



Caractérisation et fonction des microARN plaquettaires chez l'humain

**Implications dans l'insuffisance rénale chronique
et dans l'activation plaquettaire**

Thèse

Hélène Plé

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

Québec, Canada

© Hélène Plé, 2013

Résumé

Les plaquettes jouent un rôle central dans le maintien de l'hémostase et sont impliquées dans les maladies cardiovasculaires. Ces éléments sont anucléés, mais contiennent des ARN messagers (ARNm), dont la traduction pourrait être régulée par leurs microARN. Au cours de ce projet, je me suis concentrée à mieux caractériser ces microARN, afin de déterminer leur rôle dans la fonction plaquettaire.

L'étude du répertoire complet des microARN plaquettaires humains, réalisée par séquençage à haut débit, montre un profil caractérisé par la forte expression de microARN impliqués dans la différenciation cellulaire et la mégacaryopoïèse. La diversité des microARN plaquettaires est enrichie par l'expression d'isoformes décalées en 5', tel que miR-140-3p, ce qui leur confère la capacité de réguler des ARNm différents de l'isoforme principale. Beaucoup de microARN plaquettaires sont modifiés en 3', ce qui peut altérer leur stabilité et influencer leur fonction. La présence de deux nucléotidyl-transférases et l'activité d'uridylation, observées dans des extraits protéiques de plaquettes *in vitro*, démontrent la capacité des plaquettes à modifier et à réguler leurs microARN. Dans un second temps, j'ai étudié l'implication des microARN dans les défauts plaquettaires observés chez les patients urémiques, dialysés ou non. Bien que les complexes impliqués dans la biogenèse et la fonction des microARN demeurent fonctionnels, le profil des microARN plaquettaires est altéré chez les patients urémiques, et semble rétabli par la dialyse. Deux gènes ont été identifiés comme étant régulés par des microARN altérés chez les patients urémiques, suggérant que l'altération de la régulation de certains ARNm par les microARN pourrait contribuer aux défauts plaquettaires chez ces patients. Militant en faveur d'un rôle des microARN dans la traduction des ARNm plaquettaire, j'ai mis en évidence (i) l'association des complexes effecteurs Argonaute 2 (Ago2)•microARN avec les ARNm, et (ii) la régulation de certains ARNm, traduits dans les plaquettes, par des microARN abondamment retrouvés dans celles-ci. Suite à l'activation des plaquettes, ces dernières sécrètent des microARN, essentiellement dans des microparticules, à l'intérieur desquelles ils sont associés à Ago2.

Globalement, mes résultats laissent entrevoir un rôle important pour les microARN plaquettaires dans la régulation de leurs ARNm et la communication intercellulaire.

Abstract

Platelets play a central role in hemostasis and are involved in cardiovascular diseases. Devoid of a nucleus, platelets nevertheless contain messenger RNAs (mRNAs) and are capable of *de novo* protein synthesis. MicroRNAs are particularly abundant in platelets, suggesting that they may regulate mRNA translation. In this project, I characterized further the microRNA repertoire and pathway of human platelets in order to gain more insights into their role in platelet function.

High-throughput sequencing analysis of human platelet small RNAs revealed an abundant array of microRNAs involved in cell differentiation or megakaryopoiesis. The diversity of platelet microRNAs is expanded by the expression of 5' shifted isoforms, as observed with miR-140-3p that may regulate mRNAs different than the reference sequence. Most platelet microRNAs are extensively modified at their 3' extremity, a process that is thought to alter their stability and function. The detection of two nucleotidytranferases, as well as uridylation activity in platelets, demonstrate their ability to modify and regulate their microRNAs. I then studied the implication of microRNAs in the platelet defects observed in uremic patients, undergoing dialysis or not. Although the complexes involved in microRNA biogenesis and function remain functional, the platelet microRNA profile of uremic patients was altered, but seems to be restored by dialysis. The identification of two genes that are regulated by microRNAs altered in uremic patients suggests that an alteration of microRNA-based mRNA regulatory mechanisms may underlie the platelet response to uremia. Consistent with a role for microRNAs in regulating platelet mRNAs, Ago2•microRNA complexes are associated with platelet mRNAs. In addition, certain mRNAs translated in platelets can be regulated by microRNAs that are particularly abundant in platelets. Following their activation, platelets secrete microRNAs, mainly via microparticles, in which they are found associated with Ago2.

Altogether, my results suggest that platelet microRNAs may play an important role in the regulation of platelet mRNAs as well as in intercellular communications.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvii
Avant-Propos.....	xix
1. Introduction.....	1
1.1. Biogenèse et fonction des microARN.....	1
1.1.1 Découverte de la voie de l'ARN interférence et des microARN.....	1
1.1.2 Biogenèse des microARN chez l'humain.....	3
1.1.3 Fonction des microARN.....	9
1.1.4 Régulation des microARN et des complexes protéiques associés.....	19
1.1.5 Implications physiologiques et pathologiques des microARN.....	25
1.1.6 Application du séquençage à haut débit dans la découverte des microARN.....	28
1.2. Les plaquettes.....	32
1.2.1 Structure et origine des plaquettes sanguines chez l'humain.....	32
1.2.2 Rôle physiologique des plaquettes dans l'hémostase.....	37
1.2.3 Les ARN messagers plaquettaires et la traduction.....	47
1.2.4 Implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires.....	50
1.2.5 Pathologies plaquettaires associées à l'insuffisance rénale chronique.....	52
2. Objectifs.....	57
3. Résultats.....	59
3.1. The repertoire and features of human platelet microRNAs.....	59
3.1.1 Auteurs et affiliations.....	59
3.1.2 Résumé.....	59
3.1.3 Abstract.....	60
3.1.4 Introduction.....	60
3.1.5 Materials and methods.....	62
3.1.6 Results.....	65
3.1.7 Discussion.....	82
3.1.8 Supplemental information.....	87
3.2. Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease.....	97
3.2.1 Auteurs et affiliations.....	97
3.2.2 Résumé.....	97
3.2.3 Summary.....	98
3.2.4 Introduction.....	98
3.2.5 Material and methods.....	100
3.2.6 Results.....	102
3.2.7 Discussion.....	116
3.2.8 Supplementary information.....	118
3.3. Analyse des microARN et des complexes associés dans les plaquettes au repos et activées.....	129

3.3.1 Auteurs	129
3.3.2 Matériel et méthodes	129
3.3.3 Résultats	137
4. Discussion	153
4.1. Analyse des microARN par séquençage à haut débit	153
4.1.1 Analyse du profil d'expression des microARN plaquettaires	153
4.1.2 Identification de nouveaux microARN	156
4.1.3 Modifications des microARN plaquettaires	157
4.2. Altération du transcriptome plaquettaire chez les patients en insuffisance rénale chronique	159
4.2.1 Identification de gènes altérés dans les plaquettes de patients en insuffisance rénale chronique	159
4.2.2 Altération des microARN dans les plaquettes de patients urémiques	160
4.2.3 Une régulation des ARNm plaquettaires par les microARN?	162
4.3. Caractérisation des microARN et des complexes associés dans les plaquettes au repos et activées	164
4.3.1 Implication des microARN dans la régulation des ARNm plaquettaires	164
4.3.2 Rôle extracellulaire des microARN au cours de l'activation plaquettaire	165
5. Perspectives	169
5.1 Origine des microARN plaquettaires	169
5.2 Fonction des microARN à l'intérieur des plaquettes	170
5.3 Fonction extraplaquettaire des microARN	171
6. Conclusion	173
7. Bibliographie	175

Liste des tableaux

Table 1. The 15 most abundant microRNA families detected in human platelets	69
Table 2. Novel mature microRNAs derived from known microRNA precursors (pre-microRNAs).....	71
Table 3 Novel mature microRNA sequences detected in human platelets.....	72
Table 4. Characteristics, causes of renal disease and pharmacological treatments of the subjects.....	103
Table 5. Hematology and biochemistry profile of the subjects.	104
Table 6. Comparison of gene expression data obtained by microarray and qPCR	106
Tableau 7. Séquences des oligonucléotides d'ARN et d'ADN utilisés dans ce chapitre ...	132
Tableau 8 Anticorps utilisés en Western Blot.	133
Tableau 9. Localisation génomique des 20 microARN variant le plus entre les plaquettes au repos et activées.	142
Tableau 10. Localisation génomique des 20 microARN variant le plus chez les individus dont les plaquettes sont hyper- ou hyporéactives à l'épinéphrine.	143
Tableau 11. Liste des pré-microARN présents sur les 2 regroupements (<i>clusters</i>) du chromosome 14.....	145
Supplementary Table S1. Platelet messenger RNA (mRNA) targets of the two main isoforms of miR-140-3p.....	94
Supplementary Table S2. The 50 most abundant microRNAs detected in human platelets by high-throughput sequencing.	95
Supplementary Table S3. PCR primer sequences and annealing temperatures	126

Liste des figures

Figure 1. La voie classique de biogenèse des microARN.	5
Figure 2. Voies alternatives de biogenèse des microARN.	8
Figure 3. Structure du complexe Ago2•miR-20a.	10
Figure 4. Formation du complexe miRNP mature.	12
Figure 5. Mécanisme d'interaction entre le microARN et son site de liaison.	14
Figure 6. Mécanismes de régulation des ARNm par les complexes miRNP.	18
Figure 7. De la différenciation des cellules souches à la production de plaquettes.	33
Figure 8. Morphologie des plaquettes sanguines humaines.	36
Figure 9. Récepteurs et voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire.	40
Figure 10. La cascade de coagulation.	44
Figure 11. The small RNA profile of human platelets.	67
Figure 12. The annotated microRNA profile of human platelets.	68
Figure 13. Post-transcriptional modifications of platelet microRNAs.	75
Figure 14. Platelets possess microRNA terminal nucleotidyltransferase activity.	76
Figure 15. Detection of multiple microRNA isoforms in human platelets.	79
Figure 16. Redirection of platelet miR-140-3p targeting upon a 1-nt shift of the 5' cleavage site.	81
Figure 17. Differential platelet mRNA profile of uremic and dialysis patients.	105
Figure 18. qPCR analyses of selected platelet mRNA expression levels in uremic and dialysis patients.	107
Figure 19. Differential platelet microRNA profile of uremic and dialysis patients.	108
Figure 20. The level of some platelet mRNAs is corrected by dialysis.	111
Figure 21. Platelet PCTP mRNA, whose levels are corrected by dialysis, is regulated by hsa-miR-599.	113
Figure 22. WDR1 protein expression, which is involved in uremic platelet defects, is subjected to microRNA regulation.	115
Figure 23. Association des complexes Ago2•microARN avec les ARNm plaquettaires.	139
Figure 24. Régulation d'ARNm traduits dans les plaquettes par des microARN.	140
Figure 25. Analyse du profil de microARN plaquettaires au cours de l'activation.	145
Figure 26. Détection des pri- et pré-microARN inclus dans les 2 regroupements (<i>clusters</i>) du chromosome 14 dans les plaquettes.	147
Figure 27. Analyse des microparticules et des microARN sécrétés par les plaquettes activées.	149
Figure 28. Devenir des complexes associés aux microARN suite à l'activation plaquettaire.	150
Supplementary Figure S1. Flowchart applied for the discovery of novel platelet microRNAs.	89
Supplementary Figure S2. Correlation of the number of reads obtained for each microRNA sequences detected in Pool 1 and Pool 2.	90
Supplementary Figure S3. Expression of 4 selected novel platelet microRNAs was confirmed by qPCR analyses.	91
Supplementary Figure S4. Validation of selected novel platelet microRNAs by Northern blot hybridization.	92

Supplementary Figure S5. Both the miR-140-3p reference sequence and its 1-nt 5' shifted isomiR can silence Rluc reporter gene activity.	93
Supplementary Figure S6. Analysis of platelet microRNA biosynthesis in uremic and dialysis patients.	127
Supplementary Figure S7. Analysis of platelet microRNA function in uremic and dialysis patients.	128

Liste des abréviations

3'UTR	<i>3' untranslated region</i> (région non codante en 3' d'un ARNm)
5'UTR	<i>5' untranslated region</i> (région non codante en 5' d'un ARNm)
A	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARE	<i>A-U-rich element</i> (motif riche en A et U)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNi	ARN interférence
ARNdb	ARN double brin
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
C	cytosine
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DMS	<i>demarcation membrane system</i> (système de démarcation membranaire)
dT	(désoxy)thymidine
DTS	<i>dense tubular system</i> (système tubulaire dense)
eGFR	<i>estimated glomerular filtration rate</i> (estimation du taux de filtration glomérulaire)
G	guanosine
GTP	guanosine triphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (tri cellulaire par cytofluorométrie)
HSC	<i>hematopoïetic stem cells</i> (cellules souches hématopoïétiques)
HTS	<i>high throughput sequencing</i> (séquençage à haut débit)
IP	immunoprécipitation
IgG	immunoglobuline G
miRNP	complexe RNP comprenant un microARN mature
MK	<i>megakaryocyte</i> (mégacaryocyte)
MP	microparticules
NB	<i>northern blot</i>
nt	nucléotides
OCS	<i>open canalicular system</i> (système canaliculaire ouvert)
<i>p-bodies</i>	<i>processing bodies</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)

pb	paires de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérase en chaîne)
PLT	<i>platelets</i> (plaquettes)
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i> (leucocytes polymorphonucléaires, neutrophiles)
poly(A)	polyadénylé
pri-microARN	microARN primaire
pré-microARN	précurseur de microARN
pré-miRNP	complexe RNP contenant un pré-microARN
qPCR	<i>quantitative PCR</i> (PCR semi-quantitative)
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RLS	<i>releasate</i> (produits libérés par les plaquettes)
RNase	ribonucléase
RNP	ribonucléoprotéique
RT-PCR	<i>reverse-transcription PCR</i> (réaction PCR de transcription inversée)
siARN	<i>small interfering RNA</i>
SN	surageant
Thr	thrombine
TXA ₂	thromboxane A ₂
U	uridine
WB	<i>western blot</i>

*Ever tried. Ever failed. No matter. Try again.
Fail again. Fail better.*

Samuel Beckett

Remerciements

Cette thèse de doctorat représente l'aboutissement de quatre années d'études. Le doctorat est un travail de longue haleine, un projet à la fois personnel, mais qui n'aurait pu être mené à bien sans l'aide et le soutien de nombreux collaborateurs et proches.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Patrick Provost de m'avoir acceptée dans son laboratoire, et m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je tiens à lui exprimer ici ma gratitude pour son accompagnement et ses conseils tout au long de ces quatre années, au cours desquelles j'ai beaucoup appris.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, qui m'ont aidée, conseillée et encouragée tout au long de ce projet. Je tiens à remercier en premier lieu Patricia pour tout ce qu'elle m'a appris et pour la patience infinie avec laquelle elle a toujours répondu à mes questions. Merci aussi à Aurélie et à Benoit, avec lesquels j'ai eu grand plaisir à collaborer et à partager nos expériences. Je tiens aussi à remercier Geneviève pour ses conseils et ses encouragements, ainsi que pour toutes nos discussions scientifiques et non scientifiques. Sa motivation et son enthousiasme m'ont beaucoup aidée. Merci aussi à Raphaël pour sa bonne humeur communicative. Je vous souhaite à tous plein de réussite dans vos projets.

Merci à la Dre Preethi Gunaratne et son équipe pour leur collaboration ainsi qu'aux Drs Guy Rousseau et François Madore, et à Manon Maltais, qui m'ont accueilli chaleureusement à Montréal, et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

Ce doctorat a été l'occasion pour moi de faire de très nombreuses rencontres et de créer de solides liens d'amitié. Je tiens particulièrement à remercier Pompom, Coincoin, Tania, Simon et Patrick pour leur amitié, et tout le bon temps que j'ai eu avec eux.

Enfin, merci à mes parents qui, malgré la distance, ont toujours été présents pour moi et m'ont encouragée dans mes projets. Je les remercie aussi pour la relecture attentive de cette thèse.

Avant-Propos

Les résultats présentés dans cette thèse ont fait l'objet de deux publications, et une troisième partie n'a pas été publiée pour le moment. Ces résultats ont été obtenus grâce à la collaboration de tous les auteurs cités, dont le rôle est précisé à l'intérieur de cette section.

The repertoire and features of human platelet microRNAs

Hélène Plé :

- Analyse des données
- Mise en place et réalisation des expériences complémentaires au séquençage
- Réalisation des figures
- Rédaction du manuscrit

Ashley Benham et Cristian Coarfa :

- Préparation et séquençage de la librairie
- Analyse des séquences : alignement sur les bases de données, identification des nouveaux microARN

Patricia Landry :

- Purification des plaquettes et extraction des ARN plaquettaires
- Détection par qPCR des nouveaux microARN
- Analyse préliminaire des données

Preethi Gunaratne :

- Supervision du séquençage et de l'analyse bioinformatique
- Correction du manuscrit

Patrick Provost :

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

Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease

Hélène Plé

- Planification et réalisation des expériences
- Réalisation des figures
- Rédaction du manuscrit

Manon Maltais

- Recrutement et prélèvement des donneurs
- Collection des données sur les donneurs

Aurélie Corduan

- Révision et analyse des données des expériences de gènes rapporteurs

Guy Rousseau et François Madore

- Supervision et planification des expériences à Montréal
- Correction du manuscrit

Patrick Provost

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

Analyse des microARN et des complexes associés dans les plaquettes au repos et activées

Hélène Plé

- Réalisation et analyse des expériences ainsi que des figures

Benoit Laffont

- Mise au point de la purification des microparticules.
- Réalisation des expériences de qPCR sur l'ARN isolé de microparticules et de surnageant de plaquettes stimulées à la thrombine

Patricia Landry

- Mise au point et détection d'ARNm par analyses PCR sur l'ARN isolé d'immunoprécipitats anti-Ago2

Nathalie Cloutier

- Compte des microparticules plaquettaires par FACS

Patrick Provost

- Supervision globale et coordination

1. Introduction

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse était de caractériser et de mieux comprendre la fonction des microARN dans les plaquettes sanguines humaines. Dans une première partie, je détaillerai donc la biogenèse et la fonction des microARN. La deuxième partie portera sur les plaquettes sanguines humaines : leur origine, leurs caractéristiques, leur fonction, ainsi que leur implication dans différentes pathologies seront détaillées. L'implication des plaquettes dans les complications associées à l'insuffisance rénale chronique sera plus particulièrement développée, puisqu'une étude réalisée sur le transcriptome plaquettaire de ces patients a été réalisée et publiée au cours de ce projet de doctorat.

1.1. Biogenèse et fonction des microARN

1.1.1 Découverte de la voie de l'ARN interférence et des microARN

Le mécanisme de l'interférence à l'ARN (ARNi), ou *RNA interference*, est le mécanisme par lequel un gène est réprimé post-transcriptionnellement par un ARN double brin (ARNdb) de manière spécifique à la séquence. L'ARN messager (ARNm) et le brin complémentaire s'apparient dans un complexe ribonucléoprotéique (RNP) au sein duquel l'ARNm est clivé puis dégradé, inhibant ainsi l'expression du gène de manière post-transcriptionnelle. Le phénomène d'ARNi a d'abord été décrit chez le vers *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Fire et al., 1998), où l'introduction de longs ARNdb induit la répression spécifique du gène de séquence identique. Les longs ARNdb ne permettent pas de réprimer de manière séquence spécifique les ARNm dans la plupart des cellules de mammifères, du fait de la réponse antivirale, appelée réponse à l'interféron, que ceux-ci déclenchent. En effet, 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 eIF2- α , aboutissant à la diminution générale de la traduction, indépendamment de la séquence introduite (Manche et al., 1992). Les travaux effectués à l'aide d'extraits de cellules d'insectes (drosophile) *in vitro* ont permis un avancement majeur dans la compréhension et l'utilisation du mécanisme de l'ARNi; ces longs ARNdb sont, au préalable, clivés en intermédiaires de 21-22 nucléotides (nt) par une ribonucléase de type

III (RNase III), afin de pouvoir réprimer l'ARNm cible (Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000). À partir de ces observations, les mêmes auteurs démontrent que le mécanisme d'ARNi est aussi très efficace chez les cellules de mammifères en utilisant des duplex de 21 nt (Elbashir et al., 2001a). Les duplex introduits, appelés *small interfering RNA* (siARN), possèdent des extrémités protubérantes de 2 nt en 3', similaires aux produits de clivage d'une RNase III, comme observé dans les travaux sur la drosophile (Elbashir et al., 2001b).

L'utilisation du mécanisme d'ARNi par des siARN a ouvert de grandes opportunités tant au niveau de la recherche, notamment sur les protéines dont la fonction est inconnue, qu'à son utilisation thérapeutique potentielle. Au-delà de ces opportunités, la compréhension du phénomène d'ARNi ainsi que sa fonction au sein des cellules sont deux questions majeures qui ont été énormément étudiées à la suite de ces travaux. Divers rôles du mécanisme d'ARNi 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 vers (Tabara et al., 1999). Par ailleurs, l'hypothèse de l'existence de petits ARN endogènes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes via le mécanisme de l'ARNi a été très rapidement formulée.

Le premier petit ARN endogène régulateur à avoir été identifié est en réalité antérieur à la découverte du mécanisme de l'ARNi et provient des travaux du groupe de Victor Ambros chez *C. elegans* (Lee et al., 1993). En effet, ces derniers mirent en évidence que le gène *lin-4*, impliqué dans la transition entre les deux premiers stades larvaires du ver, produit un petit ARN de 22 nt, à partir d'un précurseur de 61 nt, 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. Sept ans plus tard, le groupe de Craig Mello mettait en évidence la présence d'un deuxième petit ARN régulateur *let-7*, cette fois-ci impliqué dans la transition au stade adulte de *C. elegans* (Reinhart et al., 2000). Ils démontrèrent que ce petit ARN possède des sites de liaison dans la région 3'UTR de plusieurs ARNm, et était notamment capable de réguler négativement l'expression du gène *lin-41*. La très forte conservation de *let-7* a permis de déduire la présence de cette nouvelle classe de petits ARN, par la suite appelés microARN, chez la quasi-totalité des métazoaires, incluant l'Homme (Pasquinelli et al., 2000). Ces travaux ont

ouvert la voie à la recherche active de ces petits ARN régulateurs non-codant, aboutissant à la découverte de nombreux microARN en quelques années, que ce soit chez *C. elegans*, la drosophile ou chez les mammifères, démontrant ainsi que les microARN constituent une large classe de petits ARN régulateurs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Parallèlement à ces travaux, les microARN 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'ARNi initialement appelé *quelling* (Raponi and Arndt, 2003; Romano and Macino, 1992). Cependant, les siARN sont majoritairement retrouvés dans ces espèces, bien que quelques exemples d'ARN dont l'origine et le fonctionnement sont similaires aux microARN ont pu être identifiés récemment (Lee et al., 2010; Zhou et al., 2012). Outre les eucaryotes, l'expression de microARN encodés par des virus a, elle aussi, été mise en évidence (Pfeffer et al., 2004). La mise au point de techniques de séquençage à haut débit adaptées aux petits ARN a par la suite accéléré de manière exponentielle la découverte de microARN. À ce jour, 2042 séquences de microARN matures sont répertoriées chez l'humain, 1281 chez la souris, 426 chez la drosophile *D. melanogaster*, 368 chez le ver *C. elegans* (base de donnée miRBase , Release 19, Août 2012; <http://www.mirbase.org/>). De par le nombre de microARN découverts à ce jour, jumelé à leur capacité à réguler de multiples gènes, on estime qu'environ 60 % des gènes sont sous le contrôle des microARN chez les mammifères (Friedman et al., 2009). Ceux-ci sont de ce fait impliqués dans la quasi-totalité des processus physiologiques cellulaires.

1.1.2 Biogenèse des microARN chez l'humain

Parallèlement à la découverte des microARN et du mécanisme d'ARNi, les complexes protéiques impliqués dans la biogenèse et la fonction régulatrice de ces microARN, ainsi que des siARN, ont été mis en évidence. Dans ce chapitre, les mécanismes de biogenèse des microARN seront détaillés. Bien que les protéines impliquées soient conservées entre de nombreuses espèces, le nombre de ces orthologues ainsi que leurs noms diffèrent d'une espèce à l'autre. Aussi, dans un souci de clarté, je présenterai les complexes de biogenèse et les complexes effecteurs impliqués dans la voie des microARN chez l'Homme et les mammifères.

1.1.2.1 La voie classique

Les microARN matures sont constitués d'une vingtaine de nucléotides. Cependant, ils proviennent de transcrits beaucoup plus longs, qui subissent plusieurs étapes de maturation avant de pouvoir être incorporés au sein d'un complexe effecteur.

1.1.2.1.1 Transcription des gènes de microARN en microARN primaires (pri-microARN)

Les microARN primaires (pri-microARN) sont des longs ARN de différentes origines pouvant atteindre plusieurs milliers de pb. Certains sont transcrits à partir de gènes spécifiques d'ARN non-codants. Ces transcrits englobent souvent plusieurs microARN dans un même regroupement, ou *cluster*. Dans la grande majorité des cas, ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et possèdent les caractéristiques des transcrits produits par cette enzyme, à savoir une coiffe 7-méthyl-guanosine en 5' et une queue polyadénylée (poly(A)) en 3' (Cai et al., 2004). Ces gènes de microARN sont régulés par des facteurs de transcriptions, de manière similaire aux gènes codant pour des ARNm. Cependant, beaucoup de microARN primaires, voire une majorité, proviennent d'introns de gènes codant pour une protéine. Ces microARN peuvent donc être co-transcrits avec leur gène hôte (Rodriguez et al., 2004). Cependant, certains microARN introniques possèdent leur propre promoteur à l'intérieur de l'intron, permettant une transcription indépendante de leur gène hôte (Ozsolak et al., 2008). Qu'ils soient d'origine intronique ou non, les pri-microARN subissent un processus de maturation similaire, indépendant des complexes impliqués dans l'épissage (Kim and Kim, 2007).

1.1.2.1.2 Maturation des microARN primaires par le Microprocesseur

Tel qu'illustré à la **Figure 1**, les microARN primaires vont subir deux étapes de maturation successives avant que les microARN matures puissent être incorporés au sein des complexes effecteurs. Ces microARN primaires 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 microARN primaire sont reconnues par le complexe nucléaire appelé Microprocesseur, ou *Microprocessor*, qui réalise la première étape de maturation des microARN. Ce complexe est formé de la RNase III Droscha et de son cofacteur *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8). Le cofacteur DGCR8 contient deux domaines de liaisons à l'ARNdb qui permettent son association avec le pri-

microARN. L'association de DGCR8 est essentielle, puisqu'elle permet le positionnement correct de Drosha, afin que celle-ci clive le pri-microARN à environ 11 nt de la base de sa tige (Han et al., 2006). Cette première étape de maturation aboutit à la production d'un microARN précurseur (pré-microARN) de ~60-70 nt caractérisé par une structure en épingle à cheveux, ou *hairpin*, 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 complexe Exportin-5•Ran-GTP qui s'associe avec le pré-microARN afin de le transporter vers le cytoplasme (Yi et al., 2003), où ils vont subir une deuxième étape de maturation.

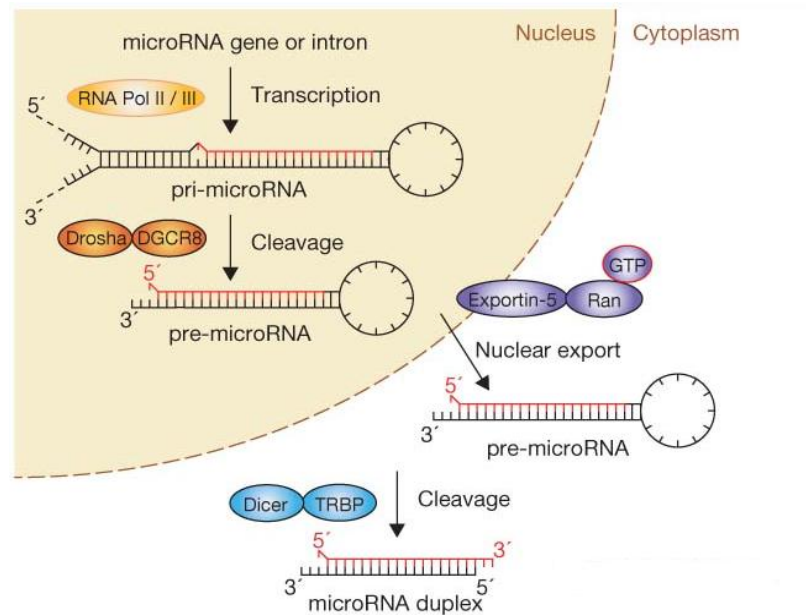


Figure 1. La voie classique de biogenèse des microARN.

Avant d'être incorporés dans un complexe effecteur, les microARN subissent deux étapes successives de maturation. Les pri-microARN sont d'abord clivés en pré-microARN par le complexe Microprocesseur composé de Drosha et DGCR8, puis exportés vers le cytoplasme par le complexe Exportin5•Ran-GTP. Dans le cytoplasme, les pré-microARN sont clivés par le complexe formé de Dicer et un de ses cofacteurs, générant ainsi un duplex de microARN matures d'une vingtaine de nucléotides. Illustration adaptée de Nature Cell Biology, (Winter et al., 2009), Copyright © 2009, avec la permission de Macmillan Publishers Ltd.

1.1.2.1.3 Maturation des pré-microARN par le complexe Dicer•TRBP

Suite à son export, le pré-microARN est incorporé dans un deuxième complexe de maturation, composé de la RNase III Dicer et de son cofacteur *TAR (HIV-1) RNA binding protein 2* (TRBP), qui réalise le clivage du pré-microARN à la base de sa boucle (Chendrimada, 2005; Yi et al., 2003). Cette deuxième étape de maturation mène à la formation d'un duplex composé de deux microARN matures partiellement complémentaires, et possédant des extrémités 3' protubérantes de 2 nt, caractéristiques du clivage par les RNase III Drosha et Dicer. La *protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator* (PACT), une protéine pouvant également lier les ARNdb, a été identifiée comme un autre cofacteur de la RNase III Dicer (Lee et al., 2006).

La structure de la protéine Dicer a été initialement déterminée chez le protozoaire *Giardia intestinalis* (MacRae et al., 2007; MacRae et al., 2006). Ces études ont mis en évidence que le domaine PAZ lie l'extrémité 3' débordante de 2 nt du pré-microARN. La distance entre ce domaine PAZ et le cœur catalytique, formé par dimérisation des 2 domaines RNase, permet de définir la localisation du site de clivage, à environ 25 nt chez le protozoaire. Plus récemment, les études réalisées sur la protéine Dicer humaine par microscopie électronique ont mis en évidence les différences structurales entre les protéines Dicer du protozoaire et humaine (Lau et al., 2012). En effet, 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 nt de l'extrémité 3' du pré-microARN chez l'humain et les métazoaires supérieurs. Ces études structurales ont de plus permis d'observer le positionnement des trois domaines hélicase de Dicer, absents chez le protozoaire, liant la boucle du pré-microARN. Bien que Dicer soit capable de cliver les pré-microARN en absence de ses cofacteurs, la déplétion par ARNi des niveaux de TRBP et PACT altère les niveaux de microARN matures endogènes (Koscianska et al., 2011). Ces cofacteurs possèdent plusieurs domaines de liaison à l'ARNdb et lient le précurseur à l'intérieur du complexe. Ils possèdent par ailleurs un domaine d'interaction situé à leur extrémité carboxylique (C-terminale) permettant leur association à Dicer. Ces cofacteurs influencent la cinétique de clivage des précurseurs en accélérant généralement leur maturation, comme il a pu être démontré pour les complexes Dicer•TRBP *in vitro* (Chakravarthy et al., 2010). En effet, TRBP augmente l'affinité de Dicer pour son substrat et pourrait aussi faciliter la

libération du duplex résultant du clivage du pré-microARN (Chakravarthy et al., 2010; Lee and Doudna, 2012). De plus, la présence de ces cofacteurs influence la localisation du site de clivage permettant ainsi soit la production de différentes isoformes, ou au contraire augmentant la précision du site de clivage (Fukunaga et al., 2012; Lee and Doudna, 2012). Enfin, TRBP stabiliserait l'interaction du complexe de maturation avec les protéines effectrices Argonautes, facilitant ainsi le transfert du duplex au sein de ces protéines à l'intérieur du *Risc Loading Complex* (RLC) et permettant aussi l'orientation du duplex pour le choix du brin guide (Noland et al., 2011).

1.1.2.2 Les voies alternatives

Consécutivement à la découverte de la voie canonique de biogenèse des microARN, d'autres voies alternatives, indépendantes du Microprocesseur ou du complexe de maturation, ont été découvertes. Ces différentes voies alternatives sont résumées à l'intérieur de la **Figure 2**.

Parmi les microARN dont la biogenèse est indépendante du Microprocesseur, on retrouve notamment les Mirtrons, qui dérivent d'introns très courts et dont la taille correspond à celle d'un pré-microARN. Une fois l'intron épissé et libéré de sa structure en lasso par une enzyme de débranchement, ceux-ci peuvent directement être envoyés au complexe de maturation Dicer•TRBP (Berezikov et al., 2007). En plus de ces Mirtrons conventionnels, d'autres Mirtrons, possédant une longue queue en 5' ou en 3', ont été découverts récemment chez l'humain et la souris. Leur biogenèse est indépendante du Microprocesseur, mais dépendante, elle aussi, des enzymes de l'épissage, et d'autres exonucléases permettant de dégrader leur queue en 5' ou en 3' (Ladewig et al., 2012). Par ailleurs, certains ARN non-codants structurés (ARN de transfert, ribosomaux, nucléolaires...) peuvent aussi être clivés de manière à produire des microARN fonctionnels, indépendamment du Microprocesseur (Yang and Lai, 2011).

Un seul exemple de microARN dont la biogenèse est indépendante de Dicer a été mis en évidence à ce jour. Il s'agit du microARN miR-451, dont 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 est caractérisé par une tige de 17 nt, trop courte pour être clivée par Dicer, et dont l'appariement est quasiment parfait. Le pré-microARN est par conséquent directement incorporé au sein de la protéine effectrice Argonaute 2 (Ago2), qui

possède un domaine endonucléase fonctionnel responsable de son clivage (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Yang et al., 2010). Ago2 clive au centre du brin 3', générant un ARN de 30-nt qui subit ensuite une résection de son extrémité 5' pour donner naissance au microARN mature fonctionnel.

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

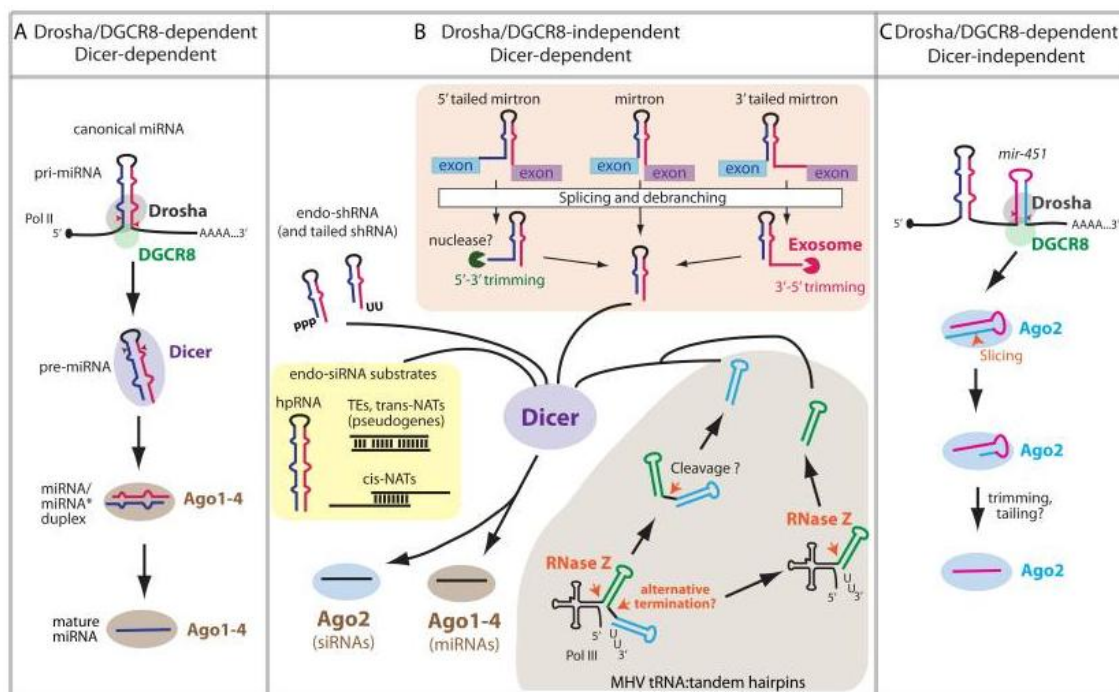


Figure 2. Voies alternatives de biogenèse des microARN.

Les voies de biogenèse des microARN canoniques (A), indépendantes de Drosha•DGCR8 (B) et indépendantes de Dicer (C) sont illustrées. De plus en plus de voies alternatives indépendantes du complexe du Microprocesseur sont rapportées, reflétant la diversité des voies et des ARN donnant naissance à une structure d'ARN double-brin pouvant être utilisée par Dicer pour générer des microARN matures. À l'opposé, peu de voies indépendantes de Dicer sont connues à ce jour. Illustration tirée de (Yang and Lai, 2011), Copyright © 2011, avec la permission de Elsevier.

1.1.3 Fonction des microARN

Suite à la production des duplex de microARN matures par Dicer, ceux-ci vont pouvoir être incorporés dans des complexes effecteurs et exercer leur régulation post-transcriptionnelle. Au cours de cette section, les mécanismes de formation des complexes effecteurs, ainsi que leurs mécanismes d'action vont être détaillés.

1.1.3.1 Le complexe effecteur Ago•microARN

Le complexe effecteur des microARN est un complexe ribonucléoprotéique, appelé miRNP. Il est composé minimalement d'une protéine Argonaute (Ago) associée à un microARN mature (Mourelatos et al., 2002). Selon les espèces, le nombre de protéines de la famille Argonaute varie. Chez l'Homme et les mammifères, on en dénombre 4, appelées Ago1-4 (Sasaki et al., 2003). Parmi elles, Ago2 se démarque par la présence d'un domaine endonucléase fonctionnel, contrairement aux autres protéines Ago (Meister et al., 2004b). Grâce à ce domaine fonctionnel, les complexes composés de la protéine Ago2 et du brin guide d'un siARN clivent les ARNm cibles parfaitement complémentaires. Ce complexe est appelé *RNA Interference Silencing Complex* (RISC). Ainsi, Ago2 est à la fois impliqué dans la voie ARNi endogène et exogène, ainsi que dans la biogenèse de miR-451, ce qui en fait la protéine Ago la plus étudiée actuellement.

1.1.3.1.1 Structure du complexe Ago•microARN

La structure de la protéine humaine Ago2 en complexe avec miR-20a a été récemment déterminée (**Figure 3**), révélant ainsi la conformation des différents domaines qui permettent l'ancrage du microARN ainsi que le positionnement du domaine PIWI de type RNase H responsable de l'activité endonucléolytique de la protéine (Elkayam et al., 2012; Schirle and MacRae, 2012). Ces travaux illustrent comment 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 hydroxyl du squelette de riboses et non les bases azotées qui sont en contact avec la protéine, ce qui explique que l'interaction entre les microARN et la protéine Ago2 soit indépendante de la séquence du microARN (Ma et al., 2005).

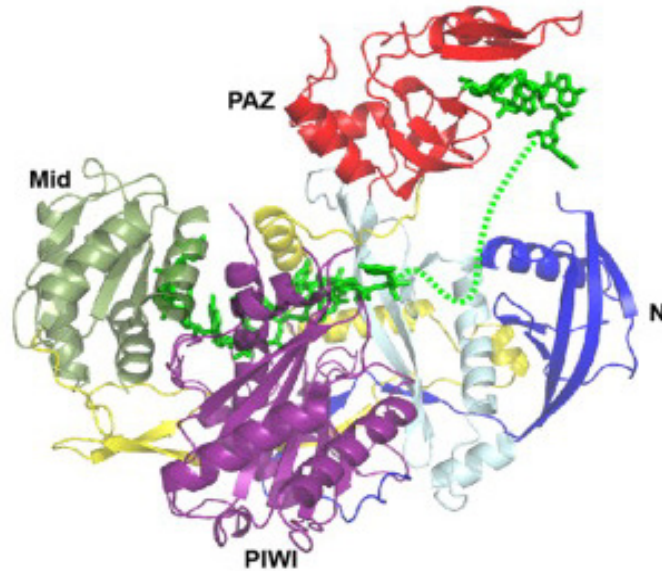


Figure 3. Structure du complexe Ago2•miR-20a.

Le microARN (en vert) est ancré dans le domaine MID via son extrémité 5' phosphate, alors que l'extrémité 3' interagit avec le domaine PAZ de la protéine humaine Ago2. Situé en face du centre du microARN, le domaine PIWI possède une activité endonucléolytique qui lui permet de cliver l'ARNm parfaitement complémentaire (cas des siARN) ou de cliver le précurseur de miR-451. Ago2 est la seule protéine Ago humaine dont le domaine catalytique est fonctionnel. Illustration tirée de (Elkayam et al., 2012), Copyright © 2012, avec la permission de *Elsevier*.

1.1.3.1.2 Une fonction redondante des protéines Ago?

Chez certaines espèces, une spécificité de substrat ainsi que de fonction a pu être démontrée pour chacune des protéines Argonaute. C'est le cas notamment chez la drosophile : dAgo1 lie spécifiquement les microARN dans un complexe réprimant les ARNm par complémentarité partielle, alors que dAgo2 lie les siARN (issus de longs ARNdb endogènes) et réalise le clivage endonucléolytique des ARNm parfaitement complémentaires (Förstemann et al., 2007). Ceci ne semble pas être le cas chez l'homme, où la majorité des microARN s'associent indifféremment avec l'une ou l'autre des protéines Argonaute et semblent avoir des fonctions redondantes (Burroughs et al., 2011; Dueck et al., 2012). Cependant, l'expression de chacune des protéines Ago peut différer d'un tissu à l'autre, et notamment Ago3 et Ago4 qui semblent plus spécialement exprimées dans les cellules germinales (González-González et al., 2008). Par ailleurs, quelques

spécificités de fonction commencent à être mises à jour. Du fait de la présence d'un domaine RNaseH fonctionnel, la protéine Ago2 est également impliquée dans la biogenèse de certains microARN, y compris ceux dont la maturation est dépendante de Dicer (Diederichs and Haber, 2007). Une spécificité de fonction de la protéine Ago4 a aussi pu être démontrée chez la souris où, particulièrement exprimée dans les cellules germinales, elle joue un rôle spécifique dans le contrôle de la méiose lors de la spermatogenèse (Modzelewski et al., 2012).

1.1.3.2 Incorporation du microARN mature au sein du complexe effecteur miRNP

Dicer en complexe avec ses cofacteurs produit un duplex de microARN matures à partir du pré-microARN. À l'intérieur de ce complexe de maturation, TRBP recrute une des protéines de la famille Argonaute (Chendrimada, 2005). Le complexe comprenant ces 3 protéines, appelé *RISC loading complex* (RLC), est capable de cliver un pré-microARN et d'aboutir à la formation d'un complexe miRNP mature, qui se dissocie par la suite du complexe (Gregory et al., 2005; MacRae et al., 2008; Maniataki and Mourelatos, 2005). La formation d'un complexe miRNP fonctionnel, une fois le pré-microARN clivé, est un processus se déroulant en deux étapes tel que schématisé à la **Figure 4**.

1.1.3.2.1 Formation du complexe miRNP mature

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 Argonaute, dans un complexe appelé pré-miRNP. Cette étape d'incorporation du duplex au sein de la protéine Argonaute requiert un changement conformationnel nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Maniataki and Mourelatos, 2005). Ce changement conformationnel est réalisé en présence de protéines chaperonnes, appelées *Heat shock cognate 70kDa protein* et *Heat shock 70kDa protein* (Hsc70 et Hsp70) (Iwasaki et al., 2010). À l'intérieur du complexe pré-miRNP, l'un des brins (le brin guide) est fermement ancré à l'intérieur de la protéine Argonaute, alors que l'autre brin, appelé brin passager, interagit beaucoup moins avec la protéine (Ma et al., 2005). Ce brin passager doit être éliminé du complexe miRNP pour aboutir à un complexe miRNP mature fonctionnel. Celui-ci est éliminé (i) par clivage endonucléolytique par Ago2, si les 2 brins sont parfaitement complémentaires, (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005; Shin, 2008), ou (ii) par déroulement des 2 brins via le domaine N-terminal de la protéine Argonaute

(Kwak and Tomari, 2012). L'instabilité thermodynamique du duplex issu du pré-microARN favorise et accélère la formation de complexes miRNP matures ne comprenant qu'un seul brin, indiquant que la séparation des deux brins par déroulement est une étape limitante du processus lorsque le brin passager ne peut être clivé (Gu et al., 2011). L'interaction des protéines Ago avec l'hélicase *moloney leukemia virus 10* (MOV10) (Meister et al., 2005), pourrait faciliter et accélérer cette étape de maturation des complexes miRNP (Liu et al., 2012a).

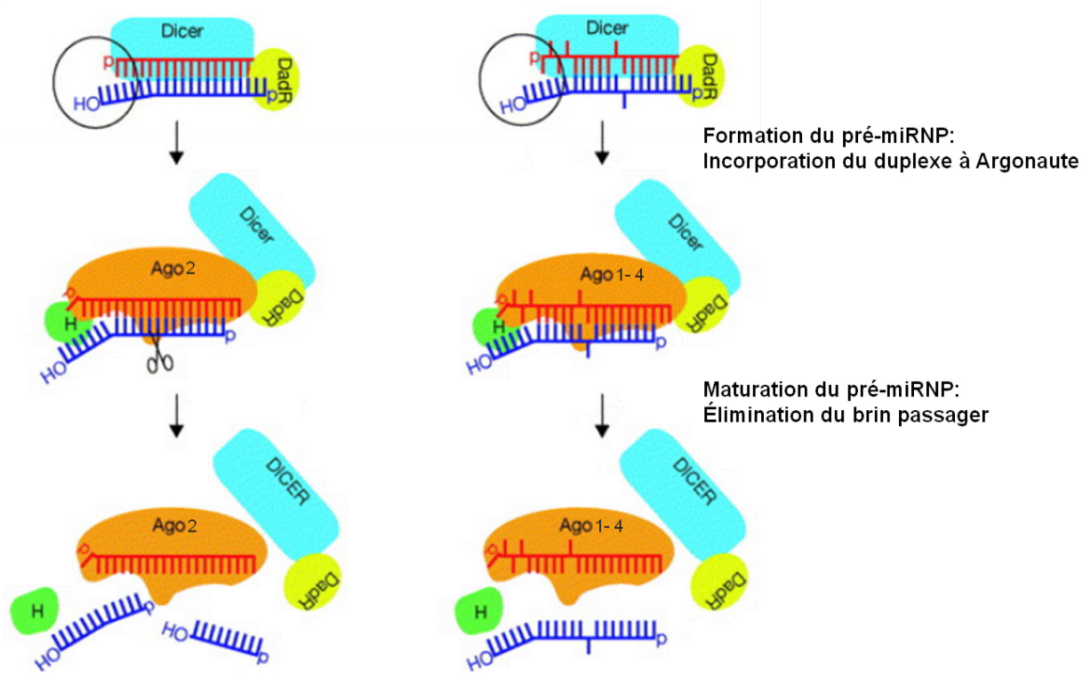


Figure 4. Formation du complexe miRNP mature.

