

III. Les microparticules

1. Définition

Les MPs sont des vésicules membranaires, de taille comprise entre 0,1 et 1 μm , libérées dans l'espace extracellulaire suite à une activation ou une apoptose de la cellule. Initialement identifiées, il y a plus de 35 ans, comme de simples « poussières de cellules », ou encore des débris inertes sans fonctions spécifiques (Wolf, 1967), ces MPs suscitent de plus en plus d'intérêt depuis quelques années. En effet, plusieurs études ont démontré qu'elles seraient des biomarqueurs d'intérêt dans de nombreuses pathologies et participeraient même au développement de leur physiopathologie en tant qu'importants systèmes de transport de molécules bioactives (Mause et Weber, 2010). Cependant, il est important de bien différencier les MPs des autres vésicules extracellulaires libérées par les différentes cellules. Ces vésicules sont généralement réparties en trois catégories, exosomes, corps apoptotiques et MPs, en fonction de leur taille, leur contenu et de leur mécanisme de formation (Figure 8).

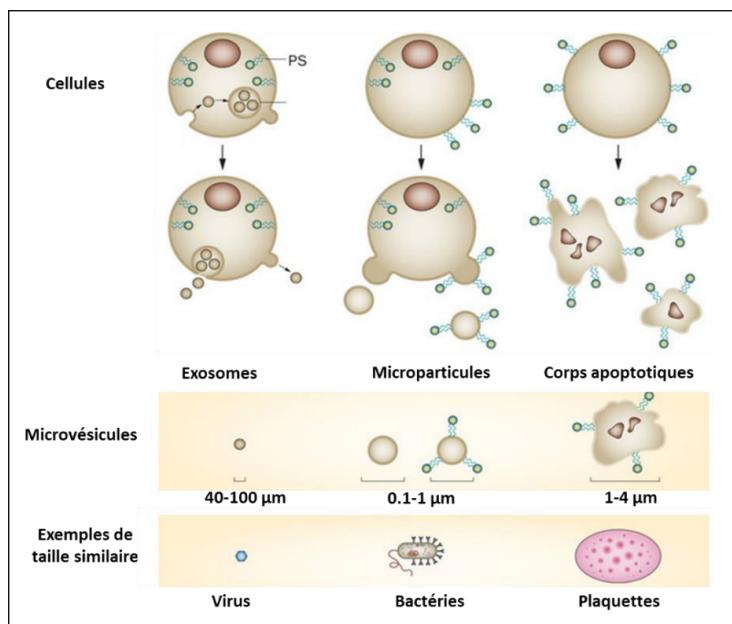


Figure 8: Taille des différents types de microvésicules libérées par les cellules
(d'après Lemoinne et al., 2014)

- **Les exosomes** : ce terme désigne les plus petites vésicules extracellulaires avec une taille comprise entre 30 et 100 nm de diamètre. Elles sont formées par bourgeonnement vers l'intérieur des membranes endosomales et sont enfermées dans des particules intracellulaires qui libèrent leur contenu par la suite dans l'environnement extracellulaire (György et al., 2011).
- **Les corps apoptotiques** : ils ont une taille comprise entre 1 et 5 µm approximativement et résultent principalement de la déformation et de la fragmentation de la cellule apoptotique. Ils peuvent être libérés par tous les types cellulaires lors des dernières étapes de l'apoptose et peuvent contenir de l'ARN et de l'ADN provenant de la fragmentation du noyau (György et al., 2011).
- **Les MPs** : elles sont identifiées comme une population hétérogène de particules phospholipidiques anucléées formées à partir des membranes cellulaires suite à des mécanismes spécifiques induisant leur libération (Diamant et al., 2004).

2. Origine des MPs

En condition normale, les MPs peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine de sujets sains dans des concentrations physiologiques. Elles peuvent être libérées par différents types cellulaires suite à des stimuli physiologiques mais sont principalement d'origine plaquettaire et, en quantité moindre, d'origine leucocytaire, endothéliale et érythrocytaire (Tushuizen et al., 2011). Ces MPs peuvent être caractérisées par l'expression membranaire d'antigènes spécifiques de leur cellule d'origine (Tableau I). Ces mêmes antigènes sont d'ailleurs utilisés pour permettre le phénotypage des MPs.

