J., Su, S., Wilks, A.F., Parton, R.G., Hume, D.A., and Sweet, M.J. (2009). Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *Journal of leukocyte biology* *85*, 278-288.

Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., *et al.* (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* *121*, 984-995.

Italiano, J.E., Jr., and Battinelli, E.M. (2009). Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *7 Suppl 1*, 173-176.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell* *39*, 292-299.

Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation* *107*, 1395-1402.

Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., and Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* *52*, 2757-2764.

Janowska-Wieczorek, A., Wysoczynski, M., Kijowski, J., Marquez-Curtis, L., Machalinski, B., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2005). Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* *113*, 752-760.

- Jansen, F., Yang, X., Hoelscher, M., Cattelan, A., Schmitz, T., Proebsting, S., Wenzel, D., Vosen, S., Franklin, B.S., Fleischmann, B.K., *et al.* (2013). Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* *128*, 2026-2038.
- Jin, J., Daniel, J.L., and Kunapuli, S.P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *The Journal of biological chemistry* *273*, 2030-2034.
- Jones, C.I., Barrett, N.E., Moraes, L.A., Gibbins, J.M., and Jackson, D.E. (2012). Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function. *Methods in molecular biology* *788*, 341-366.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Jr., Shvidasani, R.A., *et al.* (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* *317*, 1767-1770.
- Kaplan, Z.S., and Jackson, S.P. (2011). The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* *2011*, 51-61.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 3347-3352.
- Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* *315*, 1137-1140.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* *169*, 871-884.
- Keller, H., Rentsch, P., and Hagmann, J. (2002). Differences in cortical actin structure and dynamics document that different types of blebs are formed by distinct mechanisms. *Experimental cell research* *277*, 161-172.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52-67.
- Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J.P., Vainchenker, W., and Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* *164*, 189-195.
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & development* *23*, 1743-1748.
- Kim, H.K., Song, K.S., Chung, J.H., Lee, K.R., and Lee, S.N. (2004). Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *British journal of haematology* *124*, 376-384.

- Kim, Y., Yeo, J., Lee, J.H., Cho, J., Seo, D., Kim, J.S., and Kim, V.N. (2014). Deletion of human tarbp2 reveals cellular microRNA targets and cell-cycle function of TRBP. *Cell reports* 9, 1061-1074.
- Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal* 26, 775-783.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11, 441-450.
- Knowles, D.W., Tilley, L., Mohandas, N., and Chasis, J.A. (1997). Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12969-12974.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual review of physiology* 72, 463-493.
- Kondkar, A.A., Bray, M.S., Leal, S.M., Nagalla, S., Liu, D.J., Jin, Y., Dong, J.F., Ren, Q., Whiteheart, S.W., Shaw, C., *et al.* (2010). VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 8, 369-378.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., and Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1, 7.
- Kozaki, K., and Inazawa, J. (2012). Tumor-suppressive microRNA silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Cancer science* 103, 837-845.
- Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J.K., and Chi, D.S. (1999). Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 19, 91-104.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Krombach, F., Munzing, S., Allmeling, A.M., Gerlach, J.T., Behr, J., and Dorger, M. (1997). Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environmental health perspectives* 105 Suppl 5, 1261-1263.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30, 16-34.
- Kundu, P., Fabian, M.R., Sonenberg, N., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. (2012). HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic acids research* 40, 5088-5100.
- Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology* 19, 145-151.
- Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome research* 22, 1634-1645.