La protéine Argonaute (Ago) s'associe au complexe Dicer•TRBP (ici annoté DadR) pour former le RLC, à l'intérieur duquel le duplex de microARN matures est transféré à l'intérieur de la protéine Ago, formant ainsi le complexe pré-miRNP. L'élimination du brin passager mène à la formation du complexe miRNP mature fonctionnel, qui se dissocie alors du complexe RLC. Lorsque les 2 brins du duplex sont très complémentaires, le brin passager peut être clivé par Ago2, facilitant ainsi son élimination (panneau de gauche). Dans les autres cas (panneau de droite), le brin passager doit être déroulé, possiblement via le domaine N-terminal de la protéine Argonaute. La présence de protéines accessoires de type Hélicase (H) pourrait faciliter ce processus. Illustration adaptée de (Hutvagner, 2005), Copyright © 2005, avec la permission de Elsevier.

1.1.3.2.2 Sélection du brin guide

Généralement un seul des deux brins est incorporé au complexe miRNP mature, tandis que le brin passager, n'est pas retrouvé, ou à des niveaux très faibles, indiquant un biais de sélection de l'un des deux brins comme brin guide. Ce biais de sélection est essentiellement lié à la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex, aboutissant à l'incorporation préférentielle du microARN dont l'extrémité 5' est la moins stable à l'intérieur du complexe miRNP mature (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). La protéine Dicer, avec l'aide de l'un de ces cofacteurs (TRBP ou PACT), mesure la stabilité thermodynamique du duplex, ce qui influence son positionnement à l'intérieur du RLC et oriente l'incorporation du duplex dans Ago2 (Noland et al., 2011). Par ailleurs, au niveau de la protéine Ago2, l'affinité du domaine MID avec le microARN dépend du nucléotide terminal en 5' (Frank et al., 2010), et explique l'abondance relative des microARN matures possédant un nucléotide uridine (U) ou adénosine (A) à leur extrémité 5' (Hu et al., 2009).

Cependant, pour certains microARN, 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 physiologiques (Ro et al., 2007). Ceci implique donc que d'autres facteurs, à ce jour inconnus, peuvent influencer la sélection du brin mature. Dans les versions précédentes de la base de données miRBase, le brin guide était distingué du brin passager par un astérisque (microARN*) pour ce dernier. Du fait de la présence du brin dit passager à l'intérieur des protéines Ago, ainsi que de leur capacité à réguler des ARNm (Yang et al., 2011), cette distinction n'est plus faite dans la version actuelle de miRBase. Les deux brins sont désormais distingués uniquement par rapport à leur origine et sont dits -5p ou -3p, selon s'ils proviennent de l'extrémité 5' ou 3' du pré-microARN. Bien que le choix du brin guide puisse varier, le modèle dans lequel un seul des deux brins du duplex est fermement incorporé dans la protéine Ago tandis que l'autre est dégradé reste valide.

1.1.3.3 Reconnaissance des ARNm cibles

Les microARN des complexes miRNP matures permettent la reconnaissance et la fixation des complexes sur des sites de liaison présents au sein de leurs ARNm cibles. Dans le cas des siARN, la complémentarité parfaite avec le site de liaison sur l'ARNm permet à la protéine Ago2 de cliver l'ARNm entre les nucléotides 10 et 11, aboutissant à la

dégradation du messager (Meister et al., 2004b). Ce mécanisme de régulation est aussi très fréquemment observé chez les plantes, où l'appariement du microARN sur l'ARNm est dans la plupart des cas parfaitement complémentaire (Rhoades et al., 2002). Chez les mammifères, très peu d'exemples de sites de liaisons parfaitement complémentaires ont été identifiés à ce jour; les microARN ont plutôt tendance à s'apparier par complémentarité de base partielle sur l'ARNm.

Les différents critères favorables à l'interaction entre les complexes miRNP et leurs ARNm cibles ont été déterminés par l'étude des premiers couples microARN:ARNm cibles identifiés, ainsi que par immunoprécipitation et séquençage des sites de liaisons associés à Ago2. Ces différents critères sont illustrés par la **Figure 5**.

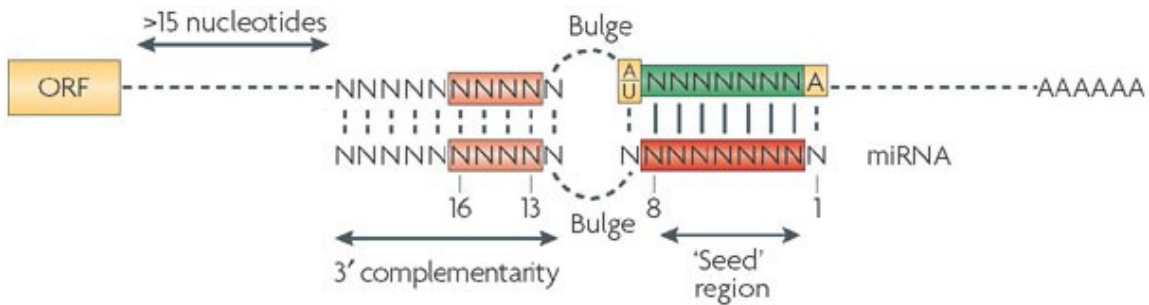


Figure 5. Mécanisme d'interaction entre le microARN et son site de liaison.

La région critique de reconnaissance des microARN, la région *seed*, est composée des nucléotides (nt) 2 à 8 en 5' qui sont parfaitement complémentaires au site de liaison. Cette interaction est habituellement renforcée par une complémentarité supplémentaire du côté 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' est un indice favorable de la possibilité de liaison du complexe miRNP. Ce site de liaison est majoritairement situé au niveau de la région 3'UTR des ARNm, à au moins 15 nt de la séquence codante. Illustration tirée de *Nature Reviews Genetics*, (Filipowicz et al., 2008), Copyright © 2008, reproduite avec la permission de *Macmillan Publishers Ltd*.

Le 1^{er} nucléotide en 5' permet l'ancrage du microARN dans le complexe miRNP, et n'est donc pas impliqué dans la reconnaissance des ARNm cibles (Ma et al., 2005). 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). Les nucléotides 9-11 ne sont généralement pas complémentaires, empêchant le clivage par Ago2, alors qu'un appariement supplémentaire en 3' est parfois observé, ce qui

permet de renforcer l'interaction du complexe miRNP avec l'ARNm ciblé, notamment lorsque que le *seed* n'est pas parfaitement apparié. Par ailleurs, la présence d'un A ou U en 5' de la séquence complémentaire au *seed*, ainsi que d'un A en 3' sont fréquemment observés. Les sites de liaison des microARN se situent en majorité dans la partie 3' non-codante (*3' untranslated region*, 3'UTR), et sont souvent conservés d'une espèce à l'autre. De plus, ces sites de liaison se situent souvent dans des régions peu structurées, à proximité d'autres sites de liaison de complexes miRNP et/ou de domaines riches en A et U (Grimson et al., 2007). Ils doivent se situer à au moins 15 nt de la fin de la séquence codante et, dans le cas de longs 3'UTR, soit à proximité de la fin de la séquence codante ou à proximité de la queue poly(A) (Grimson et al., 2007).

De nombreux exemples de sites de liaisons non-conservés, ne se situant pas dans le 3'UTR ou n'étant pas parfaitement complémentaires au *seed* du microARN ont été validés expérimentalement, démontrant la versatilité des sites de liaisons pouvant être reconnus par les complexes miRNP. Cette versatilité rend les prédictions bioinformatiques de couples microARN:ARNm cible plutôt difficile, d'où le recours à des méthodes de validation expérimentales, notamment par immunoprécipitation des complexes miRNP et séquençage des sites de liaisons des ARNm associés (Chi et al., 2009).

1.1.3.4 Mécanismes de régulation des ARNm ciblés par les complexes miRNP

De rares exemples de stimulation de la traduction des ARNm par les complexes miRNP ont été mis à jour. Les travaux de Vasudevan et Steitz (2007) ont démontré que la liaison de miR-369-3p induit la traduction du gène codant pour le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) lorsque les cellules sont privées de sérum. Ce microARN, en complexe avec Ago2 et la protéine *fragile X mental retardation, autosomal homolog 1* (FXR1), s'associe à un motif riche en A et U (*A-U-rich element*, ARE) de l'ARNm du TNF- α (Vasudevan and Steitz, 2007). La traduction des protéines ribosomales serait, quant à elle, stimulée par la liaison de miR-10a au niveau de la partie 5' non codante (*5' untranslated region*, 5'UTR) de leurs ARNm (Ørom et al., 2008).

Cependant, la très grande majorité des microARN inhibent l'expression de leurs gènes cibles de manière post-transcriptionnelle. Chez les animaux, très peu d'ARNm sont clivés par l'action des microARN, étant donné la complémentarité partielle avec leurs sites de liaison, en particulier dans la portion centrale de l'appariement. Les microARN exercent

leur effet par deux mécanismes principaux, soit la répression de la traduction (Olsen and Ambros, 1999), et la déstabilisation de l'ARNm menant à sa dégradation (Bagga et al., 2005) (**Figure 6**). Bien que la coexistence de ces deux mécanismes soit avérée, la prévalence de l'un ou l'autre de ces mécanismes est encore débattue. Les études de corrélation entre les résultats d'analyses transcriptomiques et de protéomiques suggèrent néanmoins que la déstabilisation des ARNm par les microARN serait le mécanisme prépondérant, ou du moins le plus efficace pour diminuer l'expression protéique (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Par ailleurs, ces travaux ont démontré que malgré la présence de sites de liaisons dans la région codante des ARNm, ces sites semblent beaucoup moins affecter les niveaux protéiques que ceux situés dans la région 3'UTR.

1.1.3.4.1 Mécanisme de répression de la traduction

Différents mécanismes de répression traductionnelle ont été envisagés, dont l'inhibition de l'initiation de la traduction des ARNm, l'inhibition de l'élongation de la chaîne polypeptidique et la dégradation des peptides naissants. Les premières études réalisées sur la régulation de *lin-14* par le microARN *lin-4* chez *C. elegans* mirent en évidence que, suite à l'expression de *lin-4*, le niveau d'expression de l'ARNm de *lin-14* est plutôt stable et que celui-ci demeure associé aux polysomes (Olsen and Ambros, 1999). Ces premières observations favorisaient donc l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition postérieur à l'initiation de la traduction. Cependant, de plus en plus d'évidences démontrent que la répression traductionnelle se fait majoritairement au niveau de l'initiation de la traduction (Pillai et al., 2005).

Les protéines de la famille *trinucleotide containing 6* (TNRC6A, B et C chez l'Homme) lient les protéines Ago et sont un composant essentiel du complexe effecteur (Liu et al., 2005). L'association d'une de ces trois protéines avec Ago est en effet nécessaire à la répression des ARNm par les miRNP, et ces 3 protéines semblent avoir une fonction redondante (Baillat and Shiekhhattar, 2009). Cependant, la majorité des travaux ont été effectués sur TNRC6A, aussi appelé *GW repeats proteins of 182 kDa* (GW182).

La circularisation des ARNm, qui se fait 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 (Kelen et al., 2009). GW182 interagit avec PABP1 de manière compétitive et empêche sa

liaison au complexe d'initiation eIF4F (Zekri et al., 2009). Ainsi, les complexes miRNP bloquent l'initiation de la traduction en inhibant la circularisation des ARNm qui est nécessaire à leur traduction.

1.1.3.4.2 Mécanismes de déstabilisation des ARNm

En plus de son rôle dans la répression traductionnelle GW182 est impliquée dans la déstabilisation des ARNm par les complexes miRNP. En effet, GW182 interagit directement avec la protéine *negative regulator of transcription 1, yeast*, (CNOT1) et permet ainsi le recrutement du complexe de déadénylation CCR4•Not1 (Fabian et al., 2011). Ce complexe réalise la dégradation de la queue poly(A) de l'ARNm cible par l'action d'exonucléases 3'→5'. La coiffe 7-méthylguanosine située à l'extrémité 5' de l'ARNm est ensuite dégradée par un mécanisme appelé *decapping* (Behm-Ansmant et al., 2006; Rehwinkel et al., 2005). Les enzymes de *decapping* DCP1/DCP2 sont en effet activées par les protéines *DEAD box helicase 6* (DDX6 ou RCK) et l'*ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5* (UBR5 ou EDD) recrutées par GW182 (Chen et al., 2009; Chu and Rana, 2006). Le *decapping* des ARNm a pour conséquence immédiate leur dégradation 5'→3' par l'exoribonucléase 1 XRN1 (Lejeune et al., 2003).

Ainsi, les ARNm sont réprimés par les complexes miRNP par répression de leur traduction, ou par leur déstabilisation par un mécanisme impliquant la déadénylation, le *decapping* et la dégradation 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 les complexes miRNP (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012).

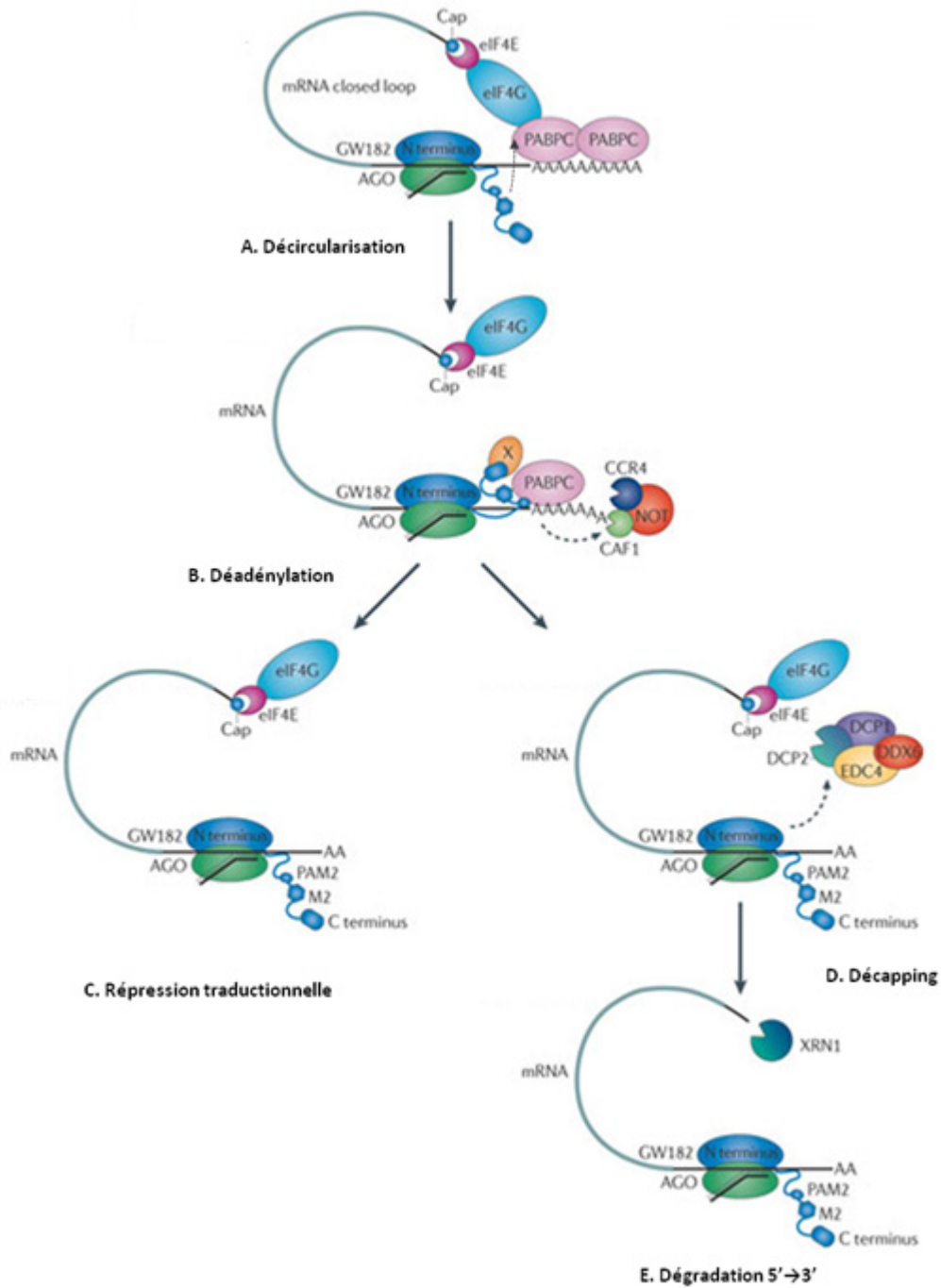


Figure 6. Mécanismes de régulation des ARNm par les complexes miRNP.

Les complexes miRNP peuvent réguler leurs ARNm cibles par (A) la répression de l'initiation de la traduction et décircularisation, (B) la déstabilisation par la déadénylation, (C) la répression traductionnelle, et (D) le *decapping* suivi de (E) la dégradation de l'ARNm par XRN1. Illustration adaptée de *Nature Reviews Genetics* (Huntzinger and

Izaurrealde, 2011), *Copyright* © 2011, reproduite avec la permission de *Macmillan Publishers Ltd.*

1.1.3.4.3 Localisation des ARNm ciblés par les complexes miRNP

GW182 est essentielle à la fonction des complexes miRNP. Alors que le domaine N-terminal permet son association à la protéine Ago2, le domaine C-terminal de GW182 sert de plateforme qui permet le recrutement des complexes et des protéines effectrices nécessaires pour la répression et la déstabilisation des ARNm ciblés. Les protéines TNRC6 se concentrent dans des corps cytoplasmiques de taille microscopique, appelés corps GW (Baillat and Shiekhattar, 2009; Eystathioy et al., 2002). Certains de ces corps colocalisent avec des granules ribonucléoprotéiques, appelés *processing bodies* (*p-bodies*) (Liu et al., 2005; Pillai et al., 2005; Sen and Blau, 2005). Ceux-ci contiennent des enzymes impliquées dans le *decapping*, la déadénylation et la dégradation des ARNm (Sheth and Parker, 2003; van Dijk et al., 2002). Ces *p-bodies* sont impliqués non seulement dans la dégradation, mais aussi le stockage des ARNm, puisque certains ARNm contenus dans ces corps, peuvent retourner vers les polysomes et être traduits (Bhattacharyya et al., 2006). Cependant certains des complexes miRNP ne sont pas inclus dans les *p-bodies*, et sont associés aux corps multivésiculaires, ce qui pourrait permettre leur transfert au sein des exosomes (Gibbings et al., 2009). Par ailleurs, cette diversité de localisation pourrait expliquer les différents mécanismes de répression des ARNm par les microARN.

1.1.4 Régulation des microARN et des complexes protéiques associés

L'activité et la biogenèse des microARN peuvent être modulées par différents mécanismes, tels que l'association des complexes avec des protéines accessoires, des modifications post-traductionnelles, ainsi que la modification des microARN. Ces différents mécanismes, ainsi que leur influence sur la biogenèse et la fonction des microARN sont l'objet de cette section.

1.1.4.1 Cofacteurs impliqués dans la régulation de la biogenèse des microARN

Certains composants additionnels s'associent au complexe Microprocesseur pour faciliter leur clivage par Drosha. C'est le cas notamment des hélicases p68 et p72 (Fukuda et al., 2007), qui facilitent la maturation de nombreux microARN. Ces hélicases peuvent aussi s'associer avec d'autres protéines pour faciliter la maturation spécifique de certains

microARN par le Microprocesseur. C'est le cas, par exemple, des protéines SMAD : impliquées dans la voie de signalisation activée par la *bone morphogenetic protein 4* et le *transforming growth factor beta* (BMP4 et TGF- β), celles-ci s'associent au Microprocesseur via p68 pour faciliter la maturation de miR-21 (Davis et al., 2008). De manière similaire, le suppresseur de tumeur p53 peut s'associer au complexe du Microprocesseur via p68 pour faciliter la maturation de certains microARN, suite à un dommage à l'ADN (Suzuki et al., 2009). Ainsi, la signalisation cellulaire suite à différents stress/stimuli peut agir directement sur la biogenèse spécifique de certains microARN.

D'autres protéines telles que l'*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (hnRNPA1) et la *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) reconnaissent des motifs présents dans la boucle terminale de certains microARN, et facilitent leur maturation par Drosha et Dicer. Ces deux protéines lient de manière compétitive la boucle du pri-microARN pri-let-7a, KSRP facilitant sa maturation, alors que hnRNPA1 l'inhibe (Michlewski and Caceres, 2010). La protéine hnRNPA1 peut aussi faciliter la maturation de certains pri-microARN, dont pri-miR-18a (Michlewski et al., 2008). De manière générale, KSRP facilite la maturation de plusieurs microARN. Ceci se fait par la reconnaissance de différents motifs au niveau de la boucle terminale des pri-microARN, facilitant leur clivage par le Microprocesseur, ainsi qu'au niveau des pré-microARN, facilitant leur maturation par le complexe Dicer•TRBP (Trabucchi et al., 2009). De manière similaire, Lin28b s'associe à un motif conservé présent sur la boucle des microARN de la famille let-7. Celle-ci séquestre les pri-microARN de cette famille, empêchant leur maturation par le Microprocesseur (Piskounova et al., 2011).

1.1.4.2 Modulation de l'activité des complexes miRNP par des protéines liant les ARNm

La présence de protéines liant l'ARNm à proximité du site de liaison d'un complexe miRNP peut favoriser ou défavoriser sa liaison à l'ARNm. Ainsi, différentes protéines liant le 3'UTR des ARNm sont impliquées dans la régulation de la liaison du complexe miRNP à son site.

C'est le cas notamment des protéines de la famille *Fragile X mental retardation* (FMR). Dans les dendrites neuronales, la proximité entre FMRP et le site de liaison de miR-125a sur l'ARNm codant pour la protéine *post-synaptic density protein 95* (PSD-95)

stabilise le complexe miRNP, tandis que la déphosphorylation de FMRP induit la déstabilisation du complexe miRNP, levant ainsi la répression du gène par miR-125a (Muddashetty et al., 2011). Quant à FXR1, une protéine de la famille FMR qui œuvre en association avec Ago2, elle stimule la traduction de l'ARNm de TNF- α sous certaines conditions, notamment lorsque les cellules sont privées de sérum (Vasudevan and Steitz, 2007).

Parallèlement, d'autres travaux sur la protéine *Hu antigen R* (HuR, aussi appelée *ELAV-like protein 1*, ELAVL1), qui a la propriété de lier les motifs riches ARE, démontrent que cette protéine est capable d'influencer la fonction des complexes miRNP. Ceci se fait dans un contexte (i) coopératif (Glorian et al., 2011; Kim et al., 2009), où l'association de HuR facilite la liaison et amplifie l'action du complexe miRNP, ou (ii) compétitif, elle empêche sa liaison et favorise la traduction de l'ARNm (Bhattacharyya et al., 2006; Young et al., 2012).

Un autre exemple de compétition entre les complexes miRNP et les protéines liant les ARNm a été mis en évidence pour la protéine *Dead End 1* (DND1), qui lie le 3'UTR de l'ARNm codant pour la p27, et empêche sa régulation par miR-221 (Kedde et al., 2007).

1.1.4.3 Modifications des microARN

Les microARN peuvent être modifiés par différentes enzymes, que ce soit au niveau du pri-microARN, du pré-microARN ou du microARN mature. Ces modifications peuvent altérer à la fois leur biogenèse, leur fonction et leur stabilité.

1.1.4.3.1 Édition des pri-microARN

À l'intérieur du noyau, les enzymes adénosine désaminases (*adenosine deaminase that act on RNA*, ADAR) catalysent la modification des adénosines en inosines de certains pri-microARN (Luciano et al., 2004). Cette modification, appelée édition, affecte notamment le pri-microARN pri-miR-142, ce qui induit sa dégradation (Yang et al., 2006). L'édition des pri-microARN peut aussi affecter la maturation des pré-microARN par le complexe Dicer•TRBP, ce qui a été démontré pour miR-151. Les sites d'édition de pri-miR-151 par les ADAR se situent à proximité du site de clivage par Dicer sur le brin 3p, ce qui empêche sa maturation et induit l'accumulation de pré-miR-151 édité (Kawahara et al., 2007a). Dans le cas des pri-microARN de la famille miR-376, les ADAR catalysent la

désamination de bases situées au niveau du brin mature, ce qui modifie les ARNm pouvant être ciblés par ces microARN (Kawahara et al., 2007b).

1.1.4.3.2 Modifications en 3' des pré-microARN

L'amplification spécifique et le séquençage de 219 pré-microARN a permis de démontrer que nombre de pré-microARN sont modifiés par addition(s) en 3' (Newman et al., 2011). L'uridylation est la modification la plus fréquemment observée, bien que le séquençage ait également permis de détecter des additions d'adénine et de cytosine (C). Pour la majorité des pré-microARN, le rôle de ces modifications n'a pas été déterminé, contrairement aux pré-microARN de la famille let-7. De manière similaire à Lin28b, Lin28a s'associe aux microARN de la famille let-7 via un domaine conservé situé dans la boucle terminale des précurseurs. Lin28a agit au niveau des pré-microARN, en recrutant l'uridyl-transférase terminale (TUTase) TUT4 (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2009) ou alternativement TUT7 (Thornton et al., 2012). Celles-ci catalysent l'oligo-uridylation de l'extrémité 3' de pré-let-7. Cette élongation d'une dizaine de nt de l'extrémité 3' empêche l'incorporation et la maturation par Dicer de ces pré-let-7, qui sont par conséquent dégradés (Heo et al., 2008). De plus, les TUTases 2, 4 et 7 catalysent la mono-uridylation des pré-microARN de la famille let-7 possédant une extrémité 3' protubérante d'un seul nucléotide, tel que pré-let-7b. Ces pré-microARN ainsi modifiés possèdent alors une extrémité protubérante de 2 nt, ce qui facilite leur incorporation et leur maturation par Dicer (Heo et al., 2012).

1.1.4.3.3 Modifications en 3' des microARN matures

Les séquençages à haut débit des microARN (*high throughput sequencing*, HTS) a par ailleurs démontré que beaucoup de microARN matures sont modifiés par l'ajout en 3' de un ou deux nucléotides, généralement des A ou U. Plusieurs nucléotidyl-transférases terminales pourraient modifier l'extrémité 3' des microARN. L'analyse des modifications en 3' des microARN suite à la déplétion de différentes nucléotidyl-transférases, a permis de démontrer l'implication de 7 d'entre elles dans ces modifications terminales (Wyman et al., 2011). À ce jour, l'activité catalytique de seulement deux de ces nucléotidyl-transférases a été directement démontrée sur les microARN. L'adénylation de miR-122 par *PAP associated domain containing 4* (PAPD4 ou GLD2) dans les hépatocytes murins

stabilise ce microARN et empêche sa dégradation (Katoh et al., 2009), ce qui renforce l'activité du microARN sur ses ARNm cible. À l'inverse, l'uridylation des microARN matures de la famille miR-26 par TUT4 (aussi appelée *Zcchc11*) n'affecte pas la stabilité de ceux-ci, mais supprime leur capacité à réguler l'expression de l'interleukine 6 (Il-6) (Jones et al., 2009). Ainsi, ces quelques exemples démontrent que les modifications en 3' des microARN matures peuvent à la fois altérer la fonction et la stabilité des microARN matures, bien que le rôle de ces modifications ne soit pas encore bien compris à l'échelle globale.

1.1.4.4 Modifications et stabilité des complexes associées aux microARN

Les protéines impliquées dans la voie des microARN peuvent être modifiées de manière post-traductionnelle. Quelques exemples ont été mis à jour, et démontrent que ces modifications peuvent affecter la stabilité, la fonction ainsi que la localisation de ces complexes. De plus, des protéines accessoires s'associent à ces complexes pour favoriser leur stabilité ou leur dégradation.

1.1.4.4.1 Modifications du complexe Dicer•TRBP

Situées entre les domaines de liaison à l'ARNdb de TRBP, quatre sérines peuvent être phosphorylées par la *mitogen activated protein* (MAP) kinase Erk. Cette phosphorylation stabilise non seulement la protéine TRBP, mais aussi indirectement Dicer, ce qui accélère la maturation des pré-microARN par le complexe Dicer•TRBP (Paroo et al., 2009). Par ailleurs, Dicer transite à l'intérieur du réticulum endoplasmique suite à sa synthèse, où il interagit avec la protéine *cytoskeleton-linking endoplasmic reticulum (ER) membrane protein of 63 kDa* (CLIMP-63). À l'intérieur du réticulum endoplasmique, celui-ci peut être glycosylé. Bien que la fonction de cette glycosylation ne soit pas encore connue, la présence de CLIMP-63 stabilise l'expression de Dicer et pourrait permettre sa sécrétion à l'extérieur des cellules humaines (Pépin et al., 2012).

1.1.4.4.2 Modifications des complexes contenant Ago

L'activité et la stabilité des protéines Ago sont régulées à la fois par des modifications post-traductionnelles ainsi que par leur association à des protéines accessoires.

Par exemple, la stabilité des protéines Ago2 et Ago4 est renforcée par l'hydroxylation d'une de leurs prolines de leur domaine Piwi, par le complexe *type I collagen prolyl-4-hydroxylase* (CP4H) (Qi et al., 2008). Le complexe CP4H est inductible par hypoxie, ce qui entraîne l'accumulation de Ago2 dans cette condition (Wu et al., 2011).

L'activité des protéines Ago, et plus particulièrement leur capacité à incorporer des microARN ou siARN, peut être régulée par leur phosphorylation. En effet, les protéines de la famille Argonaute possèdent de multiples sites de phosphorylation. L'une des tyrosines située dans le domaine PAZ interagit directement avec l'extrémité 5' phosphate des microARN. La phosphorylation de cette tyrosine crée une charge négative répulsive, empêchant l'incorporation du microARN à l'intérieur des protéines Argonaute (Rüdel et al., 2011). Les protéines Ago, qui ne contiennent pas de microARN, s'associent avec la *Heat shock protein of 90 kDa* (HSP90), ce qui permet de les stabiliser et empêchent leur dégradation par le protéasome. Ces protéines Argonaute ne contenant pas de microARN incorporent plus facilement les siARN, et leur déstabilisation diminue l'efficacité de ceux-ci (Johnston et al., 2010).

Les protéines Ago peuvent être dégradées par le protéasome, ce qui implique leur ubiquitination. En effet, celles-ci peuvent être ubiquitinées, ce qui pourrait être réalisé notamment par la ligase d'ubiquitine de type E3, lin-41, que l'on retrouve associée à Ago2. Chez la souris, mLin-41 est exprimée dans les cellules souches embryonnaires, ce qui induit l'ubiquitination de la protéine Ago2 et sa dégradation par le protéasome (Rybak et al., 2009). Cependant, des travaux effectués récemment chez la souris, démontrent que lin-41 est impliquée dans la prolifération et le maintien des cellules souches neuroépithéliales au cours du développement embryonnaire, et ce, de manière indépendante de l'ubiquitination de Ago2, dont les niveaux restent inchangés en absence de mLin-41 (Chen et al., 2012).

La dégradation des complexes impliqués dans la voie des microARN peut aussi être réalisée par autophagie. En effet, les complexes RLC sont associés aux autophagosomes, et la suppression des processus d'autophagie induit l'accumulation des protéines Ago2 et Dicer qui composent ces complexes. Cependant, l'activité des siARN, ainsi que des microARN endogènes, est diminuée dans ces conditions, ce qui indique que les complexes RLC accumulés ne sont pas fonctionnels. Ainsi, l'autophagie permettrait d'éliminer les

complexes RLC non fonctionnels, et le renouvellement de ceux-ci au sein des cellules (Gibbins et al., 2012).

1.1.5 Implications physiologiques et pathologiques des microARN

1.1.5.1 Fonction intracellulaire des microARN

Par leur mécanisme de fonctionnement, les microARN permettent une régulation fine de l'expression des gènes. En effet, la régulation d'un gène par un microARN n'induit pas sa suppression totale, mais plutôt une diminution de son expression. Chaque microARN peut réguler plusieurs centaines de gènes, et chaque gène peut être régulé par plusieurs microARN (Chi et al., 2009). On estime qu'au moins 60 % des gènes codants sont sous le contrôle des microARN (Friedman et al., 2009). Leur implication a été démontrée dans la quasi-totalité des processus physiologiques et pathologiques étudiés à ce jour, et est illustrée dans les chapitres suivants.

1.1.5.1.1 Les microARN, acteurs dans les processus physiologiques essentiels

Les premiers travaux sur les microARN démontraient leur implication dans la régulation temporelle des gènes au cours du développement de *C. elegans* (Fire et al., 1998; Lee et al., 1993). Des expériences de délétion (*knock out*) conditionnelle des enzymes impliquées dans la biogenèse des microARN, ou de certains microARN spécifiques, ont démontré que les microARN sont aussi impliqués dans l'embryogenèse et le développement des mammifères (Blakaj and Lin, 2008). Certains microARN sont caractéristiques des cellules souches et participent au maintien de leur pluripotence (Marson et al., 2008). D'autres microARN, dont ceux de la famille let-7, favorisent au contraire la différenciation, et leur inhibition facilite la dé-différenciation des cellules somatiques en cellules pluripotentes (Melton et al., 2010). Alors que les microARN de la famille let-7 sont impliqués dans la différenciation cellulaire globale, d'autres microARN vont faciliter l'engagement vers un type cellulaire spécifique. Ceci a été particulièrement étudié dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells*, HSC) qui permettent la production quotidienne de toutes les cellules sanguines circulantes. Chaque type de cellule sanguine possède un répertoire de microARN qui leur est propre, et l'expression de certains microARN va engager leurs progéniteurs vers une

voie de différenciation spécifique. Par exemple, l'expression de miR-223 induit la différenciation des progéniteurs vers les cellules de lignée myéloïde (Fazi et al., 2005) alors qu'au contraire, miR-181 engage la différenciation vers les lignées de type lymphoïde (Chen et al., 2004).

Les microARN sont impliqués dans tous les processus cellulaires majeurs. Par exemple, les microARN de la famille miR-26, fortement exprimés dans les cellules quiescentes et dont les niveaux varient au cours du cycle cellulaire, inhibent des gènes impliqués dans la transition G1/S (Zhu et al., 2012). À l'opposé miR-21, surexprimé dans de nombreux cancers, possède un très fort potentiel oncogénique (Pan et al., 2011). L'inhibition des gènes ciblés par ce microARN promeut à la fois la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose ainsi que l'invasion (Buscaglia and Li, 2011). Les microARN de la famille miR-34, induits par le gène suppresseur de tumeur p53 joueraient, quant à eux, un rôle prépondérant dans la sénescence et l'apoptose (He et al., 2007).

1.1.5.1.2 Conséquences pathologiques de l'altération des microARN

Du fait de leur implication dans le contrôle de ces processus cellulaires essentiels, la dérégulation des niveaux de microARN dans les cancers a très rapidement été mise en évidence (Calin et al., 2004). 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. Par exemple, le rôle critique des microARN pour le bon fonctionnement du cerveau a notamment été révélé par des études démontrant que l'altération de leur expression ou la mutation de leurs sites de liaisons contribuent à la progression des maladies neurodégénératives (Martí et al., 2010; Mouradian, 2012; Schonrock et al., 2012). De manière similaire, les microARN participent à la régulation du métabolisme, et leur altération a été démontrée dans les pathologies de dyslipidémie et de diabète (Rottiers and Näär, 2012).

1.1.5.2 MicroARN extracellulaires

En plus de leur fonction intracellulaire, les microARN ont pu être détectés dans tous les fluides biologiques testés tels que le plasma (Chim et al., 2008), l'urine (Melkonyan et al., 2008), les larmes, la salive et le lait maternel (Weber et al., 2010). Leur rôle dans la communication intercellulaire a notamment été démontré pour les microARN contenus

dans les exosomes. Le transfert d'ARN par les exosomes a pour la première fois été démontré pour les exosomes dérivés de lignées cellulaires de mastocytes humains et murins, qui contiennent des ARNm et des microARN, transférables dans d'autres cellules mastocytes (Valadi et al., 2007). La régulation par des microARN extracellulaires de gènes d'une cellule réceptrice a, par exemple, été démontrée pour les exosomes produits par la lignée de cellules cancéreuses K562. Le microARN miR-92a est très abondant dans ces exosomes, qui sont incorporés par les cellules endothéliales HUVEC, où la régulation d'ARNm cibles de ce microARN va favoriser la migration et la formation de structures tubulaires (Umezue et al., 2012).

1.1.5.2.1 Utilisation des microARN circulants en tant que biomarqueurs

Le répertoire de microARN extracellulaires, surtout celui des microARN circulants (*i.e.* plasma et sérum), est altéré dans de multiples conditions pathologiques et pourrait donc constituer un excellent outil diagnostique peu invasif. C'est notamment le cas de tumeurs solides, où la biopsie n'est pas toujours possible et où de nombreux microARN ont été identifiés comme étant altérés dans ces cancers (Brase et al., 2010). De manière similaire, on a pu observer une altération des niveaux de microARN circulants dans d'autres pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires (Creemers et al., 2012), ce qui pourrait mener, à terme, au développement d'outils diagnostiques et pronostiques.

1.1.5.2.2 Caractéristiques des microARN circulants

Malgré la forte activité ARNase détectée dans le plasma et le sérum, les microARN circulants sont étonnamment stables, ce qui indique qu'ils sont protégés de la dégradation par des composantes de nature lipidique et/ou protéique. En effet, les microARN circulants peuvent se trouver à l'intérieur de vésicules de type exosomes (Valadi et al., 2007) ou dans des vésicules plus grosses telles que les microparticules (Hunter et al., 2008) et les corps apoptotiques (Zernecke et al., 2009). Cependant, une grande proportion des microARN est aussi associée aux lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein*, HDL) (Vickers et al., 2010) ainsi qu'à des protéines liant les ARN. Parmi les protéines associées aux microARN circulants, on retrouve les protéines Ago1 (Turchinovich and Burwinkel, 2012) et Ago2 (Turchinovich et al., 2011). Fait intéressant, le répertoire de microARN associés à Ago1 et à Ago2 diffère très fortement dans le plasma comparativement à ce qui a été

observé dans des cellules spécifiques, suggérant qu'ils puissent être exportés par des types cellulaires différents (Turchinovich and Burwinkel, 2012).

1.1.6 Application du séquençage à haut débit dans la découverte des microARN

Le développement des technologies de séquençage à haut débit, appliquées aux petits ARN, ont permis non seulement la découverte de très nombreux nouveaux microARN, mais également des avancées majeures dans la compréhension de la voie des microARN, aussi bien au niveau de la biogenèse, que de la fonction et la régulation des microARN. Dans cette section, les différentes technologies de séquençage à haut débit ainsi que leurs applications seront détaillées.

1.1.6.1 Les techniques de séquençage à haut débit

Les technologies de séquençage à haut débit (*High Throughput Sequencing*, HTS) ont révolutionné l'analyse transcriptomique en permettant le séquençage direct de millions de séquences en parallèle, diminuant ainsi très significativement le coût d'utilisation de ces techniques. Les technologies de HTS ont été adaptées au séquençage des petits ARN non-codants. Actuellement, 3 technologies différentes sont principalement utilisées et seront détaillées dans ce chapitre. Il s'agit de la technologie de pyroséquençage 454, la technologie SOLiD et la technologie Solexa, développées/rachetées par les compagnies Roche, Applied Biosystem et Illumina, respectivement. Les principes sur lesquels reposent ces 3 technologies sont présentés sur le site internet de chacune des compagnies et ont fait l'objet d'un article de revue récent, détaillant les principes, les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes (Liu et al., 2012b). Quelle que soit la technologie utilisée, on distingue 3 étapes : la préparation de la librairie, l'amplification et le séquençage.

1.1.6.1.1 Préparation de la librairie d'ADN complémentaire

La préparation de la librairie est similaire pour les 3 technologies, et a spécifiquement été adaptée aux microARN. Une fois l'ARN total extrait et purifié, des séquences adaptatrices sont liées en 5' et 3' de chaque ARN par *ligation*. Un ADN complémentaire (ADNc) est ensuite produit par transcription inversée (*Reverse*

transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) en utilisant une amorce spécifique, complémentaire à la séquence adaptatrice en 3'. L'ARN est par la suite dégradé et l'ADNc est purifié sur gel, afin de sélectionner les séquences dont la taille correspond aux microARN (entre 15 et 30 nt environ).

1.1.6.1.2 Amplification de la librairie

Chaque molécule d'ADNc doit ensuite être amplifiée séparément. Cette amplification se fait par une réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR).

Dans le cas des technologies 454 et SOLiD, l'amplification est réalisée par amplification clonale en émulsion. Cette technique permet d'isoler chaque brin d'ADNc par émulsion dans des gouttelettes contenant chacune une bille magnétique dont la surface est recouverte d'oligonucléotides complémentaires aux séquences adaptatrices. À l'intérieur de chaque gouttelette comprenant un ADNc, celui-ci va être amplifié par PCR à la surface de la bille. Ce sont ensuite chacune de ces billes, sur lesquelles un seul ADNc a été amplifié qui vont être séquencées.

Dans le cas de la technologie Solexa, l'ADNc est directement hybridé sur la surface de la cellule sur laquelle aura lieu le séquençage. De manière similaire aux deux autres technologies, la surface de la cellule est recouverte d'oligonucléotides complémentaires aux deux adaptateurs. Ces séquences complémentaires constituent les amorces à partir desquelles chaque molécule d'ADNc est amplifiée. Après le premier cycle de PCR, la molécule complémentaire synthétisée est donc immobilisée à la surface, alors que la molécule d'ADNc libre est éliminée. Par la suite, l'amplification, appelée *bridge PCR amplification*, est donc réalisée sur un support immobilisé, par hybridation de l'extrémité 3' des molécules d'ADN nouvellement synthétisées avec les oligonucléotides complémentaires libres, situés à proximité. Ceci permet une amplification de manière locale de chaque séquence d'ADNc initialement hybridée, formant ainsi un *cluster* qui va par la suite être séquencé.

1.1.6.1.3 Séquençage

Les ADNc amplifiés, que ce soit à la surface d'une bille ou par cluster, vont pouvoir ensuite être séquencés de manière simultanée.

La technologie 454 repose sur le pyroséquençage. Une polymérase à ADN réalise l'élongation en incorporant des bases complémentaires qui comportent chacune un fluorophore différent, qui apparaît seulement lors de leur hydrolyse. Dans ce cas, le fluorophore est situé au niveau du phosphate, et est libéré par hydrolyse du pyrophosphate au cours de la polymérisation. La technologie SOLiD repose sur la *ligation* de dinucléotides complémentaires, chacun marqué par un fluorophore différent. La technologie Solexa repose elle aussi sur la polymérisation de bases fluorescentes, dérivée de la technologie de séquençage Sanger. Dans ce cas-ci, le fluorophore est associé au ribose de la base incorporée, et doit par la suite être éliminé pour pouvoir incorporer la base suivante.

1.1.6.2 Analyse des données de séquençage

Les séquences ainsi obtenues doivent d'abord être filtrées selon différents critères de qualité avant de pouvoir être analysées. Par la suite, les séquences aux extrémités correspondant aux adaptateurs sont éliminées, et les séquences ainsi obtenues peuvent être alignées sur différentes bases de données, notamment la base de données de référence des microARN, miRBase.

1.1.6.3 Application à la découverte des microARN et de leur fonctionnement

Le principal avantage des technologies de HTS est la possibilité de découvrir de nouvelles séquences de microARN. Pour cela, les séquences ne correspondant pas à des microARN connus (séquences inconnues) sont alignées sur le génome de l'organisme auquel l'échantillon séquencé appartient. Lorsque ces séquences inconnues s'alignent parfaitement, les séquences génomiques de part et d'autre en 5' et 3' sont extraites et leur structure est analysée. Cette séquence doit former une structure en tige-boucle caractéristique des pri- et pré-microARN, à partir de laquelle le clivage successif des complexes Microprocesseur et Dicer•TRBP peut aboutir à la formation d'un microARN mature dont la séquence correspond à la séquence inconnue. Avec la démocratisation de l'utilisation des technologies HTS, de nombreux nouveaux microARN ont ainsi pu être découverts, et différents logiciels permettant l'identification de nouveaux microARN à partir des données HTS sont disponibles publiquement (Li et al., 2012b).

De plus, le séquençage a pu mettre en évidence la modification post-transcriptionnelle des microARN, ainsi que les enzymes impliquées dans ces modifications. L'addition en 3' des microARN a pu être démontrée chez les mammifères (Landgraf et al., 2007), et l'analyse par HTS de cellules après la déplétion de différentes nucléotidyltransférases a permis de montrer l'importance de GLD-2 dans l'adénylation des microARN (Burroughs et al., 2010). De manière similaire, l'étude des microARN matures par HTS dans des embryons de souris mutants a démontré l'importance des enzymes ADAR et ADAR-B1 dans l'abondance des microARN, et permis de plus l'identification de nouveaux sites d'éditations (Vesely et al., 2012).

Le HTS permet aussi l'analyse des différentes isoformes présentes pour un même microARN, appelées isomiRs. En effet, de nombreux variants d'un même microARN sont généralement détectés, correspondant soit à un décalage du clivage de Dicer et/ou Drosha, soit à l'activité d'exonucléases et de nucléotidyltransférases. Si l'extrémité 5' des microARN est très conservée, l'extrémité 3' l'est beaucoup moins, caractéristique qui constitue un des critères de reconnaissance des nouveaux microARN (Ambros et al., 2003). Il a pu être démontré par HTS que les microARN associés à Ago2 dans étaient plus courts que ceux associés aux autres protéines Ago. Ce raccourcissement serait lié au fait que l'extrémité 3' des microARN associés à Ago2 est plus accessible, et donc plus fortement dégradée par une/des exonucléase(s), qui à ce jour ne sont pas encore identifiées (Juvvuna et al., 2012). L'abondance de ces différents isomiRs varie en fonction du type cellulaire et des conditions, ce qui a pu être observé par exemple dans le cas de tumeurs gastriques, où l'abondance de certains isomiRs est altérée, comparativement aux tissus sains (Li et al., 2012a). Ainsi, la présence de ces différents isomiRs pourrait avoir une implication physiologique et pathologique, qui à ce jour est encore peu analysée.