Tableau I : Quelques exemples de marqueurs antigéniques permettant de caractériser l'origine des MPs (d'après Zahra et al., 2011).

Origine cellulaire des MPs	Antigène
Cellules endothéliales	CD31 (molécule d'adhésion PECAM-1)
	CD34
	CD62E (molécule d'adhésion E-sélectine)
	CD51 (molécule d'adhésion αv intégrine)
	CD105 (endogline)
	CD144 (VE-cadhérine)
	CD146
Globules rouges	CD235a (glycophorine A)
Lymphocytes	CD45
Monocytes	CD14
Plaquettes	CD41 (GPIIb)
	CD61 (GPIIIa)

Toutefois, en conditions pathologiques, de nombreuses études ont observé une augmentation significative de leurs concentrations plasmatiques ainsi qu'un changement des proportions de chaque type cellulaire d'origine (Barteneva et al., 2013).

3. Composition des MPs

Les MPs sont formées d'une membrane cytoplasmique entourant un contenu cytosolique, tous deux originaires de la « cellule mère ». Plusieurs antigènes de surface, caractéristiques de la membrane « mère », ainsi que des constituants cytosoliques peuvent ainsi être retrouvés dans ces MPs. Toutefois, leur composition est étroitement dépendante du type cellulaire ainsi que des circonstances physio-pathologiques de leur libération.

3.1. Lipides

Les MPs possèdent une membrane formée par une bicoche de phospholipides résultant du phénomène de bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de leur cellule d'origine. Toutefois, au contraire des membranes cellulaires, ces MPs se caractérisent par un feuillet externe présentant des phospholipides chargés négativement tels que la phosphatidylsérine (PS). Ceci est principalement dû à leur mécanisme de formation impliquant un réarrangement de la membrane plasmique (voir chapitre 4 : Formation des MPs). Cette composition lipidique des MPs pourrait également jouer un important rôle dans la détermination de l'activité protéique des MPs. En effet, certains travaux ont démontré, par exemple, qu'un enrichissement en cholestérol de monocytes humains induisait la génération de MPs au potentiel fortement pro-coagulant (Liu et al., 2007).

3.2.Protéines

Les membranes des MPs contiennent des antigènes spécifiques de la cellule d'origine, mais également des molécules surexprimées ou transloquées dans la membrane suite à leur activation (Combes et al., 1999). Ces marqueurs de surface sont d'un grand intérêt lors de l'identification des MPs. Il est généralement admis que les MPs externalisent la PS ce qui en fait un bon marqueur d'identification. En effet, les microvésicules sont considérées comme des MPs si elles sont annexine V positive (l'annexine V se liant spécifiquement à la PS). Toutefois, plusieurs études ont pu identifier des MPs annexine V négative ce qui suggèrerait que ces microvésicules pourraient ne pas externaliser la PS (Connor et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par le fait que des voies de signalisation, autres que la perte de l'asymétrie membranaire, non reconnues à ce jour, seraient impliquées dans la formation des MPs (Boulanger et al., 2008). Une autre hypothèse serait que le site de liaison de la PS serait occupé par une autre protéine, empêchant ainsi l'interaction avec l'annexine V. Par exemple, la lactadhéchine présente dans le sang peut

se lier fortement à la PS limitant ainsi l'interaction avec l'annexine V lors du dosage (Dasgupta et al., 2006).

3.3.Matériel génétique

Plusieurs études ont démontré que les MPs pouvaient transporter des séquences d'ARN d'une cellule à une autre, pouvant ainsi contribuer à la « reprogrammation » phénotypique de la cellule-cible (Mause et Weber, 2010). Parmi ces ARN, les travaux les plus récents se sont particulièrement penchés sur les microARN (miR) qui sont des séquences non codantes d'une vingtaine de nucléotides intervenant dans la régulation posttranscriptionnelle de nombreux gènes d'intérêt. Ces miRs peuvent être retrouvés libres dans la circulation ou, le plus souvent, inclus dans microvésicules (MPs, exosomes et corps apoptotiques) avec toutefois les MPs comme principal vecteur de transport (Diehl et al., 2012). Ainsi, ces miRs peuvent aller réguler l'expression de gènes dans d'autres cellules, autres que leur cellule d'origine. Par exemple, il a été observé que certaines MPs pouvaient avoir des effets athéroprotecteurs grâce à leur contenu en miRs. En effet, il a été observée que des cellules HUVEC, stimulées par des forces de cisaillement ou shear stress, et enrichies en miR-143/145 pouvaient intervenir dans la régulation de gènes de cellules musculaires lisses, en coculture avec ces HUVEC, permettant ainsi la réduction de la formation de lésions athéromateuses au niveau de l'aorte de souris ApoE -/- (Hergenreider et al., 2012).