- Laffont, B., Corduan, A., Ple, H., Duchez, A.C., Cloutier, N., Boilard, E., and Provost, P. (2013a). Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* *122*, 253-261.
- Laffont, B., Corduan, A., Ple, H., Duchez, A.C., Cloutier, N., Boilard, E., and Provost, P. (2013b). Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* *122*, 253-261.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853-858.
- Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* *109*, II27-33.
- Landry, P., Plante, I., Ouellet, D.L., Perron, M.P., Rousseau, G., and Provost, P. (2009). Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature structural & molecular biology* *16*, 961-966.
- Laresche, C., Pelletier, F., Garnache-Ottou, F., Lihoreau, T., Biichle, S., Mourey, G., Saas, P., Humbert, P., Seilles, E., and Aubin, F. (2014). Increased levels of circulating microparticles are associated with increased procoagulant activity in patients with cutaneous malignant melanoma. *The Journal of investigative dermatology* *134*, 176-182.
- Lasbury, M.E., Tang, X., Durant, P.J., and Lee, C.H. (2003). Effect of transcription factor GATA-2 on phagocytic activity of alveolar macrophages from *Pneumocystis carinii*-infected hosts. *Infection and immunity* *71*, 4943-4952.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858-862.
- Lau, P.W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., and MacRae, I.J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nature structural & molecular biology* *19*, 436-440.
- Lawrie, A.S., Albanyan, A., Cardigan, R.A., Mackie, I.J., and Harrison, P. (2009). Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox sanguinis* *96*, 206-212.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boultwood, J., Wainscoat, J.S., *et al.* (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology* *141*, 672-675.
- Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *Rna* *15*, 1059-1066.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* *75*, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415-419.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO journal* *25*, 522-532.

- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* *21*, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* *23*, 4051-4060.
- Leung, A.K., Calabrese, J.M., and Sharp, P.A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 18125-18130.
- Levi, M. (2005). Platelets in sepsis. *Hematology* *10 Suppl 1*, 129-131.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* *115*, 787-798.
- Li, J., Guo, Y., Liang, X., Sun, M., Wang, G., De, W., and Wu, W. (2012). MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. *J Cancer Res Clin Oncol* *138*, 763-774.
- Li, X., Zhang, Y., Zhang, H., Liu, X., Gong, T., Li, M., Sun, L., Ji, G., Shi, Y., Han, Z., *et al.* (2011). miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* *9*, 824-833.
- Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology* *61*, 253-270.
- Lievens, D., and von Hundelshausen, P. (2011). Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* *106*, 827-838.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of cell biology* *154*, 485-490.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* *7*, 719-723.
- Lotvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzas, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., *et al.* (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* *3*, 26913.
- Loyer, X., Vion, A.C., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2014). Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circulation research* *114*, 345-353.
- Lu, D., Kalafatis, M., Mann, K.G., and Long, G.L. (1996). Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* *87*, 4708-4717.

- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* *407*, 233-241.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666-670.
- MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* *15*, 825-835.
- MacRae, I.J., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology* *14*, 934-940.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195-198.
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* *101*, 841-843.
- Maly, M.A., Tomasov, P., Hajek, P., Blasko, P., Hrachovinova, I., Salaj, P., and Veselka, J. (2007). The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* *56*, 685-695.
- Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and cellular biology* *12*, 5238-5248.
- Mantovani, A., Bussolino, F., and Introna, M. (1997). Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunology today* *18*, 231-240.
- Mantovani, A., and Dejana, E. (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunology today* *10*, 370-375.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., and Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews* *25*, 315-322.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *European journal of immunology* *37*, 14-16.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* *25*, 677-686.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Posnett, D.N., Schoenborn, M.A., Schooley, K.A., et al. (1997). The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *The Journal of clinical investigation* *99*, 1351-1360.

Marguerie, G.A., Plow, E.F., and Edgington, T.S. (1979). Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* *254*, 5357-5363.

Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., *et al.* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521-533.

Marti, E., Pantano, L., Banez-Coronel, M., Llorens, F., Minones-Moyano, E., Porta, S., Sumoy, L., Ferrer, I., and Estivill, X. (2010). A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic acids research* *38*, 7219-7235.

Mason, S.D., and Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends in cell biology* *21*, 228-237.

Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., *et al.* (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* *196*, 887-896.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* *123*, 607-620.