1.2. Les plaquettes

À l'intérieur d'une cellule, de multiples niveaux de régulation géniques existent. Tel qu'il sera présenté dans ce chapitre, les plaquettes constituent un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, tel que la régulation par les microARN, car celles-ci sont anucléées. Dans cette prochaine section, l'origine, les caractéristiques et la fonction des plaquettes vont donc être détaillées.

1.2.1 Structure et origine des plaquettes sanguines chez l'humain

1.2.1.1 Découverte des plaquettes

Les plaquettes sanguines sont des éléments anucléés présents dans le sang, qui sont impliquées principalement dans l'hémostase, ainsi que dans la réponse inflammatoire. On doit le nom *plaquette*, en allemand *Blutplättchen*, qui signifie « petites plaques du sang », à Giulio Bizzozero. Ses travaux (1881-1882) furent les premiers à décrire les plaquettes comme des éléments anucléés du sang, et non des fragments de dégradation, responsables de la coagulation sanguine *in vivo* (Ribatti and Crivellato, 2007).

1.2.1.2 Origine des plaquettes

Les plaquettes sont produites au niveau de la moelle osseuse par leurs cellules progénitrices, les mégacaryocytes (*megakaryocyte*, MK) (Wright, 1906). Ceux-ci sont issus de la différenciation séquentielle des cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells*, HSC) en différentes cellules progénitrices, qui perdent peu à peu leur caractère pluripotent pour se spécialiser vers la lignée MK (Visser et al., 1984). Les différentes étapes de différenciation des cellules HSC à la formation des plaquettes sont illustrées à la **Figure 7**. Les HSC s'engagent d'abord vers les progéniteurs myéloïdes pluripotents (Akashi et al., 2000), caractérisés notamment par l'expression des facteurs de transcription, tels que GATA-1 et PU.1 (Arinobu et al., 2007; Stachura et al., 2006). La diminution de l'expression de PU.1 va initier la différenciation de ces progéniteurs myéloïdes vers les progéniteurs communs érythrocytaires et mégacaryoblastiques bipotents (Debili et al., 1996; Nutt et al., 2005), qui se différencient à leur tour vers les progéniteurs des MK, les mégacaryoblastes. Il est intéressant d'observer qu'au cours de ce processus de différenciation, le profil de microARN évolue (Garzon et al., 2006). Il a notamment été

démontré que PU.1 induit directement la transcription de plusieurs pri-microARN (Ghani et al., 2011).

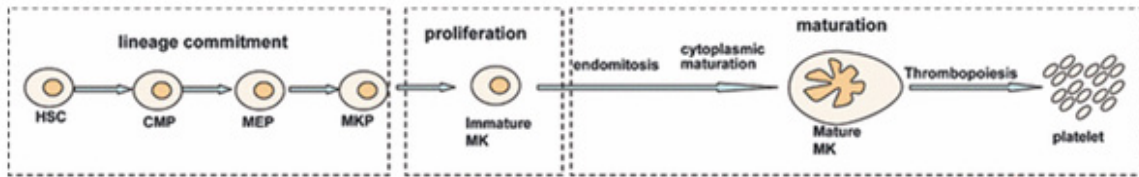


Figure 7. De la différenciation des cellules souches à la production de plaquettes.

Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse par les mégacaryocytes matures (*megakaryocyte*, MK). Ceux-ci sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cell*, HSC) qui perdent peu à peu leur caractère multipotent pour s'engager vers la lignée mégacaryocytaire. Les HSC se différencient d'abord en progéniteur myéloïde commun (*common myeloid precursor*, CMP), puis en progéniteur commun érythroblastique-mégacaryocytaire (*megakaryocytic-erythroblastic precursor*, MEP) et enfin en progéniteur des MK (*MK precursor*, MKP), les mégacaryoblastes. Ceux-ci prolifèrent et se différencient en MK matures. Ceci se traduit par plusieurs cycles d'endomitoses, suivis de la maturation de leur cytoplasme, notamment par la formation des granules et d'un système de démarcation membranaire. Enfin, les MK matures vont migrer dans des niches médullaires à proximité de vaisseaux sanguins, dans lesquels les proplaquettes vont être libérées. En se fragmentant, celles-ci vont donner naissance aux plaquettes, directement à l'intérieur de la circulation sanguine. Illustration tirée de (Li et al., 2011) avec la permission de *John Wiley and Son, Copyright © 2011*.

Les mégacaryoblastes précoces vont, dans un premier temps, proliférer puis arrêter leur multiplication (Bridgell et al., 1989), pour ensuite commencer plusieurs cycles d'endomitose. L'endomitose est un mécanisme dans lequel l'ADN est d'abord répliqué et suivi d'une mitose incomplète qui ne donne pas naissance à deux cellules filles. Au lieu d'une mitose avortée en anaphase, les modèles actuels du mécanisme de l'endomitose suggèrent que la cytokinèse serait presque complète, suivie d'un mécanisme inverse de retour vers une seule cellule (Lordier et al., 2008). Ainsi, les mégacaryoblastes se différencient donc en mégacaryocytes qui acquièrent progressivement une polyploïdie, jusqu'à 128N (Tomer et al., 1988), caractéristique des MK matures. Le rôle de la polyploïdie, qui provoque une augmentation de la taille des MK, n'est pas vraiment bien compris, bien que cela pourrait permettre de faciliter l'amplification des gènes (Raslova et al., 2003). Cette augmentation de la taille des MK, au cours de leur maturation, est en effet très marquée (jusqu'à 100 μm), et elle se caractérise par une augmentation du volume de leur noyau, dans un premier temps, puis de leur cytoplasme.

De nombreux ARNm présents dans le cytoplasme sont traduits massivement pour permettre la production en quantité suffisante des protéines spécifiques des plaquettes, notamment celles contenues dans les granules alpha. Par ailleurs, certains facteurs et protéines présents en grande quantité dans les plaquettes ne sont pas directement produits, mais sont prélevés du milieu extracellulaire par les plaquettes et/ou les MK par endocytose, comme c'est le cas pour le fibrinogène (Raslova et al., 2003), ou via des transporteurs spécifiques, comme la sérotonine (Humphrey and Toh, 1954). La synthèse et l'incorporation des protéines plaquettaires, ainsi que la formation des granules denses et alpha débutent dès les stades précoces de maturation des MK. Ainsi, le récepteur glycoprotéique (GP) plaquettaire GPIIb/IIIa (ou intégrine α IIb β 3) et des protéines présentes dans les granules alpha, telles que le facteur de von Willebrand (vWF) et le facteur plaquettaire appelé *platelet factor 4* (PF4), sont synthétisés dès le stade diploïde et sont des marqueurs précoces de la différenciation en MK (Tomer, 2004). L'apparition des granules est plus tardive. Leur nombre et taille augmentent avec la maturation des MK. 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 (*demarcation membrane system*, DMS) constitue le réservoir nécessaire à la formation des membranes plaquettaires (Schulze et al., 2006).

Les MK matures migrent dans des niches proches des vaisseaux médullaires, par le chimiotactisme induit par le *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) et le *fibroblast growth factor 4* (FGF-4), deux chimiokines produites par les cellules endothéliales médullaires (Avecilla et al., 2004). Les MK matures vont alors produire de longues extensions cytoplasmiques, appelées pré-pro-plaquettes. L'élongation de ces extensions est dirigée vers les vaisseaux sanguins, ce qui implique notamment la reconnaissance par son récepteur de la sphingosine 1 phosphate (Zhang et al., 2012), présente dans le plasma associée aux lipoprotéines (Murata et al., 2000). Celles-ci sont libérées 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). Chaque MK permet la production de plusieurs milliers de plaquettes (Stenberg and Levin, 1989). Ainsi, chez l'adulte, 10^{11} plaquettes sont produites quotidiennement par les MK. La concentration physiologique

moyenne est de $200-300 \times 10^9$ plaquettes par litre de sang, renouvelées complètement tous les 8-9 jours (Hawker et al., 1980).

Le principal facteur de croissance permettant la mégacaryopoïèse (i.e. la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en MK) est une hormone appelée thrombopoïétine (TPO) (Bartley et al., 1994; de Sauvage et al., 1994; Lok et al., 1994; Wendling et al., 1994). La TPO est le ligand du récepteur *myeloproliferative leukemia virus oncogene* (cMPL), et sa liaison favorise notamment la prolifération des mégacaryoblastes, et accélère la maturation des MK (de Sauvage et al., 1996). Cette hormone est produite de manière constitutive par le foie, et son niveau plasmatique est directement régulé par les plaquettes. En effet, celles-ci possèdent le récepteur cMPL sur lequel la TPO peut se lier, ce qui induit sa dégradation. Ainsi, plus le nombre de plaquettes 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).

1.2.1.3 Structures et caractéristiques des plaquettes

Les plaquettes sont caractérisées par leur forme discoïdale, dont la taille n'est que de 2 à 3 μm . L'ultrastructure des plaquettes a pu être déterminée grâce aux avancées réalisées dans le domaine de la microscopie électronique à transmission, et est illustrée dans la **Figure 8** (White and Krumwiede, 2007). La forme discoïdale des plaquettes au repos est assurée par la présence d'un réseau microtubules à la périphérie (White, 1968). Ces plaquettes sont caractérisées par de nombreuses invaginations de leur membrane plasmique, appelées système canaliculaire ouvert (*open canalicular system*, OCS), qui permettent les échanges entre la plaquette et le plasma (Escolar and White, 1991). En plus du réseau de microtubules périphérique, les plaquettes possèdent un cytosquelette dense, riche en actine et en protéines contractiles, telles que la myosine, qui leur permet de changer de forme et d'étendre leurs pseudopodes lors de leur activation (Bearer et al., 2002).

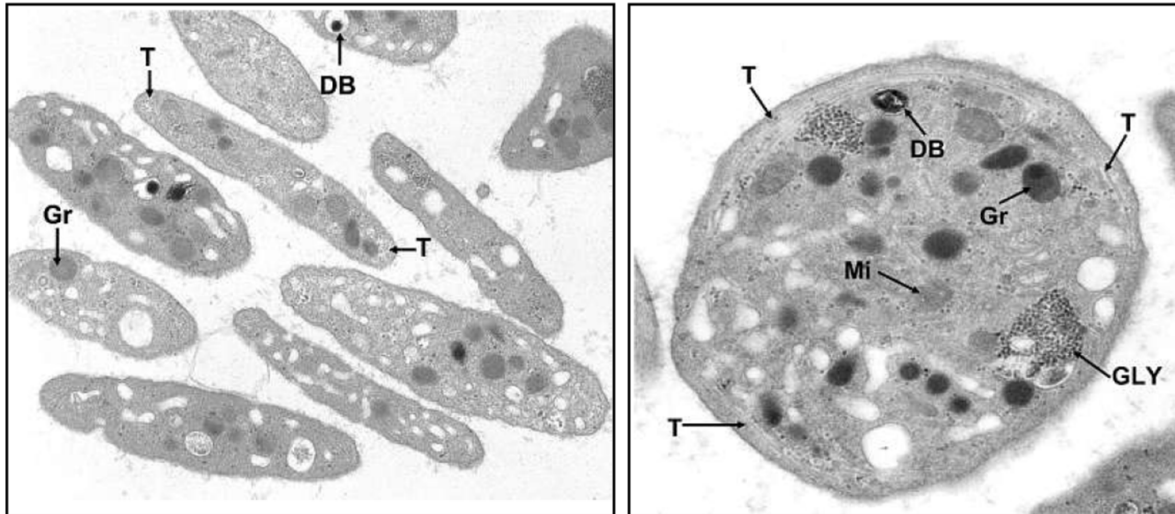


Figure 8. Morphologie des plaquettes sanguines humaines.

Microscopie électronique à transmission de plaquettes au repos. Grossissement : 17 000x (gauche) et 37 000x (droite). Les plaquettes au repos ont une forme discoïdale. Elles sont caractérisées par la présence d'un réseau de microtubules (T) en périphérie, d'organelles, telles que les mitochondries (M), de granules appelés corps dense (DB) et de granules alpha (Gr). Des amas de glycogène (Gly) sont aussi très facilement visibles en microscopie. Illustration tirée de (White and Krumwiede, 2007) avec la permission de *Schattauer GmbH*. Copyright © 2007.

Bien que dépourvues d'un noyau, les plaquettes contiennent des organelles, telles que des mitochondries, des lysosomes et un réticulum endoplasmique appelé système tubulaire dense (*dense tubular system*, DTS). Ce système est principalement impliqué dans le stockage du calcium intracellulaire (Cutler et al., 1978) et la production de lipides bioactifs, tels que le thromboxane A₂ (TXA₂) (Gerrard et al., 1978). Par ailleurs, les plaquettes contiennent deux types de granules, les granules alpha et les corps denses qui sont sécrétés lors de leur activation. Les corps denses contiennent essentiellement de petites molécules non-protéiques, telles que des nucléotides (e.g., ATP, ADP, GTP, GDP), des amines (e.g., sérotonine, histamine) ainsi que des ions inorganiques (e.g., calcium, magnésium, pyrophosphate) (Rendu and Brohard-Bohn, 2001). Les granules alpha contiennent une grande diversité de protéines, dont plus de 300 différentes ont été identifiées par spectrométrie de masse (Coppinger et al., 2004; Maynard et al., 2007). Les granules alpha contiennent, entre autres, des protéines impliquées dans l'adhérence plaquettaire (e.g., vWF, fibronectine, vitronectine, thrombospondine), des facteurs spécifiques des plaquettes (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). Ces granules sont contenus 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 très fréquemment utilisée comme marqueur de l'activation plaquettaire (McEver and Martin, 1984; Stenberg et al., 1985) et qui est impliquée dans la liaison des plaquettes aux leucocytes (McEver, 1991). Par ailleurs, la composition et la structure de ces granules ne sont pas uniformes : il existe différentes sous-populations de granules, dont la sécrétion est sélective et dépend du stimulus utilisé (Italiano Jr and Battinelli, 2009).

1.2.2 Rôle physiologique des plaquettes dans l'hémostase

La fonction essentielle des plaquettes est d'assurer le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire. Lors de lésions de l'endothélium, les plaquettes sont à l'origine de l'hémostase primaire. Elles s'activent, adhèrent puis agrègent dans un laps de temps très court afin de former le clou plaquettaire, stoppant rapidement l'hémorragie. Dans un deuxième temps, les plaquettes participent à la formation du thrombus, qui se met en place afin de permettre la réparation de l'endothélium. Le rôle des plaquettes dans chacune de ces étapes est détaillé dans les chapitres suivants.

1.2.2.1 Initiation de l'activation plaquettaire

L'activation plaquettaire est initiée suite à une lésion de l'endothélium vasculaire. Cette initiation met en jeu différents récepteurs impliqués dans l'immobilisation de la plaquette au niveau de la zone lésée, ainsi que dans la transduction du signal, aboutissant à l'activation plaquettaire.

1.2.2.1.1 Immobilisation sur la matrice sous-endothéliale

La lésion de l'endothélium vasculaire a pour conséquence directe l'exposition de la matrice sous-endothéliale, constituée essentiellement de laminine et de collagène. La fixation du facteur de vWF sur le collagène ainsi que les forces de cisaillement induisent un changement de conformation du vWF sous une forme active, reconnue par les récepteurs plaquettaires (Hassan et al., 2012; Uff et al., 2002). Le vWF circule librement dans le

plasma. Cependant, il est aussi contenu dans des granules de sécrétion des cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade) (Jaffe et al., 1973) et des plaquettes (granules alpha) (Cramer et al., 1985), et peut donc être libéré en grande quantité suite à leur activation. Le vWF associé au collagène est reconnu par le complexe glycoprotéique GPIb/V/IX présent à la surface des plaquettes, ce qui va, dans un premier temps, ralentir puis permettre l'adhérence des plaquettes à la matrice exposée (Savage et al., 1996). L'interaction initiale entre vWF et le complexe GPIb/V/IX est essentielle, car elle permet l'ancrage de la plaquette sur la matrice, même lorsque les forces de cisaillement sont très élevées, comme dans les artérioles. La ferme association entre le récepteur et le cytosquelette, via la filamine 1, va permettre la formation d'extensions membranaires qui vont ralentir et maintenir la plaquette à proximité de la matrice, permettant la fixation d'autres complexes GPIb/V/IX et menant à l'immobilisation et à l'adhérence de la plaquette à la matrice sous-endothéliale (Dopheide et al., 2002; Williamson et al., 2002).

1.2.2.1.2 Initiation de l'activation par GPVI

L'immobilisation de la plaquette va permettre au récepteur GPVI de se lier au collagène (Moroi et al., 1989), ainsi qu'à la laminine (Inoue et al., 2006). De plus, GPVI est physiquement lié au complexe GPIb/V/IX, ce qui permet son activation directe suite à la reconnaissance du vWF lié au collagène (Arthur et al., 2005). L'activation de la GPVI est un événement-clé de la signalisation plaquettaire induite par le collagène (Clemetson, 2012; Stegner and Nieswandt, 2011). L'activation de ce récepteur couplé au récepteur Fc gamma ($FcR\gamma$) (Zheng et al., 2001) déclenche une cascade de phosphorylation de tyrosines, qui permet l'activation de la phospholipase C gamma 2 ($PLC\gamma 2$) (Blake et al., 1994), et ainsi la production d'inositol triphosphate (IP_3) (Ichinohe et al., 1997). Cette cascade de signalisation induit, d'une part, la synthèse de TXA_2 (Garcia et al., 2005a) et, d'autre part, la libération de calcium des organelles de stockage (notamment du DTS), ce qui déclenche la sécrétion massive des granules alpha et des corps denses (Brass and Joseph, 1985). De plus, l'augmentation du calcium intraplaquettaire va induire un changement de forme des plaquettes (Rink et al., 1982). Celles-ci passent d'une structure discoïdale à l'extension de pseudopodes, puis à l'étalement de la plaquette et le rassemblement des organelles en son centre (Allen et al., 1979). Cette cascade de signalisation mène également à l'activation des récepteurs intégrines qui, sous une forme de haute affinité, sont impliquées dans

l'adhérence et l'agrégation plaquettaire ($\alpha 2\beta 1$ et $\alpha I I b \beta 3$) (Jung and Moroi, 2000; Quinton et al., 2002).

1.2.2.2 Propagation de l'activation et formation du clou plaquettaire

Les cascades de signalisation cellulaire lors de l'activation plaquettaire permettent l'adhérence et l'agrégation qui mènent à la formation du clou plaquettaire. Ce processus implique de multiples récepteurs et voies de transduction, qui ont fait l'objet de différents articles de revue récents (Broos et al., 2012; Li et al., 2010; Stegner and Nieswandt, 2011), et sont illustrés dans la **Figure 9**.

1.2.2.2.1 Activation des récepteurs couplés aux protéines G

La cascade de signalisation activée par GPVI provoque la sécrétion de médiateurs secondaires, tels que TXA_2 et l'ADP, qui vont permettre de soutenir l'activation des plaquettes dans une boucle autocrine et, simultanément, d'activer les plaquettes environnantes en se liant à leurs récepteurs couplés aux protéines G. L'ADP se lie à deux récepteurs sur les plaquettes, appelés récepteurs purinergiques P2Y couplés aux protéines G, 1 (P2Y1) et 12 (P2Y12) (Hollopeter et al., 2001; Jantzen et al., 1999). L'activation de P2Y1 entraîne la mobilisation du calcium intracellulaire, qui est nécessaire au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion des granules et à leur agrégation (Fabre et al., 1999; Léon et al., 1999). Ces travaux sur la fonction du récepteur P2Y1, réalisés sur les plaquettes de souris déficientes en P2Y1, ont mis en évidence l'existence d'un autre récepteur à l'ADP sur les plaquettes. Celui-ci, couplé à une protéine G de type inhibitrice (G_i), est impliqué dans l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase suite à la stimulation par l'ADP. Ce récepteur, identifié en 2001 et nommé P2Y12 (Hollopeter et al., 2001), permet de diminuer les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (AMPc), qui est un puissant inhibiteur de l'activation plaquettaire (Salzman and Weisenberger, 1972; Wolfe and Shulman, 1969). Le récepteur du TXA_2 , TXA_2R (aussi appelé récepteur TP), a été identifié en 1991 (Hirata et al., 1991). Ce récepteur est essentiellement couplé à une protéine G_q , non-sensible à la toxine pertussique (Brass et al., 1987). L'utilisation d'analogues stables du TXA_2 a permis de démontrer que l'activation du récepteur induit l'activation de la phospholipase C bêta (PLC β), menant à la production d'IP3 et à l'augmentation du calcium intracellulaire (Brass

et al., 1987). Ces événements favorisent l'activation plaquettaire, leur changement de forme, la libération de leur contenu et leur agrégation.

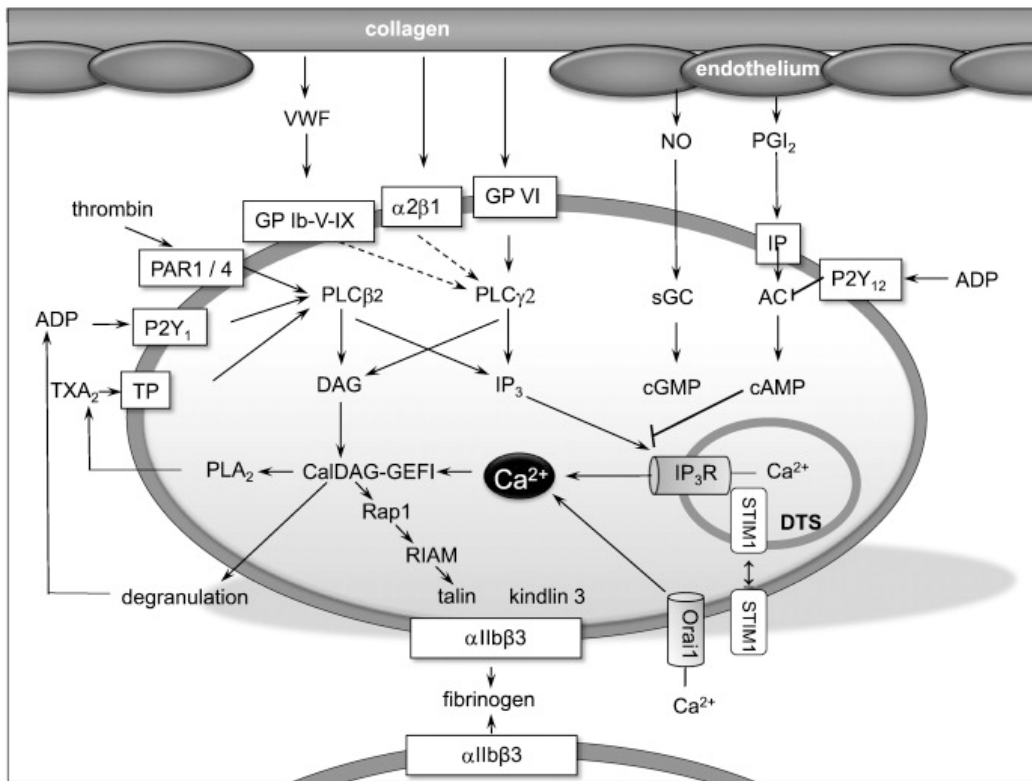


Figure 9. Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans l'activation plaquettaire.

L'ancrage initial de la plaquette sur la matrice sous-endothéliale est réalisé par le complexe GPIb/V/IX. L'immobilisation sur la matrice permet la liaison du récepteur GPVI, qui induit une cascade de signalisation plaquettaire. Celle-ci aboutit, d'une part, à la sécrétion de messagers secondaires (ADP et TXA₂) qui renforcent l'activation et permettent l'activation des plaquettes environnantes. D'autre part, les intégrines impliquées dans l'adhérence (α₂β₁) et l'agrégation (αIIbβ₃) sont activées, en passant d'une forme de basse affinité à haute affinité. Illustration tirée de (Broos et al., 2012), reproduit avec la permission de Elsevier. Copyright © 2012.

1.2.2.2.2 Activation des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhérence des cellules. L'affinité pour leur ligand peut être modulée par différentes cascades d'activation intracellulaire et, à l'inverse, la liaison de leurs ligands induit l'activation de voies de signalisation intracellulaires, permettant ainsi une signalisation bidirectionnelle (Hynes, 2002). Différentes intégrines sont exprimées à la surface des plaquettes, notamment les

intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$, qui jouent un rôle-clé dans l'adhérence et l'agrégation plaquettaire. Les cascades de signalisation, induites par la liaison du collagène à GPVI ainsi que par d'autres agonistes, permettent l'activation de ces intégrines et leur transition vers une forme de haute affinité (Chen and Kahn, 2003; Jung and Moroi, 2000; Kasirer-Friede et al., 2004; Quinton et al., 2002). Alors que GPIb/V/IX lie, de manière transitoire, le collagène pour l'immobilisation de la plaquette, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, sous sa forme de haute affinité, lie fermement le collagène et est un acteur-clé du maintien de l'adhérence plaquettaire à la matrice sous-endothéliale (Saelman et al., 1994; Santoro, 1986). L'activation de GPVI induit la transition de $\alpha 2\beta 1$ vers une forme de haute affinité (Chen and Kahn, 2003), tandis que la liaison du collagène à l'intégrine active la PLC γ , renforçant ainsi l'activation plaquettaire (Inoue et al., 2003). L'activation de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ permet, quant à elle, l'agrégation des plaquettes (Holmback et al., 1996). Sous sa forme de haute affinité, cette intégrine lie, entre autres, le vWF (Ruggeri et al., 1982) et le fibrinogène (Bennett and Vilaire, 1979; Marguerie et al., 1979). La structure multimérique du vWF et dimérique du fibrinogène rend possible la liaison de plusieurs de ces intégrines, et leur pontage permet ainsi l'agrégation des plaquettes.

1.2.2.2.3 Production de microvésicules par les plaquettes

Bien que de nombreux facteurs solubles soient sécrétés directement dans le plasma par les plaquettes activées, d'autres sont sécrétés à l'intérieur ou à la surface de vésicules membranaires. Les exosomes sont caractérisés par une petite taille (30-100 nm) et sont sécrétés par fusion des corps multivésiculaires ou des granules avec la membrane plasmique (Thery et al., 2002). Les microparticules (MP) se distinguent par une taille supérieure (100 nm à 1 μm) et une plus grande hétérogénéité. Elles sont issues de la vésiculation de la membrane plasmique par bourgeonnement (*blebbing*), et possèdent donc les marqueurs de surface de leur cellule d'origine. Les plaquettes produisent ces deux types de vésicules suite à leur activation (Heijnen et al., 1999). Bien que ces deux types de particules lipidiques puissent être séparés par centrifugation différentielle, les méthodes d'isolation des MP ne sont pas standardisées, et beaucoup d'études publiées sur les MP plaquettaires incluent les exosomes du fait d'une centrifugation élevée (>50 000 g). Les MP permettent la communication intercellulaire (Pap et al., 2009) et possèdent de multiples propriétés. La présence de facteurs de coagulation dans les MP plaquettaires (Garcia et al.,

2005b) et de leurs récepteurs (Sinauridze et al., 2007) leur confère une activité procoagulante, qui a été mise en évidence dès leur découverte (Wolf, 1967). De plus, le feuillet externe de ces MP est généralement riche en phosphatidylsérine (Perez-Pujol et al., 2007), ce qui permet d'augmenter la surface membranaire sur laquelle peut s'établir la coagulation. Ces MP dérivées des plaquettes possèdent aussi des propriétés pro-inflammatoires (Boilard et al., 2010) et pro-angiogéniques (Kim et al., 2004). Ces différentes propriétés des MP plaquettaires pourraient être associées, non seulement à leur contenu en protéines, mais aussi en lipides bioactifs (Barry et al., 1997) et en acides nucléiques, notamment en microARN (Diehl et al., 2012).

1.2.2.3 Interaction avec la cascade de coagulation formation du thrombus

Parallèlement à l'hémostase primaire, la cascade de coagulation est initiée de manière concomitante. Celle-ci mène à la conversion par protéolyse du fibrinogène soluble en fibrine (Bailey et al., 1951), qui polymérise en un réseau insoluble et permet la formation d'un thrombus stable. Les principaux facteurs impliqués dans cette cascade sont résumés à la **Figure 10**.

Le modèle initial de la coagulation, établi dans les années '60, consiste en des protéases non-actives (ou zymogène) qui sont activées par protéolyse. Une fois activées, celles-ci vont à leur tour pouvoir réaliser la protéolyse des facteurs situés en aval de la cascade, menant ultimement au clivage de la pro-thrombine en thrombine par le facteur X (FX), une fois celui-ci activé (FXa). Ainsi, cette cascade permet une amplification permettant la production massive et rapide d'une grande quantité de thrombine qui est la protéase effectrice de cette cascade, réalisant la conversion du fibrinogène en réseau de fibrine (Davie and Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Cependant, certains de ces composants activés par protéolyse ne sont pas enzymatiques, mais correspondent à des cofacteurs facilitant l'activité des protéases. Deux voies majeures menant à la production de thrombine ont été décrites, soit les voies intrinsèque et extrinsèque. Celles-ci convergent vers une voie commune, dans laquelle le FXa réalise la conversion de la pro-thrombine. Ces deux voies, décrites initialement comme deux voies indépendantes, ne sont cependant pas redondantes, puisque l'altération de composants de l'une ou l'autre de ces voies entraîne des troubles de saignement sévères ou en un ralentissement de la formation de thrombus (Peyvandi et al., 2006). Les modèles actuels tendent plus vers une fonction

séquentielle de ces deux cascades (Furie and Furie, 2008). Alors que la voie extrinsèque permet l'initiation de la cascade par la génération d'une faible quantité de thrombine, l'activation subséquente de la voie intrinsèque permet l'amplification de la coagulation, et génère une quantité de thrombine beaucoup plus importante (Brummel et al., 2002).

La cascade de coagulation, essentiellement initiée via la voie extrinsèque, dépend de l'exposition de *tissue factor* (TF) sous sa forme active à la surface de cellules ou des MP. Les premières observations, selon lesquelles le TF est uniquement exprimé par les cellules extravasculaires, sont à l'origine de la qualification d'« extrinsèque » donnée à cette voie (Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990). Cependant, elle peut aussi être induite suite à un stimulus à la surface des cellules endothéliales (Bevilacqua et al., 1984) et des monocytes (Cermak et al., 1993). L'expression de TF circulant, associé aux MP, a aussi été observée (Giesen et al., 1999). Cependant, la majorité du TF exposé à la surface des cellules et des MP est sous une forme inactive, ayant ainsi peu d'effet procoagulant (Bach, 2006). La catalyse de sa conversion sous une forme active a initialement été attribuée à l'action de la protéine disulfide isomérase (PDI), qui est sécrétée par les plaquettes et les cellules endothéliales activées (Reinhardt et al., 2008). Cependant, ce modèle est actuellement remis en cause; l'activation de TF nécessiterait plutôt la présence de phosphatidylsérine à la surface des membranes externes (Rao et al., 2012). L'association du TF avec le facteur de coagulation plasmatique FVII à la surface des cellules va permettre l'activation de celui-ci en FVIIa (Osterud and Rapaport, 1977) et, par la suite, l'activation séquentielle dans une cascade protéolytique de FX et de la pro-thrombine. La faible quantité de thrombine ainsi générée est cependant suffisante pour (i) induire ou renforcer l'activation plaquettaire, (ii) initier la conversion du fibrinogène en fibrine, et (iii) amplifier la cascade de coagulation, qui permettra la production d'une seconde vague de thrombine, cette fois-ci beaucoup plus conséquente.

En effet, la thrombine est un puissant agoniste de l'activation plaquettaire qui exerce son action via les récepteurs couplés aux protéines G, appelés *protease-activated receptor - 1* (PAR-1) et *-4* (PAR-4) (Kahn et al., 1998; Vu et al., 1991). Le mécanisme d'activation de ces récepteurs est particulier, car il nécessite l'activité protéase de celle-ci : elle clive l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur et la nouvelle extrémité ainsi formée constitue le ligand du récepteur (Vu et al., 1991). Cette génération de thrombine est

suffisante pour initier la formation du thrombus et l'agrégation plaquettaire, et ce, en l'absence d'exposition de la matrice de collagène (Dubois et al., 2006).

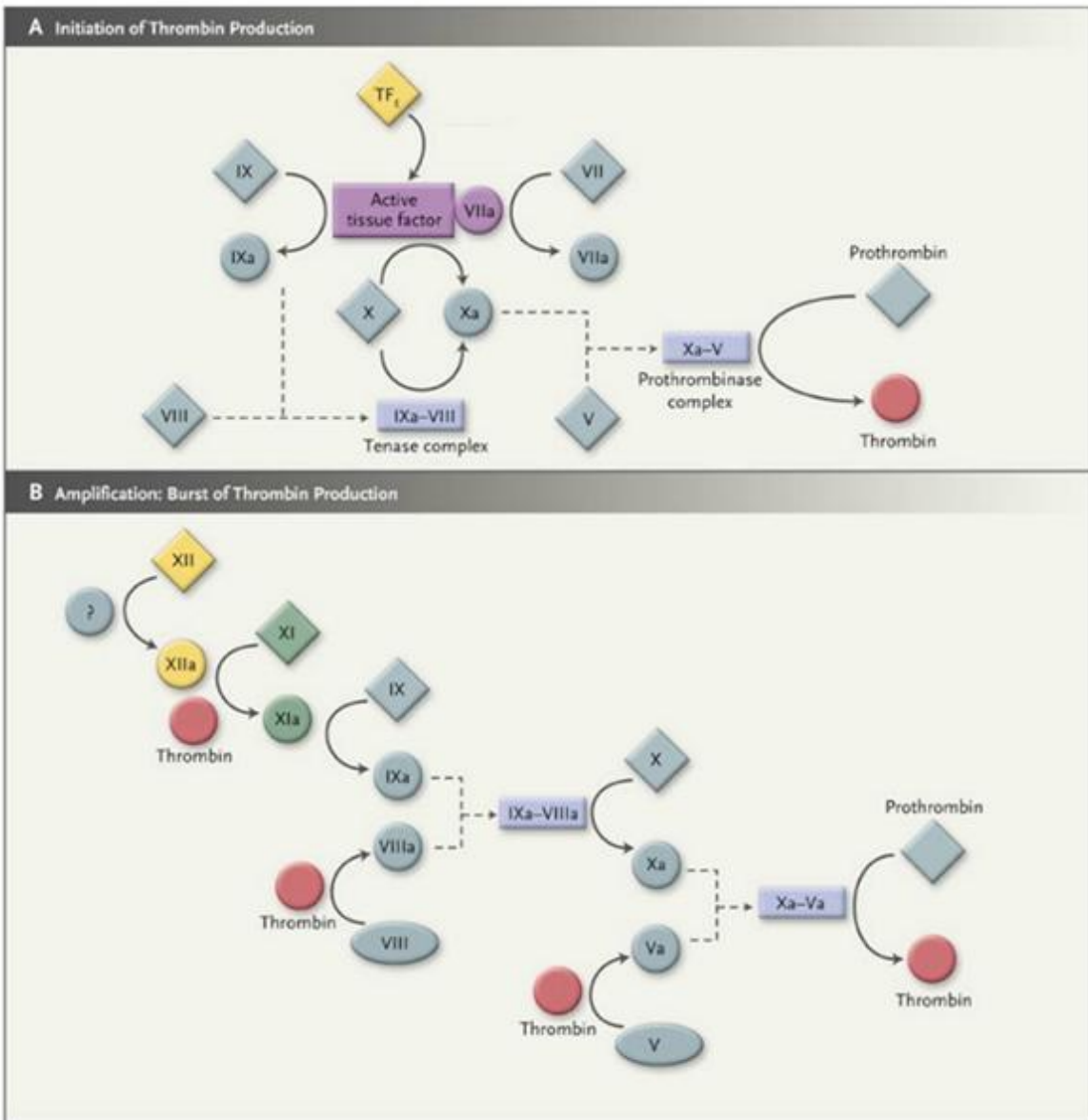


Figure 10. La cascade de coagulation.

(A) La cascade de coagulation est initiée par la voie extrinsèque, via l'exposition de TF procoagulant. Cette voie permet la génération d'une petite quantité de thrombine pouvant initier une seconde vague de coagulation. (B) L'amplification de la coagulation passe par l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation, impliquant l'activation protéolytique de nombreux facteurs par la thrombine. Illustration adaptée de (Furie and Furie, 2008), reproduite avec la permission de la *Massachusetts Medical Society - Copyright © 2008*

La thrombine active différentes protéases et cofacteurs de la voie intrinsèque et de la voie commune de coagulation. Au départ de la voie intrinsèque, la thrombine clive le facteur FXI pour l'activer (Gailani and Broze, 1991). De manière similaire, la thrombine permet l'activation protéolytique des cofacteurs de FIXa et FXa, respectivement FVIII (Eaton et al., 1986; Lenting et al., 1994) et FV (Suzuki et al., 1982). Ainsi, la faible quantité de thrombine générée initialement, en activant de nombreux facteurs, aboutit à une activation robuste de la cascade de coagulation et à la génération massive de thrombine.

Les interactions entre les plaquettes et la cascade de coagulation sont multiples. La cascade de coagulation permet l'activation des plaquettes par la génération de thrombine. Inversement, certains éléments impliqués dans la cascade sont sécrétés par les plaquettes activées. Les plaquettes sécrètent, entre autres, le cofacteur FV, qui permet de générer efficacement la thrombine (Chesney et al., 1981). Les plaquettes sécrètent également le substrat majeur de la cascade, le fibrinogène (Broekman et al., 1975), ce qui a pour effet d'augmenter localement sa concentration afin de former le réseau de fibrine nécessaire à la stabilité du thrombus. Certaines des réactions de la cascade de coagulation se déroulent à la surface même des plaquettes activées, ce qui permet de circonscrire la formation du thrombus (Lentz, 2003).

1.2.2.4 Contrôle de l'activation plaquettaire et de la croissance du thrombus

La formation d'un thrombus doit être localisée et contrôlée, afin de ne pas propager la réaction hémostatique dans tout le vaisseau sanguin et de provoquer son obstruction. Pour cela, il existe différents systèmes qui inhibent l'activation plaquettaire de même que la coagulation, et limitent ainsi la croissance du thrombus et sa propagation.

Afin d'empêcher l'activation des plaquettes en dehors de la zone lésée, les cellules endothéliales non-activées sécrètent de manière constitutive différentes molécules, 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). La liaison du NO sur la guanylyl-cyclase soluble (sGC) induit directement la production de GMP cyclique (GMPc) intraplaquettaire, qui inhibe plusieurs des mécanismes de signalisation cellulaire menant à leur activation. La liaison de la PGI₂ sur son récepteur PI induit, quant à elle, l'augmentation de l'AMPc qui, en inhibant la protéine kinase A (PKA), inhibe fortement l'activation plaquettaire (Jones et al., 2012). Ces deux molécules, produites de manière

continue par l'endothélium non lésé, permettent le maintien sous une forme inactive des plaquettes circulantes.

La restriction de la coagulation à la zone lésée se fait essentiellement par la séquestration des complexes actifs de la cascade de coagulation à la surface des cellules immobilisées. En effet, ces complexes s'assemblent directement sur les cellules endothéliales lésées ou les plaquettes adhérentes qui, toutes deux, exposent à la surface de leurs membranes de la phosphatidylsérine, qui est procoagulante (Lentz, 2003). L'assemblage de ces complexes actifs à la surface des cellules se fait, dans certains cas, par la présence de facteurs de coagulation transmembranaires, tels que le TF, où le complexe TF/FVIIa/FXa s'assemble pour former la thrombine. Dans d'autres cas, ces facteurs, tels que le FV, le FVII et la prothrombine, s'associent à la phosphatidylsérine via leur domaine gamma carboxy-glutamate, modifié post-transcriptionnellement par la vitamine K (Butenas et al., 2002). Leur association aux membranes riches en phosphatidylsérine va permettre l'assemblage des différents complexes de coagulation (Lentz, 2003). Ainsi, les facteurs de coagulation circulants, non complexés à des surfaces membranaires ne peuvent propager la cascade de coagulation.

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 le cas, par exemple, de la protéine C, qui est activée par clivage protéolytique par la thrombine lorsque celle-ci est associée au récepteur endothélial thrombomoduline (Kisiel, 1979; Stearns-Kurosawa et al., 1996). Une fois activée, cette sérine protéase clive les facteurs Va et VIIIa pour limiter la production de thrombine (Lu et al., 1996). D'autres facteurs, appelés *serin protease inhibitors* (Serpines) inhibent les protéases de la cascade de coagulation. Parmi eux, l'antithrombine est un acteur majeur de la régulation de la coagulation. En présence d'héparine, cette Serpine se lie à la thrombine (Rosenberg and Damus, 1973) ainsi qu'aux protéases FIXa (Rosenberg et al., 1975) et FXa (Marciniak, 1973), qui a pour effet d'inhiber leur fonction.

La croissance du thrombus est, par ailleurs, limitée par la fibrinolyse, c'est-à-dire la lyse du réseau de fibrine par la plasmine (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005). Celle-ci circule dans le plasma sous forme zymogène (plasminogène) et son activation protéolytique est réalisée par deux protéases appelées *tissue Plasminogen Activator* (tPA) et l'urokinase.

La fibrinolyse est, elle aussi, régulée par différents inhibiteurs, tels que le *plasminogen activator inhibitor* (PAI-1), sécrété par les plaquettes activées, et les inhibiteurs de la fibrinolyse activables par la thrombine (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI). Ainsi, la balance entre la coagulation et la fibrinolyse réalisée par de multiples facteurs et inhibiteurs permet le contrôle et la régulation de la croissance du thrombus.

1.2.3 Les ARN messagers plaquettaires et la traduction

1.2.3.1 Découverte de la synthèse de protéines *de novo* au sein des plaquettes

Les plaquettes sont dépourvues de noyaux, et ne peuvent donc pas transcrire d'ADN génomique en ARN. Cependant, elles héritent d'ARNm poly(A) de leurs cellules progénitrices, les MK. L'élucidation du profil complet des ARNm plaquettaires par *RNA-seq* a récemment été publiée, et a permis l'identification de plus de 9000 gènes référencés chez l'humain (Rowley et al., 2011). Bien qu'aucune transcription ne soit possible dans les plaquettes, les comparaisons des analyses transcriptomique et protéomique effectuées dans les plaquettes démontrent que le transcriptome plaquettaire est un reflet fidèle du protéome plaquettaire (McRedmond et al., 2004). Les plaquettes contiennent des protéines et ARN ribosomiaux, ainsi que des facteurs d'initiation de la traduction, tels que eIF4-E et eIF2- α (Rosenwald et al., 2001), appuyant ainsi leur capacité à traduire leurs ARNm en protéines.

Dès les années '60, la capacité des plaquettes à synthétiser des protéines a été mise en évidence par l'incorporation de leucine marquée au ^{14}C dans les protéines plaquettaires (Warshaw et al., 1966, 1967). Les premières protéines identifiées comme étant traduites dans les plaquettes de manière constitutive sont les plus abondantes, telles que les protéines contractiles (Booyse and Rafelson, 1967). Cette synthèse protéique se fait majoritairement dans les plus grosses plaquettes, correspondant vraisemblablement aux plaquettes les plus jeunes qui, en vieillissant, perdent peu à peu leur potentiel traductionnel (Karparkin and Charnatz, 1969). Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par le fait que les plaquettes des personnes souffrant de purpura thrombopénique idiopathique (PTI) ont une capacité supérieure à synthétiser des protéines que les personnes saines (Kieffer et al., 1987). Cette pathologie auto-immune, liée à la production d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur glycoprotéique plaquettaire $\alpha\text{IIb}\beta_3$, accélère la destruction des plaquettes au niveau de la rate. La durée de vie des plaquettes de ces patients est donc réduite, ce qui est compensé

partiellement par une augmentation de la production plaquettaire menant au rajeunissement des plaquettes circulantes comparativement aux individus sains. L'étude des plaquettes de ces patients a également permis de démontrer la synthèse de protéines importantes au sein des plaquettes, telles que les récepteurs glycoprotéiques (GPIb, IIb, IIIa) et les protéines contenues dans les granules alpha (fibrinogène, vWF, albumine, thrombospondine). De plus, la présence d'un réticulum endoplasmique et de polyribosomes a pu être observée dans les jeunes plaquettes, suite à l'induction de thrombocytopénie ou chez les patients souffrant de PTI (Kieffer et al., 1987; Ts'ao, 1971).

Ainsi, les plaquettes sont capables de synthèse protéique continue, dont le niveau semble diminuer au cours de leur vieillissement.

1.2.3.2 Régulation de la synthèse protéique

En plus de la synthèse continue, certaines protéines sont traduites dans les plaquettes suite à leur stimulation par différents agonistes. C'est le cas, par exemple, de la *B-cell lymphoma 3-encoded protein* (Bcl-3), qui est fortement exprimée dans les plaquettes activées par la thrombine (Weyrich et al., 1998). Cette étude a également démontré que la synthèse de Bcl-3 est sous le contrôle de la cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian target of rapamycin*, mTOR). Suite à l'activation de mTOR par la voie PI3 kinase, la protéine séquestrant le facteur d'initiation eIF-4E (*eIF4E binding protein 1*, 4EBP1) est phosphorylée, ce qui permet la libération de celui-ci. Par ailleurs, la traduction plaquettaire est fortement induite lorsque celles-ci sont agrégées, et il a été démontré que la liaison de α IIb β 3 au fibrinogène était nécessaire à cette traduction (Pabla et al., 1999). L'engagement de l'intégrine induit notamment la translocation de eIF-4E à l'intérieur des plaquettes, dans une zone riche en ARNm (Lindemann et al., 2001). De manière similaire, la cyclo-oxygénase 1 (Cox-1), impliquée dans la voie de biosynthèse du TXA₂, est synthétisée *de novo* par les plaquettes stimulées en présence de fibrinogène et de thrombine, de manière dépendante de la voie mTOR (Evangelista et al., 2006). Cette capacité des plaquettes à synthétiser Cox-1 *de novo* pourrait expliquer la résistance observée chez certains patients au traitement antiplaquettaire par l'aspirine, qui inhibe de manière irréversible cette enzyme par acétylation.

eIF-2 α est un autre point de contrôle de l'initiation de la traduction. Sa phosphorylation, qui a pu être observée dans les plaquettes suite à l'induction d'un stress au

réticulum endoplasmique, inhibe la traduction (López et al., 2009; Zbidi et al., 2010). Cependant, l'implication de ce facteur d'initiation dans la régulation de la traduction plaquettaire n'a, pour le moment, pas été démontrée.