4. Formation des MPs

En conditions physiologiques, les MPs peuvent être libérées de façon spontanée en faible quantité. Toutefois, différents stimuli, tels que les forces de cisaillement, i.e. shear stress, des agonistes physiologiques, une stimulation pro-apoptotique, peuvent induire la libération des MPs en fortes concentrations (György et al., 2011). Parmi ces

stimuli, nous pouvons par exemple citer certaines cytokines inflammatoires (TNF α), des inducteurs apoptotiques (i.e. staurosporine) ou encore un stress cellulaire qui permettent de générer des MPs à partir de cellules cultivées *in vitro* (Baron et al., 2012). Les médiateurs et les mécanismes impliqués dans la libération des MPs *in vivo* restent toutefois encore mal compris.

Il est cependant admis que la formation des MPs dépende essentiellement de deux grandes étapes : 1/ le phénomène de « flip-flop », qui va permettre l'externalisation des protéines du feuillet membranaire interne, et 2/ le réarrangement du cytosquelette, qui va induire le bourgeonnement de microvésicules à partir de la membrane et la libération de microparticules (Diamant et al., 2004) (Figure 9).

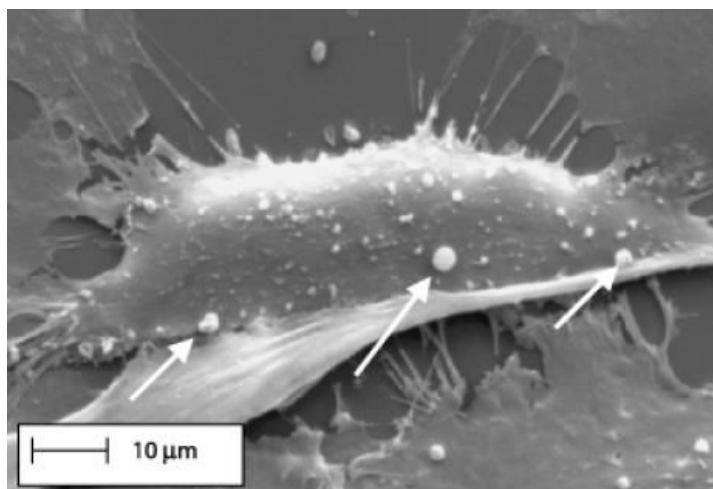


Figure 9 : Formation des MPs à la surface des cellules stimulées. Les MPs sont marquées par des flèches blanches. Cliché de microscopie électronique à balayage réalisé après stimulation par interleukine $\alpha 1$ de cultures endothéliales issues de veines ombilicales (Diamant et al., 2004).

La membrane plasmique varie d'une cellule à l'autre mais il est généralement admis que le feuillet externe se compose majoritairement de phosphatidylcholine et de sphingomyéline alors que la phosphatidyléthanolamine et la PS sont retrouvées essentiellement sur le feuillet interne. En conditions physiologiques (i.e. absence de

stimuli), la membrane externe est non chargée tandis que celle interne est chargée négativement. Le maintien de ce déséquilibre de charge se fait grâce à différentes protéines transmembranaires. La scramblase (dont l'activité est calcium-dépendante) et la floppase (protéine ATP-dépendante responsable de l'externalisation de la PS en particulier) sont inactives tandis que la flippase, dont le rôle est l'internalisation des phospholipides chargés négativement, est activée (Barteneva et al., 2013).

Dans le cas de l'activation cellulaire, la concentration cytosolique en calcium, sous forme d'ions Ca^{2+} , va rapidement augmenter. Cette augmentation aura deux effets principaux : 1/ inhibition de la flippase et augmentation de l'activité de la scramblase ce qui va perturber l'équilibre lipidique de la surface cellulaire ; et 2/ activation de la calpaine, une protéine qui va permettre de découper les filaments d'actine et détruire la taline, un constituant du cytosquelette (VanWijk et al., 2003).