Maurer, M., and von Stebut, E. (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *The international journal of biochemistry & cell biology* *36*, 1882-1886.

Mause, S.F., Ritzel, E., Liehn, E.A., Hristov, M., Bidzhekov, K., Muller-Newen, G., Soehnlein, O., and Weber, C. (2010). Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* *122*, 495-506.

Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zernecke, A., Koenen, R.R., and Weber, C. (2005). Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *25*, 1512-1518.

Mause, S.F., and Weber, C. (2010). Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research* *107*, 1047-1057.

Maynard, D.M., Heijnen, H.F., Horne, M.K., White, J.G., and Gahl, W.A. (2007). Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *5*, 1945-1955.

McEver, R.P. (1991). GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *Journal of cellular biochemistry* *45*, 156-161.

McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D.F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation* *84*, 92-99.

- McEver, R.P., and Martin, M.N. (1984). A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *The Journal of biological chemistry* *259*, 9799-9804.
- McLaughlin, P.J., Gooch, J.T., Mannherz, H.G., and Weeds, A.G. (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* *364*, 685-692.
- McRedmond, J.P., Park, S.D., Reilly, D.F., Coppinger, J.A., Maguire, P.B., Shields, D.C., and Fitzgerald, D.J. (2004). Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *3*, 133-144.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews Immunology* *5*, 606-616.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* *15*, 185-197.
- Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics* *41*, 365-370.
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., *et al.* (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer cell* *26*, 707-721.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* *463*, 621-626.
- Merten, M., Pakala, R., Thiagarajan, P., and Benedict, C.R. (1999). Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* *99*, 2577-2582.
- Michelson, A.D. (2003). How platelets work: platelet function and dysfunction. *Journal of thrombosis and thrombolysis* *16*, 7-12.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology* *196*, 430-443.
- Michlewski, S., Dransfield, I., Megson, I.L., and Rossi, A.G. (2009). Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *23*, 844-854.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., *et al.* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 10513-10518.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of

microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2, 282.

Moberg, K.H., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 413, 311-316.

Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Garg, R., and Dandona, P. (2002). Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *The American journal of clinical nutrition* 75, 767-772.

Mohanty, P., Hamouda, W., Garg, R., Aljada, A., Ghanim, H., and Dandona, P. (2000). Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 2970-2973.

Momen-Heravi, F., Bala, S., Bukong, T., and Szabo, G. (2014). Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 10, 1517-1527.

Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stoltz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.

Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.

Morel, O., Hugel, B., Jesel, L., Mallat, Z., Lanza, F., Douchet, M.P., Zupan, M., Chauvin, M., Cazenave, J.P., Tedgui, A., et al. (2004). Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2, 1118-1126.

Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.M., and Toti, F. (2011). Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 15-26.

Moroi, M., Jung, S.M., Shinmyozu, K., Tomiyama, Y., Ordinas, A., and Diaz-Ricart, M. (1996). Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 88, 2081-2092.

Mouradian, M.M. (2012). MicroRNAs in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 46, 279-284.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappaport, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* 16, 720-728.

Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T., and Bassell, G.J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Molecular cell* 42, 673-688.

Muller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotzsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., Zieseniss, S., Zahler, S., Preissner, K., and Engelmann, B. (2003). Intravascular tissue factor initiates

coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 476-478.

Muller, W.A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* 24, 327-334.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 8, 618-631.

Nagalla, S., Shaw, C., Kong, X., Kondkar, A.A., Edelstein, L.C., Ma, L., Chen, J., McKnight, G.S., Lopez, J.A., Yang, L., *et al.* (2011). Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood* 117, 5189-5197.

Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V., and Ignarro, L.J. (2006). Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 15, 265-279.

Nardin, A., and Abastado, J.P. (2008). Macrophages and cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 3494-3505.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.

Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-1222.

O'Connell, D.J., Rozenvayn, N., and Flaumenhaft, R. (2005). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation. *Biochemistry* 44, 6361-6370.