D'autres protéines synthétisées *de novo* suite à l'activation plaquettaire ont été décrites dans la littérature. Récemment, la traduction du facteur dérivé des cellules stromales, *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), a été démontrée suite à l'activation par la thrombine (Huang et al., 2012). PAI-1 est synthétisé de manière continue, et sa synthèse est renforcée par la thrombine (Brogren et al., 2004). L'export sélectif de l'ARNm de l'inhibiteur des métallopeptidases, *TIMP metalloproteinase inhibitor 2* (Timp-2), des MK vers les plaquettes permet sa synthèse après l'activation plaquettaire (Cecchetti et al., 2011).

En plus des activateurs plaquettaires classiques, les molécules pro-inflammatoires peuvent aussi induire la synthèse protéique plaquettaire. Par exemple, l'alpha-toxine, dérivée du staphylocoque doré, induit la traduction de Bcl-3 par les plaquettes (Schubert et al., 2011). D'autre part, la stimulation des plaquettes par le lipopolysaccharide (LPS) induirait la synthèse de la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2) et de l'interleukine 1 beta (Il-1 β) (Shashkin et al., 2008).

La présence de pré-ARNm pouvant être épissés à la suite de l'activation plaquettaire a aussi été observée. En effet, la présence des ARN et de protéines impliquée dans l'épissage a pu être détectée dans les plaquettes (Denis et al., 2005). L'épissage de l'ARNm codant pour l'Il-1 β , le TF (Schwartz et al., 2006) et la Cox-2 (Shashkin et al., 2008) pourrait ainsi mener à la traduction de ces ARNm suite à la stimulation plaquettaire. Cependant, la synthèse de l'Il-1 β est controversée, car elle pourrait être liée à la présence de leucocytes contaminants, dont la capacité de traduction est largement supérieure à celle des plaquettes (Pillitteri et al., 2007). La présence et la synthèse *de novo* du TF au sein des plaquettes a été remise en cause pour les mêmes raisons (Bouchard et al., 2012; Bouchard et al., 2010).

De manière générale, la traduction des ARNm plaquettaire, suite à différents stimuli, est très difficile à confirmer, du fait de la présence, bien que minime, de leucocytes contaminants, dont les capacités synthétiques sont beaucoup plus élevées.

1.2.3.3 Présence de microARN dans les plaquettes

La régulation de la synthèse protéique au sein des plaquettes implique la présence d'éléments régulateurs de la traduction. Les microARN sont un acteur majeur de la régulation post-transcriptionnelle dans les cellules eucaryotes, et leur présence au sein des plaquettes méritait donc d'être examinée de plus près. Les travaux réalisés au sein de mon laboratoire d'accueil, avant le début de mon doctorat, ont d'ailleurs permis de démontrer que les plaquettes humaines sont très riches en microARN matures (Landry et al., 2009). Au cours de cette étude, la présence et la fonctionnalité des différents complexes impliqués dans la voie des microARN ont été analysées. Ceci a permis de démontrer que certaines protéines des complexes cytosoliques de la voie des microARN sont présentes, telles que la protéine Ago2, FMRP, Dicer et TRBP, et que les protéines Ago2 et Dicer sont fonctionnelles *in vitro*. Tel qu'attendu, les composantes nucléaires Drosha et DGCR8 sont absentes des plaquettes, en raison de l'absence de noyau. Le transcriptome des plaquettes est enrichi en ARNm possédant de longues séquences 3'UTR, suggérant que ces microARN, particulièrement abondants, peuvent être impliqués dans la régulation de la traduction des ARNm plaquettaires. Par ailleurs, la présence de pré-microARN, observée par northern blot, suggère un rôle pour le complexe Dicer•TRBP dans la génération de nouveaux microARN matures au sein des plaquettes. La présence de microARN dans les plaquettes a été confirmée subséquentement par d'autres groupes (Nagalla et al., 2011; Osman and Falker, 2011; Stratz et al., 2012). Le profil des microARN plaquettaires a, par la suite, été corrélé avec leur réactivité (Nagalla et al., 2011), ainsi que diverses pathologies, telles que la thrombocytémie essentielle (Xu et al., 2012), la colite ulcéreuse (Duttgupta et al., 2012), et les cardiopathies coronariennes (CAD) (Sondermeijer et al., 2011).

1.2.4 Implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires

Les plaquettes sont impliquées dans de multiples pathologies. Les défauts plaquettaires, que ce soit de numération (thrombocytopénie) ou de réactivité, induisent un temps de saignement prolongé et un risque d'hémorragie élevé, ou un risque accru de thrombose occlusive.

L'implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques, qui demeure la première cause de mortalité mondiale (WHO, 2011), est l'une des

principales raisons de l'intensité des recherches réalisées sur les plaquettes, notamment dans la recherche de nouveaux traitements antiplaquettaires. L'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire chronique (Ross, 1999). Dans ce processus, les plaquettes sont impliquées à la fois dans l'initiation, la propagation et la phase finale de formation du thrombus occlusif (Kaplan and Jackson, 2011). L'athérosclérose est caractérisée par le dépôt, à l'intérieur de la paroi vasculaire, d'une plaque riche en lipides, notamment en *low density lipoproteins* (LDL) et cholestérol, causé par l'inflammation du vaisseau. Contrairement aux cellules endothéliales au repos, l'endothélium inflammé expose des récepteurs et sécrète des médiateurs favorisant son interaction avec les plaquettes ainsi que leur adhérence (Massberg et al., 2002). De plus, cette interaction plaquette/endothélium favorise le maintien de l'activation endothéliale et plaquettaire (Henn et al., 1998), ce qui induit le recrutement de leucocytes par la libération de médiateurs plaquettaires pro-inflammatoires et chimiotactiques, tels que l'Il-1, le PF4 et la chimiokine *regulated and normal T cell expressed and secreted* (RANTES) (Gawaz et al., 2000; von Hundelshausen et al., 2001; Weber, 2005). Cette interaction induit également l'expression de récepteurs, tels que la E-sélectine et la P-sélectine, qui permettent (i) les interactions endothélium-leucocytes et plaquettes-leucocytes, via le ligand glycoprotéique PSGL-1 présent à la surface de ces cellules (Frenette et al., 2000; Sako et al., 1993), ainsi que (ii) la sécrétion de CD40 ligand, qui renforce l'activation endothéliale (Henn et al., 1998). L'adhérence des plaquettes à l'endothélium induit donc le recrutement de leucocytes et leur activation. Les monocytes activés ainsi que les lymphocytes T migrent au travers de l'endothélium jusqu'à la plaque athérosclérotique, où ils favoriseront sa croissance. Les monocytes se différencient en macrophages, qui se transforment en cellules spumeuses caractéristiques des lésions athérosclérotiques (Aqel et al., 1984). La croissance de cette plaque obstrue peu à peu le vaisseau sanguin et le rigidifie par la formation d'un cap fibreux (Hatsukami et al., 2000). Lorsque cette plaque se rompt, elle expose une surface et libère dans la circulation son contenu, tout deux pro-thrombogéniques, dans une série d'événements qui induisent la formation rapide d'un thrombus obstruant le vaisseau sanguin. La rupture de cette plaque est donc l'élément déclencheur provoquant l'ischémie des tissus (infarctus) (e.g., infarctus du myocarde) et lors d'incidents cérébrovasculaires, les deux principales causes de mortalité associées aux maladies cardiovasculaires.

Du fait de leur participation à la croissance de la plaque ainsi qu'à la formation finale du thrombus, les plaquettes sont une cible majeure dans le traitement des maladies athérosclérotiques. En effet, les traitements antiplaquettaires associés aux traitements anticoagulants sont très couramment utilisés, de manière préventive et continue, chez les personnes à haut risque, ou pour la dissolution du thrombus formé suite à un accident cardiovasculaire (BMJ, 2002). Les traitements antiplaquettaires essentiellement utilisés sont l'aspirine et les thienopyridines. L'aspirine inhibe de façon irréversible les cyclo-oxygénases par acétylation, notamment la Cox-1, qui est nécessaire à la biosynthèse de TXA₂ par les plaquettes (Roth et al., 1975). Les inhibiteurs de P2Y₁₂, notamment le Clopidogrel (Hollopeter et al., 2001), bloquent ce récepteur de manière irréversible (Savi et al., 1994). Cependant, le Clopidogrel est une pro-drogue, qui doit d'abord être métabolisée par le foie pour être active, ce qui leur confère une efficacité très variable d'un individu à l'autre (Savi et al., 1992; Tantry et al., 2012). Les intolérances et la résistance à ces deux types de traitements, observées chez certains patients (Linden et al., 2012), démontre le besoin de mettre au point d'autres inhibiteurs oraux de la fonction plaquettaire.

1.2.5 Pathologies plaquettaires associées à l'insuffisance rénale chronique

Des dysfonctions plaquettaires peuvent être subséquentes à différentes pathologies. C'est le cas, par exemple, de l'insuffisance rénale chronique, une pathologie à laquelle nous nous sommes intéressés afin de déterminer l'influence des microARN dans les dysfonctions plaquettaires. Cette section détaille donc l'étiologie et les conséquences de l'insuffisance rénale chronique, notamment sur la fonction plaquettaire.

1.2.5.1 L'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique est une pathologie dans laquelle la capacité de filtration des reins, prise en charge par les néphrons, est altérée de manière permanente (>3 mois) et irréversible. Cinq (5) stades sont définis selon la sévérité de l'atteinte (Levin et al., 2008). Ils sont établis en fonction du taux de filtration glomérulaire estimé (*estimated glomerular filtration rate*, eGFR), mesuré à partir de la concentration plasmatique de certaines substances, notamment la créatinine (Fesler and Mimran, 2011). La progression vers les stades avancés est caractérisée par l'accumulation de déchets métaboliques, notamment l'urée, donnant le nom alternatif d'urémie à cette pathologie. Lorsque

l'insuffisance rénale atteint le stade 5, la fonction rénale résiduelle n'est plus suffisante, et le recours à des thérapies de remplacement rénal, telles que la dialyse ou la transplantation, devient alors essentiel à la survie des patients. En 2010, près de 40 000 patients ont été recensés en stade terminal d'insuffisance rénale au Canada. Ce chiffre correspond à une augmentation de 189 % par rapport à 2001 (RCITO, 2012), et reflète en partie le vieillissement de la population canadienne, de même que l'accroissement des pathologies pouvant mener à l'insuffisance rénale, telles que l'hypertension et le diabète.

L'insuffisance rénale chronique peut être liée directement à des pathologies rénales (glomérulonéphrite, polykystose, obstruction, etc). Cependant, elle est beaucoup plus souvent subséquente à d'autres pathologies, notamment le diabète et l'hypertension, qui sont les deux causes majeures de l'insuffisance rénale.

1.2.5.2 Maladie cardiovasculaires chez les patients en insuffisance rénale

Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques représentent une cause majeure de la morbidité et de la mortalité des patients en insuffisance rénale chronique. La prévalence des accidents cardiovasculaires est particulièrement élevée chez les patients hémodialysés, représentant environ 50 % des causes de mortalité chez ces patients (RCITO, 2008). Elle est aussi très élevée chez les patients aux stades moins avancés, puisque la probabilité d'accident cardiovasculaire fatal prématuré est plus élevée que le risque de progression vers le stade final d'insuffisance rénale (Stein et al., 2006). Cette très forte incidence des maladies cardiovasculaires chez ces patients est attribuable, du moins en partie, aux facteurs de risques traditionnels qui sont concomitants à l'insuffisance rénale. En effet, les patients souffrant d'insuffisance rénale sont généralement âgés, et l'hypertension et le diabète, qui sont très souvent à l'origine de cette insuffisance, constituent également des facteurs de risques traditionnels d'accidents cardiovasculaires. De plus, la progression de l'insuffisance vers les stades plus avancés (stade 3 ou plus) implique fréquemment la dyslipidémie et l'hypertension, ce qui contribue à augmenter le risque d'accidents cardiovasculaires encore davantage (Levin et al., 2008). Cependant, ces facteurs de risques traditionnels n'expliquent pas entièrement la très forte incidence des accidents cardiovasculaires. D'autres facteurs de risques, dits non traditionnels, tels que le stress oxydatif et l'inflammation, liés à l'accumulation de déchets métaboliques dans la circulation, pourraient aussi contribuer à cette incidence élevée (Siasos et al., 2012).

1.2.5.3 Défauts plaquettaires et insuffisance rénale

Paradoxalement, les patients en insuffisance rénale souffrent à la fois de troubles thrombotiques et hémorragiques (Boccardo et al., 2004; Kaw and Malhotra, 2006; Rios et al., 2010). Les troubles hémorragiques observés chez ces patients sont essentiellement attribuables à un défaut plaquettaire ainsi qu'à un défaut d'interaction entre l'endothélium et les plaquettes (Castillo et al., 1986). En effet, les plaquettes urémiques montrent une plus faible réactivité. L'altération du contenu de leurs granules alpha, à savoir la diminution de l'ADP et de la sérotonine (Eknoyan and Brown, 1981), ainsi qu'un niveau d'AMPc intracellulaire élevé (Vlachoyannis and Schoeppe, 1982), pourraient expliquer cette faible réactivité. Des défauts au niveau du cytosquelette et dans la contractilité plaquettaire ont également été observés (Escolar et al., 1993). De plus, la forte activité protéolytique présente dans le plasma des personnes urémiques diminue l'expression du récepteur glycoprotéique de surface GPIIb/IIIa (Sloand et al., 1991). Parallèlement, l'accumulation de fragments de fibrinogène sature le récepteur α IIb β 3, réduisant ainsi sa capacité à fixer le fibrinogène et le vWF (Benigni et al., 1993; Sreedhara et al., 1996). Ensemble, l'altération de ces deux récepteurs diminue, de manière importante, la capacité d'agrégation et d'interaction des plaquettes avec la paroi endothéliale. Ces défauts plaquettaires se traduisent aussi par une altération du protéome, comme il a été démontré dans plusieurs études, que ce soit chez les patients urémiques ou dialysés (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007; Walkowiak et al., 2012). Cependant, seuls Marques et al (2010) ont réalisé l'identification par spectrométrie de masse des protéines. Cette étude a été réalisée chez les patients urémiques montrant une faible réactivité plaquettaire, comparés à ceux ne présentant pas ces troubles. Parmi les protéines identifiées, la *WD repeat-containing protein 1* (WDR1, ou *actin-interacting protein 1*, AIP1) qui est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine est diminuée. La sous unité alpha des intégrines, α IIb, est quant à elle augmentée dans les plaquettes des patients urémiques dont la réactivité est réduite. Parmi les protéines impliquées dans le stress oxydatif, certaines des protéines de la famille des *glutathione S-transferases* ainsi que la *peroxyredoxine VI* sont diminuées chez les patients montrant une faible réactivité plaquettaire.

La dialyse ne permet de corriger que partiellement ces troubles hémorragiques, ce qui complexifie davantage, voire empêche, l'intervention chirurgicale de transplantation

rénale. Ainsi, les patients en insuffisance rénale, qu'ils soient dialysés ou non, souffrent de troubles hémostatiques complexes à la fois thrombotiques et hémorragiques, se traduisant notamment par une altération de la fonction plaquettaire.

2. Objectifs

Dans un article paru peu après mon arrivée en 2009, mon laboratoire d'accueil a démontré la présence de microARN plaquettaires, ainsi que des complexes cytoplasmiques fonctionnels de la voie des microARN impliqués à la fois dans la biogenèse et la fonction de ces microARN (Landry et al., 2009). L'objectif de mon doctorat était de mieux caractériser ces microARN, ainsi que de déterminer leur activité et leur fonction, que ce soit dans un contexte pathologique, tel que l'insuffisance rénale chronique, ou plus physiologique, comme l'activation plaquettaire.

Étant donné que les plaquettes ne peuvent transcrire des gènes *de novo* et ont une durée de vie estimée à 8 jours dans la circulation (Hawker et al., 1980), les microARN présents dans cet élément anucléé pourraient posséder des caractéristiques uniques. J'ai donc voulu analyser, plus en détail, le répertoire des microARN plaquettaires par séquençage à haut débit, afin d'étudier leur origine, leurs séquences, leurs modifications, l'existence de nouveaux microARN et la présence de microARN spécifiques aux plaquettes.

Les multiples défauts plaquettaires observés chez les patients en insuffisance rénale chronique avancée se traduisent notamment par une altération du protéome plaquettaire (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007; Walkowiak et al., 2012). Ainsi, il est possible que la traduction de certains ARNm soit altérée chez ces patients, et que leur régulation par les microARN puisse être impliquée. C'est pour cette raison que j'ai étudié l'impact de l'insuffisance rénale chronique sur les microARN plaquettaires et leur fonction, et examiné si cette condition pouvait affecter le transcriptome plaquettaire.

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire, qui passe par leur activation suite à la lésion de l'endothélium. Au cours du processus d'activation des plaquettes, la traduction de certaines protéines a pu être observée, ce qui implique la présence de mécanismes de contrôle de la traduction, dont les microARN sont un acteur majeur. C'est pourquoi j'ai cherché à caractériser le devenir, la fonction et l'activité des microARN plaquettaires au cours de l'activation.

3. Résultats

3.1. The repertoire and features of human platelet microRNAs

3.1.1 Auteurs et affiliations

Hélène Plé¹, Patricia Landry¹, Ashley Benham², Cristian Coarfa², Preethi H. Gunaratne², Patrick Provost¹

¹ Centre de recherche du CHUQ/CHUL, Université Laval, Québec, Qc, Canada

² Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Houston, Texas, United States of America

La version définitive de ce manuscrit, qui a été acceptée pour publication dans le journal *PLoS One* (Plé et al., 2012a) le 24 octobre 2012, a été publiée en décembre 2012 et est disponible en libre accès à l'adresse suivante :

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0050746>

3.1.2 Résumé

Dans cette étude, le répertoire complet des microARN plaquettaires humains a été élucidé par séquençage à haut débit. Plus de 492 microARN matures différents ont été détectés, auxquels s'ajoute l'identification de 40 nouveaux microARN humains. Les microARN plaquettaires montrent des signes de modifications post-transcriptionnelles en 3', principalement d'adénylation et d'uridylation. Des essais enzymatiques *in vitro* ont démontré la capacité des plaquettes humaines à uridyler les microARN, ce qui corrèle avec la présence de la nucléotidyl-transférase TUT4. De nombreuses isoformes (isomiRs) résultant d'un clivage imprécis par les ribonucléases Drosha et/ou Dicer ont été détectées. Dans certains cas, ces isomiRs sont plus abondants que la séquence de référence. L'isomiR majoritaire de miR-140-3p est décalé d'un nucléotide en 5', ce qui lui confère la capacité de réguler des ARNm différents du microARN original. Cette étude constitue une nouvelle étape dans la compréhension du rôle joué par les microARN dans la fonction plaquettaire.

3.1.3 Abstract

Playing a central role in the maintenance of hemostasis as well as in thrombotic disorders, platelets contain a relatively diverse messenger RNA (mRNA) transcriptome as well as functional mRNA-regulatory microRNAs, suggesting that platelet mRNAs may be regulated by microRNAs. Here, we elucidated the complete repertoire and features of human platelet microRNAs by high-throughput sequencing. More than 492 different mature microRNAs were detected in human platelets, whereas the list of known human microRNAs was expanded further by the discovery of 40 novel microRNA sequences. As in nucleated cells, platelet microRNAs bear signs of post-transcriptional modifications, mainly terminal adenylation and uridylation. *In vitro* enzymatic assays demonstrated the ability of human platelets to uridylylate microRNAs, which correlated with the presence of the uridylyltransferase enzyme TUT4. We also detected numerous microRNA isoforms (isomiRs) resulting from imprecise Drosha and/or Dicer processing, in some cases more frequently than the reference microRNA sequence, including 5' shifted isomiRs with redirected mRNA targeting abilities. This study unveils the existence of a relatively diverse and complex microRNA repertoire in human platelets, and represents a mandatory step towards elucidating the intraplatelet and extraplatelet role, function and importance of platelet microRNAs.

3.1.4 Introduction

Platelets play a central role in the maintenance of hemostasis as well as in thrombotic disorders. Released into the circulation as cytoplasmic fragments by bone marrow megakaryocytes, circulating platelets retain a small amount of poly(A)⁺ RNA from their megakaryocytic precursors (Roth et al., 1989). Initial microarray-based studies revealed that up to ~32% of all human genes are present in platelets at the messenger RNA (mRNA) level (Bugert et al., 2003; Gnatenko et al., 2003; McRedmond et al., 2004), an observation confirmed and expanded recently in human and murine platelets by Rowley et al. (Rowley et al., 2011). Human platelets also possess the essential components of the mRNA translational machinery (Ts'ao, 1971) and respond to physiological stimuli using biosynthetic processes that are regulated at the protein translational level (Booyse and Rafelson, 1968; Kieffer et al., 1987).

Recently, we reported that human blood platelets harbor a functional microRNA pathway as well as a relatively diverse array of microRNAs (Landry et al., 2009), an observation corroborated by independent groups (Edelstein and Bray, 2011; Nagalla et al., 2011; Osman and Falker, 2011). Forming a class of small, 19- to 24-nucleotide (nt) non-coding RNA species and known as master regulators of mRNA translation (Fabian et al., 2010), microRNAs derive from the sequential processing of longer RNA precursors by the ribonucleases Droscha and Dicer, as reviewed recently (Krol et al., 2010; Perron and Provost, 2008; Winter et al., 2009). One or both strands of microRNA duplexes are subsequently loaded into an effector ribonucleoprotein (microRNP) complex containing an Argonaute (Ago) protein. Exerting effects that are mainly repressive, microRNAs act in concert through recognition of specific binding sites of imperfect complementarity, usually located in the 3' untranslated region (UTR), by base pairing of their "seed" region (nt 2 to 8 in the 5'→3' orientation). Predicted to regulate ~60% of the genes in human, microRNAs are believed to be involved in most, if not all, physiological and pathological processes; one can thus anticipate that microRNAs will play a significant role in health and disease.

The role and importance of microRNAs in platelets is gradually emerging. After Kondkar et al. (2010) reported findings that support a role for microRNA-96 in the regulation of VAMP8/endobrevin, which is overexpressed in hyperreactive human platelets, Nagalla et al. (2011) described a subset of microRNAs that are differentially expressed between subjects grouped according to platelet aggregation to epinephrine. These studies unveiled a link between microRNA profiles and platelet reactivity, and suggest a role for small regulatory RNA species in modulating mRNA translation in platelets.

Moreover, the demonstrated delivery of microRNAs from one cell to another through microvesicles (Valadi et al., 2007), together with the ability of activated platelets to release microparticles (Boilard et al., 2010) and the recently reported ability of platelet-like particles to mediate intercellular mRNA transfer (Risitano et al., 2012), suggest that platelet microRNAs may also fulfill extraplatelet role(s). Together, these observations prompted us to elucidate the complete repertoire and features of human platelet microRNAs by using a high-throughput sequencing (HTS) approach.

3.1.5 Materials and methods

3.1.5.1 Ethic statement

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.

3.1.5.2 Human platelet purification

Platelets were isolated from venous blood as previously described (Landry et al., 2009). Briefly, blood from healthy volunteers was collected using sodium citrate (100 mM) as anticoagulant. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 250 g for 20 min, followed by filtration through leukocyte depletion filters (Pall Corporation). The platelet suspension was subsequently incubated with CD45+ antibody coupled to magnetic microbeads (EasySep, StemCell Technologies), for negative selection of blood platelets. Highly purified platelets were harvested by centrifugation at 6,000 g for 1 min, and either directly lysed in TRIzol (Invitrogen) for RNA extraction or stored as frozen pellet for *in vitro* assays.

3.1.5.3 Platelet RNA extraction

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). The purity of each platelet preparation was assessed by PCR analysis of platelet (GPIIIa) and leukocyte (CD45) markers, as described previously (Landry et al., 2009). Equal amounts of platelet total RNA, extracted from 5 (pool 1) or 14 (pool 2) healthy subjects, were pooled together, and purified further using an RNeasy Mini kit (Qiagen). The integrity of platelet RNA was assessed using Bioanalyzer 2100 (Agilent) prior to further analyses.

3.1.5.4 Small RNA library construction and sequencing

Small RNA libraries from pools 1 and 2 were constructed separately, each from 15 µg total RNA, by isolating RNA species between 18 and 30 nt in length using the DGE small RNA sample prep kit (Illumina), following the manufacturer's instructions. The labeled cDNAs were quantified with the Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit (Invitrogen) and

diluted to 3 pM for sequencing in a single lane on an Illumina 1G Genome Analyzer (Solexa), essentially as described previously (Creighton et al., 2010).

3.1.5.5 Raw sequences filtering

Raw sequences were filtered through serial quality control criteria. First, the presence of at least 6 nt of the 3' Solexa adapter was verified. The sequence reads that did not comply with this criterion were discarded, whereas the others were trimmed to remove the adapter sequence harbored at the 3' end. The remaining tags were further filtered regarding their length (>10 nt), copy number (>4 reads) and readability (>9 non-identified nucleotides, annotated N). Reads complying with all those criteria were subsequently defined as usable reads.

3.1.5.6 Analysis of annotated microRNAs

All the usable reads were aligned to pre-microRNAs extracted from miRBase database (release 18.0). Sequence tags that matched perfectly to more than one precursor were distributed equally among them. In order to account for Drosha and Dicer imperfect cleavage (Morin et al., 2008), any sequence tag that perfectly matched the pre-microRNA in the mature microRNA region, allowing up to 4 nt shift as compared to the reference mature microRNA position, was considered as a mature microRNA. The microRNA expression level was defined as the number of reads mapping each mature microRNA normalized to the total number of usable reads, considering that the overall number of small RNAs is invariant. The relative abundance of each microRNA was defined as the number of reads mapping each microRNA compared to the total number of reads mapping mature microRNAs.

3.1.5.7 Identification of new microRNA sequences

The analytical approach that we applied for the identification of novel microRNA species in human platelets is depicted in the flowchart shown in **Supplementary Figure S1** and has been described in detail previously (Creighton et al., 2010; Creighton et al., 2009). In brief, all the usable reads that did not match to known pre-microRNAs (unknown reads) were mapped to the human genome. For the reads that matched perfectly, the 100 nucleotides flanking each side of the sequence were extracted in order to test whether these resulting ~220 nt genomic sequences could be transcribed and fold into pre-microRNA-like

structures, using the Vienna RNA secondary structure prediction and comparison package. The hairpin structured sequences were trimmed down to remove the sequence portions that were not included in the stem-loop. These sequences were folded again and further tested for their ability to form pre-microRNA structures that meet the criteria previously established by Ambros et al. (Ambros et al., 2003). These sequences must form a characteristic stem-loop structure with a minimum free energy below -20 kcal/mol, and harbor the putative mature microRNA on either arm of the stem. Hairpin structures that fulfill all the conditions were considered as putative pre-microRNAs. All the unknown reads were subsequently re-aligned to the putative new precursors. These hairpins, from which the predicted mature microRNA sequence matched perfectly to detected reads, were classified as high-confidence pre-microRNA hairpins. If reads corresponding to the opposite strand were also detected, the high-confidence hairpins were considered as confirmed pre-microRNAs, as of miRBase 18.0.

3.1.5.8 *In vitro* terminal uridylation and adenylation assays

Frozen platelet pellets from 3 different donors, as well as the megakaryoblastic cell line Meg-01 (obtained from ATCC) cultured as described previously (Landry et al., 2009), were used to assess their ability to perform 3' terminal nucleotide additions to synthetic microRNA species *in vitro*. Before enzymatic assay, platelet and Meg-01 protein extracts were treated by RNase digestion in order to decrease the signal of endogenous RNA adenylation/uridylation. Uridylation and adenylation assays were performed on 20 µg of protein extracts, incubated with 10 pmol RNA substrates in the presence of α -³²P labeled UTP or ATP, respectively. The RNAs were subsequently extracted and adenylated/uridylated RNA species were analyzed on denaturing 10% polyacrylamide gel.

3.1.5.9 Western Blot analysis of terminal nucleotidyltransferases

Expression of terminal nucleotidyltransferases in Meg-01 cells and human platelets was assessed by Western blot (Landry et al., 2009). Protein extracts (20 µg) were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and immunoblotted using mouse polyclonal anti-TUT4 (ab89165, Abcam) and rabbit polyclonal anti-GLD2 antibodies (ab103884, Abcam) used at the dilution recommended by the manufacturer.

3.1.5.10 Reporter gene activity assays

HEK293 cells (2×10^5) were plated in 24-well plates 24 h before cotransfection with RNA duplexes encoding the reference miR-140-3p or the 1-nt 5' shifted isomiR (0.2 to 20 pmol) and a psiCHECK (Promega) reporter construct (100 ng DNA) using Lipofectamine 2000. A binding site of perfect complementarity for both miR-140-3p isomiRs or the sequence of adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1) 3'UTR were inserted downstream of the Renilla luciferase (Rluc) gene of the psiCHECK reporter. A small interfering RNA (siRNA) targeting the green fluorescent protein (GFP) was used as a negative control, and results obtained with both isomiRs were normalized to those obtained with this non-targeting siRNA. Twenty four (24) h later, cells were harvested and protein extracts were prepared for measurement of Rluc and Firefly luciferase (Fluc) activities, essentially as described previously (Landry et al., 2009).

3.1.6 Results

3.1.6.1 The small RNA profile of human platelets

Two samples of platelet small RNAs, prepared by pooling equivalent amounts of RNA isolated from either 5 (pool 1) or 14 (pool 2) healthy subjects, were analyzed by HTS. Each pool yielded 3,970,224 and 6,366,352 raw sequences, respectively. From each pool, we retrieved 3,154,352 and 5,680,165 usable reads (for a total of 8.83M usable reads), corresponding to 19,498 and 18,071 unique tags, respectively. The length distribution analysis of the usable reads, obtained from the 2 different pools, revealed that more than 90% of the sequences were in the 19- to 24-nt window of RNA sizes, which is characteristic of microRNAs (**Figure 11A**). The HTS datasets are available online in Database S1.

Genome mapping of all the usable reads allowed the assignment of the detected small RNA sequences to various categories among the classes of functional non-coding RNAs and genomic repeats. These analyses unveiled microRNAs as the most abundant small RNA species in human platelets, representing ~80% of the sequenced RNAs (**Figure 11B**). Small RNAs originating from genomic repeats collectively represented ~5% of all the small RNA sequences detected, whereas the other functional non-coding RNAs accounted for ~6% of the sequenced RNAs. The nuclear localization of scaRNAs and

snoRNAs, and the germline-specific expression of piRNAs probably explain their virtual absence in anucleate platelets. In addition, low representation of highly abundant RNA species, such as rRNA and tRNA, reflects the quality of our RNA preparations, as the RNA size window of our libraries (i.e. 18-30 nt) excludes integral rRNA and tRNA from the sequencing analyses. These results confirm that human platelets are highly enriched for microRNAs, as compared to other classes of small RNAs. Moreover, the significant correlation obtained by plotting the microRNA expression data from Pool 1 versus Pool 2 (**Supplementary Figure S2**) supports the validity of our RNA pooling approach involving a relatively small number of subjects, as well as merging of our data.

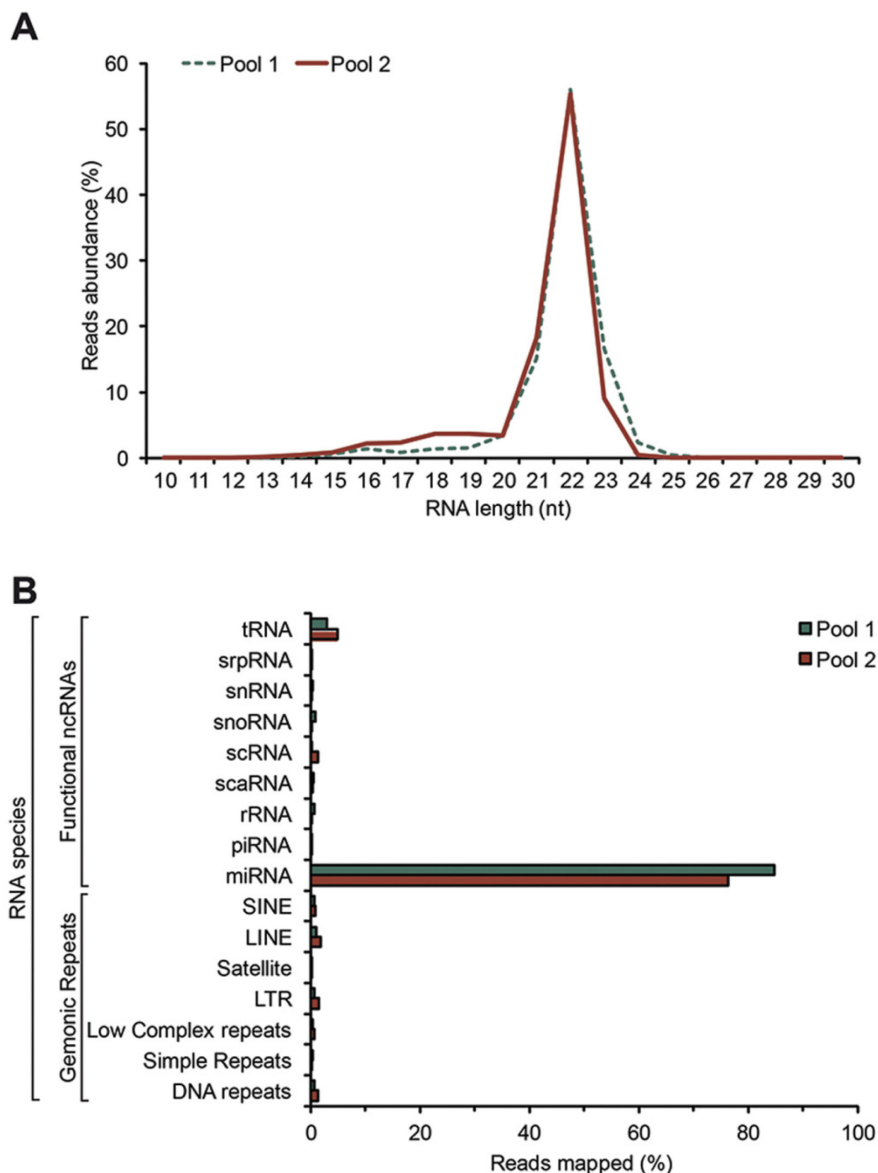


Figure 11. The small RNA profile of human platelets.

(Figure à la page précédente)

(A) Size distribution of usable reads detected in each of the platelet RNA pool 1 and 2. Most of the RNA sequences are 21 to 23 nucleotides (nt) in length, representing 88% and 83% of the sequences obtained from pool 1 and pool 2, respectively. (B) Classification of the small RNA species isolated and sequenced from human platelet RNA pool 1 and 2. The proportion of sequences (%) matching to each RNA category is shown. MicroRNAs represent approximately 80% of the small RNA species between 18 and 30 nt in length in human platelets.

3.1.6.2 The annotated microRNA profile of human platelets

Further analyses of our HTS data focused on characterizing the diversity and relative abundance of microRNAs in platelets. In order to establish the microRNA expression profile of human platelets, sequence reads were aligned to the pre-microRNAs annotated in miRBase database, release 18.0 (<http://www.mirbase.org/>). A total of 492 mature microRNA sequences were detected in our human platelet RNA preparations, out of 1870 mature microRNAs annotated in miRBase 18.0. Whereas the majority of mature microRNAs (285) could be detected in both Pool 1 and Pool 2, microRNAs that were detected in only one of the two pools represented less than 0.01% of all detected microRNAs, in terms of relative abundance, which might reflect the high variability and diversity of lowly expressed microRNA in human platelets.

As depicted in **Figure 12A**, platelet microRNA expression levels covered a range greater than 5 orders of magnitude, a range more than 2-fold greater than that reported using a microarray approach (Landry et al., 2009). The most abundant microRNAs are members of the let-7 microRNA family, which represented 48% of the platelet microRNA content (**Figure 12B**). Other microRNA families were highly represented in human platelets, such as miR-103 and miR-25 (**Table 1**). Overall, the 15 most abundant microRNA families represented more than 90% of all microRNAs present in human platelets.

The data pertaining to the 50 most abundant platelet microRNAs, irrespective of their family, are compiled in **Supplementary Table S2** and show that individual microRNAs, such as miR-199a/b-3p, miR-140-3p and miR-21, also accounted for an important proportion of human platelet microRNAs.

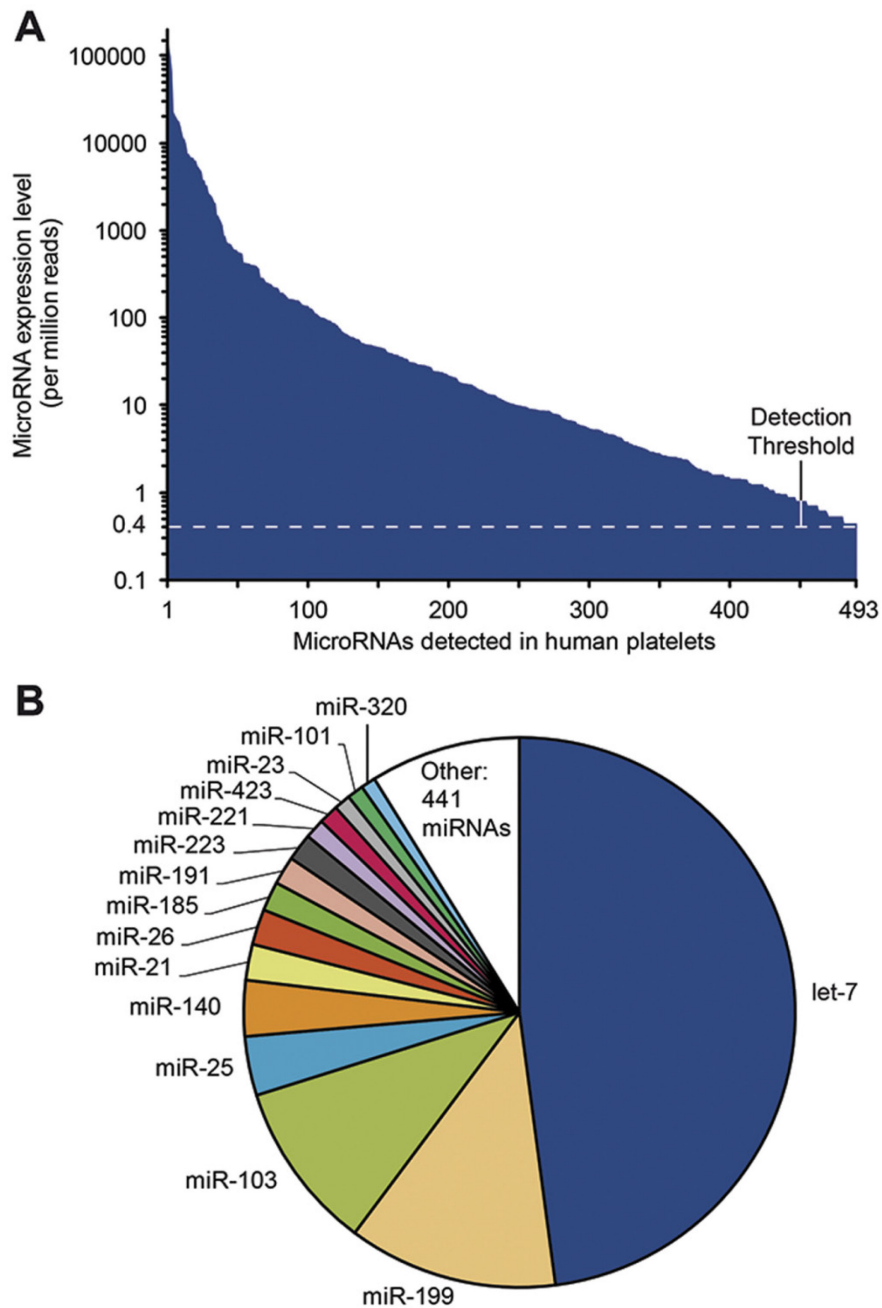


Figure 12. The annotated microRNA profile of human platelets.

(A) The HTS profiling of platelet microRNAs, which is shown in order of decreasing number of reads. (B) Distribution of the 15 most abundant mature microRNA families detected in human platelets. The let-7 microRNA family represented 48% of a total of 492 different mature microRNAs, whereas the 15 most abundant microRNAs accounted for more than 90% of all platelet microRNAs.

Table 1. The 15 most abundant microRNA families detected in human platelets

MicroRNA Family	Mature microRNA	Expression level (per million reads)	Relative abundance
let-7	hsa-let-7f-5p	158765.9	47.9%
	hsa-let-7a-5p	118095.6	
	hsa-let-7g-5p	20681.4	
	hsa-let-7b-5p	18029.4	
	hsa-let-7d-5p	17526.2	
	hsa-let-7i-5p	6714.4	
	hsa-let-7e-5p	3711.6	
	hsa-let-7c	1231.3	
	hsa-mir-98	397.7	
	hsa-let-7d-3p	54.1	
	hsa-let-7i-3p	4.6	
	hsa-let-7b-3p	2.9	
	hsa-let-7a-3p	2.5	
	mir-199	hsa-mir-199a-3p	
hsa-mir-199b-5p		51.2	
hsa-mir-199a-5p		17.6	
mir-103	hsa-mir-103a-3p	63934.9	9.9%
	hsa-mir-107	6876.4	
	hsa-mir-103a-2-5p	1.4	
mir-25	hsa-mir-25-3p	19393.5	3.5%
	hsa-mir-92a-3p	4902.8	
	hsa-mir-25-5p	136.1	
	hsa-mir-92b-3p	56.4	
	hsa-mir-92a-1-5p	12.2	
	hsa-mir-92b-5p	1.6	
mir-140	hsa-mir-140-3p	22540.7	3.3%
	hsa-mir-140-5p	5.7	
mir-21	hsa-mir-21-5p	15428.8	2.1%
mir-26	hsa-mir-26b-5p	9511.2	2.1%
	hsa-mir-26a-5p	5428.6	
	hsa-mir-26a-1-3p	1.1	
mir-185	hsa-mir-185-5p	13029.3	1.7%
	hsa-mir-185-3p	99.0	
mir-191	hsa-mir-191-5p	11314.8	1.7%
	hsa-mir-191-3p	5.2	
mir-223	hsa-mir-223-3p	10861.4	1.6%
	hsa-mir-223-5p	157.2	
mir-221	hsa-mir-221-3p	7431.4	1.2%
	hsa-mir-221-5p	559.5	
	hsa-mir-222-3p	551.2	

Table 1. The 15 most abundant microRNA families detected in human platelets
(suite de la page précédente)

MicroRNA Family	Mature microRNA	Expression level (per million reads)	Relative abundance
mir-423	hsa-mir-423-5p	7507.1	1.1%
	hsa-mir-423-3p	688.1	
mir-23	hsa-mir-23a-3p	6276.4	1.0%
	hsa-mir-23b-3p	282.6	
	hsa-mir-23a-5p	12.9	
	hsa-mir-23b-5p	6.0	
mir-101	hsa-mir-101-3p	6752.1	1.0%
	hsa-mir-101-5p	1.7	
mir-320	hsa-mir-320a	6191.1	0.9%
	hsa-mir-320b	49.3	
	hsa-mir-320c	7.7	
	hsa-mir-320d	2.6	
Other	441 microRNAs	64002	8.8%

3.1.6.3 Discovery of novel microRNAs in human platelets

One of the major advantages of HTS, as compared to microarray and PCR-based detection methods, is the possibility to discover new RNA sequences. The processing of microRNA precursors (pre-microRNAs) yields a microRNA duplex, from which one (or both) of the strand is incorporated in the microRNP effector complex, while the other one is generally believed to be degraded. As a consequence, only one of the 2 putative mature microRNA sequences is currently known for numerous microRNA duplexes (60% of all pre-microRNAs referenced in miRBase, release 18.0). In total, 15 novel mature sequences from known pre-microRNAs have been detected in human platelets (**Table 2**). These findings confirm the existence and localization of the putative Drosha and Dicer cleavage sites on the pre-microRNA sequences from which both mature microRNA strands derive, and that were predicted solely on the experimental cloning of one of the mature microRNA strands.

Table 2. Novel mature microRNAs derived from known microRNA precursors (pre-microRNAs).

Pre-microRNA	MicroRNA sequence	Reads detected	Strand
hsa-mir-1537	AGCUGUAAUUAGUCAGUUUUUCU	17	5p
hsa-mir-1908	CCGGCCGCCGGCUCGCCCCCG	9	3p
hsa-mir-1910	GAGGCAGAAGCAGGAUGACA	32	3p
hsa-mir-412	UGGUCGACCAGUUGGAAAGUAAU	74	5p
hsa-mir-433	UACGGUGAGCCUGUCAUUUUUC	12	5p
hsa-mir-450a-1	AUUGGGAACAUUUUGCAUGUAU	16	3p
hsa-mir-487a	GUGGUUAUCCUGUGUGUUUCG	37	5p
hsa-mir-5189	UGCCAACCGUCAGAGCCCAGA	27	3p
hsa-mir-548e	CAAAAGCAAUCGCGUUUUUG	41	5p
hsa-mir-548j	CAAAAACUGCAUUACUUUUGC	28	3p
hsa-mir-5189	UGCCAACCGUCAGAGCCCAGA	27	3p
hsa-mir-605	AGAAGGCACUAUGAGAUUUAGA	31	3p
hsa-mir-619	GCUGGGAUUACAGGCAUGAGCC	5	5p
hsa-mir-627	UCUUUUUUUGAGACUCACU	10	3p
hsa-mir-758	AUGGUUGACCAGAGACACACG	5	5p

In order to identify mature microRNAs from novel pre-microRNAs, we used the flowchart shown in **Supplementary Figure S1**. Our approach yielded the discovery of 21 novel pre-microRNA sequences, including 4 for which both mature strands could be detected (**Table 3**). These microRNAs displayed a relatively low level of expression, and the majority of them could only be detected in one of the 2 pools, suggesting a certain degree of interindividual variations. Whether these microRNAs come from single individuals remains a possibility that would need to be assessed by investigating the platelet microRNAs of individual subjects. Of notice, most of these newly discovered microRNA hairpins originate from intronic sequences, which might be a characteristic of platelet microRNAs, whereas two of the new hairpins, i.e. hairpin 02 and 16, are expressed from the antisense strand of microRNAs miR-4433 and miR-5683, respectively.