Toutefois, les mécanismes de formation des MPs lors de l'activation cellulaire diffèrent de ceux retrouvés lors de l'apoptose. L'apoptose est en effet caractérisée par des contractions cellulaires, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement dynamique au niveau membranaire. Il est admis que dans le cas de l'apoptose, le bourgeonnement membranaire dépend essentiellement de l'action de la Rho-associated kinase, ROCK I, activée par les caspases, et qui est responsable du remodelage de la structure du cytosquelette (Coleman et al., 2001) (Figure 10).

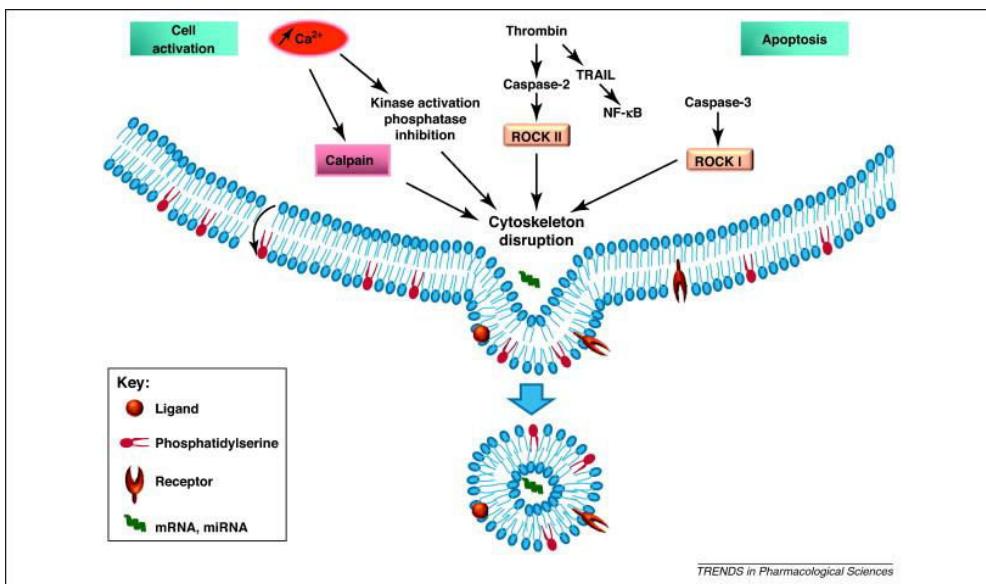


Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la formation des MPs durant l'activation cellulaire (à gauche) et l'apoptose (à droite) (Martinez et al., 2011).

5. Mode d'action des MPs

Il est admis que les MPs peuvent transférer des constituants de leur cellule d'origine vers d'autres cellules, participant ainsi à la communication intercellulaire. Différents mécanismes de transfert de l'information peuvent être observés. Les MPs peuvent transférer leurs composants membranaires ou contenu cytoplasmique aux cellules-cibles suite à une fusion membranaire ou encore par internalisation. Certains composants des MPs peuvent induire des cascades biologiques et une reprogrammation au niveau de la cellule-cible tandis que d'autres constituants de la membrane des MPs peuvent être recyclés au niveau de la membrane de la cellule-cible (Mause et Weber, 2010) (Figure 11).