Ohta, H., Wada, H., Niwa, T., Kirii, H., Iwamoto, N., Fujii, H., Saito, K., Sekikawa, K., and Seishima, M. (2005). Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 180, 11-17.

Ono, K., Kuwabara, Y., and Han, J. (2011). MicroRNAs and cardiovascular diseases. *The FEBS journal* 278, 1619-1633.

Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell* 30, 460-471.

Osman, A., and Falker, K. (2011). Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets* 22, 433-441.

Owens, A.P., 3rd, and Mackman, N. (2011). Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research* 108, 1284-1297.

Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 22, 3172-3183.

Pan, X., Wang, Z.X., and Wang, R. (2010). MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer biology & therapy* 10, 1224-1232.

Pan, Y., Liang, H., Liu, H., Li, D., Chen, X., Li, L., Zhang, C.Y., and Zen, K. (2014). Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced

glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Journal of immunology* 192, 437-446.

Park, J.B., Charbonneau, F., and Schiffrian, E.L. (2001). Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *Journal of hypertension* 19, 415-420.

Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., and Wong, D.T. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 5473-5477.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112-122.

Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13, 271-282.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.

Pepin, G., Perron, M.P., and Provost, P. (2012). Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63. *Nucleic acids research* 40, 11603-11617.

Perno, C.F., Svicher, V., Schols, D., Pollicita, M., Balzarini, J., and Aquaro, S. (2006). Therapeutic strategies towards HIV-1 infection in macrophages. *Antiviral research* 71, 293-300.

Perron, M.P., Landry, P., Plante, I., and Provost, P. (2011). Detection of human Dicer and Argonaute 2 catalytic activity. *Methods in molecular biology* 725, 121-141.

Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 185-191.

Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews* 21, 157-171.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576.

Ple, H., Landry, P., Benham, A., Coarfa, C., Gunaratne, P.H., and Provost, P. (2012a). The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PloS one* 7, e50746.

Ple, H., Maltais, M., Corduan, A., Rousseau, G., Madore, F., and Provost, P. (2012b). Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease. *Thrombosis and haemostasis* 108, 605-615.

- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews Immunology* *9*, 259-270.
- Preall, J.B., and Sontheimer, E.J. (2005). RNAi: RISC gets loaded. *Cell* *123*, 543-545.
- Prescott, S.M., McIntyre, T.M., and Zimmerman, G.A. (2001). Events at the vascular wall: the molecular basis of inflammation. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* *49*, 104-111.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., and Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *440*, 653-666.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal* *21*, 5864-5874.
- Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* *455*, 421-424.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39-51.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences* *9*, 1057-1069.
- Rak, J. (2010). Microparticles in cancer. *Seminars in thrombosis and hemostasis* *36*, 888-906.
- Rand, M.L., Wang, H., Bang, K.W., Packham, M.A., and Freedman, J. (2006). Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *4*, 1621-1623.
- Rank, A., Nieuwland, R., Crispin, A., Grutzner, S., Iberer, M., Toth, B., and Pihusch, R. (2011). Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* *22*, 111-116.
- Raponi, M., and Arndt, G.M. (2003). Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic acids research* *31*, 4481-4489.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N., and Vainchenker, W. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* *101*, 541-544.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* *20*, 1487-1495.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *The Plant cell* *11*, 1207-1216.
- Rautou, P.E., Leroyer, A.S., Ramkhelawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A.C., Nalbone, G., Castier, Y., Leseche, G., Lehoux, S., et al. (2011a). Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation research* *108*, 335-343.