The existence of 5 of the novel microRNA candidates was validated by Northern blot hybridization (**Supplementary Figure S4**). For Hairpin 03, a ~75-nucleotide (nt) pre-microRNA, a ~35-nt intermediate and the ~21-nt mature microRNA (indicated by *) were only detected in the platelet RNA sample. A microRNA species migrating at ~35 nt was also detected for hsa-miR-2115, and may represent a cleavage intermediate containing loop

sequences resulting from asymmetrical processing of the pre-microRNA substrate (Ouellet et al., 2008), although this possibility remains to be confirmed.

The relatively weak intensity of the microRNA bands revealed by Northern blotting is consistent with the relatively low number of reads obtained from these microRNAs, which may explain why some of them were discovered only recently. qPCR analyses confirmed expression of 4 novel microRNAs detected by HTS in human platelets (**Supplementary Figure S3**). These findings expand further the microRNA repertoire of human platelets and raises the possibility of platelet-specific microRNA sequences.

Table 3 Novel mature microRNA sequences detected in human platelets.

Hairpin	Mature Sequence	Reads	Genomic position	Genomic context
01	3p-AUGAAGCCUUCUCUGCCUUACG	6	14(+): 72983574	RGS6 (Intron)
	5p-GAGGGCAGAGCCAGCUUCCUGA	5		
02	3p-CAGGAGUGGGGGUGGGACGU	9130	2(-): 64567903	AL355732 (Intron)
	5p-AUGUCCCACCCCACUCCUGU	34		hsa-miR-4433 (AS)
03	3p-CUGCAGACUCGACCUCCAGGC	81	16(+): 24214507	PRKCB (Intron)
	5p-CUGGGAGGUCAAGGCUGCAGU	39		
04	3p-AUCAUGUAUGAUACUGCAAACA	25	17(+): 75085510	c17orf86 (intron)
	5p-UUUGCAGUACAGGUGUGAGCA	23		/ SCARNA16
05	5p-AAAACUAGGACUGUGUGGUGUA	21	12(-): 94965082	TMCC3 (3'-UTR)
06	5p-AAGGGACAGGGAGGGUCGUGG	50	2(+): 20803112	KLF7 (Intron)
07	5p-AGAUGCCGGGGUCUCUGUGUGC	12	20(+): 35990206	SRC (Intron)
08	3p-CAGCGGAGCCUGGAGAGAAGG	5	1(+): 12227067	TNRFSF1B (ORF)
09	3p-CGUGGAGGACGAGGAGGAGGC	12	11(+): 1901335	LSP1 (ORF)
10	3p-CUACCCUCGGUCUGCUUACCACA	7	8(-): 134058739	SLA/TG (Intron)
11	3p-GACAAUUGUUGAUCUUGGGCCU	5	4(+): 147329798	SLC10A7 (Intron)
12	3p-GAUGCCUGGGAGUUGCGAUCUGC	6	22(+): 43011374	RNU12
13	5p-GUUUGGACAUAGUGUGGCUGG	7	19(+): 2630721	GNG7 (Intron)
14	3p-UACCUGGGAGACUGAGGUUGGA	5	12(-):42717542	ZCRB1 (Intron)
15	3p-UAUGUAGUAGUCAAAAGCAUUU	9	1(-): 108439846	VAV3 (Intron)
16	5p-UCAAAUGCAGAUCCUGACUUC	9	6(-): 6169613	F13A1 (Intron)
				hsa-miR-5683 (AS)
17	5p-UGAGGGACCCAGGACAGGAGA	5	7(+): 100465663	TRIP6 (Intron)
18	3p-UGAGGUGACCCGAGAUUGGGAA	5	16(+): 81567547	CMIP (Intron)
19	3p-UUGGUCGGUCUCUGCUCCGCAG	6	8(+): 27290930	PTK2B (Intron)
20	5p-UUGGUGAGGACCCCAAGCUCGG	6	14(-):65252381	SPTB (Intron)
21	5p-UUUUAAGGACACUGAGGGAUC	6	1(-): 86823348	ODF2L (Intron)

3.1.6.4 Post-transcriptional modifications of microRNAs in human platelets

Previous studies reported that mature microRNAs can be modified post-transcriptionally, a process that can influence their stability and/or mRNA target recognition. Most of these modifications consist in the 3' terminal addition of nucleotides U or A through uridylation and adenylation reactions, respectively, and generally do not exceed 2 to 3 nucleotides additions. In order to document platelet microRNA modifications, the remaining tags that did not match exactly to any precursors were re-aligned by allowing up to 3 mismatches as compared to the canonical sequence. As depicted in **Figure 13A**, mutations were predominantly located at positions 21 to 24 of mature microRNAs, which is consistent with preferential 3' end modifications. In contrast, nucleotides 2 to 8 forming the microRNA seed region were relatively well preserved, which tends to support a functional role for this motif in platelet microRNAs. We were able to detect adenylated as well as uridylated derivatives for the majority of the modified platelet microRNAs. Whereas some microRNAs showed preferential adenylation, like let-7f-5p (**Figure 13B**, left panel), other microRNAs displayed preferential uridylation, as in the case of miR-223-3p (**Figure 13B**, right panel). MicroRNA sequence editing events were also detected among platelet small RNA species, consistent with a previous study performed on mouse tissues (Reid et al., 2008), enhancing further the diversity of platelet microRNA sequences.

Pre-microRNA species may be uridylated (Heo et al., 2009), adenylated or cytidinylated (Newman et al., 2011). Since our RNA sequencing was restricted to 18-30 nt RNA species, precursor 3' end modifications could only be detected indirectly by analyzing the mature microRNA species released from the 3p strand. For this purpose, we analyzed whether the origin of mature microRNA from the precursor (e.g. deriving from 5p- or 3p-strand) influenced their terminal modification. The average relative abundance of modified 5p- and 3p-microRNA were respectively of 11% and 15%. These similar levels of modified 3p- and 5p-microRNAs suggest a minor contribution (4%) of precursor modifications and rather reflect that terminal modifications of platelet microRNAs occur predominantly on mature microRNA strands. Next, we analyzed whether the type of terminal modification was influenced by the strand origin of microRNAs. For that purpose, we focused our

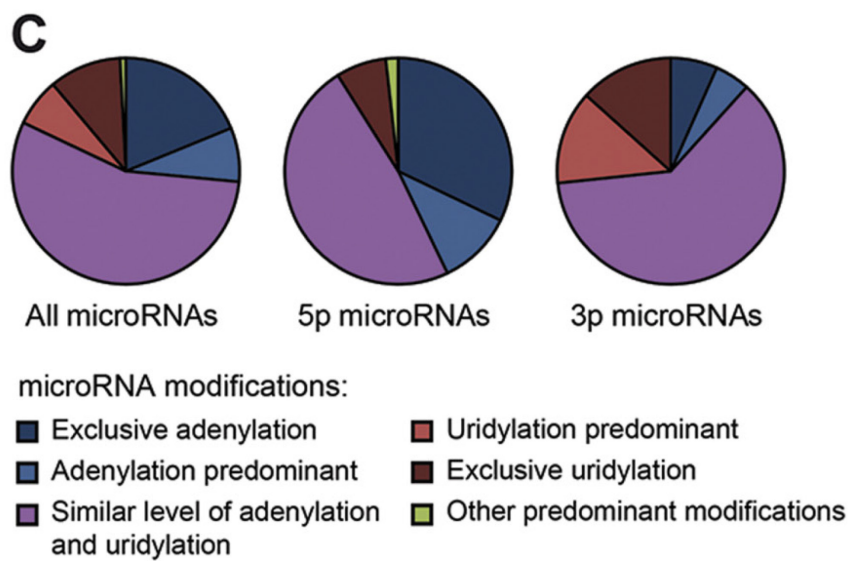
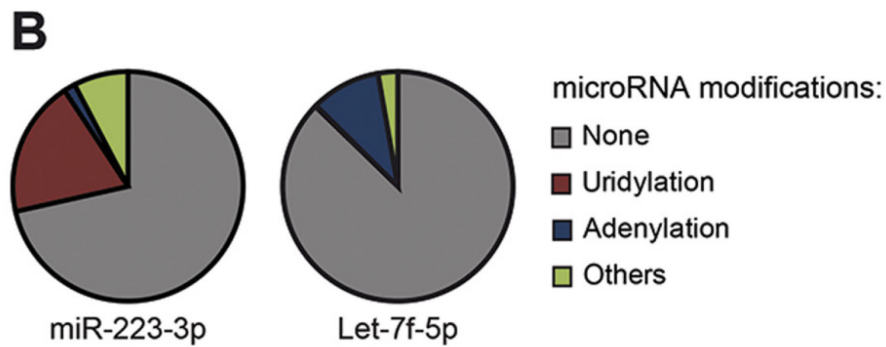
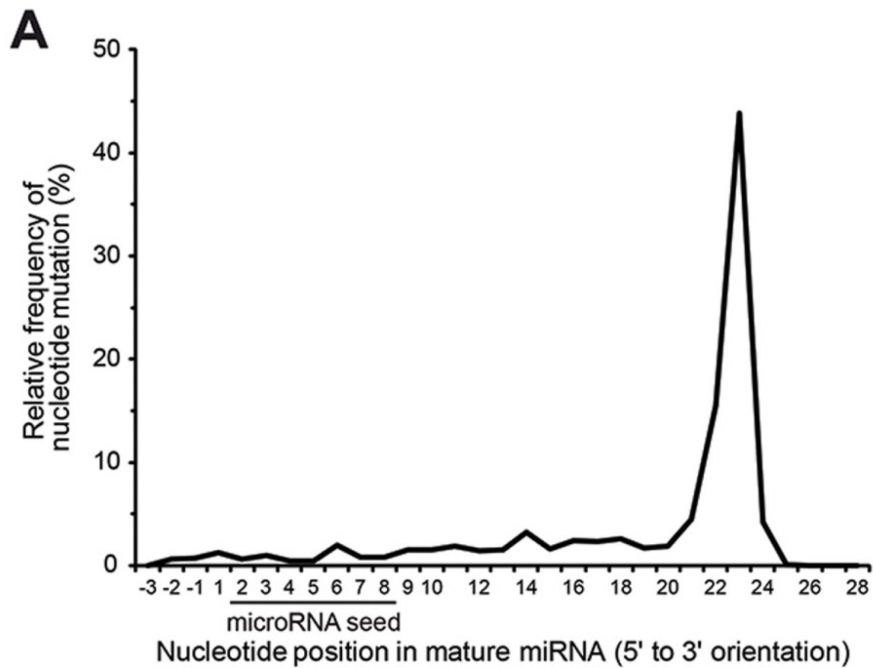


Figure 13. Post-transcriptional modifications of platelet microRNAs.

(Figure à la page précédente)

(A) The relative frequency of nucleotide mutation ordered by position on the mature microRNA sequences. The majority of the nucleotide modifications were observed at the 3' end of microRNAs, whereas the sequence of their seed region was relatively well preserved. (B) Analysis of post-transcriptional modifications affecting two highly expressed platelet microRNAs, miR-223-3p and let-7f-5p. Whereas miR-223-3p showed preferential uridylation, let-7f-5p exhibited predominant adenylation. These modifications represented 29% and 13% of the expressed forms of miR-223-3p and let-7f-5p, respectively. (C) Prevalence of the modifications observed in microRNAs that displayed more than 10% modified sequences in abundance. MicroRNAs for which adenylated/uridylated sequences were at least 10 times more abundant than other modifications were classified as predominant adenylated/uridylated microRNAs. Similar level (e.g. within a 10-fold range) of adenylated and uridylated forms were detected for the majority (56%) of microRNAs. Exclusive or predominant adenylation was observed for 43% of the 5p-microRNAs as compared to 12% of the 3p-microRNAs. On the contrary, exclusive or predominant uridylation was more frequent in 3p-microRNAs (27%), as compared to 5p-microRNA (7%).

analyses on the microRNAs that were detected in both RNA pools and for which the modified forms accounted for more than 10% of the microRNA sequences, in terms of abundance. Similar levels of uridylated and adenylated forms were observed for the majority of these microRNAs (**Figure 13C**, left pie chart). However, microRNAs with predominant or exclusive adenylation more frequently derived from the 5p strand (43% of modified 5p microRNAs) (**Figure 13C**, center pie chart) versus microRNAs derived from the 3p strand (12% of modified 3p microRNAs) (**Figure 13C**, right pie chart). In contrast, microRNAs with predominant or exclusive uridylation more frequently derived from the 3p strand (27% of modified 3p microRNAs) (**Figure 13C**, right pie chart), as compared to microRNAs derived from the 5p strand (7% of modified 5p microRNAs) (**Figure 13C**, center pie chart). The relatively high frequency of adenylated 5p-microRNAs suggests that this modification occurs predominantly on mature microRNA species, whereas terminal uridylation, which is more frequent on 3p strand, might occur both at pre-microRNA and mature microRNA levels.

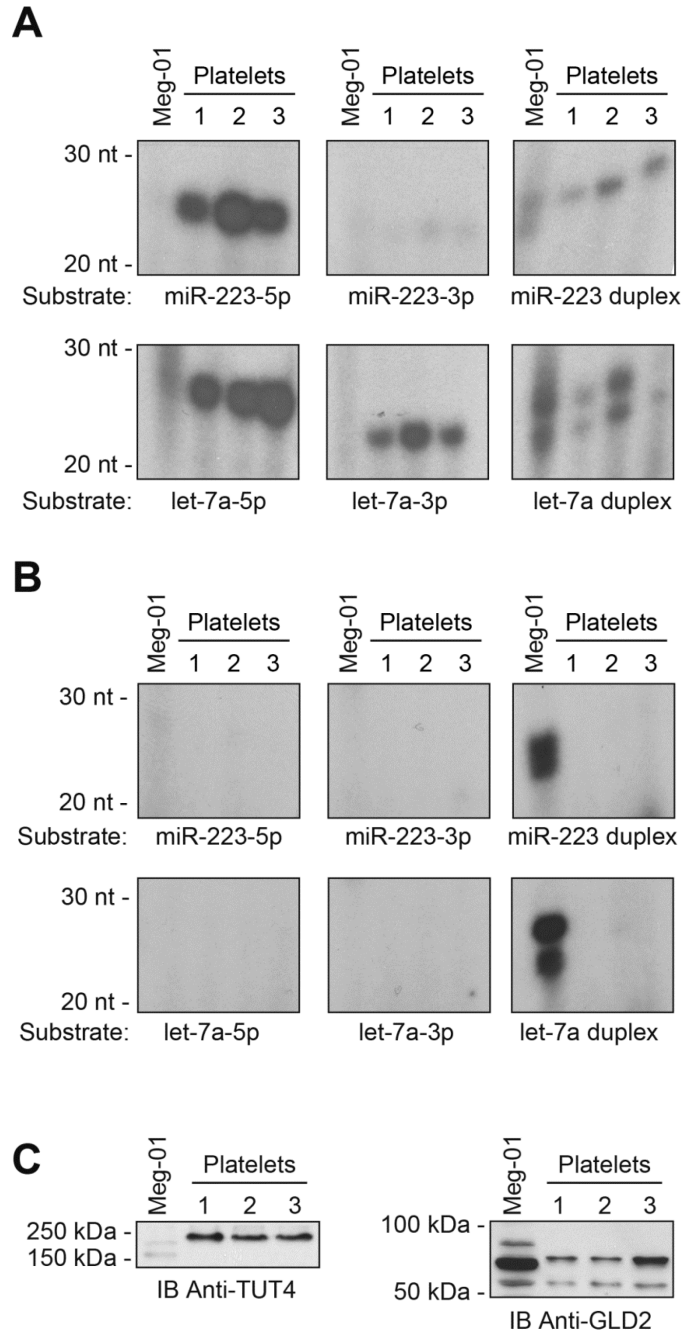


Figure 14. Platelets possess microRNA terminal nucleotidyltransferase activity.

(A–B) Uridylation (A) and adenylation (B) assays were performed by incubating synthetic miR-223 or let-7a mature microRNAs or microRNA duplexes with protein extracts, prepared from Meg-01 cells or platelets isolated from 3 healthy volunteers, in the presence of α -³²P-labeled UTP or ATP respectively, at 30°C for 90 min. Uridylated or adenylated forms of microRNAs were detected by denaturing PAGE and autoradiography. (C) Western blot detection of TUT4 uridylyltransferase (left panel) and GLD2 adenylyltransferase (right panel) enzymes in Meg-01 and platelet extracts using anti-TUT4 and anti-GLD2 antibodies, respectively.

3.1.6.5 MicroRNA species may be modified in human platelets

In order to verify whether platelets can uridylylate or adenylate microRNA species, we performed *in vitro* uridylation and adenylation assays by incubating synthetic mature microRNAs or duplexes of microRNAs derived from miR-223 and let-7a in the presence of platelet protein extracts. Our results indicate that platelets can uridylylate single-stranded microRNAs, as compared to the megakaryoblastic cell line Meg-01 (**Figure 14**). The uridylation activity varied among the microRNAs tested, which may be related to the nature of the 3' extremity: the two microRNAs that were the most readily uridylylated exhibit a terminal U (let-7a-5p and mir-223-5p) (**Figure 14A**, left panels). In comparison, let-7a-3p exhibiting a terminal C was uridylylated to a lesser extent (**Figure 14A**, center lower panel), whereas miR-223-3p harboring a terminal A was barely uridylylated (**Figure 14A**, center upper panel).

The capacity of platelets to uridylylate microRNA duplexes was relatively lower than single-stranded microRNAs. In contrast, Meg-01 cells displayed a preferential uridylyating activity for microRNA duplexes (**Figure 14A**). These results indicate that, in addition to inherit of uridylylated microRNAs from its precursor megakaryocyte cell, platelets can uridylylate its microRNA species, which may account for a proportion of the uridylylated microRNAs that we detected by HTS.

We were unable to detect significant microRNA adenylation activity in human platelets (**Figure 14B**), although other endogenous small RNA species could be adenylated (H.P. and P.P., data not shown). As observed with uridylation, Meg-01 cells displayed preferential adenylating activity for microRNA duplexes, as compared to single-stranded microRNAs (**Figure 14B**). The undetectable terminal adenylyltransferase activity of human platelets suggests that the adenylated forms of microRNAs may be passed on to platelets from their megakaryocytic precursor cells.

As many as seven human nucleotidyltransferases have been involved in microRNA modifications (Wyman et al., 2011), and specific catalytic activity on microRNAs was demonstrated for two of them, namely TUT-4 (ZCCHC11) (Jones et al., 2009) and GLD2 (PAPD4) (Kato et al., 2009). Western blot analyses, aimed at detecting these two enzymes, revealed substantially higher levels of TUT4 expression in platelets compared to

Meg-01 cells (**Figure 14C**, left panel). This may explain the similar difference in terms of uridylyltransferase activity observed between these two cell types (**Figure 14A**).

On the other hand, the GLD2 adenylyltransferase enzyme exhibited a higher expression level in Meg-01, as compared to platelets (**Figure 14C**, right panel), which is consistent with the higher level of adenylyltransferase activity measured *in vitro* (**Figure 14B**).

3.1.6.6 Detection of numerous microRNA isoforms in human platelets

As reported previously in other human RNA samples (Morin et al., 2008), multiple microRNA isoforms (or isomiRs) were detected in human platelets. These isoforms result from the imperfect cleavage of the pre-microRNA species and/or the post-transcriptional modifications of microRNAs. Since a sizeable proportion of sequence reads aligning with some of the pre-microRNAs from miRBase were isomiRs, we were prompted to consider the microRNA sequences that perfectly matched the pre-microRNA in the mature microRNA region, allowing up to 4 nt shift as compared to the reference mature microRNA position. As exemplified with miR-140-3p, the most abundant sequences that match pre-microRNAs may represent an isomiR; here, the reference miR-140-3p sequence represents only a minority of the reads (**Figure 15**, in bold). In contrast to cleavage shifts at the 3' extremity, which was observed for most, if not all, microRNAs, 5' cleavage shifts were less frequent. This is in accordance with previous studies on nucleated cells (Guo et al., 2012) and reflects the functional importance of the 5' sequence of platelet microRNAs, especially the positioning of the microRNA seed region.

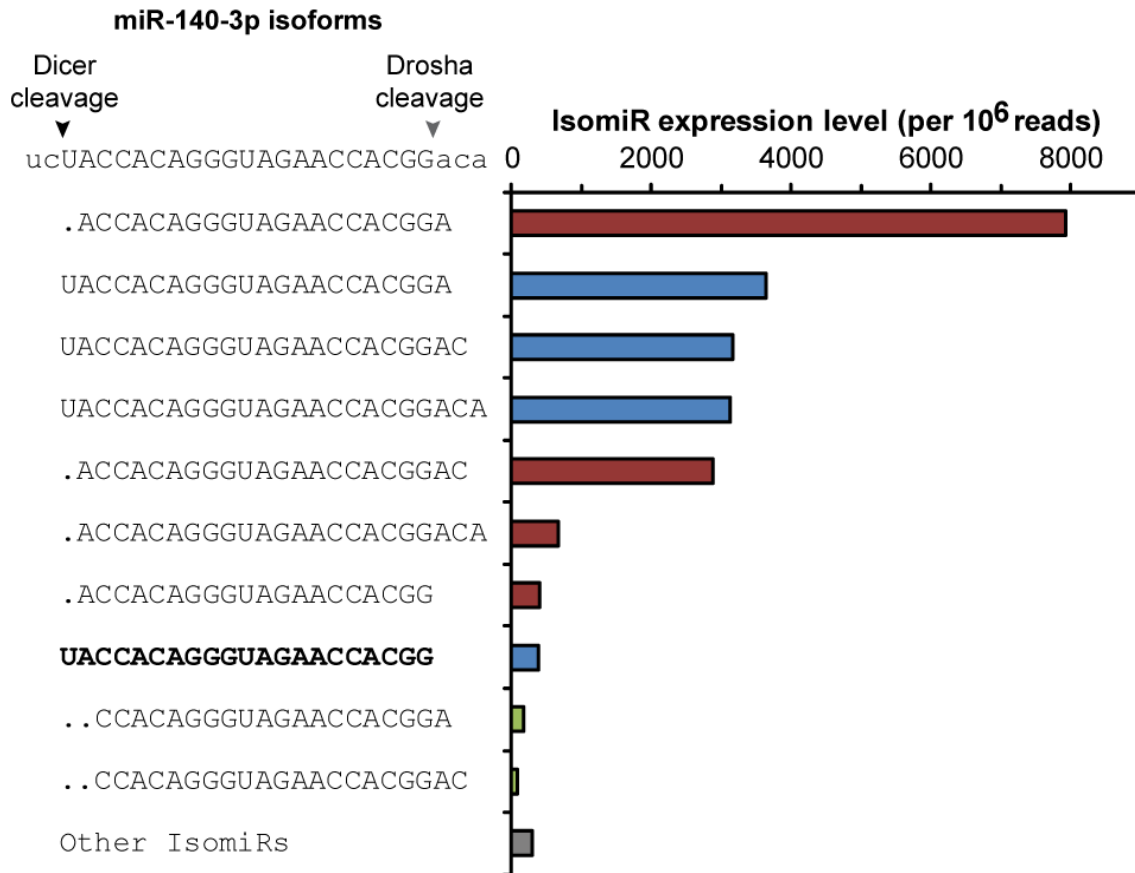
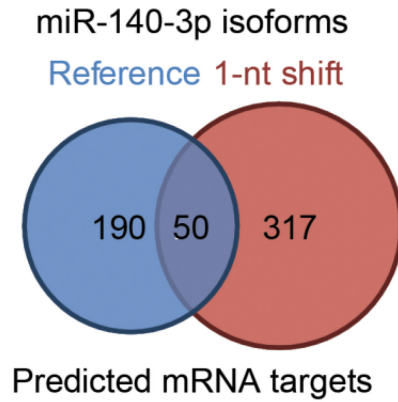


Figure 15. Detection of multiple microRNA isoforms in human platelets.

The expression level of the main isoforms of miR-140-3p are shown. The expected mature microRNA sequence, as retrieved from miRBase, is highlighted in bold and does not correspond to the most frequently encountered isoform. As shown on the left, most of the miR-140-3p isoforms may result from a combination of imprecise processing by Drosha and/or Dicer, including the most abundant, whose cleavage sites on the pre-microRNA species are shifted towards the 3' end by a single nucleotide. Of notice 2 major miR-140-3p isomiRs population coexist in platelets depending on 5'clivage by Dicer, either at the canonical position (blue bars) or harboring a 1 nt cleavage shift (red bars).

A**B**

miR-140-3p isoforms: ■ Reference ■ Shifted

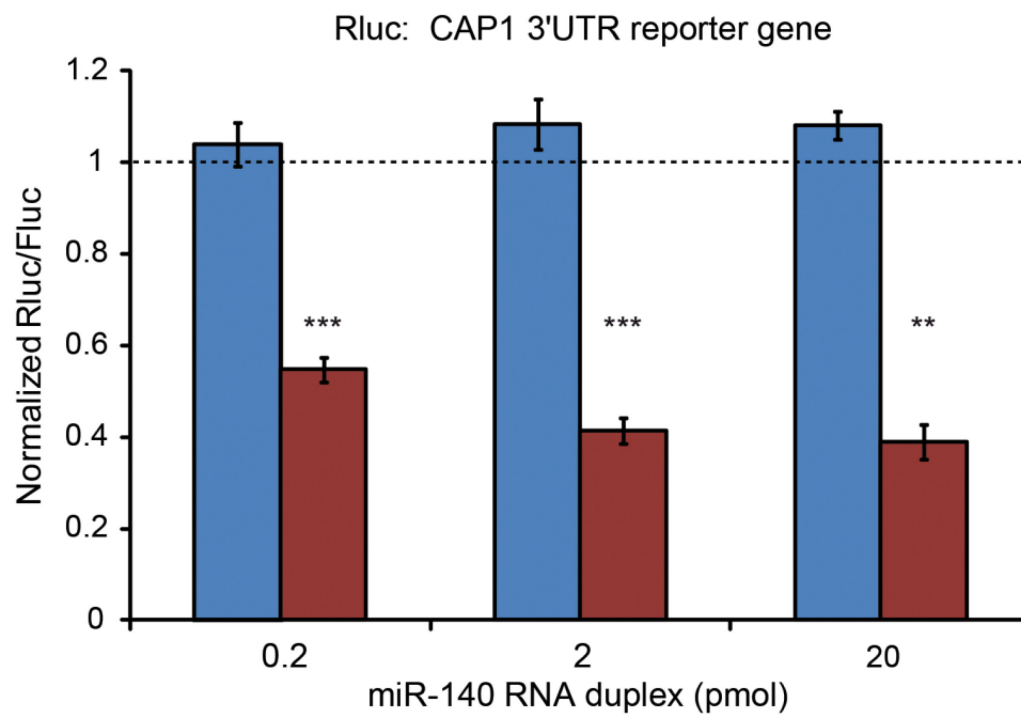
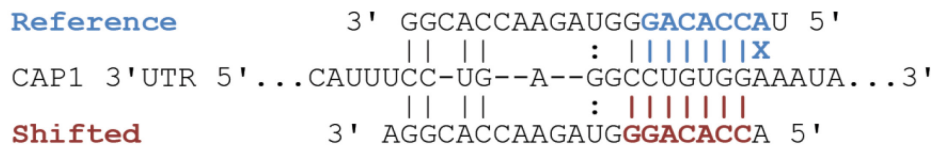


Figure 16. Redirection of platelet miR-140-3p targeting upon a 1-nt shift of the 5' cleavage site.

(Figure à la page précédente)

(A) mRNA target prediction for the reference mature miR-140-3p sequence and the miR-140-3p isomiR harboring a 1-nt 5' shift using TargetScan. The reference isomiR potentially regulates 240 different mRNA targets, whereas the shifted isomiR potentially regulates 367 mRNA targets. Notably, only 50 of these mRNAs are predicted to be regulated by both forms of miR-140-3p. (B) Experimental validation of the target specificity of the 1-nt 5' shifted isomiR for CAP1 mRNA. HEK 293 cells were co-transfected with miR-140 microRNA duplexes, containing either the reference microRNA sequence (Reference) or the most abundant 1-nt 5' shifted isomiR (Shifted), and a reporter gene construct in which the adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1) 3'UTR was inserted downstream of the Rluc reporter gene. Base pairing complementarity between miR-140-3p microRNAs and their binding sites is shown in the upper panel. Base pairing involving the microRNA seed region is highlighted in color. The blue X denotes the loss of base pairing of nt 2 of the miR-140-3p reference isoform, which may explain its lower efficiency in regulating CAP1 mRNA 3'UTR expression. Rluc and Fluc activities were measured, and the values were normalized to those obtained with a non-relevant RNA duplex (n = 3 to 4 experiments, in duplicate) (lower panel). ** p<0.01, *** p<0.001 (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test).

3.1.6.7 Redirection of platelet microRNA targeting properties upon a 5' cleavage shift

A restricted number of microRNAs harbor 5' shifted isomiRs at a relatively high frequency. Among them is miR-140-3p, which is one of the most abundant microRNA in platelets (please refer to **Figure 12B**). The detected miR-140-3p isoforms were distributed as follows: 46% without a 5' shift and 54% with a 1-nt 5' shift. This latter feature is of particular interest, as it modifies the composition of the microRNA seed sequence, which confers the mRNA specificity of microRNAs. mRNA target prediction analysis of the reference mature miR-140-3p sequence using TargetScan revealed that this microRNA potentially regulates 240 different mRNA targets, whereas the miR-140-3p isomiRs harboring a 1-nt 5' shift potentially regulates 367 mRNA targets. Notably, only 50 of these mRNAs are predicted to be regulated by both forms of miR-140-3p (**Figure 16A**). Seven (7) mRNA targets that are predicted to be regulated by either miR-140-3p isoforms (**Supplementary Table S1**) are present in platelets and are involved in platelet activation and degranulation, as referenced in the Gene Ontology (GEO) database.

In order to assess the functionality of the major miR-140-3p isomiR, which results from a 1-nt shift of the Drosha and Dicer cleavage sites in the 3' orientation, we employed a reporter gene activity assay involving cotransfection of RNA duplexes encoding either

the reference miR-140-3p or the major 1-nt shifted isomiR with a Rluc reporter construct in cultured HEK293 cells. Both miR-140 RNA duplexes generated functional miR-140-3p that could silence the activity of a Rluc reporter gene harboring a binding site perfectly complementary to either forms of miR-140-3p (**Supplementary Figure S5**).

In order to demonstrate the mRNA target specificity of the 1-nt shifted miR-140-3p, either forms of miR-140-3p were cotransfected with a reporter construct containing adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1) mRNA 3'UTR sequence inserted downstream of the Rluc reporter gene. As shown in **Figure 16B** (in blue), the reference miR-140-3p sequence had no regulatory activity on the Rluc reporter gene placed under the control of CAP1 3'UTR, which is consistent with TargetScan prediction. In contrast, the 1-nt shifted miR-140-3p isomiR significantly reduced reporter gene expression controlled by the CAP1 3'UTR element (**Figure 16B**, in red). The differential regulatory effects of the reference and 1-nt shifted miR-140-3p microRNAs may be explained by the CAP1 mRNA regulatory abilities conferred by pairing of nt 2 of the 1-nt shifted miR-140-3p isomiR. Indeed, the architecture of microRNA:mRNA complexes usually involves perfect base pairing of the microRNA seed region, comprised of nucleotides 2 to 8 from the 5' end, which is critical to the mRNA regulatory properties of microRNAs (Bartel, 2009). Having different seed regions, reference and 1-nt shifted microRNA sequences are thus most likely to target different mRNAs. These results suggest that the relative processing inaccuracy of Drosha and Dicer may modulate the mRNA targeting specificity and greatly expand the diversity of mRNAs targeted and regulated by platelet microRNAs.

3.1.7 Discussion

This study presents the complete repertoire and features of human platelet microRNAs. In order to obtain data that would be most representative of the human population, we opted for a pooling strategy so to minimize the influence of inter-individual variability. Previous studies have shown it to be a valid alternative to biological replicates at much reduced cost for large-scale gene expression approaches (Glass et al., 2005; Kendzioriski et al., 2005; Kendzioriski et al., 2003).

The microRNA profile of human platelets is characterized by a small number of highly expressed microRNAs or microRNA families. Members of the let-7 family were the most abundant, representing 48% of all platelet microRNAs. This feature, observed in a

terminally differentiated element, is consistent with a role for let-7 microRNAs in cell differentiation (Boyerinas et al., 2010). Although let-7a and let-7d have been shown to be down-regulated during *in vitro* CD34+ megakaryocytic differentiation (Garzon et al., 2006), whether the level of let-7 microRNA family members change during the megakaryocyte-proplatelet-platelet transition remains to be determined. Other highly expressed platelet microRNAs, such as miR-223, have been previously involved in thrombopoiesis. Considered as a specific marker of the myeloid cell lineage, miR-223 expression is decreased when myeloid progenitor cells are committed into erythroid lineage and, conversely, up-regulated during megakaryocytic differentiation (Chen et al., 2004; Felli et al., 2009; Garzon et al., 2006). Similar decreases during erythroid differentiation were also described for other highly abundant platelet microRNAs, such as miR-103 (Yang et al., 2009) and miR-221 (Felli et al., 2005). MicroRNAs of the miR-23a/27/24-2 cluster, which show a particularly high expression level, are also involved in myeloid commitment (Kong et al., 2010). Human platelets thus harbor an abundant array of microRNAs involved in myeloid cell differentiation, megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. Likely representing a hallmark of terminal cell differentiation, the question as to whether these microRNAs remain biologically relevant and important to platelet function remains unanswered.

The diversity of platelet microRNA sequences is reflected both in terms of sequences and relative abundance, as the microRNA content of platelets covers a range greater than 5 orders of magnitude, i.e. more than 2-fold greater than that reported previously (Landry et al., 2009). This may be related to the superior sensitivity of the HTS approach versus that of sequence-dependent, hybridization-based micro-array approaches. As well, the observed difference between the expression pattern of individual let-7 family members and of other highly expressed microRNAs (eg, miR-142, miR-185 and miR-126), versus that previously published by our group (Landry et al., 2009) may also pertain, in addition to interindividual variations, to the microRNA detection method used, i.e. microarray (Landry et al., 2009), a hybridization-based approach that may yield different results depending on the normalization procedure, versus the more advanced high-throughput sequencing technology (this study). More than 532 different microRNAs (or 28% of the 1870 human microRNAs annotated in miRBase, release 18.0) could be detected

by HTS, including 40 novel, previously unannotated mature microRNAs, illustrating the rich diversity in platelet microRNA sequences. This is in accordance with microarray (Nagalla et al., 2011) and quantitative PCR (Osman and Falker, 2011) data reported by independent groups.

Like the analysis of the pre-microRNA species provided key insights and led to the discovery of the enzyme that produces them, i.e. Drosha (Lee et al., 2003), a detailed analysis of the platelet microRNA sequences would be expected to provide important insights into their origin, biogenesis and function. For instance, the relative enrichment of platelets in microRNAs, as compared to a nucleated blood cell of myeloid origin (eg, neutrophils) or their megakaryocytic precursor cells (Landry et al., 2009), is consistent with the absence of microRNA-degrading enzymes in platelets and/or the existence of a microRNA partitioning mechanism.

Platelet microRNAs are subjected to sequence variability and 3' modifications, whereas the 5' extremity is relatively well preserved, as observed in nucleated cells (Guo et al., 2012). Modifications at the 3' end of microRNAs may have functional implications, as they may affect microRNA biogenesis and stability. For example, uridylation of let-7 pre-microRNAs prevents their processing by Dicer and promotes microRNA degradation (Heo et al., 2009). In contrast, 3' terminal adenylation by GLD2 has been reported to specifically stabilize miR-122 expression levels in mouse liver (Kato et al., 2009). Terminal modifications of mature microRNAs may also influence their mRNA target silencing efficiency, as demonstrated by the abrogation of miR-26b-mediated silencing of IL-6 expression upon uridylation by TUT4 (Jones et al., 2009). As for microRNA adenylation by GLD2, it is thought to alter mRNA target silencing efficiency of microRNAs by decreasing their incorporation in Argonaute protein complexes (Burroughs et al., 2010).

The similar abundance of 3' modifications sustained by microRNA species deriving from the 5p or 3p strands of pre-microRNAs suggests that most microRNA modifications are subsequent to pre-microRNA processing. However, we observed that the nature of the modifications varies depending on the strand origin of the microRNA, as the 3p-microRNAs were preferentially adenylated and the 5p-microRNAs preferentially uridylated. Although the molecular mechanisms underlying the differential, polar modifications of platelet microRNAs remain unclear, they are likely to occur during

microRNA biogenesis, possibly before strands separation (i.e. at the microRNA duplex level), and to involve a specific structure/nucleotide context. These modifications are expected to influence the biogenesis, strand selection, stability and effectiveness of platelet microRNAs (Burroughs et al., 2010; Heo et al., 2009; Katoh et al., 2009), which may be crucial for an anucleate element bereft of de novo transcription. The detection of microRNA terminal uridylyltransferase (TUTase) activity in platelets, which appear to be distinct from that documented in the megakaryoblastic cell line Meg-01, correlates with the presence of TUT4. The higher level of TUT4 expression in platelets compared to Meg-01 cells might explain the increased TUTase activity observed *in vitro*. The presence and relative contribution of the other six known TUTase enzymes (TUT1 to TUT7) (Heo et al., 2009) to platelet microRNA terminal uridylation, however, remains to be determined.

In contrast, we were not able to detect microRNA adenylation activity in assays using platelet extracts *in vitro*, although it remains possible that the experimental setting/conditions may need to be optimized more thoroughly. The apparent lack of terminal adenylyltransferase activity in human platelets suggests that the adenylated forms of platelet microRNAs are likely inherited, already modified, from their megakaryocytic precursor cells. This possibility is supported by the microRNA duplex adenylating properties of Meg-01 cells. Therefore, our results indicate that platelets would have the potential to modulate the activity and stability of its microRNA content through terminal uridylation, whereas the regulation of its microRNAs through adenylation events would be initiated in its megakaryocytic precursor cell.

We identified a restricted number of microRNAs harboring a relatively high rate of 5' cleavage shift. This feature determines the composition of the microRNA seed sequence, which plays a critical role in mRNA recognition (Bartel, 2009), thereby markedly expanding the repertoire of mRNAs that could be regulated upon expression of a single microRNA gene in human platelets. Redirection of the mRNA targeting abilities of 5' shifted microRNAs, for which we used miR-140-3p as a proof-of-principle, is in accordance with a recent report in cardiomyocytes (Humphreys et al., 2012) and confirms the mRNA targeting specificity and functionality of the 5' shifted platelet isomiRs. Interestingly, variations of the 5' sequence of platelet microRNAs are less frequent than those observed at their 3' extremity, a region that is dispensable for mRNA target

recognition (Bartel, 2009). This feature, in association with a relatively well preserved microRNA seed sequence and functionality, is supportive of a potential role for microRNAs in platelet mRNA recognition and regulation.

In the present study, we analyzed the small RNA profile of resting platelets. However, Osman and Falker (Osman and Falker, 2011) recently reported specific changes in the microRNA content of activated platelets, whereby 6 microRNAs were up- or down-regulated in response to a physiological agonist (thrombin). These results suggest a possible link between the activation status of platelets and their microRNA repertoire, whose alterations may induce agonist-specific, adapted changes in platelet function. In fact, the platelet microRNA profile may be modified as a consequence of the activation-induced release of microparticles containing microRNAs. Moreover, the demonstrated delivery of microRNAs from one cell to another through microvesicles (Valadi et al., 2007), together with the ability of activated platelets to release microparticles (Boilard et al., 2010) and the recently reported ability of platelet-like particles to mediate intercellular mRNA transfer (Risitano et al., 2012), suggest that platelet microRNAs may also fulfill extraplatelet role(s). Platelet microRNAs may thus be delivered to a variety of cells in the cardiovascular system and have the potential to modulate gene expression in recipient cells. Whether platelet microRNAs exert their function predominantly in platelets or in other cells of the cardiovascular system warrants further investigations.

Considering the complexity (or plurality) of mRNA regulation by microRNAs, whereby (i) a single microRNAs may regulate hundreds of different mRNAs with varying efficiency, and (ii) each mRNA can be regulated by several microRNAs (Chi et al., 2009), the repertoire of potential platelet and extra-platelet mRNA targets of platelet microRNAs may be rather large. In fact, it may be as broad as the number of different cell types that may inherit of platelet microRNAs multiplied by the number of mRNAs expressed in these cells and potentially regulated by microRNAs. mRNA targets of platelet microRNAs can be predicted by a variety of Web-based bioinformatic tools, such as MicroCosm Targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) (Griffiths-Jones et al., 2008), DIANA-microT-CDS (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>) (Reczko et al., 2011), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) (Krek et al., 2005), Miranda (www.microrna.org) (John et al., 2004), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) (Friedman et al., 2009) and miRecords

(<http://mirecords.biolead.org>) (Xiao et al., 2009). These tools combine different parameters of the sequence requirements for microRNA:mRNA binding and calculate the free energy of the interaction as a predictive method to identify mRNA targets with a relatively high degree of confidence. Serving as a guidance, these predictions remain to be validated experimentally which, in some cases, may represent a relatively challenging task.

In addition to provide a valuable resource to researchers interested in both the intraplatelet and extraplatelet role, function and importance of platelet microRNAs, our findings may have clinical applications, prior to which they would probably need to be expanded, by examining a larger set of subjects from different geographic location, nationality, origin, age and sex, at different periods of the year. However, the relatively strong correlation observed between our platelet microRNA data (in Quebec City) and those reported by the group of Dr. Paul F. Bray (in Philadelphia) (Edelstein and Bray, 2011) strengthens the possibility of using platelet microRNAs as universal biomarkers of platelet-related diseases. Although several issues will need to be addressed and circumvented, including that of inter-individual variations, the small RNA or microRNA profile of platelets sampled from individual subjects may eventually form the basis of personalized diagnosis and individualized therapy (Perron et al., 2007).

3.1.8 Supplemental information

3.1.8.1 Supplementary Methods

3.1.8.1.1 Northern blot analysis

HEK293, HeLa and the megakaryocytic cell line Meg-01 (ATCC) were maintained in culture, as previously described (Landry et al., 2009). Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). One (1) µg of total RNA was separated on a 12% (w/v) polyacrylamide gel containing 7 M urea and transferred to a nylon membrane, followed by detection using randomly ³²P-labeled RNA probes complementary to mature microRNA species using a Northern blot procedure improved for the detection of small RNAs (Pall et al., 2007).

3.1.8.1.2 qPCR detection of novel microRNA

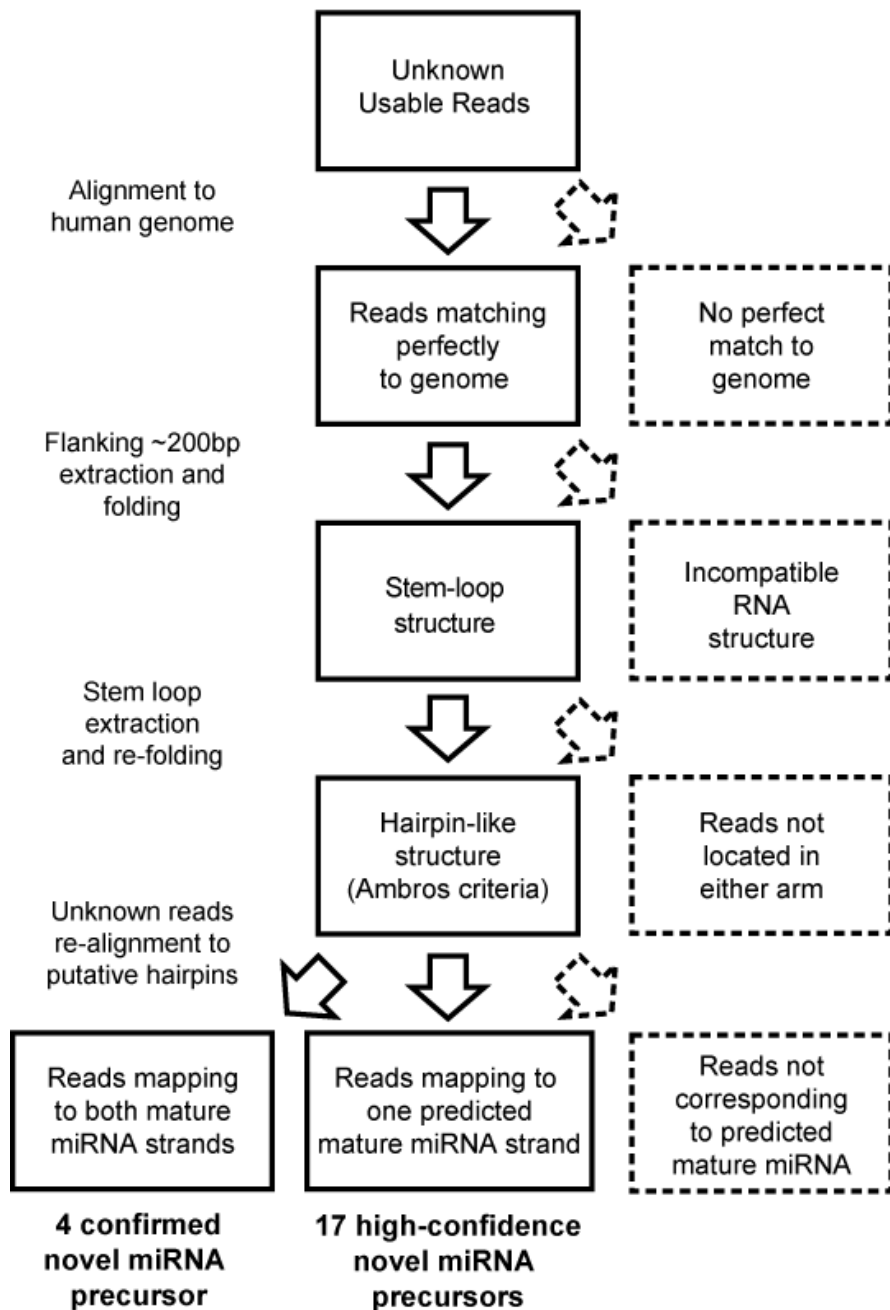
One (1) μg total RNA, extracted from purified platelets as described in the Materials and Methods section, was used for reverse transcription using miScript RT II kit (Qiagen). SYBR Green PCR kit (Qiagen) and specific primers for each microRNA (miScript Primer assay, Qiagen) were used to assess the expression of 4 selected novel microRNAs.