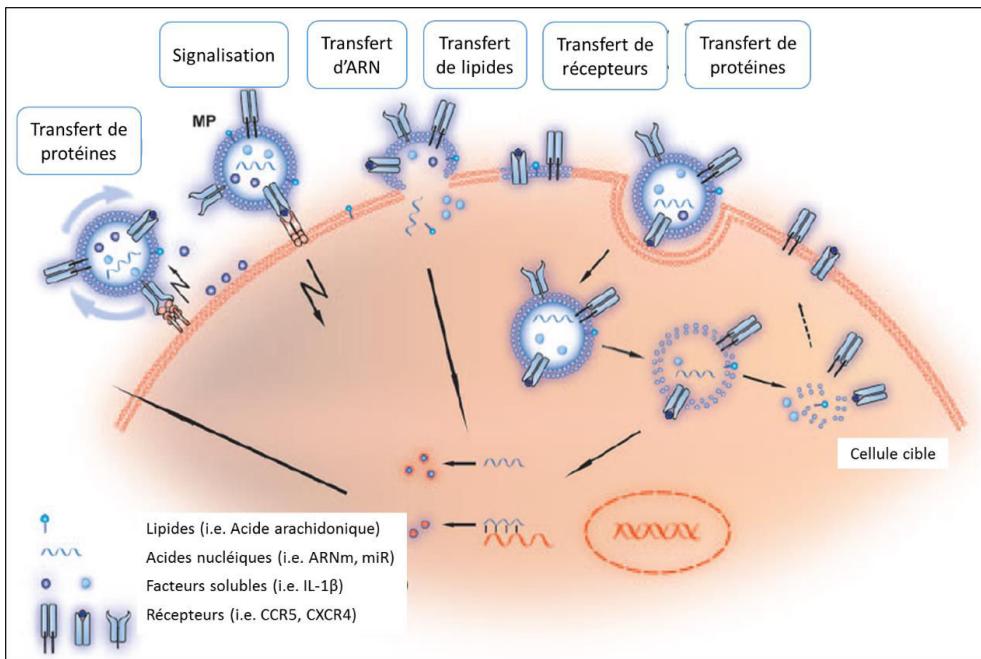


Figure 11: Les différents modes de transfert intercellulaire de l'information par les MPs (Mause and Weber, 2010)

Les MPs peuvent par exemple transférer des récepteurs membranaires vers leurs cellules-cibles leur conférant ainsi la possibilité d'effectuer de nouvelles interactions. Ceci a notamment été observé pour les récepteurs à chimiokines CCR5 (Mack et al., 2000) et CXCR4 (Rozmyslowicz et al., 2003), qui sont des récepteurs membranaires intervenant dans la pénétration cellulaire des virus, notamment celui du VIH. Par ailleurs, les MPs peuvent également transférer des protéines solubles telles que des chimiokines, des facteurs de croissances ou encore des cytokines, en fusionnant avec la membrane de la cellule-cible ou après internalisation afin de libérer leur contenu cytoplasmique. Dans ce sens, plusieurs études ont pu mettre en évidence la présence de l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 β dans les MPs provenant de cellules immunitaires activées, en quantité plus élevée dans les MPs par rapport à la fraction plasmatique dépourvue de MPs (MacKenzie et al., 2001; Pizzirani et al., 2007). Lindemann et al., ont pu observer que, pendant la formation du caillot de fibrine, les plaquettes pouvaient libérer des MPs

enrichies en IL-1 β qui interviendraient dans la surexpression des molécules d'adhésion et des chimiokines et favoriseraient l'adhésion des neutrophiles au niveau des cellules endothéliales (Lindemann et al., 2001).

Outre les protéines membranaires ou solubles, les MPs peuvent également transférer des ARN provenant de leur cellule d'origine. En effet, comme nous l'avons cité précédemment, les MPs sont l'un des principaux vecteurs de transport des miR qu'ils peuvent libérer au niveau du cytoplasme de la cellule-cible, suite à une fusion membranaire ou une internalisation (Figure 11). Ces miRs ont notamment été détecté dans les MPs de sujets sains (Hunter et al., 2008) et la variation de leurs concentrations a été associée à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité (Ortega et al., 2013), le diabète de type 2 (Guay et Regazzi, 2013) ou encore le syndrome métabolique (Karolina et al., 2012). Plusieurs études rapportent également l'implication de certains miR dans plusieurs mécanismes biologiques tels que les processus inflammatoires (Schroen et Heymans, 2012). Par exemple, miR-146a serait surexprimé *in vitro* dans des monocytes, suite à une stimulation pro-inflammatoire par les lipopolysaccharides, et interviendrait dans la régulation négative de l'expression de certaines protéines pro-inflammatoires (Taganov et al., 2006). Par ailleurs, miR-223 serait impliqué dans la régulation de la maturation et la prolifération des neutrophiles en stimulant la différenciation des précurseurs myéloïdes en granulocytes (Johnnidis et al., 2008).