- Rautou, P.E., and Mackman, N. (2012). Del-ection of microvesicles from the circulation. *Circulation* *125*, 1601-1604.
- Rautou, P.E., Vion, A.C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2011b). Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circulation research* *109*, 593-606.
- Ray, D.M., Spinelli, S.L., Pollock, S.J., Murant, T.I., O'Brien, J.J., Blumberg, N., Francis, C.W., Taubman, M.B., and Phipps, R.P. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thrombosis and haemostasis* *99*, 86-95.
- Rayner, K.J., Sheedy, F.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., Temel, R.E., Parathath, S., van Gils, J.M., Rayner, A.J., Chang, A.N., Suarez, Y., *et al.* (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* *121*, 2921-2931.
- Reape, T.J., and Groot, P.H. (1999). Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* *147*, 213-225.
- Rees, A.J. (2010). Monocyte and macrophage biology: an overview. *Seminars in nephrology* *30*, 216-233.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* *11*, 1640-1647.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901-906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development* *16*, 1616-1626.
- Rendu, F., and Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* *12*, 261-273.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H., and Verfaillie, C.M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation* *109*, 337-346.
- Rijken, D.C., Wijngaards, G., and Welbergen, J. (1980). Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood and vascular wall. *Thrombosis research* *18*, 815-830.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671-674.
- Risitano, A., Beaulieu, L.M., Vitseva, O., and Freedman, J.E. (2012). Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* *119*, 6288-6295.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic acids research* *35*, 5944-5953.

- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* 6, 3343-3353.
- Rose, S.D., Kim, D.H., Amarzguioui, M., Heidel, J.D., Collingwood, M.A., Davis, M.E., Rossi, J.J., and Behlke, M.A. (2005). Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic acids research* 33, 4140-4156.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340, 115-126.
- Rottiers, V., and Naar, A.M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 239-250.
- Rousseau, M., Belleannee, C., Duchez, A.C., Cloutier, N., Levesque, T., Jacques, F., Perron, J., Nigrovic, P.A., Dieude, M., Hebert, M.J., *et al.* (2015). Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. *PloS one* 10, e0116812.
- Rowley, J.W., Oler, A.J., Tolley, N.D., Hunter, B.N., Low, E.N., Nix, D.A., Yost, C.C., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2011). Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118, e101-111.
- Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S.L., Conover, D.O., Poncz, M., Ratajczak, J., Gaulton, G.N., and Ratajczak, M.Z. (2003). Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* 17, 33-42.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.
- Rudel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Korner, R., Hsiao, H.H., Urlaub, H., Patel, D., and Meister, G. (2011). Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic acids research* 39, 2330-2343.
- Ruggeri, Z.M. (1999). Structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and haemostasis* 82, 576-584.
- Ruggeri, Z.M. (2009). Platelet adhesion under flow. *Microcirculation* 16, 58-83.
- Ruggeri, Z.M., Bader, R., and de Marco, L. (1982). Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 6038-6041.
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology* 10, 987-993.
- Saaristo, A., Karpanen, T., and Alitalo, K. (2000). Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 19, 6122-6129.
- Sadallah, S., Amicarella, F., Eken, C., Iezzi, G., and Schifferli, J.A. (2014). Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4+T cells into T regulatory cells. *Thrombosis and haemostasis* 112,