3.1.8.2 Supplementary results

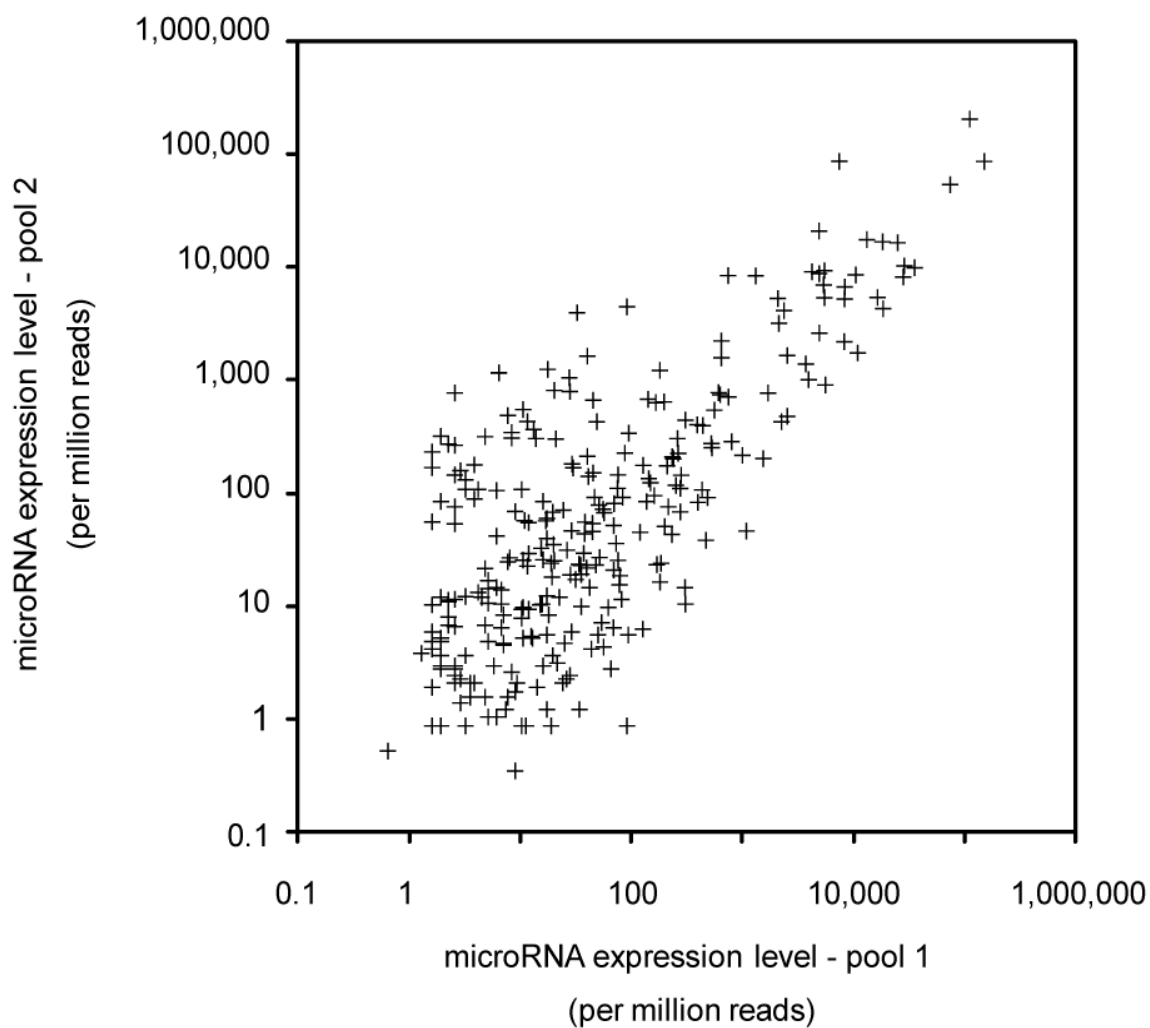
Validation of five selected microRNAs by Northern blot

We elected to validate the existence of 5 of the novel microRNA candidates by Northern blot hybridization analysis of total RNA extracted from primary human platelets and 3 cultured human cell lines, using sequence-specific complementary ^{32}P -labeled probes. Four (4) of the 5 hairpins were annotated in miRBase during the course of our study, and named hsa-miR-5189, hsa-miR-3928, hsa-miR-3138 and hsa-miR-2115, respectively. Although the hybridization signal was relatively weak, which is consistent with their relatively low abundance, a ~21- or 22-nt RNA species could be detected solely in human platelets, not in HEK293, HeLa or Meg-01 cells (**Supplementary Figure S3**). A larger RNA species, corresponding to the ~75-nt pre-microRNA, was detected in human platelets, but also in the cultured human cell lines for 3 of them. Expanding further the microRNA repertoire of human platelets, our findings raise the possibility of platelet-specific microRNA sequences, an assertion that would need to be verified more thoroughly by probing a much wider array of human tissues and cells.

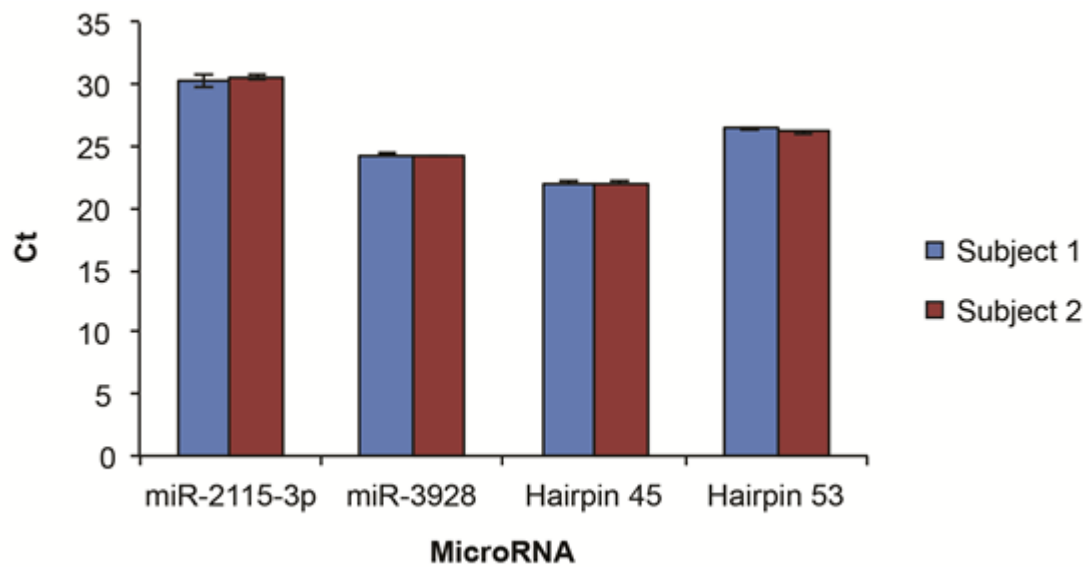
3.1.8.3 Supplementary Figures and Tables



Supplementary Figure S1. Flowchart applied for the discovery of novel platelet microRNAs.

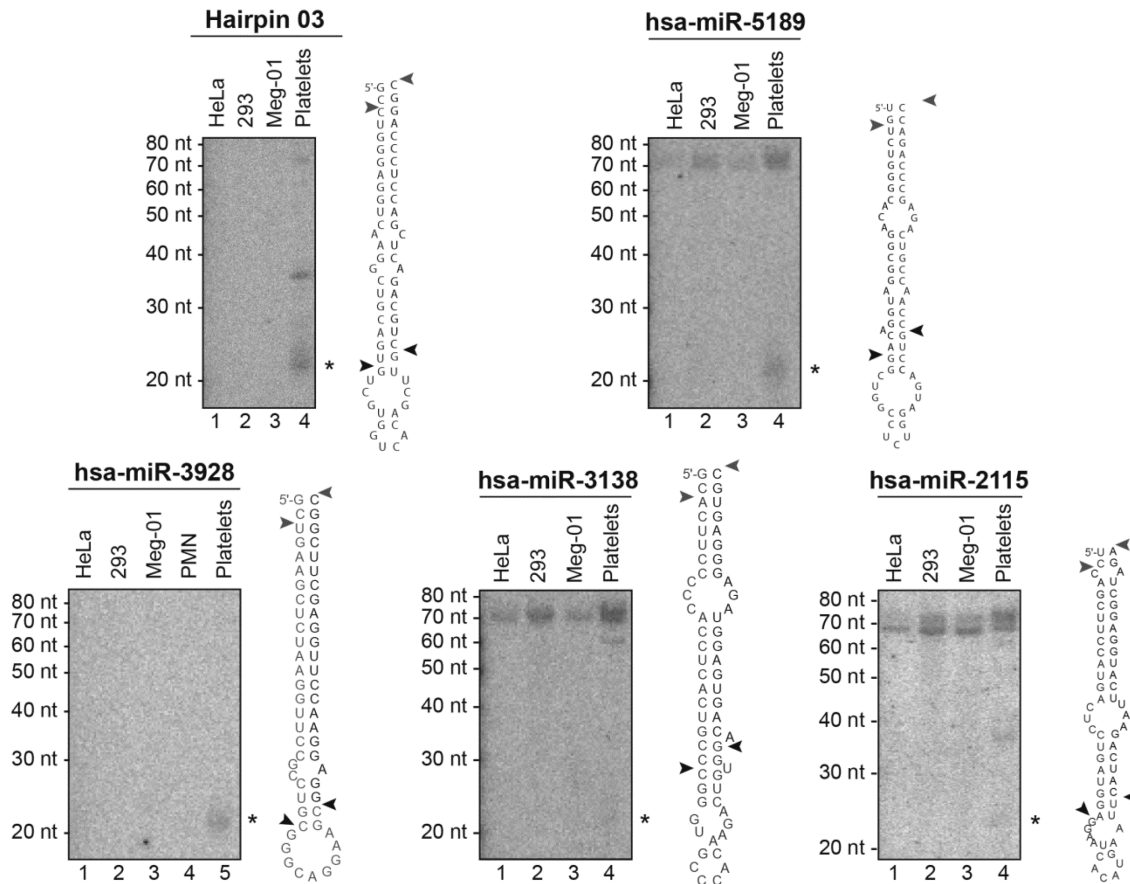


Supplementary Figure S2. Correlation of the number of reads obtained for each microRNA sequences detected in Pool 1 and Pool 2.



Supplementary Figure S3. Expression of 4 selected novel platelet microRNAs was confirmed by qPCR analyses.

The expression of 4 selected novel microRNAs was assessed by qPCR using platelet total RNA from two healthy volunteers. One (1) μg of RNA was reverse transcribed into cDNA using miScript II RT kit (Qiagen), and the different microRNAs were detected by qPCR using miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) and specific primers for each microRNA. Ct, cycle threshold.



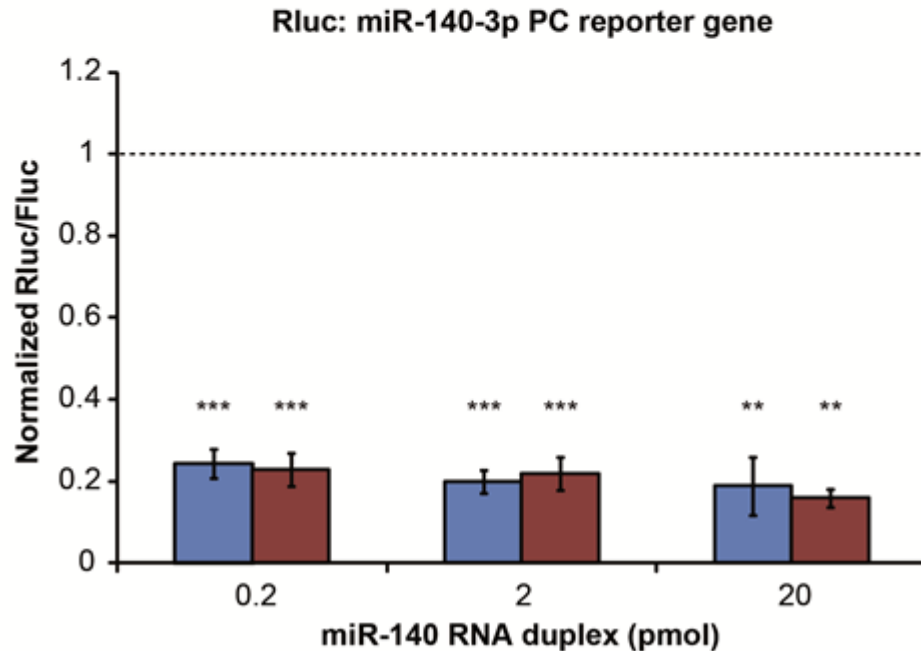
Supplementary Figure S4. Validation of selected novel platelet microRNAs by Northern blot hybridization.

Total RNA extracts prepared from HeLa cells, 293 cells, Meg-01 cells and human platelets were analyzed by Northern blot using ³²P-labeled probes recognizing the mature microRNA sequences (in black) encoded by Hairpin 03 (A) as well as hsa-miR-5189 (B), hsa-miR-3928 (C), hsa-miR-3138 (D) and hsa-miR-2115 (E) that were annotated in miRBase during the course of this study. The secondary structure of the microRNA precursors (pre-microRNAs) is predicted by RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). The arrows indicate the predicted Drossha (in grey) and Dicer (in black) cleavage sites, yielding the mature microRNA and putative opposite strands. The presence of two bands at the size expected for the pre-microRNA species either (i) suggests that more than one precursor may exist for a given mature microRNA, such as for miR-19a (Landry et al., 2009), or that pre-microRNAs may be extensively modified at their 3' end (Newman et al., 2011). Alternatively Ago2-mediated processing of some pre-microRNAs may result in 10 to 11-nt shortening of the 3' end, as described for let-7 and miR-20a (Diederichs and Haber, 2007). The ~35-nt intermediate bands that do not correspond to precursor or mature microRNA species may represent microRNA cleavage intermediate (Flores-jasso et al., 2009; Ouellet et al., 2008).

miR-140-3p isoforms:

■ Reference ■ Shifted

```
Reference      3' GGCACCAAGAUGGGGACACCAU 5'
                |||
PC BS         5' ...AGCCGUGGUUCUACCCUGUGGUAGC...3'
                |||
Shifted       3' AGGCACCAAGAUGGGGACACCA 5'
```



Supplementary Figure S5. Both the miR-140-3p reference sequence and its 1-nt 5' shifted isomiR can silence Rluc reporter gene activity.

HEK 293 cells were co-transfected with miR-140 microRNA duplexes, containing either the reference microRNA sequence (Reference) or the most abundant 1-nt 5' shifted isomiR (Shifted), and a reporter gene construct in which a binding site perfectly complementary (PC) to miR-140-3p was inserted downstream of the Rluc reporter gene. Base pairing complementarity between miR-140-3p microRNAs and the PC binding site is shown in the upper panel. Base pairing involving the microRNA seed region is highlighted in bold. Rluc and Fluc activities were measured, and the values were normalized to those obtained with a non-relevant RNA duplex targeting green fluorescent protein (GFP) (n = 3 to 4 experiments, in duplicate) (lower panel). ** p<0.01, *** p<0.001 (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test).

Supplementary Table S1. Platelet messenger RNA (mRNA) targets of the two main isoforms of miR-140-3p.

mRNA target	mRNA:miroRNA base pairing	miR-140-3p isoform	GO analysis
MAPK1	5' UCCCCACUGCUCUCUGUGGUG : : 3' GGCACCAAGAUGG GACACCAU	Reference (no shift)	Platelet activation
RHOA	5' GCAGAGUUACAGUUCUGUGGUU : 3' GGCACCAAGAUG-G GACACCAU	Reference (no shift)	Platelet activation
YWHAZ	5' GAGCACUUACAAGGCUGUGGUA 3' GGCACCAAGAUGG GACACCAU	Reference (no shift)	Platelet activation
PIK3R1	5' CCAGACACAUCGCACUGUGGA 3' AGGCACCAAGAUG GGACACCA	5' shift +1 nt	Platelet activation
CAP1	5' CCAUUUCCUGAGGCCUGUGGA 3' AGGCACCAAGAUG GGACACCA	5' shift +1 nt	Platelet activation Platelet degranulation
PRKCQ	5' UAUUCUAUUCUAUCUGUGGA : 3' AGGCACCAAGAUG GGACACCA	5' shift +1 nt	Platelet activation
SNCA	5' AGGGUCUUUGUGGCUGUGGA 3' AGGCACCAAGAUG GGACACCA	5' shift +1 nt	Colocalizes with platelet α -granules

Supplementary Table S2. The 50 most abundant microRNAs detected in human platelets by high-throughput sequencing.

miRNA		Number of reads		Average	
Rank	ID	Pool 1	Pool 2	Expression (per 10 ⁶)	Abundance
1	hsa-let-7f-5p	347326	1178189	158765.9	21.49%
2	hsa-let-7a-5p	468491	497975	118095.6	16.78%
3	hsa-mir-199ab-3p	46458	998118	95224.1	12.28%
4	hsa-mir-103a-3p	230988	310373	63934.9	9.00%
5	hsa-mir-140-3p	110557	56986	22540.7	3.28%
6	hsa-let-7g-5p	77741	94956	20681.4	2.92%
7	hsa-mir-25-3p	89444	59251	19393.5	2.80%
8	hsa-let-7b-5p	87483	47286	18029.4	2.62%
9	hsa-let-7d-5p	56904	96634	17526.2	2.44%
10	hsa-mir-21-5p	41169	101142	15428.8	2.12%
11	hsa-mir-185-5p	15233	120587	13029.3	1.71%
12	hsa-mir-191-5p	57647	24733	11314.8	1.66%
13	hsa-mir-223-3p	51251	31099	10861.4	1.57%
14	hsa-mir-26b-5p	32610	49328	9511.2	1.33%
15	hsa-mir-423-5p	25999	38466	7507.1	1.05%
16	hsa-mir-221-3p	17075	53676	7431.4	1.01%
17	hsa-mir-107	15276	50610	6876.4	0.93%
18	hsa-mir-101-3p	25864	30132	6752.1	0.96%
19	hsa-let-7i-5p	13201	52506	6714.4	0.90%
20	hsa-mir-23a-3p	34022	10037	6276.4	0.93%
21	hsa-mir-320a	16779	40118	6191.1	0.85%
22	hsa-mir-26a-5p	17048	30972	5428.6	0.75%
23	hsa-mir-29a-3p	25747	12623	5192.3	0.76%
24	hsa-mir-92a-3p	4101	48313	4902.8	0.64%
25	hsa-mir-744-5p	2313	48532	4638.7	0.60%
26	hsa-mir-142-5p	15352	15037	3757.1	0.54%
27	hsa-let-7e-5p	6490	30478	3711.6	0.50%
28	hsa-mir-340-5p	7379	23788	3263.6	0.44%
29	hsa-mir-192-5p	17386	5229	3216.2	0.47%
30	hsa-mir-24-3p	6637	18358	2668.0	0.36%
31	hsa-mir-181a-5p	11584	8010	2541.3	0.37%
32	hsa-mir-16-5p	12302	5824	2462.7	0.36%
33	hsa-mir-1	284	25745	2311.2	0.29%
34	hsa-mir-27a-3p	7886	9537	2089.5	0.30%
35	hsa-mir-584-5p	101	22784	2021.6	0.26%
36	hsa-mir-143-3p	7890	2756	1493.3	0.22%
37	hsa-mir-30d-5p	2014	12794	1445.4	0.19%

Supplementary Table S2. The 50 most abundant microRNAs detected in human platelets by high-throughput sequencing.

(Suite de la page précédente)

miRNA		Number of reads		Average	
Rank	ID	Pool 1	Pool 2	Expression (per 10⁶)	Abundance
38	hsa-mir-30e-3p	7002	2465	1326.9	0.20%
39	hsa-let-7c	5305	4435	1231.3	0.18%
40	hsa-mir-128	2012	9092	1119.3	0.15%
38	hsa-mir-30e-3p	7002	2465	1326.9	0.20%
39	hsa-let-7c	5305	4435	1231.3	0.18%
40	hsa-mir-128	2012	9092	1119.3	0.15%
41	hsa-mir-93-5p	4794	1165	862.5	0.13%
42	hsa-mir-152	125	9406	847.8	0.11%
43	hsa-mir-330-3p	2329	4087	728.9	0.10%
44	hsa-mir-27b-3p	562	7031	708.0	0.09%
45	hsa-mir-186-5p	1897	4467	693.9	0.10%
46	hsa-mir-423-3p	1965	4279	688.1	0.09%
47	hsa-mir-126-5p	55	7174	640.2	0.08%
48	hsa-mir-30e-5p	3112	1244	602.8	0.09%
49	hsa-mir-151b	20	6706	593.5	0.08%
50	hsa-mir-151a-5p	20	6670	590.3	0.08%

3.2. Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease.

3.2.1 Auteurs et affiliations

Hélène Plé¹, Manon Maltais², Aurélie Corduan¹, Guy Rousseau², François Madore² and Patrick Provost¹

¹ Centre de recherche du CHUQ/CHUL, Université Laval, Québec, Qc, Canada

² Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

La version définitive de ce manuscrit, qui a été accepté pour publication dans le journal *Thrombosis Haemostasis* (Plé et al., 2012b) le 12 juin 2012, a été publié en octobre 2012 et est disponible sur le site Web de la compagnie d'édition Schattauer à l'adresse suivante :

<http://www.schattauer.de/en/magazine/subject-areas/journals-a-z/thrombosis-and-haemostasis/contents/archive/issue/special/manuscript/17907.html>

3.2.2 Résumé

Les défauts plaquettaires chez les patients en insuffisance rénale chronique se traduisent notamment par une altération de leur protéome, découlant potentiellement d'une altération de leur transcriptome. Nous avons donc analysé le transcriptome plaquettaire et la fonction des microARN chez des patients urémiques, sous dialyse (stade 5) ou non (stade 4), et des sujets sains. Altérés chez les patients urémiques, les niveaux de quelques ARN messagers (ARNm) et de la plupart des microARN sont rétablis par la dialyse. La *phosphatidyl choline transfer protein* (PCTP) et la *WD repeat containing protein 1* (WDR1) sont réduits chez les patients urémiques, et nous avons démontré que ces deux gènes sont régulés par des microARN dont les niveaux sont augmentés chez ces patients. Ces résultats suggèrent que l'altération de la régulation de certains ARNm plaquettaires par les microARN pourrait contribuer aux défauts plaquettaires chez les patients urémiques.

3.2.3 Summary

Bleeding and thrombotic disorders are major complications affecting patients with chronic kidney disease (CKD). Exposure of circulating platelets to uremic toxins and contact with artificial surfaces during dialysis induce platelet abnormalities and alter the platelet proteome. We hypothesized that these changes may be subsequent to changes in the composition and/or regulation of the platelet transcriptome. In this study, we investigated the circulating platelets of 10 CKD patients (i.e. 5 chronic hemodialysis patients and 5 stage 4 CKD uremic patients) and 5 age- and sex-matched healthy subjects. We observed an alteration of the platelet messenger RNA (mRNA) and microRNA transcriptome in CKD patients. Impaired in uremic platelets, the levels of some mRNAs and of most microRNAs appeared to be corrected by dialysis, which is consistent with a beneficial effect of dialysis and a mRNA regulatory role of platelet microRNAs. Reduced in platelets of uremic patients, phosphatidylcholine transfer protein (PCTP) and WD repeat-containing protein 1 (WDR1) were found to be regulated by microRNAs, the latter of which involving hsa-miR-19b, a microRNA increased in platelets of uremic patients and involved in platelet reactivity. These results suggest that an alteration of microRNA-based mRNA regulatory mechanisms may underlie the platelet response to uremia and entail the development of platelet-related complications in CKD.

3.2.4 Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of morbidity and mortality among patients suffering from chronic kidney disease (CKD) and is the leading cause of death in patients on chronic hemodialysis (Collins et al., 2001; Foley et al., 2005; Sidhu and Dellsperger, 2011). The high prevalence of established traditional risk factors in CKD patients, such as lipid disorders, diabetes and hypertension, as well as non-traditional risk factors (e.g. oxidative stress, inflammation) and platelet abnormalities (Cheung et al., 2000; Xue et al., 2005), may contribute to accentuate the risks of CVD and thrombotic complications (Libetta et al., 2011; Vaziri and Norris, 2011). Patients with CKD suffer from complex hemostatic disorders. On one hand, uremic patients present abnormalities of primary hemostasis (i.e. platelet dysfunction and impaired platelet-vessel wall interactions) and increased risk of bleeding (Boccardo et al., 2004; Kaw and Malhotra, 2006; Rios et al.,

2010). On the other hand, several studies have shown that platelet reactivity is increased in CKD patients undergoing hemodialysis (Aggarwal et al., 2002), which is associated with increased risk of thrombo-embolic events (Kabbani et al., 2001; Thaulow et al., 1991; Trip et al., 1990). CKD is thus characterized by a delicate balance in which deficient hemostasis paradoxically coexists with enhanced risk of thrombosis, and in which platelet abnormalities may play an important role.

Playing a critical role in the maintenance of hemostasis, platelets may directly contribute to cardiovascular complications, such as myocardial infarction and stroke, in CKD patients (Boccardo et al., 2004; Kaw and Malhotra, 2006; Rios et al., 2010). Although devoid of a nucleus and lacking genomic DNA, circulating human platelets retain as much as 45% of the Refseq genes in the form of mRNAs (Rowley et al., 2011), inherited mainly from their megakaryocyte progenitor cells (Roth et al., 1989). Several reports confirmed that platelet mRNAs can support de novo protein synthesis (Schubert and Devine, 2010), including a recent study reporting the translation and secretion of the metalloproteinase inhibitor Timp 2 by activated platelets (Cecchetti et al., 2011). Weyrich et al. (Weyrich et al., 2007) had previously demonstrated that synthesis of Bcl-3 by activated platelets participate in blood clot retraction, while Evangelista et al. (Evangelista et al., 2006) reported that de novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin.

Proteomic analyses of platelets revealed that their protein expression profile is altered in CKD patients (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007). Although reticulated platelets sustain changes in terms of platelet volume, morphology and RNA content in subjects treated with hemodialysis (Schoorl and Bartels, 2008; Tassies et al., 1995), whether the mRNA profile of platelets is altered in CKD and hemodialysis patients remains unknown. These observations prompted us to formulate and verify the hypothesis that the biochemical conditions (e.g., increased uremic toxins) prevailing in patients with CKD, leading or not to end-stage kidney failure and dialysis, might negatively affect the transcriptome of circulating platelets, which is constituted mainly of mRNAs and of non-coding microRNAs.

3.2.5 Material and methods

3.2.5.1 Recruitment of the subjects

After obtaining informed consent, 10 CKD patients (n=5 chronic hemodialysis patients and n=5 stage 4 CKD patients, later referred as dialysis and uremic patients, respectively) were recruited to participate in this study, which was approved by our Institutional Human Ethics Committees. Five age- and sex-matched healthy subjects with normal renal function were recruited as control group. For all participants, data on demographics, medical history and current pharmacological treatment regimen were collected, as detailed in **Table 4**. Approximately 400 ml of venous blood was collected from each subject using collection bag containing sodium citrate as anticoagulant. For dialysis patients, blood collection was performed immediately prior to dialysis treatment. Hematological and biochemical data were recorded for each subject and are summarized in **Table 5**.

3.2.5.2 Purification of blood platelets

Venous blood was centrifugated at 170 g for 15 min to obtain the platelet-rich plasma (PRP), which was cleared by another centrifugation at 600 g for 10 min and filtered through leukocyte depletion filters (Pall corporation). Platelets were collected by centrifugation at 1,500 g for 15 min and subjected to negative selection based on magnetic cell sorting using human CD45⁺ depletion kit (EasySep, Stemcell technologies). Approximately two thirds of purified platelets were lysed in TRIzol solution (Invitrogen) for RNA extraction, whereas the remaining platelets were flash-frozen in a dry-iced ethanol bath and stored at -80°C for subsequent enzymatic and Western blot experiments, as described previously (Landry et al., 2009).

3.2.5.3 RNA extraction and analysis

Platelet total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Purity of the platelet preparations was assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the leukocyte marker CD45 and platelet marker GPIIIa, as previously described (Landry et al., 2009). For microarray analysis, 1.5 µg of total RNA from each subject were pooled together for each cohort. Pooled total RNA was

purified further using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The integrity of the total RNA samples was assessed by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology) prior to mRNA and microRNA profiling.

3.2.5.4 Microarray profiling and analysis of platelet mRNAs

mRNA profiling was performed through the CRCHUQ Genomics platform (CHUQ research center/CHUL) using Human Gene 1.0 ST DNA BioChip (Affymetrix), according to the manufacturer's protocol. Analysis of mRNA profiles from Human Gene 1.0 ST microarray data was performed on protein-coding genes. Differentially expressed mRNAs were defined as mRNAs 2 fold more (or less) expressed among the uremic or dialysis patients as compared to healthy subjects.

3.2.5.5 Quantitative real-time PCR (qPCR) experiments

Expression of selected genes of interest was assessed by qPCR using QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystem). The $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to perform the relative quantification of the target genes using GAPDH mRNA as the reference gene. Expression of microRNA of interest was assessed by qPCR using miSCRIPT PCR system (Qiagen). MiR-191 was used as the reference for relative quantification, as this microRNA displays no expression variation in our microarray data; similar observations were reported by Nagalla et al. upon analysis of platelet miR-191 from 17 healthy donors (Nagalla et al., 2011). All results were normalized to the average expression level obtained for the healthy subjects group, and arbitrarily set at 1.

3.2.5.6 Microarray profiling and analysis of platelet microRNAs

MicroRNA profiling was performed by Exiqon microRNA profiling service (Vedbaek, Denmark). The 3 samples (healthy, uremic and dialysis platelets total RNA pool) were labeled using the miRCURY™ Hy3/Hy5 Power labeling kit and hybridized on the miRCURY™ Locked Nucleic Acid (LNA) Array (5th generation arrays covering microRNA registered in miRBase 15.0 - Sanger Institute (Griffiths-Jones, 2004)). Differentially expressed microRNAs were defined as microRNA whose expression level was 2 fold higher or lower than that observed in healthy subject group. Predicted mRNA

targets of differentially expressed microRNAs were determined using miRecords (<http://mirecords.biolead.org>) (Xiao et al., 2009).

3.2.5.7 Reporter gene activity assays

HEK293 cells (2×10^5) were plated in 24-well plates 24 hours before cotransfection with a pGeneClip (Promega) construct expressing pre-miR-599 or pre-miR-19b-1 (2.5 to 250 ng DNA) and a psiCHECK (Promega) reporter construct, in which the 3'UTR of phosphatidylcholine transfer protein (PCTP) or WDR1 (100 ng DNA) was inserted downstream of the Rluc reporter gene, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). A pGeneClip-Neg vector (Plante et al., 2006), encoding a short hairpin RNA (shRNA) directed against a deleted region in Rluc mRNA, was used as a negative control. Forty-eight hours later, cells were harvested and protein extracts were prepared for measurement of Renilla luciferase (Rluc) and Firefly luciferase (Fluc) activities, essentially as described previously (Plante et al., 2006).

3.2.5.8 Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using InStat 3 software (GraphPad). For all analyses, a $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3.2.6 Results

3.2.6.1 Recruitment and characteristics of the subjects

In this study, we characterized the mRNA and microRNA transcriptomes of circulating platelets from a total of 10 CKD patients: (i) 5 patients suffered from end-stage renal disease (stage 5) and were treated by chronic hemodialysis (dialysis patients) (**Table 4**), whereas (ii) the other 5 patients suffered from stage 4 CKD (uremic patients), the last stage before renal replacement therapy (e.g. hemodialysis or renal transplantation), which corresponds to an eGFR ranging from 15 to 29 ml/min/1.73m² (Levey et al., 1999). **Table 4** shows chronic medication use in study participants. Although the dialysis patients were treated for anemia, their red blood cell count, hemoglobin content and hematocrit remained relatively lower than the other subjects (**Table 5**). None of the subjects presented obvious platelet disorders, as platelet count and platelet mean volume were within a normal range.

Table 4. Characteristics, causes of renal disease and pharmacological treatments of the subjects

Subjects (<i>n</i> = 5 in each group)	Healthy	Kidney failure	
		Uremic	Dialysis
Age	60 ± 11	58 ± 17	56 ± 12
Gender (Male:Female)	4:1	4:1	3:2
Smokers	-	1	-
Cause of renal disease			
Polycystic kidney	-	1	2
Obstructive uropathy	-	1	-
Polynephritis	-	1	-
Diabetes	1	2	2
Hypertensive nephropathy	-	1	-
Amyloidosis	-	-	1
Lithium nephropathy	-	-	1
Treatments			
Dialysis†	-	-	5
Anti hypertensives	-	4	4
Hypolipemiant	1	3	3
Anti-platelet agents	-	2	4
Hypoglycaemic	1	2	2

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD)

† Dialysis treatment was complemented with the same pharmacological treatment for all the patients, which comprised Darbepoetin and Iron Sucrose (anemia treatment), 1-OH-Vitamin D and furosemide. Other agents: phosphate binders (calcium or non calcium), sodium polystyrene and allopurinol.

3.2.6.2 Differential platelet mRNA profile of uremic and dialysis patients

The previously reported alteration of the protein expression profile in circulating platelets of CKD patients (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007) prompted us to examine the impact of CKD on the platelet mRNA transcriptome. Microarray profiling of platelet mRNAs on pooled RNA samples revealed that the majority of platelet mRNAs is not markedly affected in uremic and dialysis patients, as compared to control healthy subjects. However, we did observe an altered expression (> 2 fold vs healthy subjects) of a total of 33 platelet mRNAs in CKD patients: (i) 17 platelet mRNAs were differentially expressed in uremic patients (**Figure 17A**, left panel), whereas (ii) in dialysis patients, 23 platelet mRNAs showed a differential expression (**Figure 17A**, right panel). Analyzing those differentially expressed platelet mRNAs among our uremic and dialysis patient

cohorts (**Figure 17B**), 7 genes showed a similar deregulation in both cohorts of CKD patients, whereas 15 genes were altered specifically in dialysis patients.

Table 5. Hematology and biochemistry profile of the subjects.

Subjects (n = 5 in each group)	Healthy	CKD		Reference values
		Uremic	Dialysis	
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	n.d.	20.6 ± 5	n.d.	15-29†
Hematology				
Red blood cells (10 ¹² /l)	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.1	3.7 ± 0.2 *	4.5-5.9
Hematocrit	0.41 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.01 *	0.42-0.50
Hemoglobin (g/l)	141 ± 15	129 ± 9	120 ± 4 *	140-175
White blood cells (10 ⁹ /l)	6.4 ± 0.4	7.6 ± 0.5	7.0 ± 1.1	4.0-11.0
Platelets (10 ⁹ /l)	198 ± 54	237 ± 29	201 ± 35	150-400
MPV (fl)	8.6 ± 1.1	9.1 ± 0.8	8.4 ± 0.6	7.4-10.4
Biochemistry				
Urea (mmol/l)	7.4 ± 1.7	18.6 ± 1.0 *	20.2 ± 2.8 *	2.4-4.1
Creatinine (µmol/l)	86 ± 22	289 ± 78 **	554 ± 187 *	53-120
Cholesterol (mmol/l)	4.6 ± 1.3	4.2 ± 1.3	4.1 ± 0.7	4.2-6.2
Triglycerides (mmol/l)	2.2 ± 1.8	1.8 ± 0.8	1.8 ± 0.8	0.6-2.3
HDL Cholesterol (mmol/l)	1.4 ± 0.7	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.5	0.9-2.4
Tot. Chol./HDL	3.6 ± 1.2	4.1 ± 1.5	3.6 ± 1.1	0.0-5.0

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

* p<0.05; ** p<0.01 versus healthy subjects (Mann-Whitney Test)

† Reference values correspond to stage 4 chronic kidney disease (CKD).

n.d., not determined; eGFR, estimated glomerular filtration rate; MPV, mean platelet volume; HDL, high density lipoprotein; Tot. Chol., total cholesterol

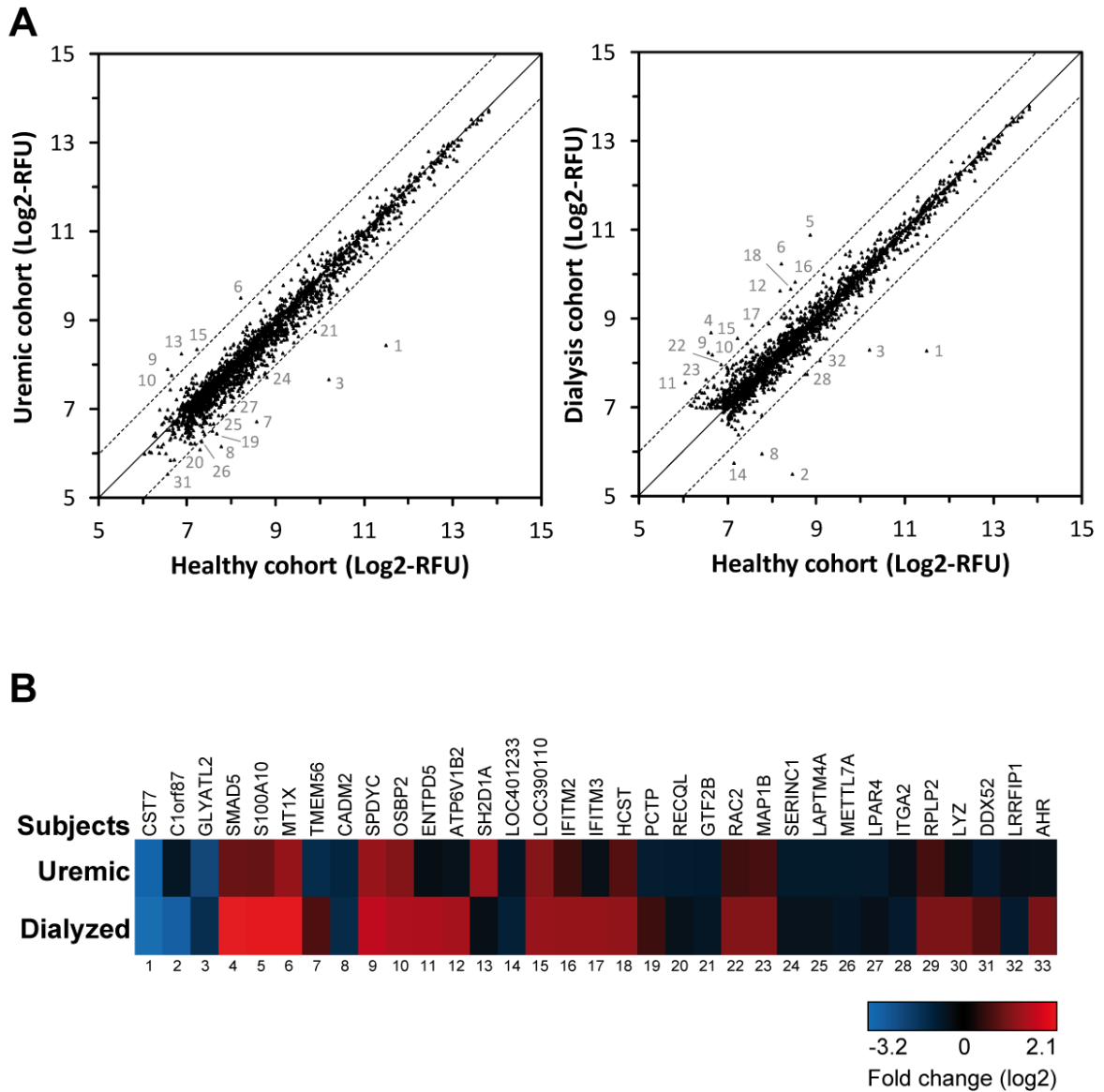


Figure 17. Differential platelet mRNA profile of uremic and dialysis patients. Platelet RNA samples were obtained from each subject, and equivalent amounts were pooled and analyzed by DNA-based microarray (Affymetrix, human Gene 1.0 chip). Platelet mRNA profile of the uremic and dialysis patients were compared to the healthy subjects. (A) Platelet mRNA expression level correlation between healthy and uremic (left panel) or dialysis (right panel) subjects. Data are expressed as log₂-transformed relative fluorescence unit (RFU). The mRNAs that varied by more than 2-fold were numbered, as indicated in B. (B) Platelet mRNAs displaying more than 2-fold changes among the uremic and dialysis patients, as compared to the healthy subjects. Twenty-three (23) and 17 mRNAs are differentially expressed in platelets from dialysis and uremic patients respectively, as compared to healthy subjects. Seven (7) mRNAs are differentially expressed in both patient groups.

3.2.6.3 Validation of selected platelet mRNAs by qPCR analyses

Next, we wished to confirm the differential expression observed for selected mRNAs, on an individual basis, by qPCR. Four genes were selected based on their different patterns of expression and potential relevance to platelet function. Assessment of their mRNA expression levels by qPCR accurately reflected those obtained by microarray profiling (**Table 6**), thereby confirming the validity of our microarray approach using pooled RNA samples. As expected, the level of two of them, serine incorporator 1 (SERINC1) (**Figure 18A**) and lysophosphatidic acid receptor 4 (LPAR4) (**Figure 18B**), was reduced by ~50% in CKD patients, as compared to healthy subjects. In contrast, the mRNAs encoding for oxysterol binding protein 2 (OSBP2) and metallothionein 1X (MT1X) were upregulated in CKD patients (**Figure 18C and D**, respectively). Although in some cases statistical significance could not be reached, the differential mRNA expression assessed by microarray and qPCR displayed similar tendencies.

Table 6. Comparison of gene expression data obtained by microarray and qPCR

Gene symbol Gene name	Subjects	mRNA expression level (fold changes)	
		Microarray	qPCR
SERINC1 serine incorporator 1	Uremic Dialysis	0.48 0.73	0.49 ± 0.10 ** 0.61 ± 0.19 *
LPAR4 lysophosphatidic acid receptor 4	Uremic Dialysis	0.49 0.83	0.50 ± 0.18 0.61 ± 0.43
OSBP2 oxysterol binding protein 2	Uremic Dialysis	2.17 2.93	3.81 ± 2.06 ** 3.40 ± 2.39
MT1X metallothionein 1X	Uremic Dialysis	2.48 4.11	4.69 ± 4.68 4.59 ± 3.80

qPCR data are provided as mean ± standard deviation.

* p<0.05; ** p<0.01 versus healthy subjects (Mann-Whitney Test)

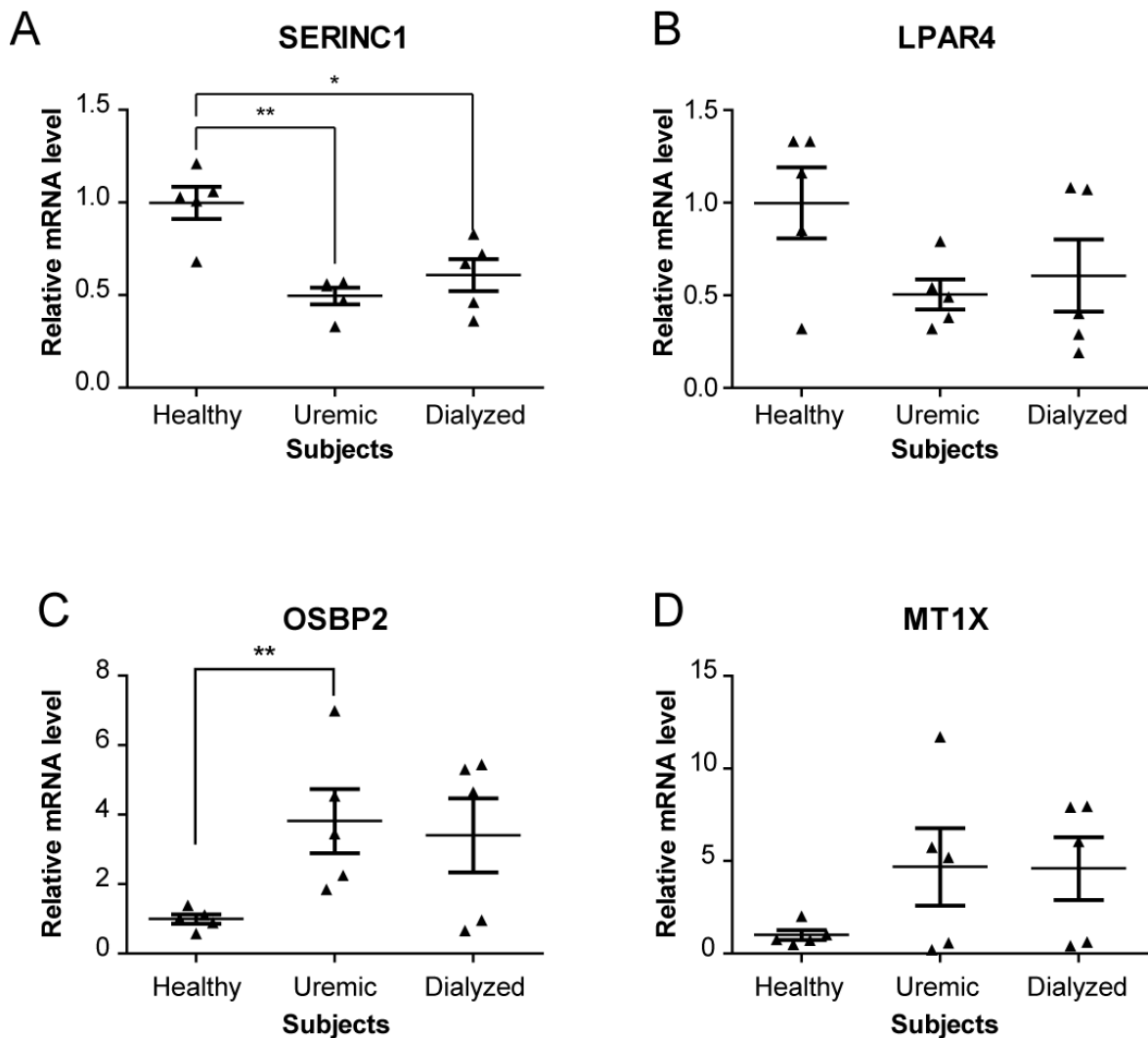


Figure 18. qPCR analyses of selected platelet mRNA expression levels in uremic and dialysis patients.

(A-D) Serine incorporator 1 (SERINC1) (A), lysophosphatidic acid receptor 4 (LPAR4) (B), oxysterol binding protein 2 (OSBP2) (C) and metallothionein 1X (MT1X) (D) mRNAs were quantified by qPCR using the $\Delta\Delta C_t$ method and GAPDH mRNA as a reference. Results were normalized to the average expression level of the healthy subjects and expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney Test.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus the healthy group.