De plus, certaines études ont démontré que les MPs pouvaient transférer des lipides bioactifs. Barry et al. par exemple, ont pu mettre en évidence que des MPs plaquettaires, enrichies en AA, étaient capables d'induire l'activation plaquette suite à un transfert de l'AA par les MPs (Barry et al., 1997). Ainsi, elles joueraient un rôle dans la fonction endothéliale en intervenant dans la voie des COX2 (Barry et al., 1999).

6. Implication des MPs dans les maladies cardiovasculaires

Les MPs représentent un pool de bioeffecteurs circulants qui jouent un rôle crucial dans la coagulation, l'inflammation, la fonction vasculaire et l'angiogenèse (Lovren and Verma, 2013). L'endothélium représente une des principales cibles des MPs circulantes en raison de sa localisation stratégique au niveau de la paroi vasculaire. La réponse endothéliale aux MPs peut être aigu, résultant de la libération de plusieurs facteurs, ou chronique, impliquant des changements dans l'expression de gènes impliqués dans la régulation structurelle et fonctionnelle de la paroi vasculaire (Martínez et al., 2005). Les effets des MPs sont rapportés très variables dans la littérature. Ils peuvent être bénéfiques ou délétères en fonction des stimuli de génération, de la composition et du lieu d'action de ces MPs (Lovren et Verma, 2013).

6.1. Effets délétères

Les MPs jouent un rôle dans de nombreux mécanismes délétères impliqués dans les maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont démontré que des MPs isolées de patients souffrant de diverses pathologies, telles que l'infarctus du myocarde (Boulanger et al., 2001) ou encore l'insuffisance rénale (Amabile et al., 2005), pouvaient entraîner une dysfonction endothéliale sur des anneaux d'aorte de rats *ex vivo*, en diminuant la capacité de relaxation à l'acétylcholine. Cette altération pourrait être causée par une diminution de la production de NO ou par une augmentation de l'expression de la cavéoline-1. De plus, des études ont démontré que les MPs contribuent à la production de ERO par les cellules endothéliales, *in vitro* et *in vivo* (Gambim et al., 2007; Mastronardi et al., 2011). Gambim et al. (2007) ont montré que des MPs plaquettaires, possédant une activité NADPH oxydase, pouvaient produire des peroxynitrites, ayant pour conséquence d'induire une apoptose endothéliale. Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré *in*

vitro que les MPs circulantes interviennent dans les réactions pro-inflammatoires. En effet, il a été observé que les MPs (plaquettaires et leucocytaires) contribuent au processus inflammatoire en augmentant la production d'interleukine IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales et leucocytaires (Mesri et Altieri, 1999; Nomura et al., 2001). De plus, elles peuvent induire l'adhésion des monocytes et l'expression des molécules d'adhésion, telles que les antigènes CD11a sur les monocytes et les ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Barry et al., 1998; Nomura et al., 2001). Toutefois, ces études se sont essentiellement basées sur des MPs générées *in vitro*. En effet, une étude utilisant le surnageant de plaquettes activées, contenant des MPs plaquettaires, a démontré que ces dernières n'affectaient pas l'adhésion leucocytaire *in vivo* chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}, modèle d'athérosclérose murin) et n'avaient pas d'effet sur le développement des plaques d'athérosclérose (Huo et al., 2003).

6.2. Effets bénéfiques

Plusieurs études ont rapporté que les MPs pouvaient jouer un rôle bénéfique au niveau vasculaire. Dalli et al. (2008) ont rapporté que des MPs d'origine leucocytaire pouvaient prévenir la réponse inflammatoire des leucocytes exposés aux lipopolysaccharides et induire la production de cytokines antiinflammatoires telles que TGF-β1. De plus, Köppler et al. (2006) ont montré qu'*in vitro*, des MPs pouvaient être internalisées par les monocytes et les lymphocytes B par différents mécanismes et moduler leur activation vers un profil anti-inflammatoire.

Les MPs circulantes jouent également un rôle important dans la coagulation du fait de l'exposition de la PS et du facteur tissulaire (FT) au niveau de leur membrane. Elles peuvent donc participer à la thrombose grâce à l'expression du FT et à l'interaction du ligand de la P-sélectine présent sur les MPs et de la P-sélectine des plaquettes (Falati et al., 2003). Les MPs de monocytes générées *in vitro* participent également à