- Sadallah, S., Eken, C., Martin, P.J., and Schifferli, J.A. (2011). Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *Journal of immunology* *186*, 6543-6552.
- Sahin, U., Lapaquette, P., Andrieux, A., Faure, G., and Dejean, A. (2014). Sumoylation of human argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability. *PloS one* *9*, e102957.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 17719-17724.
- Santoro, S.A. (1986). Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell* *46*, 913-920.
- Savage, B., Saldivar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* *84*, 289-297.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today* *14*, 131-136.
- Schaefer, A., Jung, M., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., Erbersdobler, A., and Jung, K. (2010). Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med* *42*, 749-758.
- Scheding, S., Bergmann, M., Shimosaka, A., Wolff, P., Driessen, C., Rathke, G., Jaschonek, K., Brugger, W., and Kanz, L. (2002). Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo. *Transfusion* *42*, 321-327.
- Schirle, N.T., and MacRae, I.J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science* *336*, 1037-1040.
- Schmeisser, A., Garlichs, C.D., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R.H., and Daniel, W.G. (2001). Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovascular research* *49*, 671-680.
- Schnittler, H.J. (1998). Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic research in cardiology* *93 Suppl 3*, 30-39.
- Schober, A., Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Bidzhekov, K., Gremse, F., Grommes, J., Megens, R.T., Heyll, K., Noels, H., Hristov, M., et al. (2014). MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nature medicine* *20*, 368-376.
- Schonbeck, U., and Libby, P. (2001). CD40 signaling and plaque instability. *Circulation research* *89*, 1092-1103.
- Schonrock, N., Matamales, M., Ittner, L.M., and Gotz, J. (2012). MicroRNA networks surrounding APP and amyloid-beta metabolism--implications for Alzheimer's disease. *Experimental neurology* *235*, 447-454.
- Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Herman, A.G., and Martinet, W. (2007). Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovascular research* *73*, 470-480.

- Schubert, S., Weyrich, A.S., and Rowley, J.W. (2014). A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood* *124*, 493-502.
- Schulze, H., Korpal, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., and Shivdasani, R.A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* *107*, 3868-3875.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., and Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology* *3*, 346-352.
- Sellam, J., Proulle, V., Jungel, A., Ittah, M., Miceli Richard, C., Gottenberg, J.E., Toti, F., Benessiano, J., Gay, S., Freyssinet, J.M., *et al.* (2009). Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis research & therapy* *11*, R156.
- Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr., and Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nature reviews Immunology* *11*, 264-274.
- Seyrantepe, V., Iannello, A., Liang, F., Kanshin, E., Jayanth, P., Samarani, S., Szewczuk, M.R., Ahmad, A., and Pshezhetsky, A.V. (2010). Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. *The Journal of biological chemistry* *285*, 206-215.
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y.B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S.O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W.C., Chen, C.H., *et al.* (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature* *497*, 383-387.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805-808.
- Shi, J., Pipe, S.W., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., and Gilbert, G.E. (2008). Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *6*, 1167-1174.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M.H., Wijelath, E.S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L.R., *et al.* (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* *92*, 362-367.
- Shi, T., Giannakopoulos, B., Yan, X., Yu, P., Berndt, M.C., Andrews, R.K., Rivera, J., Iverson, G.M., Cockerill, K.A., Linnik, M.D., *et al.* (2006). Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis and rheumatism* *54*, 2558-2567.
- Siedlecki, C.A., Lestini, B.J., Kottke-Marchant, K.K., Eppell, S.J., Wilson, D.L., and Marchant, R.E. (1996). Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* *88*, 2939-2950.
- Sondermeijer, B.M., Bakker, A., Halliani, A., de Ronde, M.W., Marquart, A.A., Tijsen, A.J., Mulders, T.A., Kok, M.G., Battjes, S., Maiwald, S., *et al.* (2011). Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340* and miRNA624*. *PloS one* *6*, e25946.