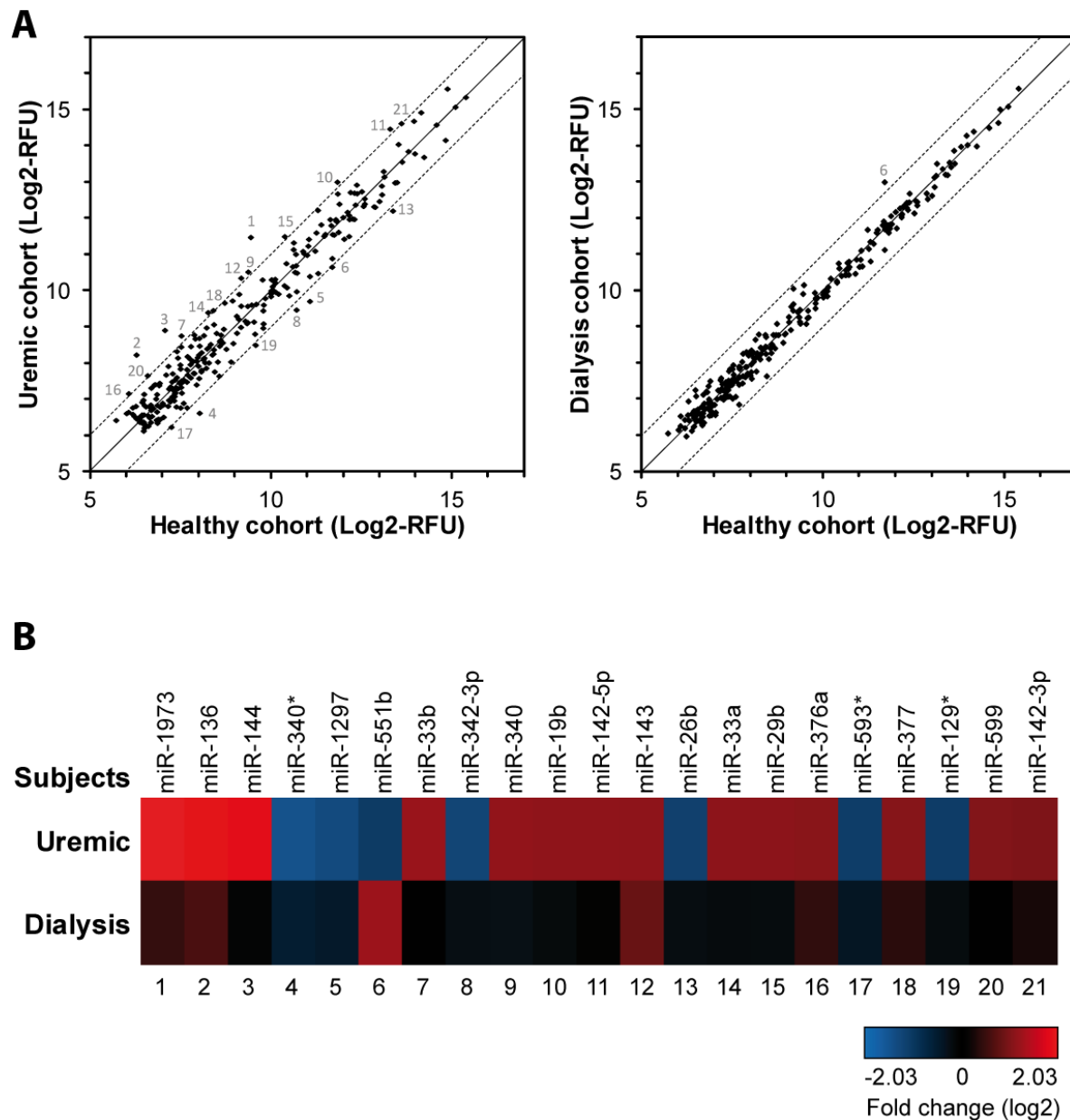


Figure 19. Differential platelet microRNA profile of uremic and dialysis patients. Platelet RNA samples were obtained from each subject, and equivalent amounts were pooled and analyzed by LNA-based microRNA microarray (Exiqon). The platelet microRNA profile of the uremic and dialysis patients were compared to the healthy subjects. (A) Platelet microRNA expression level correlation between healthy and uremic (left panel) or dialysis (right panel) subjects. Data are expressed as log₂-transformed relative fluorescence unit (RFU). The microRNAs that varied by more than 2-fold were numbered, as indicated in B. (B) Platelet microRNAs displaying more than 2-fold changes among the uremic and dialysis patients, as compared to the healthy subjects. Whereas 21 platelet microRNAs are differentially expressed in platelets from uremic patients, as compared to healthy subjects, a single microRNA is altered by more than 2 fold in platelets of dialysis patients, namely miR-551b.

3.2.6.4 Alteration of the platelet microRNA profile in uremic patients

The conditions associated to CKD may affect the ability of platelets to synthesize or mediate the function of microRNAs, a family of small non-coding RNAs known as key regulators of mRNAs. To verify that possibility, we performed Dicer activity assays *in vitro* using protein extracts prepared from purified circulating platelets. We observed no significant changes in the ability of platelet Dicer to produce microRNAs among the uraemic or dialysis patients, as compared to healthy subjects (see Fig. S1A), although we noted a certain degree of inter-individual variations. A similar observation was made when monitoring the expression level of the ribonuclease Dicer and of its cofactor TRBP (see Fig. S1B), which are known to mediate platelet microRNA biogenesis. Using a similar approach, we also assessed the functionality of microRNA effector complexes, composed of the ribonuclease Argonaute 2 (Ago2), by RISC activity assay *in vitro*. Our assays unveiled a platelet Ago2 activity that is relatively similar among all the subjects, which is in accordance with the relatively similar Ago2 expression level among healthy uraemic and dialysis donors (see Fig. S2). Altogether, our results suggest that the ability of platelets to synthesise or mediate the function of microRNAs is not affected by CKD.

Uremic toxins that accumulate in the blood of CKD patients may nevertheless exert systemic effects, including on platelet precursor megakaryocytic cells, and influence the microRNA content of circulating platelets. Examination of the microRNA profile of platelets isolated from CKD patients identified 21 microRNAs that were differentially expressed in uremic platelets, as compared to the healthy cohort (**Figure 19A**, left panel), thereby supporting an important alteration of the platelet microRNA profile in CKD.

When analyzing the differentially expressed platelet microRNAs among our uremic and dialysis patient cohorts (**Figure 19B**), we observed that microRNAs of the same family, as exemplified by hsa-miR-33a and hsa-miR-33b, are regulated similarly. Notably, we noted a similar trend in the level of some microRNAs deriving from both strands of a precursor in uremic platelets. Originating from pre-miR-142, both hsa-miR-142-5p and 3p were upregulated. These tandem variations in mature microRNA expression levels are indicative of a microRNA pathway that is altered upstream of the pre-miRNA processing step in uremic patients. In contrast, hsa-miR-340 and -340* were altered in the opposite way, which is indicative of a differential strand selection process. Together, these

observations suggest that microRNA biogenesis may be altered at multiple levels by uremia.

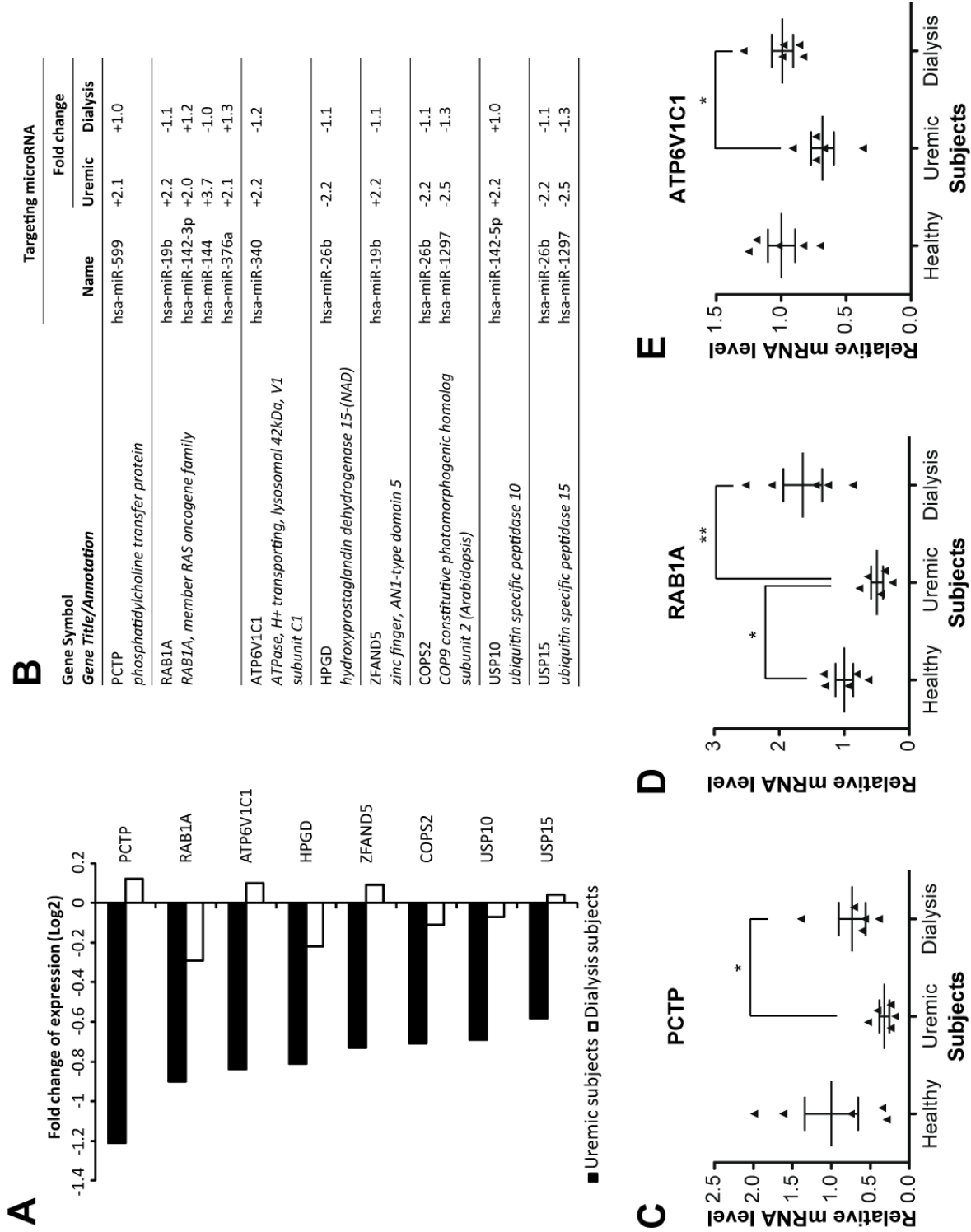


Figure 20. The level of some platelet mRNAs is corrected by dialysis.

(Figure à la page précédente)

(A) Differential expression of mRNAs corrected by dialysis in platelets of CKD patients. Data are expressed as log₂-transformed fold changes compared to the healthy subjects. (B) List of platelet mRNAs corrected by dialysis, together with their corresponding predicted regulatory microRNAs and differential expression in uremic and dialysis patients. Data are expressed as fold changes compared to the healthy subjects. PCTP (C), RAB1A (D) and ATP6V1C1 (E) mRNAs were quantified by qPCR using the $\Delta\Delta C_t$ method and GAPDH mRNA as a reference. Results were normalized to the average expression level of the healthy subjects and expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney Test.

* p<0.05; ** p<0.01 between depicted groups.

3.2.6.5 Restoration of the platelet microRNA profile upon dialysis

Importantly, only 1 microRNA (hsa-miR-551b) was found to be differentially expressed in the dialysis patients cohort, as compared to the healthy cohort (**Figure 19C**). Contrasting with the 21 microRNAs that are differentially expressed in platelets of uremic patients, these results suggest that hemodialysis may restore the microRNA expression profile of platelets in patients suffering from severe CKD.

3.2.6.6 Restoration in the level of some platelet mRNAs upon dialysis

Some of the microRNAs deregulated in platelets of uremic patients belong to the 20 most abundant platelet microRNAs in healthy subjects, such as hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-142-5p and 3p, and may likely influence platelet mRNAs. Incidentally, analyses of differentially expressed platelet microRNAs revealed that microRNAs sharing the same seed region, like hsa-miR-26b and hsa-miR-1297, are regulated similarly in uremic patients. Knowing that the microRNA seed region (i.e. nucleotides 2 to 8 from the 5' end) plays a critical role in mRNA recognition (Bartel, 2009), these observations are consistent with a possible link between microRNAs and mRNAs in platelets.

To verify that possibility, we analyzed our microarray data with bioinformatic microRNA target predictive tools in order to identify such platelet microRNA:mRNA pairs. Among a total of 81 platelet mRNAs, whose levels were corrected by dialysis, 8 mRNAs displayed, in their 3'UTR, binding site(s) for microRNAs that are differentially expressed in uremic patients (**Figure 20A**). The level of all eight mRNAs was decreased in platelets of uraemic patients. Changes in expression of the three mRNAs that were the most affected

in the platelets of uraemic patients, i.e. PCTP, RAB1A and ATP6V1C1 mRNAs, were validated by qPCR (**Figure 20C**). For three of these eight mRNAs, we observed a concomitant decrease in the corresponding regulatory microRNAs, a direct correlation consistent with a mRNA stabilizing role of microRNAs in platelets. This is the case of the following pairs: HPGD mRNA:hsa-miR-26b, COPS2 mRNA:hsa-miR-26b/hsa-miR-1297 and USP15 mRNA:hsa-miR-26b/hsa-miR-1297 (**Figure 20B**).

On the opposite, the remaining 5 mRNAs showed an inverted correlation with the corresponding microRNAs, which is expected for microRNAs that regulate platelet mRNAs through destabilization/degradation, as observed in the case of the PCTP mRNA:hsa-miR-599 pair (**Figure 20B**). The level of PCTP mRNA was decreased in platelets of uremic patients, whereas that of hsa-miR-599 was increased, which is consistent with a role for hsa-miR-599 in destabilizing PCTP mRNA. These changes in PCTP mRNA and hsa-miR-599 levels were corrected upon dialysis. Suggesting that the procedure helped restore their expression levels closer to those observed in healthy subjects, these data support a functional link between PCTP mRNA and hsa-miR-599.

3.2.6.7 MicroRNA regulation of platelet mRNAs in CKD

Computational analyses predicted the presence of several binding sites for microRNAs, including hsa-miR-599, in the 3'UTR of PCTP mRNA (**Figure 21A**). As shown in **Figure 21B**, we were able to document the regulatory control of hsa-miR-599 on the PCTP 3'UTR element in cultured HEK293 cells. These results support a role for hsa-miR-599 in regulating PCTP gene expression, which may explain, at least in part, their opposite variations in expression levels in platelets of uremic and dialysis patients.

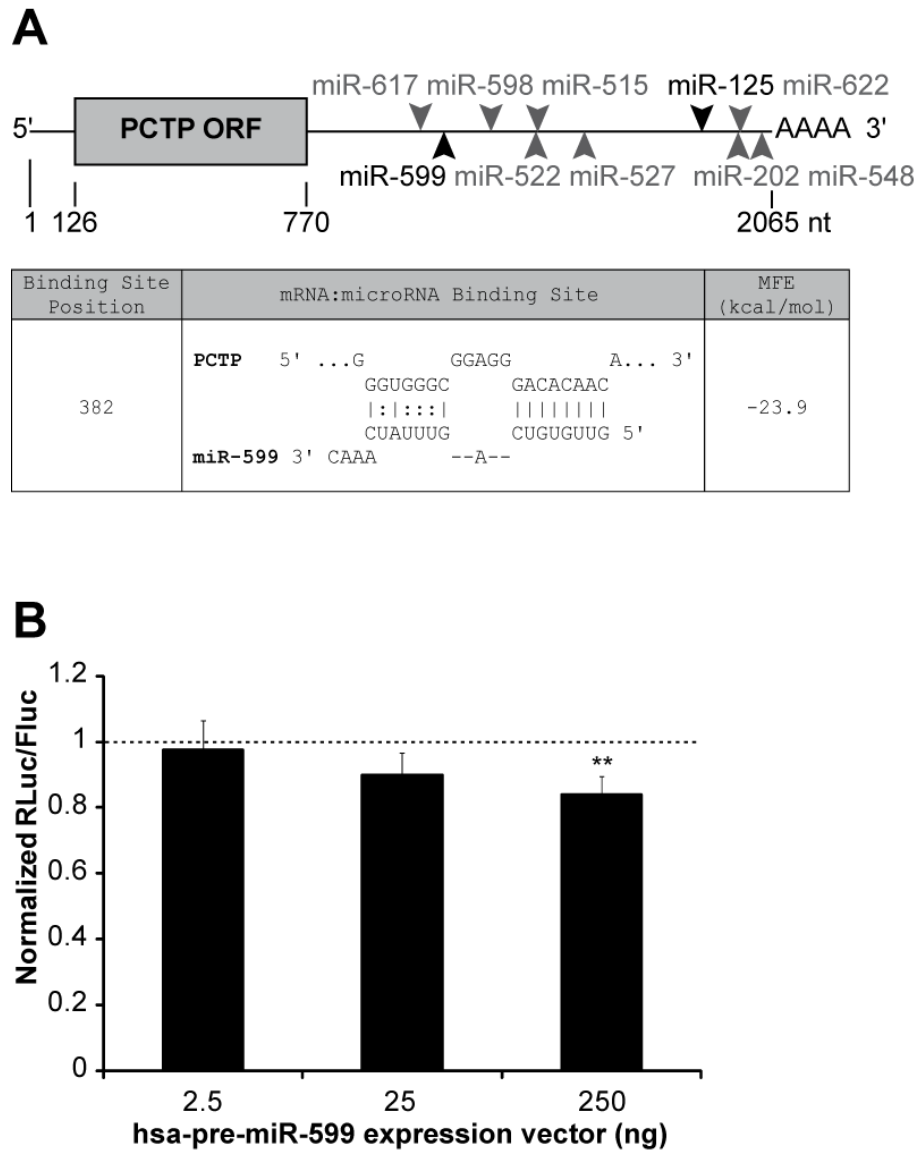
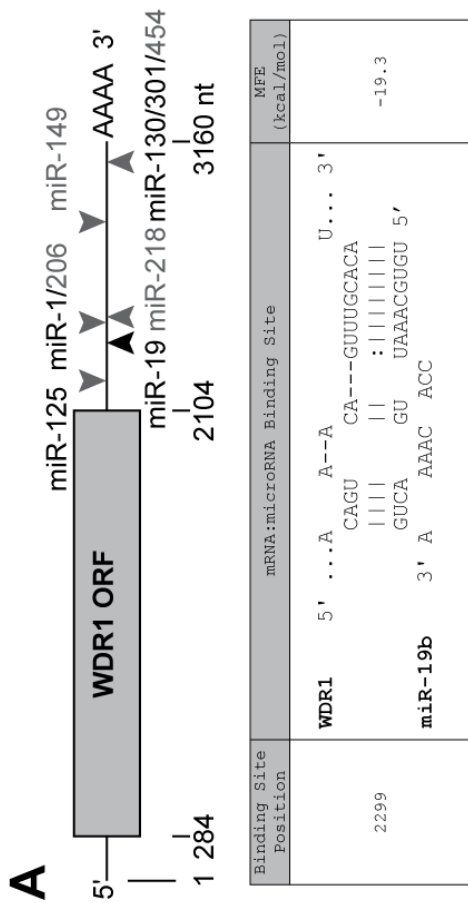
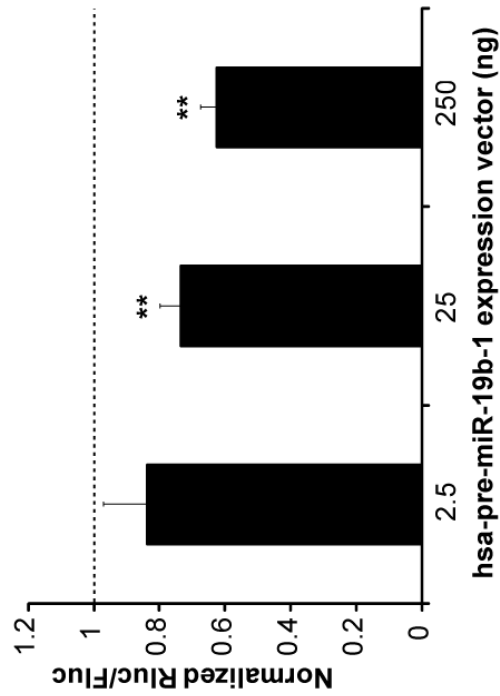


Figure 21. Platelet PCTP mRNA, whose levels are corrected by dialysis, is regulated by hsa-miR-599.

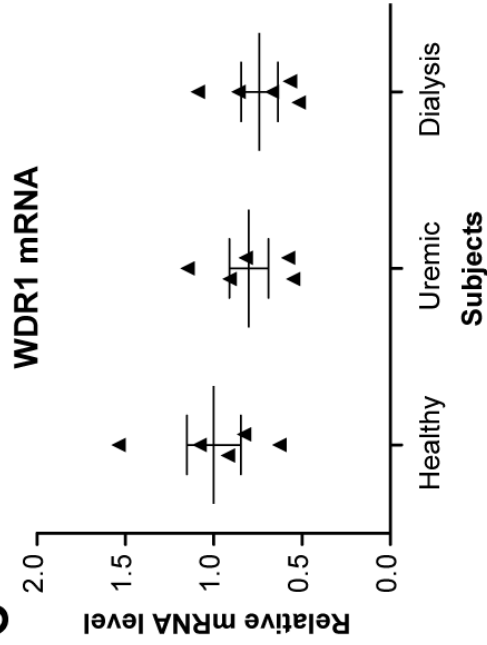
(A) Upper panel, Schematic representation of human PCTP mRNA with putative microRNA binding sites predicted by at least 2 bioinformatic programs among miRanda, TargetScan and PicTar. MicroRNAs highlighted in black are expressed in platelets. Lower panel, Topology of the interaction between hsa-miR-599 and its putative binding site, as predicted using RNA hybrid, with its calculated minimum free energy (MFE) value. (B) Reporter gene activity assay. HEK293 cells were co-transfected with a pre-miR-599 expression vector and a reporter gene construct in which the sequence of PCTP 3'UTR was inserted downstream of the RLuc coding sequence. RLuc and Fluc activities were measured, and the values were normalized to those obtained with a non-relevant short hairpin expression vector (n = 4 experiments, in duplicate). ** p<0.01 (Student's paired T test).



B



C



D

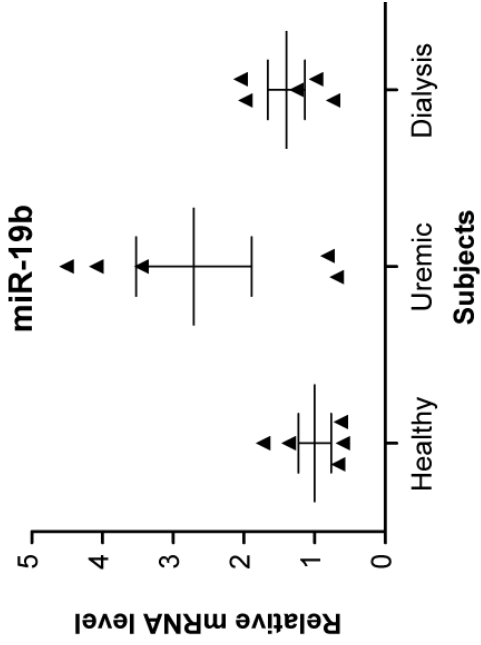


Figure 22. WDR1 protein expression, which is involved in uremic platelet defects, is subjected to microRNA regulation.

(Figure à la page précédente)

(A) Upper panel, schematic representation of human WDR1 mRNA with putative microRNA binding sites predicted by at least 2 bioinformatic programs among miRanda, TargetScan and PicTar. MicroRNAs highlighted in black are expressed in platelets. Lower panel, topology of the interaction between hsa-miR-19b and its putative binding site, as predicted using RNA hybrid, with its calculated minimum free energy (MFE) value. (B) Reporter gene activity assay. HEK293 cells were co-transfected with a pre-miR-19b expression vector and a reporter gene construct in which the sequence of WDR1 3'UTR was inserted downstream of the Rluc coding sequence. Rluc and Fluc activities were measured, and the values were normalized to those obtained with a non-relevant short hairpin expression vector (n = 4 experiments, in duplicate). ** p<0.01 (Student's paired T test). WDR1 mRNA (C) and miR-19b (D) were quantitated by qPCR using GAPDH mRNA or miR-191 as a reference, respectively. Results were normalized to the average expression level of the healthy subjects and expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Since microRNAs may also mediate their function by interfering with mRNA translation without altering mRNA levels, and may have escaped our correlative analyses, we examined proteins whose expression was reported to be altered either in uremic or dialysis patients. Among these proteins, WD repeat domain 1 (WDR1 or AIP1) is reduced in uremic patients that display platelets defects (Marques et al., 2010). We observed no significant changes in WDR1 mRNA levels, either upon micro-array or qPCR analysis, in platelets (**Figure 22C**). Bioinformatic analyses revealed that WDR1 mRNA 3'UTR harbors several putative binding sites for microRNAs, including hsa-miR-19b (**Figure 22A**), whose levels are increased in platelets of uremic patients. MiR-19b expression, assessed qPCR, confirmed that the expression of this microRNA is markedly increased in the platelets of some uremic subjects (**Figure 22D**). Using a Rluc reporter gene system in cultured HEK293 cells, we confirmed the ability of hsa-miR-19b to regulate WDR1 mRNA through its 3'UTR element (**Figure 22B**). Together, these findings suggest that (i) both PCTP and WDR1 mRNAs may be under microRNA control in human platelets, (ii) the deregulation of the platelet mRNA transcriptome may be linked to that of microRNAs, and (iii) alteration of this microRNA-based mRNA regulatory mechanism may underlie the platelet response to uremia.

3.2.7 Discussion

Uremic toxins that accumulate in the blood of patients suffering from CKD may affect platelet function, induce hemostatic imbalances and mediate thrombotic disorders (Boccardo et al., 2004; Cheung et al., 2000; Collins et al., 2001; Foley et al., 2005; Kaw and Malhotra, 2006; Rios et al., 2010). These effects have been related to an alteration of the platelet proteome that is observed in these patients (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007). In the present study, we observed that the platelet mRNA and microRNA transcriptome was altered in CKD patients and could be restored partially upon dialysis. Known to contribute to the platelet proteome, it may be the deregulation of the platelet transcriptome that underlies, and forms the molecular basis of, platelet-related disorders in CKD patients.

The level of metallothionein-encoding genes, such as MT1X, was increased in platelets of both uremic and dialysis patients, in which plasma zinc deficiency is common (Vanholder et al., 2002). Particularly abundant in platelets and involved in platelet reactivity and hemostasis (Tubek et al., 2008), zinc imbalances are involved in oxidative stress (Foster and Samman, 2010), a state that induces expression of metallothionein genes (Kadota et al., 2010). Elevated levels of platelet metallothionein genes may thus result from the altered zinc homeostasis and oxidative stress conditions that prevail in uremic and dialysis patients, and that may contribute to the relatively high prevalence of CVD in these patients (Fujii et al., 2011; Libetta et al., 2011).

Additional genes deregulated in platelets of CKD patients could be linked to platelet-related disorders observed in uremia. For instance, the mRNA encoding for LPAR4, which is suspected to inhibit platelet reactivity to lysophosphatidic acid (Pamuklar et al., 2008), is reduced by ~50% in CKD patients. Lysophosphatidic acid accumulation in atherosclerotic lesions represents an important risk factor for the development of atherosclerosis and thrombosis (Cui, 2011), and the observed decrease in LPAR4 expression in CKD patients may explain the increased risk of cardiovascular events observed in these clinical cases.

We also identified genes involved in lipid metabolism, such as glycine N-acyltransferase-like 2 (GLYATL2), phospholipase C eta 1 (PLCH1), phosphatidylcholine transfer protein (PCTP), OSBP2 and SERINC1, whose levels are deregulated in uremic

conditions. This may partially explain the altered synthesis of bioactive lipids (Di Minno et al., 1985; Vecino et al., 2002) and membrane lipid composition (Bonomini et al., 2004; Vecino et al., 1998) observed in platelets of uremic patients.

The conditions associated with CKD did not affect the ability of platelets to synthesize or mediate the function of microRNAs. However we observed an important alteration of the platelet microRNA profile in uremic patients, as a total of twenty-one (21), out of 247 microRNAs expressed in platelets, displayed more than 2-fold changes, as compared to healthy subjects. Considering that microRNA expression in mammalian cells can be regulated at multiple steps (gene transcription, processing, transport, strand selection/separation, microRNP assembly, stability) (Saj and Lai, 2011) and that uremia is usually part of a complex clinical portrait, the aim of identifying which the component(s) and/or step(s) of the platelet microRNA pathway is(are) altered in CKD patients, and how, appears to be challenging.

Correction of the level of most microRNAs and of some mRNAs, impaired in uremic platelets, upon dialysis is consistent with a mRNA regulatory role of platelet microRNAs. We were able to confirm the microRNA regulation of two mRNAs (PCTP and WDR1) that are reduced in platelets of uremic patients, the latter of which involving hsa-miR-19b. Using a proteomic approach, Marques and colleagues (Marques et al., 2010) demonstrated that WDR1 protein expression was reduced in platelets of uremic patients with low platelet reactivity and bleeding tendency. The fact that WDR1 mRNA levels were not altered in platelets of uremic or dialysis patients supports a role for hsa-miR-19b in repressing WDR1 mRNA translation, along a process independent of WDR1 mRNA levels (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Interestingly, hsa-miR-19b is among a list of 7 microRNAs that were identified as good predictors of platelet hyperreactivity to epinephrine (Nagalla et al., 2011). Upregulated by >2 fold in platelets of uremic patients, hsa-miR-19b may thus be involved in the altered reactivity of uremic platelets and the bleeding disorders observed in these patients.

When attempting to correlate platelet microRNA and mRNA levels, the caveat has to be taken into account that microRNAs may silence platelet mRNAs through translational repression (Guo et al., 2010), without inducing their cleavage and degradation. Another major limitation is the plurality of microRNA targets which, together with the functional

interplay of a myriad of microRNAs that may act in concert to regulate specific platelet mRNAs, makes reliable genome-wide assessment of functionally relevant platelet microRNA:mRNA pairs almost unattainable.

Our results suggest that the biochemical conditions prevailing in patients with CKD, leading or not to end-stage kidney failure and dialysis, may alter the mRNA and microRNA transcriptome of circulating platelets which, in turn, may affect platelet function and entail the development of platelet-related clinical complications, such as atherosclerosis and thrombosis. This study complements previous studies describing the relationship between platelet microRNAs and platelet reactivity (Kondkar et al., 2010; Nagalla et al., 2011) or human diseases, including premature coronary artery disease (Sondermeijer et al., 2011). The molecular mechanisms underlying the deregulation of platelet mRNA and microRNA transcriptome in CKD patients, which may be multifaceted considering the complexity of the medical condition of these patients, warrants further investigations.

3.2.8 Supplementary information

3.2.8.1 Complete Method

3.2.8.1.1 Recruitment of the subjects

After obtaining informed consent, 10 CKD patients (n=5 chronic hemodialysis patients and n=5 stage 4 CKD patients, later referred as dialysis and uremic patients, respectively) were recruited to participate in this study. Five age- and sex-matched healthy subjects with normal renal function were recruited as control group. For all participants, data on demographics, medical history and current pharmacological treatment regimen were collected, as detailed in **Table 4**. Approximately 400 ml of venous blood was collected from each subject using collection bag containing sodium citrate as anticoagulant. For dialysis patients, blood collection was performed immediately prior to dialysis treatment. Hematological and biochemical data were recorded for each subject and are summarized in **Table 5**.

3.2.8.1.2 Purification of blood platelets

Venous blood was centrifugated at 170 g for 15 min to obtain the platelet-rich plasma (PRP), which was cleared by another centrifugation at 600 g for 10 min and filtered

through leukocyte depletion filters (Pall corporation). Platelets were collected by centrifugation at 1,500 g for 15 min and subjected to negative selection based on magnetic cell sorting using human CD45+ depletion kit (EasySep, Stemcell technologies). Approximately two thirds of purified platelets were lysed in TRIzol solution (Invitrogen) for RNA extraction, whereas the remaining platelets were flash-frozen in a dry-iced ethanol bath and stored at -80°C for subsequent enzymatic and Western blot experiments, as described previously (Landry et al., 2009).

3.2.8.1.3 RNA extraction and analysis

Platelet total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity was determined by 260 nm and 280 nm absorbance using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). cDNA was synthesized from 0.5 µg total RNA with random hexameric primers using SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Purity of the platelet preparations was assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the leukocyte marker CD45 and platelet marker GPIIIa, as previously described (Landry et al., 2009). For microarray analysis, 1.5 µg of total RNA from each subject were pooled together for each cohort. Pooled total RNA was purified further using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The integrity of the total RNA samples was assessed by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology) prior to mRNA and microRNA profiling.

3.2.8.1.4 Microarray profiling and analysis of platelet mRNAs

mRNA profiling was performed through the CRCHUQ Genomics platform (CHUL research center/CHUQ). Labeled DNA probes were synthesized from total RNA samples and hybridized on Human Gene 1.0 ST DNA BioChip (Affymetrix) according to the manufacturer's protocol. Robust multi-Array data (RMA) method (Irizarry et al., 2003) was applied for the normalization of GeneChips array data obtained for the 3 samples.

Analysis of mRNA profiles from Human Gene 1.0 ST microarray data was performed on protein-coding genes. The mRNA for which relative fluorescence intensity values were lower than the detection threshold (arbitrarily set at 7 in log₂ values) in all three samples were excluded and assumed not to be expressed in platelets. Among the remaining 2568 mRNAs, differentially expressed mRNAs were defined as mRNAs 2 fold

more (or less) expressed among the uremic or dialysis patients as compared to healthy subjects. Platelet genes restored upon dialysis were defined as genes whose expression level in platelets of uremic patients displayed at least 1.5 fold change as compared to the healthy cohort, and whose expression in dialysis patients was closer to the healthy control than to the uremic, corresponding to at least a 1.5 fold correction of expression in platelets of the dialysis patients cohort.

3.2.8.1.5 Quantitative real-time PCR (qPCR) experiments

Expression of selected genes of interest was assessed by qPCR using QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen). For each subject, the PCR reaction was performed in triplicate using 0.25 to 0.5 μ l of cDNA reaction and 0.5 μ M of each of the oligonucleotide primers per reaction. The primer sequences and annealing temperatures are provided in **Supplementary Table S3**. The PCR reactions were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystem) with the recommended cycling temperatures provided in the QuantiTect PCR kit guide. The $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to perform the relative quantification of the target genes using StepOnePlus software, using GAPDH mRNA as the reference gene. The results were normalized to the average expression level obtained for the healthy subjects group, and arbitrarily set at 1.

Expression of miR-19b was assessed by qPCR using miScript PCR system (Qiagen). For each subject, the PCR reaction was performed in triplicate using 2 μ l of cDNA reaction (miScript II RT kit, Qiagen), diluted 1:20 as recommended by the manufacturer. The PCR reactions were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystem) with the recommended cycling temperatures provided in miScript PCR system guide. The $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to perform the relative quantification of the target genes using StepOnePlus software, using miR-191 as the reference gene. The results were normalized to the average expression level obtained for the healthy subjects group, and arbitrarily set at 1.

3.2.8.1.6 Microarray profiling and analysis of platelet microRNAs

MicroRNA profiling was performed by Exiqon microRNA profiling service (Vedbaek, Denmark). Samples were labeled using the miRCURY™ Hy3/Hy5 Power labeling kit and hybridized on the miRCURY™ Locked Nucleic Acid (LNA) Array (5th

generation arrays covering microRNA registered in miRBase 15.0 - Sanger Institute (Griffiths-Jones, 2004)). The 3 samples (healthy, uremic and dialysis platelets total RNA pool) were labeled with Hy3 dye, whereas a pool of the 3 RNA samples was labeled with Hy5 as normalization control. The quantified signals were normalized using the global Lowess (LOcally WEighted Scatterplot Smoothing) regression algorithm (Cleveland, 1979), to minimize the intensity-dependent differences between the dyes.

MicroRNA detection was considered as positive when the calculated relative fluorescence intensity (RFI) for a given microRNA capture probe was above the detection threshold, which was conservatively set at 2 times the highest mean background signal observed for negative controls in the array experiments. Differentially expressed microRNAs were defined as microRNA whose expression level was 2 fold higher or lower than that observed in healthy subject group. Predicted mRNA targets of differentially expressed microRNAs were determined using miRecords (<http://mirecords.biolead.org>), which allows the integration of predicted microRNA targets produced by multiple microRNA target prediction programs (Xiao et al., 2009). For each differentially expressed microRNA, predicted targets had to be identified by at least 2 prediction programs among miRanda (Betel et al., 2008), TargetScan (Lewis et al., 2003) and PicTar (Krek et al., 2005). For some microRNAs (e.g. hsa-miR-376a, 551b, 599), no predictions are available in PicTar. As a result, mRNA targets of these microRNAs were defined as mRNAs predicted by both TargetScan and Miranda. Hsa-miR-129*, miR-340*, miR-593* and miR-1973 were excluded from this study as neither PicTar nor miRanda could provide predictions.

3.2.8.1.7 Reporter gene activity assays

HEK293 cells (2×10^5) were plated in 24-well plates 24 hours before cotransfection with a pGeneClip (Promega) construct expressing pre-miR-599 or pre-miR-19b-1 (2.5 to 250 ng DNA) and a psiCHECK (Promega) reporter construct, in which the 3'UTR of phosphatidylcholine transfer protein (PCTP) or WDR1 (100 ng DNA) was inserted downstream of the Rluc reporter gene, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The vector encoding pre-miR-599 generated functional hsa-miR-599 species, as attested by its ability to induce a decrease in the activity of a Rluc reporter gene harboring a perfectly complementary binding site (H.P. and P.P., data not shown). A pGeneClip-Neg vector

(Plante et al., 2006), encoding a short hairpin RNA (shRNA) directed against a deleted region in Rluc mRNA, was used as a negative control. Forty-eight hours later, cells were harvested and protein extracts were prepared for measurement of Renilla luciferase (Rluc) and Firefly luciferase (Fluc) activities, essentially as described previously (Plante et al., 2006).

3.2.8.1.8 Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using InStat 3 software (GraphPad). A non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA followed, when significant, by the non-parametric Mann-Whitney test with a Bonferonni correction, was used to compare qRT-PCR mRNA expression data as well as the hematological and biochemical data between the healthy subject group and each patient cohort. The reporter gene activity data were analyzed using paired Student's T-tests. For all analyses, a $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3.2.8.2 Supplementary Methods

3.2.8.2.1 Protein extracts and analysis

Platelet protein extracts were prepared in lysis buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 3% v/v 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM tris, (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1x Roche Complete antiprotease cocktail ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) free) and cleared by centrifugation at 10,000 g for 10 min. Platelet protein extracts (20 and 50 μ g) were analyzed by 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting, followed by enhanced chemiluminescence detection (ECL plus; Amersham) using anti-Dicer (Provost et al., 2002), anti-transactivating response RNA-binding protein 2 (TRBP2) (Landry et al., 2009), anti-Ago2 (1C9 ; Abnova) and anti- β -actin (AC-40 ; Sigma) antibodies.

3.2.8.2.2 Dicer activity assay

Platelets were lysed in 2x Dicer lysis buffer (100 mM KOAc, 40 mM Hepes pH 7.6, 4 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1x Roche Complete Ethylenediaminetetraacetic

acid (EDTA) free antiprotease cocktail), and lysates were cleared by centrifugation at 10,000 g for 10 min. Dicer processing activity was assessed using platelet protein extracts (50 µg) incubated with randomly ³²P-labeled human let-7a-3 pre-microRNA in the presence of 1 mM adenosine 5'-triphosphate (ATP). Following proteinase K digestion and RNA extraction, pre-microRNA processing was analyzed by denaturing PAGE (15%) and autoradiography, as described previously (Landry et al., 2009; Perron et al., 2011). For each subject, Dicer activity was determined by densitometric quantitation of the substrate and product bands. Dicer activity was expressed as mature microRNA/pre-microRNA ratio, and normalized to the average activity determined for the healthy subject group.

3.2.8.2.3 RNA-induced silencing complex (RISC) activity assay

Platelets were lysed in 2x RISC lysis buffer (100 mM KOAc, 40 mM Hepes pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.35% v/v Triton, 1 mM PMSF, 1x Roche Complete EDTA free antiprotease cocktail) and lysate was cleared by centrifugation at 100,000 g for 1 h. Ago2-mediated cleavage activity was assessed using platelet protein extracts (30 µg) incubated with a hsa-miR-223 sensor RNA 5' end-labeled with ³²P-[ATP] (Perkin Elmer) in the presence of 1 mM ATP and 0.2 mM guanosine 5'-triphosphate (GTP). Following proteinase K digestion and RNA extraction, sensor cleavage by Ago2-miR-223 complexes were analyzed by denaturing PAGE (8%) and autoradiography, as described previously (Landry et al., 2009; Perron et al., 2011). Quantification of RISC activity was determined essentially as described for Dicer activity assays.

3.2.8.3 Supplementary results

3.2.8.3.1 Platelet microRNA biogenesis remains functional in uremic and dialysis patients

The differential expression of platelet mRNAs observed in CKD patients led us to examine a major class of mRNA regulatory RNAs, i.e. microRNAs. Representing an important component of the platelet transcriptome and generated from pre-microRNAs, microRNAs are short 21- to 24-nucleotide (nt) RNA species that act as key regulators of mRNAs in the vast majority of eukaryotes, including humans. We have previously reported that human platelets contain a functional microRNA pathway capable of mediating the biogenesis and regulatory action of microRNAs on mRNAs (Landry et al., 2009). The abundance and diversity of platelet microRNAs has been corroborated by independent

groups, and their relationship with platelet reactivity and protein expression was further demonstrated (Kondkar et al., 2010; Nagalla et al., 2011). Therefore, we examined if the ability of platelets to produce microRNAs was altered in uremic or dialysis patients, as compared to the healthy subjects. For that purpose, we purified circulating platelets and prepared protein extracts in order to perform *in vitro* Dicer activity assays. As shown in **Supplementary Figure S6A** (upper panel), addition of platelet protein extracts to a pre-microRNA species (pre-let-7a-3) led to the formation of 21-nt RNA species, which corresponds to the size expected for a mature microRNA produced by Dicer. The production of mature microRNAs in this assay indicated that the platelet microRNA biogenesis pathway remains functional in CKD patients. Although we observed a certain degree of interindividual variations in Dicer activity, no significant changes in the ability of platelet Dicer to produce microRNAs could be detected among the uremic or dialysis patients (see **Supplementary Figure S6A**, lower panel). We noticed an enhanced platelet Dicer activity in one uremic (Subject 6) and one dialysis (Subject 13) patient, and a reduced Dicer activity in a dialysis patient (Subject 12), as compared to the healthy subjects group, which might be explained by their individual conditions independent from CKD.

The differences observed in platelet Dicer activity prompted us to ask whether this was related to a differential expression of the protein components of the platelet Dicer complex, i.e. Dicer and its cofactor TRBP (Landry et al., 2009). Analysis of platelet Dicer and TRBP expression level by immunoblotting (see **Supplementary Figure S6B**) showed that the proteins are expressed at different levels among the subjects, with no relationship with the uremic or dialysis condition. No correlation between Dicer or TRBP expression level and the enzymatic activity of Dicer could be established, suggesting that the activity of the pre-microRNA processing complex may be affected by one or more factors or prevailing conditions.

3.2.8.3.2 Platelet Ago2•microRNA complexes remain functional in uremic and dialysis patients

Our data indicate that the microRNA processing machinery remains functional in platelets of uremic and dialysis patients, and allow the production of mature microRNAs. Next, we tested whether these platelet microRNAs remained functional in platelets of uremic and dialysis patients, as any alteration of the microRNA effector complex might

impair platelet protein expression control and explain the platelet proteome changes observed in patients suffering from CKD (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007). For that purpose, we measured the microRNA-guided silencing activity of Ago2, which is the main component of microRNA effector complexes. Platelet protein extracts were prepared from purified platelets and incubated with an RNA sensor bearing a sequence perfectly complementary to hsa-miR-223, which is a myeloid cell-specific microRNA particularly abundant in human blood platelets (Landry et al., 2009). As shown in **Supplementary Figure S7A** (upper panel), addition of platelet protein extracts to the hsa-miR-223 RNA sensor led to the formation of a 39-nt RNA fragment of the size expected from cleavage by the Ago2• hsa-miR-223 complex. Our data indicate that, despite a certain degree of interindividual variations, platelet Ago2 activity is very similar among all the subjects (see **Supplementary Figure S7A**, lower panel), suggesting that microRNA function is not altered in platelets of uremic and dialysis patients.