- Sporn, L.A., Marder, V.J., and Wagner, D.D. (1986). Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* *46*, 185-190.
- Sprague, D.L., Elzey, B.D., Crist, S.A., Waldschmidt, T.J., Jensen, R.J., and Ratliff, T.L. (2008). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* *111*, 5028-5036.
- Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., and De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. *Cell reports* *8*, 1432-1446.
- Stalder, L., Heusermann, W., Sokol, L., Trojer, D., Wirz, J., Hean, J., Fritzsche, A., Aeschimann, F., Pfanzagl, V., Basselet, P., *et al.* (2013). The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *The EMBO journal* *32*, 1115-1127.
- Starega-Roslan, J., Krol, J., Koscielska, E., Kozlowski, P., Szlachcic, W.J., Sobczak, K., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic acids research* *39*, 257-268.
- Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Mollica, J.S., Ferrell, G.L., and Esmon, C.T. (1996). The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 10212-10216.
- Steffel, J., Luscher, T.F., and Tanner, F.C. (2006). Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* *113*, 722-731.
- Stenberg, P.E., and Levin, J. (1989). Mechanisms of platelet production. *Blood cells* *15*, 23-47.
- Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J.I., Cheresh, D.A., and Johnson, R.S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* *456*, 814-818.
- Stratz, C., Nuhrenberg, T.G., Binder, H., Valina, C.M., Trenk, D., Hochholzer, W., Neumann, F.J., and Fiebich, B.L. (2012). Micro-array profiling exhibits remarkable intra-individual stability of human platelet micro-RNA. *Thrombosis and haemostasis* *107*, 634-641.
- Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* *22*, 539-550.
- Sugatani, T., and Hruska, K.A. (2007). MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *Journal of cellular biochemistry* *101*, 996-999.
- Sumpio, B.E., Riley, J.T., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* *34*, 1508-1512.
- Swanson, J.A. (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *Journal of cell science* *94* (*Pt 1*), 135-142.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* *99*, 123-132.

- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews Immunology* *10*, 36-46.
- Tabet, F., Vickers, K.C., Cuesta Torres, L.F., Wiese, C.B., Shoucri, B.M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Loureco, L., Levin, M.G., Thacker, S., et al. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature communications* *5*, 3292.
- Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., and Ozato, K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* *13*, 155-165.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., and Ramratnam, B. (2013). Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination. *PloS one* *8*, e72503.
- Tang, X., Zhang, Y., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2010). Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization. *Nucleic acids research* *38*, 6610-6619.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology* *23*, 901-944.
- Terrisse, A.D., Puech, N., Allart, S., Gourdy, P., Xuereb, J.M., Payrastre, B., and Sie, P. (2010). Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *8*, 2810-2819.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology* *2*, 569-579.
- Thon, J.N., and Italiano, J.E. (2010). Platelet formation. *Semin Hematol* *47*, 220-226.
- Tilly, R.H., Senden, J.M., Comfurius, P., Bevers, E.M., and Zwaal, R.F. (1990). Increased aminophospholipid translocase activity in human platelets during secretion. *Biochimica et biophysica acta* *1029*, 188-190.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* *306*, 1377-1380.
- Tomer, A. (2004). Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* *104*, 2722-2727.
- Tomer, A., Harker, L.A., and Burstein, S.A. (1988). Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood* *71*, 1244-1252.
- Trabucchi, M., Briata, P., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2011). KSRP Promotes the Maturation of a Group of miRNA Precursors. *Advances in experimental medicine and biology* *700*, 36-42.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews Immunology* *7*, 179-190.

- Tsukita, S., and Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *The Journal of biological chemistry* *274*, 34507-34510.
- Turchinovich, A., and Burwinkel, B. (2012). Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA biology* *9*, 1066-1075.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research* *39*, 7223-7233.
- Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research* *95*, 343-353.
- Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Dernbach, E., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2003). Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* *108*, 2511-2516.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* *9*, 654-659.
- Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inze, D., and De Veylder, L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *44*, 143-168.
- Varin, A., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* *214*, 630-641.
- Varon, D., Hayon, Y., Dashevsky, O., and Shai, E. (2012). Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration. *Thrombosis research* *130 Suppl 1*, S98-99.
- Vasina, E.M., Cauwenberghs, S., Feijge, M.A., Heemskerk, J.W., Weber, C., and Koenen, R.R. (2011). Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell death & disease* *2*, e211.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931-1934.
- Versari, D., Daghini, E., Virdis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2009). Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes care* *32 Suppl 2*, S314-321.
- Verschoor, C.P., Puchta, A., and Bowdish, D.M. (2012). The macrophage. *Methods in molecular biology* *844*, 139-156.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* *13*, 423-433.
- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R.A., Weyrich, A.S., and Zimmerman, G.A. (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in immunopathology* *34*, 5-30.

- Visser, J.W., Bauman, J.G., Mulder, A.H., Eliason, J.F., and de Leeuw, A.M. (1984). Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* *159*, 1576-1590.
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* *320*, 97-100.
- Voellenkle, C., Rooij, J., Guffanti, A., Brini, E., Fasanaro, P., Isaia, E., Croft, L., David, M., Capogrossi, M.C., Moles, A., *et al.* (2012). Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *Rna* *18*, 472-484.
- Vogel, R.A., Corretti, M.C., and Plotnick, G.D. (1997). Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *The American journal of cardiology* *79*, 350-354.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research* *38*, 7248-7259.
- Warshaw, A.L., Lester, L., and Shulman, N.R. (1967). Protein synthesis by human platelets. *The Journal of biological chemistry* *242*, 2094-2097.
- White, J.G. (1968). The substructure of human platelet microtubules. *Blood* *32*, 638-648.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
- Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N.S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langley, S.R., *et al.* (2013). Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for Platelet Activation. *Circulation research* *112*, 595-600.
- Willekens, F.L., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y.A., van den Bos, A.G., Bosman, G.J., and van Berkel, T.J. (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* *105*, 2141-2145.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* *11*, 228-234.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology* *13*, 269-288.
- Wu, H., Ye, C., Ramirez, D., and Manjunath, N. (2009). Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PloS one* *4*, e7566.
- Wu, L., Li, H., Jia, C.Y., Cheng, W., Yu, M., Peng, M., Zhu, Y., Zhao, Q., Dong, Y.W., Shao, K., *et al.* (2012). MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS letters* *586*, 1038-1043.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.D., Yartseva, V., Sestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* *155*, 1568-1580.

- Xu, J., and Zou, M.H. (2009). Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* *120*, 1266-1286.
- Xu, X., Gnatenko, D.V., Ju, J., Hitchcock, I.S., Martin, D.W., Zhu, W., and Bahou, W.F. (2012). Systematic analysis of microRNA fingerprints in thrombocythemic platelets using integrated platforms. *Blood* *120*, 3575-3585.
- Xu, Y., Sengupta, T., Kukreja, L., and Minella, A.C. (2010). MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *The Journal of biological chemistry* *285*, 34439-34446.
- Yang, J.S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell* *43*, 892-903.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* *17*, 3011-3016.
- Yuan, J.Y., Wang, F., Yu, J., Yang, G.H., Liu, X.L., and Zhang, J.W. (2009). MicroRNA-223 reversibly regulates erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Cell Mol Med* *13*, 4551-4559.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *The Biochemical journal* *294* (Pt 1), 1-14.
- Zampetaki, A., Willeit, P., Tilling, L., Drozdov, I., Prokopi, M., Renard, J.M., Mayr, A., Weger, S., Schett, G., Shah, A., et al. (2012). Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* *60*, 290-299.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* *29*, 6220-6231.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research* *32*, 4776-4785.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., and Graves, P.R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *The Biochemical journal* *413*, 429-436.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* *2*, ra81.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., et al. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* *39*, 133-144.
- Zhou, H., Arcila, M.L., Li, Z., Lee, E.J., Henzler, C., Liu, J., Rana, T.M., and Kosik, K.S. (2012). Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation. *Nucleic acids research* *40*, 5864-5875.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J.G., Luhm, R.A., Wiedmer, T., and Sims, P.J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating

transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *The Journal of biological chemistry* 272, 18240-18244.

Zhu, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Liu, J.J., Li, T.J., Yang, J.R., Zeng, C., and Zhuang, S.M. (2012). MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucleic acids research* 40, 4615-4625.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *Rna* 15, 781-793.

Zwaal, R.F., Comfurius, P., and Bevers, E.M. (1993). Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochemical Society transactions* 21, 248-253.

Zwaal, R.F., and Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121-1132.