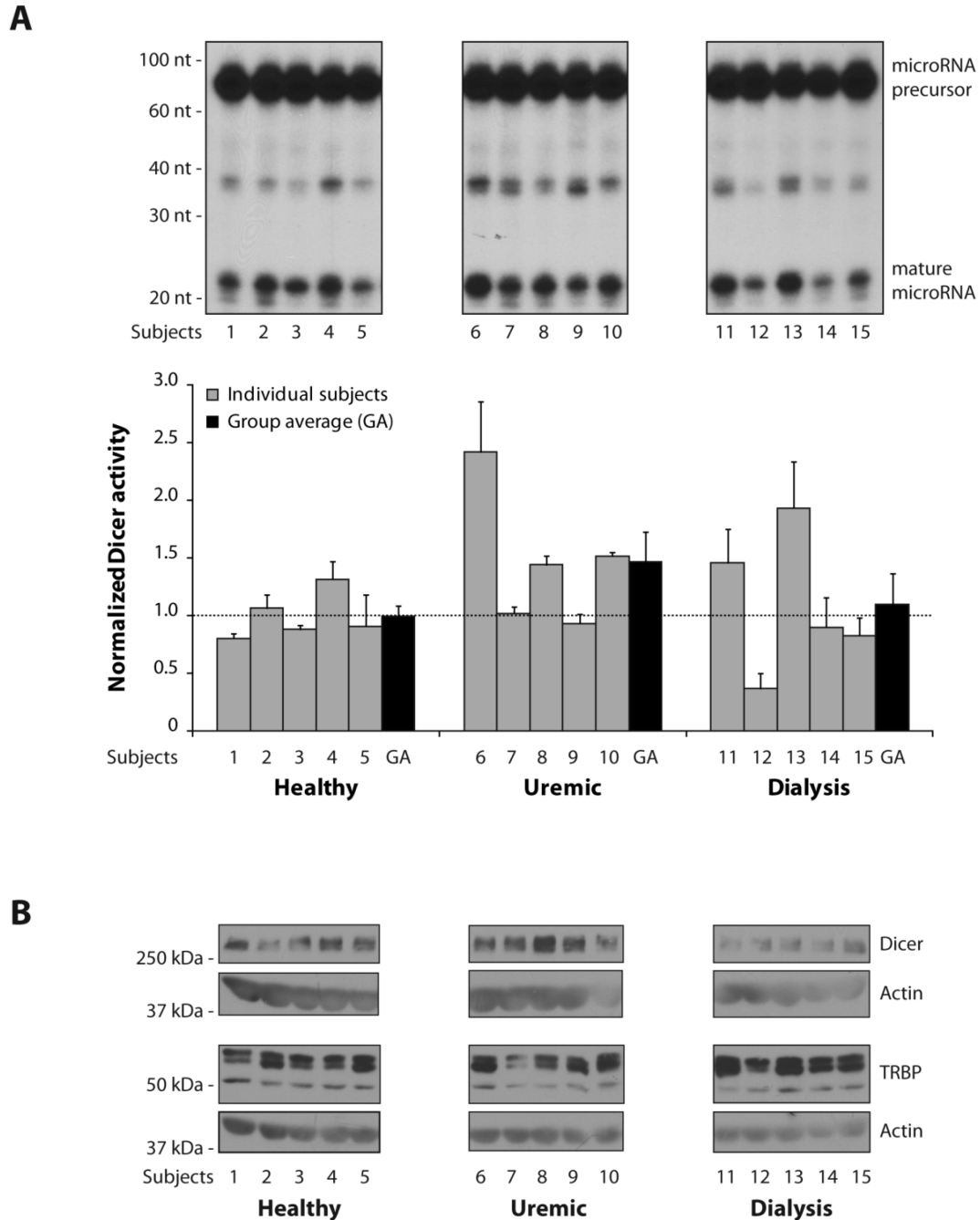
These findings were corroborated by the similar platelet Ago2 protein expression level among our subjects (see **Supplementary Figure S7B**), suggesting that platelet Ago2 function is not altered in CKD patients. We noticed a reduced Ago2• hsa-miR-223 activity in one healthy (Subject 3) and one dialysis patient (Subject 11), as compared to the healthy subjects, which might be explained by undetermined factors and/or conditions specific to these individuals.

3.2.8.4 Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table S3. PCR primer sequences and annealing temperatures

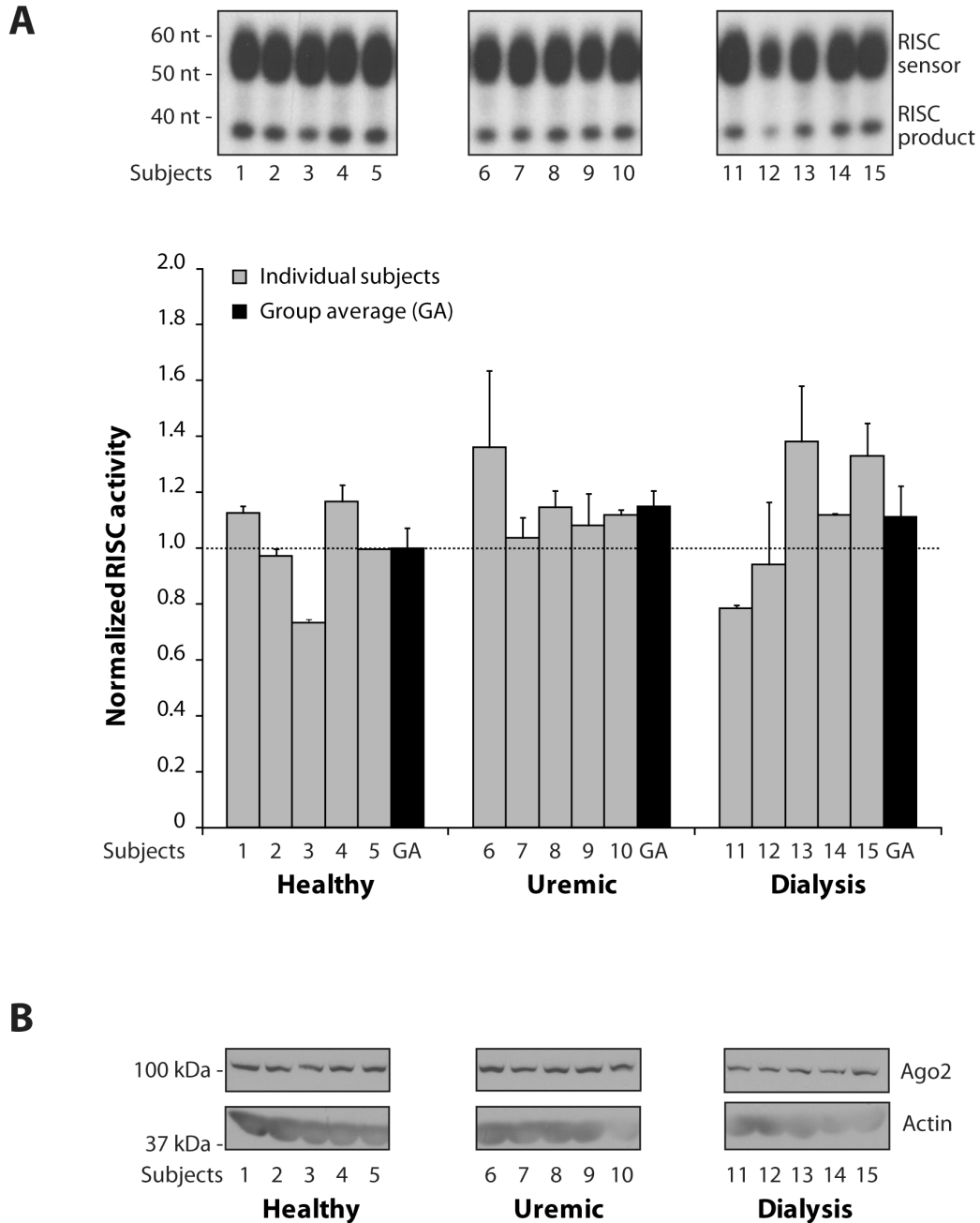
Gene Name	ID	Primer Sequence (5' → 3')	Amplicon	Annealing Temp.
GAPDH	2597	F-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R-GAAGATGGTGATGGGATTTTC	108-333 (225 bp)	57°C
LPAR4	2846	F-CCTGGCCATTGTCTATCCTT R-TCCAGACACGTTTGGAGAAG	816-997 (181 bp)	57°C
MT1X	4501	F-TCTCCTTGCCTCGAAATGGAC R-AGCTGCACTTGTCTGACGTCC	57-246 (189 bp)	57°C
OSBP2	23762	F-TCCAAAGTCAAGAGGCGAGT R-GTCCAGCAGGTGGTGGTACT	1617-1799 (182 bp)	57°C
SERINC1	57515	F-ATTGGCATCGTGCTGTATGT R-ATTCATGCCAGAACACTGGA	1364-1556 (192 bp)	57°C
PCTP	58488	F-TTCCCATGTCCAACAGAGACTA R-ATGAAAACCTTGCTCCCCTTCT	445-643 (199 bp)	61°C
RAB1A	5861	F-GGTGCTGAGAAGTCCAATGTTA R-ACCTTTGTGGAGACGGTAAGAA	936-1130 (195 bp)	52°C
ATP6V1C 1	528	F-GGCAGTTGATGACTTCAGACAC R-ACGTGAATCCATGCAATAAATG	941-1135 (195 bp)	52°C
WDR1	9948	F-GGGATTTACGCAATTAGTTGGA R-ATAGTTGATGTACCCGGACAGG	989-1192 (204 bp)	58°C

F, forward; R, reverse



Supplementary Figure S6. Analysis of platelet microRNA biosynthesis in uremic and dialysis patients.

(A) The microRNA biosynthetic capacity of platelets from each subject was assessed in *in vitro* Dicer activity assays using platelet protein extracts and a synthetic ³²P-labeled pre-microRNA substrate. The reactions were analyzed by PAGE and autoradiography (upper panel). The data are representative of two technical replicates. Dicer activity was normalized to the average activity obtained for the healthy subjects (lower panel). (B) Expression of platelet Dicer and TRBP proteins, which are known to mediate microRNA biogenesis in platelets (Landry et al., 2009), was assessed in each subject by Western blot using anti-Dicer and anti-TRBP antibodies, and anti- β -actin as a loading control.



Supplementary Figure S7. Analysis of platelet microRNA function in uremic and dialysis patients.

(A) The ability of platelet microRNAs to target and regulate mRNA was assessed in each subject in *in vitro* RISC activity assays using platelet protein extracts and a synthetic 5' end, 32 P-labeled RNA sensor bearing a sequence complementary to hsa-miR-223. The reactions were analyzed by PAGE and autoradiography (upper panel). The data are representative of two technical replicates. RISC activity was normalized to the average activity obtained for the healthy subjects (lower panel). (B) Expression of platelet Argonaute 2 (Ago2), which is the core component of the microRNA effector complex in platelets (Landry et al., 2009), was assessed in each subject by Western blot using anti-Ago2 antibody, and anti- β -actin as a loading control.

3.3. Analyse des microARN et des complexes associés dans les plaquettes au repos et activées

Dans cette troisième section est présentée l'étude des complexes miRNP au sein des plaquettes, ainsi que leur devenir au cours de l'activation plaquettaire.

3.3.1 Auteurs

Hélène Plé, Benoit Laffont, Patricia Landry, Nathalie Cloutier, Patrick Provost.

3.3.2 Matériel et méthodes

3.3.2.1 Immunoprécipitation de la protéine Ago2

Les immunoprécipitations (IP) ont été réalisées à partir d'extraits protéiques de plaquettes lysées pendant 15 min sur glace, puis centrifugées pendant 15 min à 10 000 g à 4 °C (Tampon de lyse : 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,25 % Nonidet P-40, 1,5 mM MgCl₂, 1x *EDTA-free antiprotease cocktail*, Roche, 1 mM PMSF). Les extraits protéiques, dosés par la méthode de Bradford (1976) (*Bio-Rad protein assay*), sont dilués à 5 µg/µl dans du tampon de lyse en présence d'un inhibiteur d'ARNase (SUPERase-In, 0,1 U/µl, Invitrogen). L'extrait protéique (1,5 mg) est, dans un premier temps, incubé pendant 45 min à 4 °C avec 10 µl de billes d'agarose couplées à la protéine G (Roche). Cette étape vise à éliminer les protéines et ARN interagissant de manière non-spécifique avec les billes utilisées. Ensuite, 500 µg de lysat sont transférés dans un tube contenant 20 µl de billes et 2 µl d'anticorps anti-Ago2 (clone 1C9, Abnova) ou une quantité équivalente d'immunoglobuline G (IgG) murine utilisée comme contrôle isotypique. Après 3 h d'incubation sous rotation, les billes sont lavées 6 fois avec 1 ml de tampon de lavage (50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,1 % Nonidet P-40, 5 mM MgCl₂). Puis, après digestion à la protéinase K, les ARN sont extraits des immunoprécipitats au phénol-chloroforme acide, et précipités à l'éthanol. L'ensemble des petits ARN a été analysé par marquage par phosphorylation au ³²P, alors que les microARN ont été détectés par *Northern Blot* (NB) et les ARNm par transcription inverse et PCR classique.

3.3.2.2 Extractions d'ARN

L'extraction d'ARN à partir de lysats a été réalisée par digestion à la protéinase K, suivie d'une extraction au phénol-chloroforme acide. La digestion est réalisée à 50 °C pendant 20 min en présence de 20 µg de protéinase K (Ambion), après l'ajout d'un volume équivalent de tampon 2x (20 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % dodécylsulfate de sodium, SDS). Les ARN sont extraits par l'ajout d'un volume équivalent de phénol-chloroforme acide (Ambion). La solution est mixée 20 s au vortex, et les deux phases sont séparées par 5 min de centrifugation à 16 000 g. Après le transfert de la phase aqueuse supérieure, les ARN sont précipités en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2), de 2,5 volumes d'éthanol et de 20 µg de glycogène, suivit d'incubation d'au moins 1 h à -80 °C. L'ARN est ensuite sédimenté par centrifugation à 16 000 g pendant 30 min à 4 °C, et l'excès de sel est éliminé par lavage à l'éthanol 70 % et recentrifugation. Le culot, séché à l'air, est ensuite resuspendu dans le volume désiré d'eau exempte d'ARNase et conservé à -80 °C pour les analyses subséquentes.

L'extraction directe des ARN à partir de plaquettes entières ou de MP a été réalisée en utilisant du TRIzol (Life Technologie), selon les recommandations du fabricant. Le *MirVana Paris Kit* a été utilisé, selon le protocole du fabricant, pour l'extraction des ARN sécrétés par les plaquettes (*releasate*, RLS) ou issus du surnageant des MP (*supernatant*, SN). Pour chaque ml de suspension plaquettaire, 1 fmol d'un ARN simple brin exogène (*Spike*; voir **Tableau 7**) étaient ajoutés avant l'extraction d'ARN des MP, du RLS et du SN, afin de pouvoir normaliser la quantification des ARN par l'analyse qPCR de ces différentes fractions.

3.3.2.3 Analyse par marquage au ³²P des petits ARN plaquettaires

Afin d'analyser l'ensemble des ARN immunoprécipités avec la protéine Ago2, les ARN extraits de l'IP ont été marqués radioactivement par phosphorylation au γ -³²P-[ATP] (Perkin Elmer), selon un protocole similaire à celui utilisé pour le marquage de sondes. Cinquante (50) ng d'ARN extraits de l'IP Ago2, ou un volume équivalent de l'IP réalisée avec l'IgG contrôle isotypique, ont, dans un premier temps, été déphosphorylés ou non par la *calf intestine phosphatase* (CIP, 1 U/échantillon, Roche) pendant 20 min à 37 °C. Après extraction au phénol-chloroforme acide et précipitation à l'éthanol, les ARN (déphosphorylés ou non) ont été phosphorylés au γ -³²P-[ATP] (Perkin Elmer,

0,25 µl/échantillon) par l'Optikinase (5 U/échantillon, USB) dans les conditions recommandées par le fabricant. Les ARN, dénaturés par ajout d'un volume équivalent de *gel loading buffer II* (Ambion) et chauffage pendant 5 min à 95 °C, ont été séparés sur gel polyacrylamide dénaturant (7 M urée, 15 % acrylamide:bisacrylamide, ratio 19:1) dans du tampon TBE (90 mM Tris, 90 mM Borate, 2 mM EDTA), et détectés sur films autoradiographiques.

3.3.2.4 Détection des microARN par NB

La détection des microARN par NB a été réalisée selon le même protocole que celui décrit dans la section 3.1.8.1.1 (Plé et al., 2012a). Brièvement, les ARN séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant (7 M urée, 10 % acrylamide:bisacrylamide, ratio 19:1), sont transférés sur une membrane de nylon et attachés de manière covalente par réticulation (*crosslinking*) au 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Pall et al., 2007). Ils sont ensuite détectés par hybridation d'une sonde radioactive complémentaire au microARN étudié, transcrite à partir d'un promoteur T7 (MEGAscript T7 kit, Ambion) en présence d'UTP marqué au ³²P (α -³²P[UTP], Perkin Elmer).

3.3.2.5 Détection des ARN par PCR classique et qPCR

La détection de l'ARNm de Cox-1 et de l'Actine, et des pri-microARN a été réalisée par PCR classique. Après transcription inverse des ARN totaux (SuperScript III reverse transcriptase, Invitrogen), 1 µl d'ADNc a été amplifié pendant 40 cycles avec la polymérase à ADN Taq (New England BioLabs), selon les recommandations du fabricant. La séquence des amorces utilisées et leur température d'hybridation sont décrites dans le **Tableau 7**. Les produits PCR ont ensuite été analysés sur gel d'agarose au bromure d'éthidium, et révélés aux ultraviolets (UV).

La quantification des ARN par qPCR a été réalisée en utilisant le système miScript PCR (Qiagen). L'ADNc a été synthétisé à partir d'ARN totaux en utilisant le tampon HiFlex (miScript RT kit, Qiagen), qui permet la détection de petits ARN et d'ARNm à partir d'un même échantillon d'ARN initial. La quantification des microARN et pré-microARN par qPCR ont été réalisés à partir d'amorces fournies par Qiagen, tandis que les ARNm ont été amplifiés à partir d'amorces dont les séquences sont décrites dans le **Tableau 7**, selon le protocole du fournisseur (miScript PCR system, Qiagen). La

quantification relative des microARN sécrétés par les plaquettes (RLS), présents dans les MP ou dans leur surnageant (SN) a été réalisée selon la méthode dite des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Pour chaque échantillon, les résultats obtenus pour un microARN (en duplicata) ont été rapportés à ceux obtenus pour la séquence de référence exogène (*Spike*), ajoutée juste avant l'extraction d'ARN, et normalisés par rapport à ceux obtenus dans la même fraction avec les plaquettes non stimulées.

Tableau 7. Séquences des oligonucléotides d'ARN et d'ADN utilisés dans ce chapitre

Nom	Séquence	T°C Hyb.
Spike (ARN)	CUAUGCAAUUUUUCUACGAUACC	-
Amorces PCR classique		
Cox-1	F-TGCCAGCTCCTGGCCGCCGCTT R-GTGCATCAACACAGGCGCCTCTTC	55 °C
Actine	F-CGATCCACACGGAGTACTTG R-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	55 °C
pri-miR-376a-1	F-TGTGGGTCTCGTGGTGCCA R-TGTGTCTGTCCGTCCTGTACCC	59 °C
pri-miR-376a-2	F-TGGGCTCCGTCGTCATTTT R-CCATCTTTCCACTTACCCTGGA	56 °C
pri-miR-376b	F-ACAGGCTGTGGTGTGTTGTGAC R-GGCCTACCATCTTTGCACCTAC	65 °C
pri-miR-654	F-ATCAAATGCTGCCTTGGGATC R-GCAACCGTTTTTCAGTCCCGTA	53 °C
Amorces qPCR		
GPIIIa	F-GCATCCAGAACCTGGGTACC R-CGTCAGCACGTGTTTGTAGC	55 °C
CD45	F-GCTCAGAATGGACAAGTA R-CACACCCATACACACATACA	55 °C
GAPDH	F-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R-GAAGATGGTGATGGGATTTT	55 °C
Amorces de clonage pSiCheck-2		
Cox-1 3'UTR	F-AGCTGCAGCTGCGGCCGCGGGCAGGAAAGCAGCATTCT R-AGCTGCAGCTGCGGCCACACAATTGTTGGGGTTGGC	65 °C
GPIIIa 3'UTR	F-AGCTGCAGCTCTCGAGTGATAAGCAGTCATCCTCAGATC R-AGCTGCAGCTGCGGCCGCGTCTTCAAGACCTGTGAACTTC	60 °C

3.3.2.6 Isolation des ARNm polyadénylés sur résine oligo(dT)

L'isolation sur résine oligo(dT) des ARNm polyadénylés a été réalisée à partir d'extraits plaquettaires, lysés pendant 15 min sur glace, puis centrifugés pendant 15 min à 10 000g à 4 °C [Tampon oligo(dT) : 25 mM Tris pH 7,5, 100 mM KCl, 0,25 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1x *antiprotease cocktail* (Roche), 1 mM PMSF, 0,1 U/μl SUPERase-In (Invitrogen)]. Les extraits, dosés par la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad protein

assay), sont dilués à 2 µg/µl dans du tampon de lyse, puis 500 µg sont incubés avec rotation pendant 2 h à 4 °C en présence de 2,5 mg de résine oligo(dT) cellulose (Type 7, GE Healthcare). La fraction non liée est ensuite conservée pour l'analyse des protéines ou l'extraction des ARN, tandis que la résine est lavée 3 fois avec 1 ml de tampon de lyse. Pour l'analyse des protéines, un tampon de dénaturation est ajouté aux différentes fractions à une concentration finale de 1x (6x : 350 mM Tris pH 6,8, 30 % glycérol, 10 % SDS, 9 % DTT et 0.01 % bleu de bromophénol) et les échantillons sont ensuite dénaturés par chauffage à 95 °C pendant 5 min. L'analyse de la fraction éluée par Western Blot (WB) a été réalisée à partir d'une quantité correspondant à 200 µg de protéines de la fraction éluée, ou 50 µg des autres fractions. Pour l'analyse des ARN extraits, une quantité équivalente au lysat initial a été analysée pour chaque fraction, par Northern Blot pour les microARN et transcription inverse et PCR classique pour les ARNm.

3.3.2.7 Analyse des protéines par Western Blot

L'analyse des différents extraits protéiques par WB a été réalisée avec la même méthode que dans les sections 3.1.5.9 et 3.2.8.2.1 (Plé et al., 2012a; Plé et al., 2012b). Brièvement, les extraits protéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant (10 % SDS-PAGE), transférés sur une membrane PVDF et immunodétectés avec les anticorps décrits dans le **Tableau 8**. La révélation a été effectuée après incubation d'anticorps secondaires conjugués à la *horseradish peroxidase* (HRP) par chimioluminescence (*enhanced chemiluminescence*, ECL).

Tableau 8 Anticorps utilisés en Western Blot.

Protéine détectée	Origine, Clone (Référence)	Dilution	Source
Ago2	Abnova, 1C9	1:1000	Souris
Dicer	Abcam, 13D6	1:10,000	Souris
TRBP	Eurogentech, (Landry et al., 2009)	1:2000	Lapin
α-Tubuline	DSHB, 12G10	1:40,000	Souris

3.3.2.8 Constructions de plasmides

Les séquences correspondant aux 3'UTR des ARNm GPIIIa et Cox-1 ont été clonées en aval de la séquence codant pour la Renilla Luciferase (RLuc) dans le vecteur psiCHECK-2 (Promega). Les deux 3'UTR ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc de

plaquettes à l'aide de la polymérase Phusion (High Fidelity DNA polymerase, New England BioLabs). Les amorces utilisées (**Tableau 7**) comprennent des sites de restriction pour les enzymes NotI et XhoI présents dans le site de clonage du vecteur psiCHECK-2. Le produit PCR est digéré, puis inséré par ligation dans le vecteur psiCHECK-2 clivé par les mêmes enzymes. Après vérification des clones par séquençage, les vecteurs ont été amplifiés et purifiés en utilisant le système *Endotoxin-free Plasmid purification Maxi kit* (Qiagen).

Les séquences correspondant exactement aux pré-microARN d'intérêt (miRBase; <http://www.mirbase.org/>) ont été clonées dans le vecteur pGeneClip, conformément aux instructions du fournisseur (Promega). Après vérification par séquençage, les vecteurs ont été amplifiés et purifiés avec le même système que les vecteurs psiCHECK-2.

3.3.2.9 Validation expérimentale des sites de liaison de microARN

L'identification des sites de liaison potentiels dans les 3'UTR des ARNm de GPIIIa et Cox-1 a été réalisée en utilisant les sites de prédictions bioinformatiques TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) et Miranda (<http://www.microrna.org/>). La régulation par les microARN exprimés abondamment dans les plaquettes, d'après les expériences sur biopuce (Landry et al., 2009), a été analysée expérimentalement. Pour ce faire, des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293), ensemencées à 2×10^5 cellules par puit dans des plaques à 24 puits, ont été co-transfectées par la méthode de précipitation au calcium phosphate avec un vecteur exprimant le microARN (pGeneClip, Promega, 2,5 à 250 ng d'ADN plasmidique) et 100 ng d'ADN plasmidique de vecteur psiCHECK-2 (Promega), dans lequel a été inséré le 3'UTR du gène d'intérêt en aval du gène rapporteur RLuc. Comme contrôle négatif, le vecteur psiCHECK-2 a été co-transfecté avec un vecteur pGeneClip exprimant une tige boucle d'ARN ciblant une région délétée du gène RLuc (Plante et al., 2006). L'expression de RLuc et du contrôle de transfection *Firefly Luciferase* (FLuc) ont été réalisées à partir du système *Dual Luciferase Reporter Assay* (Promega). Afin de mesurer la régulation du gène rapporteur par le microARN d'intérêt, le rapport RLuc/Fluc obtenu pour chaque concentration de vecteurs pGeneClip exprimant le pré-microARN a été normalisé avec celui obtenu avec le contrôle négatif à la même concentration.

3.3.2.10 Activation plaquettaire et purification des MP

Les plaquettes ont été purifiées à partir de sang veineux de donneurs sains, suivant la même méthode que décrite précédemment (Landry et al., 2009). Brièvement, le plasma riche en plaquettes (PRP) préparé à partir du sang total a été filtré (*Leukocyte depletion filter*, Pall) et les plaquettes purifiées par une seconde étape d'élimination des leucocytes contaminants par sélection négative basée sur une séparation magnétique (*human CD45 depletion kit*, EasySep). Afin de maintenir les plaquettes dans un état non-activé, 1 μM de prostaglandine E_1 (PGE_1) a été ajouté à chaque étape de la purification. L'état d'activation des plaquettes a été documenté par cytométrie de flux sur la plateforme de cytométrie du CHUL.

Le comptage des plaquettes (PLT) a été réalisé par le laboratoire d'hématologie du CHUL. Après dilution à 10^9 PLT/ml dans un tampon Hepes-Tyrode (10 mM HEPES pH 7,4, 136 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 0,4 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM D-glucose, 1,8 mM CaCl_2 et 0,4 mM MgCl_2), les plaquettes, incubées à 37 °C, ont été activées par l'ajout de thrombine 0,1 U/ml (*Thrombin from human plasma*, Sigma) pendant 5 à 60 min. L'activation a été stoppée par l'ajout d'EDTA 20 mM, et les plaquettes ont été culotées par centrifugation à 1 000 g pendant 10 min, lysées directement dans du TRIZOL ou conservées sous forme de culot sec à -80 °C après congélation instantanée dans un bain d'éthanol et de glace sèche. Les plaquettes restantes ont été éliminées du surnageant (*releasate*, RLS) par une deuxième centrifugation à 3 400 g pendant 10 min, congelées instantanément à -80 °C ou directement utilisé pour la préparation des microparticules (MP) et de leur surnageant (SN). Les MP isolées de leur surnageant par centrifugation pendant 2 h à 20 000 g à 4 °C, ont été lysées directement dans du TRIZOL ou congelées instantanément et stockée à -80 °C.

3.3.2.11 Cytométrie de Flux

Afin de vérifier l'état d'activation des plaquettes après purification, l'expression de P-sélectine (CD62) à la surface des plaquettes a été mesurée par cytométrie de flux. Cinquante (50) μl de suspension plaquettaire à 10^4 PLT/ μl ont été incubés pendant 20 min dans le noir en présence de 2 μl d'anticorps CD41a-APC (BD Pharmingen), utilisé comme marqueur plaquettaire, et 4 μl d'anticorps CD62-PE (Beckman Coulter), ou de leurs contrôles isotypiques en quantités équivalentes (IgG1 κ -APC et -PE murins, respectivement;

BD Pharmingen). Comme contrôle positif, des plaquettes activées au préalable pendant 15 min avec 1 U/ml de thrombine ont été analysées en parallèle. Les anticorps ont ensuite été fixés en incubant la suspension plaquettaire pendant 20 min additionnelles en présence de paraformaldéhyde 0,25 %, puis la suspension a été diluée par l'ajout de 500 µl de tampon Hepes-Tyrode. Les préparations plaquettaires, dont l'expression de CD62 à la surface était inférieure à 10 % de celle obtenue avec le contrôle positif, ont été utilisées dans nos expériences.

Le compte de MP a été réalisé en cytométrie de flux par marquage des MP au CD41a en présence de microsphères autofluorescentes, dont la taille et la concentration étaient connues. Les MP, contenues dans 10 µl de la fraction RLS et diluées dans 100 µl de tampon Hepes-Tyrode, ont été marquées pendant 20 min dans le noir, par l'ajout de 1 µl d'anticorps anti-CD41a conjugué à l'APC (BD Pharmingen), ou du contrôle isotypique à la même concentration (IgG1κ-APC murin, BD Pharmingen), avant d'être diluées dans un volume final de 600 µl. Avant l'analyse par FACS, 10⁵ microsphères autofluorescentes en polystyrène de 15 µm (Polysciences) ont été ajoutées à chaque tube. L'acquisition par cytométrie de flux a été réalisée par la Dre Nathalie Cloutier, à l'aide un FACS Canto II SORP équipé d'un photomultiplicateur sur le *Forward Scatter* (FSC), calibré afin de pouvoir détecter simultanément des particules dont la taille varie entre 100 nm et 3500 nm. Le compte de MP marquées au CD41a obtenu lors de l'acquisition de 1000 microsphères, permet ainsi la quantification absolue des MP dans chaque fraction de RLS.

3.3.2.12 Essais enzymatiques de clivage par Ago2

Afin de déterminer la capacité de clivage endonucléolytique de la protéine Ago2 dans les plaquettes et les MP, des essais d'activité RISC ont été réalisés, selon le protocole précédemment détaillé (Perron et al., 2011). Brièvement, les plaquettes et MP ont été lysées pendant 15 min sur glace dans un tampon de lyse 2x [40 mM HEPES pH 7,6, 0,35 % Triton X-100, 100 mM KOAc, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1x EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)] et les débris insolubles éliminés par centrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Cinquante (50) µg de protéines de lysat de plaquettes ou de MP produites par 5 x 10⁸ plaquettes activées avec 0,1 U/ml de Thr pendant 60 min, ou un volume équivalent de tampon de lyse (Blank), ont été incubés pendant 45 min à 30 °C en présence d'une sonde parfaitement complémentaire au microARN étudié, marquée

radioactivement en 5'. Après digestion à la protéinase K, les ARN ont été extraits par phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol, séparés sur gel polyacrylamide dénaturant (7 % urée, 10 % Acrylamide:Bisacrylamide; ratio 19:1) et analysé par exposition d'un film autoradiographique. Le clivage endonucléolytique des sondes d'ARN de 51 nt par Ago2 produit un fragment attendu de 39 nt.

3.3.3 Résultats

3.3.3.1 Association de Ago2 avec les microARN et les ARNm dans les plaquettes au repos

Dans l'article publié par mon laboratoire d'accueil (Landry et al., 2009), l'association de miR-223 avec la protéine Ago2 au sein d'un complexe fonctionnel avait été démontrée (i) par la détection de miR-223 dans l'IP de la protéine Ago2 plaquettaire par NB, et (ii) par la capacité des lysats plaquettaires et des IP anti-Ago2 à cliver une sonde parfaitement complémentaire à ce microARN. Afin d'analyser, de manière globale, les ARN associés à Ago2, les ARN extraits de l'IP ont été marqués radioactivement et analysés sur gels. J'ai pu alors observer que les IP anti-Ago2 sont très fortement enrichies en ARN d'une vingtaine de nucléotides possédant une extrémité 5' phosphorylée, caractéristiques des microARN (**Figure 23A**). En accord avec ces résultats, d'autres microARN ont ainsi pu être détectés en association avec Ago2, tels que let-7c, miR-199-3p et miR-19a (**Figure 23B**). Ces résultats confirment l'association des microARN avec Ago2 au sein des plaquettes humaines.

Par la suite, j'ai étudié l'association des complexes Ago2•microARN avec les ARNm. Pour ce faire, les ARNm ont été isolés des lysats plaquettaires en utilisant une résine oligo(dT) cellulose, qui a la propriété de lier la queue poly(A) des ARNm. Après avoir vérifié l'efficacité de la résine à isoler les ARNm possédant une queue poly(A) (**Figure 23C**, panneaux supérieurs), les protéines et microARN associés à ces ARNm ont été analysés. L'analyse par WB a mis en évidence qu'une fraction de la protéine Ago2 est éluée avec les ARNm, bien que la majorité des protéines Ago2 ne soit pas retenue par la résine (**Figure 23C**, panneau central). L'analyse des protéines impliquées dans la biogenèse des microARN (i.e. Dicer et TRBP) indique que ces protéines ne sont pas éluées avec les ARNm, ce qui suggère qu'elles ne font pas partie du complexe miRNP effecteur. De plus,

les ARNm ne sont pas associés à la tubuline (**Figure 23C**, panneau inférieur), extrêmement abondante dans les plaquettes, démontrant ainsi la spécificité relative de l'interaction entre Ago2 et les ARNm. De manière similaire, l'association de différents microARN avec les ARNm a été analysée par NB. Ces expériences démontrent qu'une partie des microARN est éluée avec les ARNm, la proportion co-éluée dépendant du microARN étudié (**Figure 23D**). En effet, alors que let-7c et miR-199-3p semblent majoritairement associés aux ARNm, une plus faible proportion de miR-19a et miR-223 est co-éluée avec les ARNm. Par ailleurs, la détection de let-7c par NB a révélé deux espèces d'ARN dont la taille est inférieure à 20 nt. Ces deux ARN, correspondant vraisemblablement à des fragments de dégradation du microARN, sont exclusivement détectés dans les lysats plaquettaires totaux. Ils ne sont en effet ni retrouvés dans les IP Ago2, ni retenus par la résine oligo(dT), indiquant que les microARN associés à Ago2 ou aux ARNm semblent protégés de cette possible dégradation. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les complexes effecteurs Ago2•microARN peuvent être associés aux ARNm plaquettaires. Cependant, ces expériences étant réalisées sur des lysats, la possibilité que les complexes Ago2•microARN s'associent ou se dissocient des ARNm suite à la lyse des plaquettes ne peut être exclue.

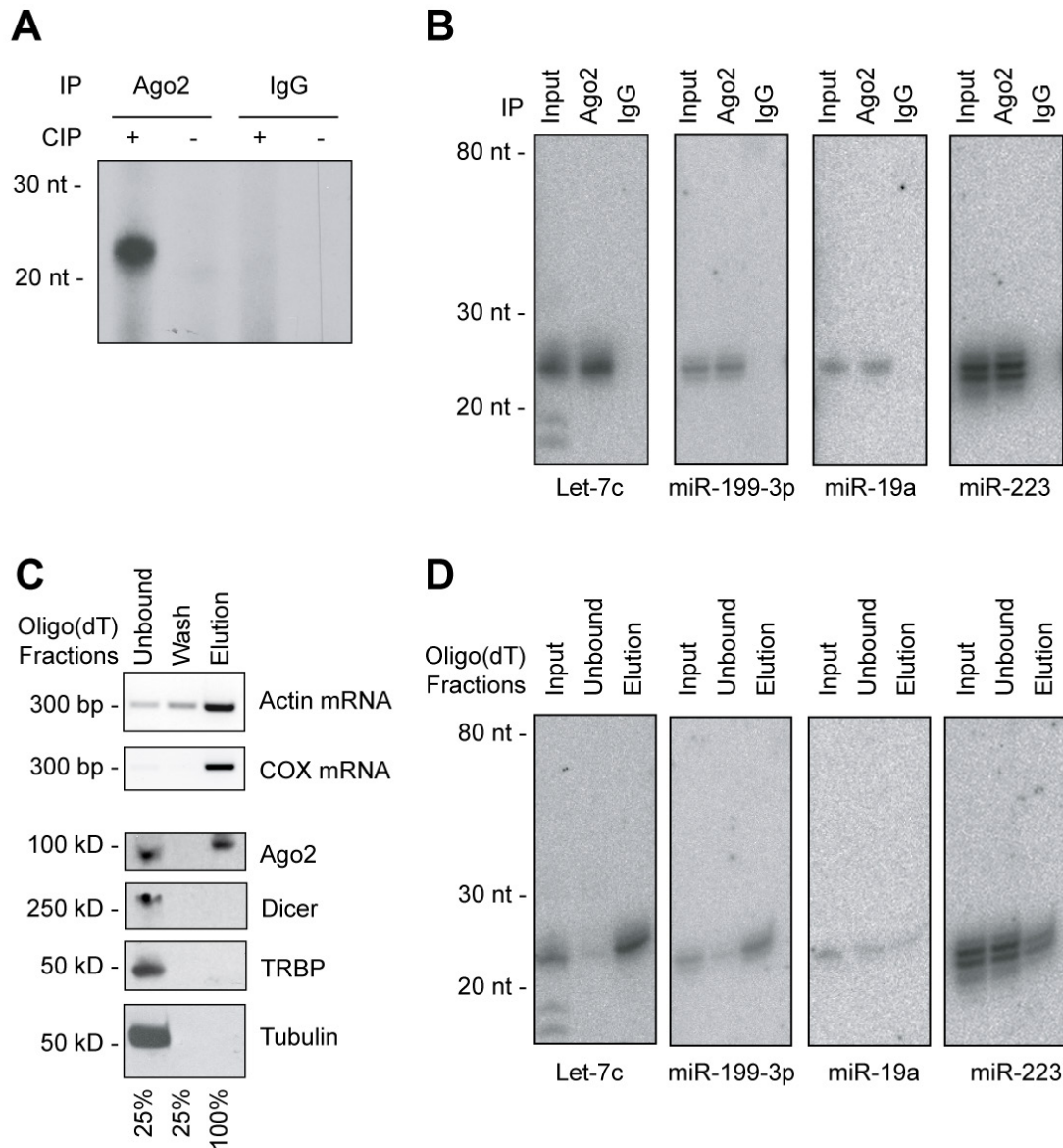


Figure 23. Association des complexes Ago2•microARN avec les ARNm plaquettaire.

(A) Analyse sur gel des petits ARN associés aux IP de la protéine Ago2 et du contrôle isotypique (IgG) dans les plaquettes. Les ARN, au préalable déphosphorylés ou non (\pm CIP), sont marqués au ^{32}P par phosphorylation. (B) Détection par NB de let-7c, miR-199-3p, miR-19a et miR-223 dans des lysats plaquettaire totaux (Input), les IP anti-Ago2 ou contrôle isotypique (IgG). (C-D) Analyse des ARN et protéines élués avec une résine oligo(dT) cellulosique. (C) La résine permet d'isoler efficacement les ARNm possédant une queue poly(A), comme le démontre l'analyse par PCR des ARNm de Cox-1 et de l'actine, qui se retrouvent dans la fraction éluee, et non dans la fraction non liée (*Unbound*) ou dans les lavages (*Wash*). L'analyse par WB des protéines éluées avec la résine oligo(dT) montre que la protéine Ago2 est partiellement associée avec les ARNm polyadénylés, contrairement à TRBP, Dicer et la tubuline. (D) Détection par NB des microARN élués avec la résine oligo(dT). De gauche à droite, let-7c, miR-199-3p, miR-19a et miR-223 ont été analysés.

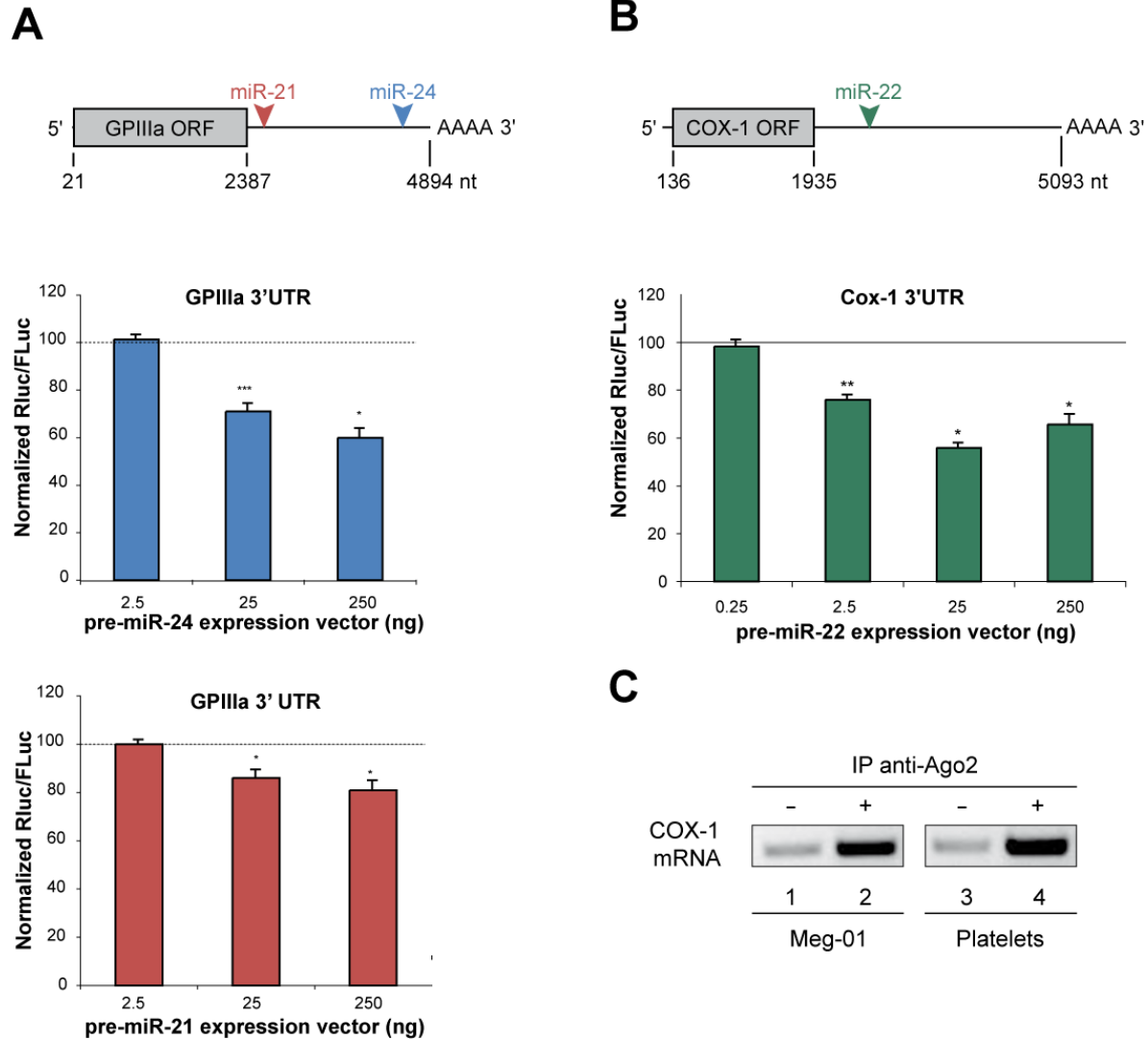


Figure 24. Régulation d'ARNm traduits dans les plaquettes par des microARN.

(A) L'ARNm codant pour GPIIIa, synthétisé de manière continue dans les plaquettes, possède de multiples sites de liaisons potentiels pour des microARN plaquettaires, notamment miR-21 et miR-24. Ces deux microARN diminuent significativement l'expression du gène rapporteur RLuc portant le 3'UTR de l'ARNm de GPIIIa (n=5-6), validant expérimentalement leur capacité à réguler ce gène. (B) L'ARNm de Cox-1, qui est traduit suite à l'activation plaquettaire, possède un site de liaison pour le microARN miR-22, qui est fortement exprimé dans les plaquettes. MiR-22 diminue significativement l'expression du gène rapporteur placé sous le contrôle du 3'UTR de Cox-1, validant expérimentalement la présence d'un ou de plusieurs sites de liaisons fonctionnels pour ce microARN (n=4). Analyse statistique par test t de *Student* pairé. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (C) Dans les plaquettes humaines, comme dans la lignée cellulaire Meg-01, l'ARNm de Cox-1 est détecté spécifiquement dans les IP anti-Ago2 (+), et non dans le contrôle isotypique (-).

3.3.3.2 Régulation par les microARN des ARNm traduits dans les plaquettes

Différentes protéines ont été démontrées comme étant traduites par les plaquettes, que ce soit de manière continue, comme l'intégrine $\beta 3$ (ou GPIIIa) (Kieffer et al., 1987; Thon and Devine, 2007), ou suite à leur activation, comme la Cox-1 (Evangelista et al., 2006). Afin de déterminer le rôle potentiel des microARN dans la traduction de ces deux ARNm, j'ai d'abord identifié les sites de liaison potentiels des microARN plaquettaires dans les séquences 3'UTR de ces ARNm, à l'aide d'outils de prédiction bioinformatique (TargetScan et Miranda). Des essais de gènes rapporteurs dans la lignée cellulaire humaine HEK 293 ont ensuite été réalisés, afin de vérifier si ces deux gènes pouvaient effectivement être régulés par les microARN identifiés. Dans ces essais, un vecteur exprimant le pré-microARN d'intérêt ou l'ARN tige boucle contrôle, est co-transfecté avec un vecteur rapporteur dans lequel la séquence 3'UTR de l'ARNm étudié est insérée en aval du gène rapporteur *Renilla luciferase* (RLuc).

L'analyse bioinformatique du 3'UTR de l'ARNm de GPIIIa a permis d'identifier de nombreux microARN plaquettaires potentiellement impliqués dans sa régulation. Parmi ceux-ci, j'ai étudié la régulation du 3'UTR de GPIIIa par les microARN de la famille let-7, miR-30, miR-19 et miR-106, ainsi que les microARN miR-21, miR-22, miR-24, miR-185 et miR-221. Pour la majorité des microARN testés, aucun effet sur l'expression du gène rapporteur sous contrôle du 3'UTR de GPIIIa n'a pu être observé, indiquant que les sites de liaisons potentiels de ces microARN sont soit non-fonctionnels ou non-accessibles (données non-présentées). Cependant, miR-21 et miR-24 diminuent de manière significative l'expression du gène rapporteur portant le 3'UTR de GPIIIa (**Figure 24A**), indiquant que ces deux microARN, exprimés de manière abondante dans les plaquettes, sont capables de réguler cet ARNm.

L'analyse bioinformatique des microARN ciblant potentiellement le 3'UTR de l'ARNm de Cox-1 a permis d'identifier le microARN miR-22, qui est fortement exprimé dans les plaquettes. L'expression de ce microARN diminue de manière significative l'expression du gène rapporteur RLuc placé sous le contrôle du 3'UTR de Cox-1, validant ainsi expérimentalement la présence d'un ou de plusieurs sites de liaison permettant la régulation de ce gène par miR-22 (**Figure 24B**). Pour étudier l'association de complexes miRNP avec l'ARNm de Cox-1 dans les plaquettes, la présence de l'ARNm de Cox-1 dans

les IP de Ago2 a été analysée par PCR (**Figure 24C**). Alors qu'il est absent du contrôle isotypique, l'ARNm de Cox-1 est spécifiquement amplifié dans les IP anti-Ago2, ce qui indique que les complexes miRNP peuvent s'associer à cet ARNm au sein des plaquettes, et possiblement réguler sa traduction via miR-22.

Tableau 9. Localisation génomique des 20 microARN variant le plus entre les plaquettes au repos et activées.

MicroARN	Localisation génomique			Variation vs non-activées	
	Chr	Position	Brin	Thr 15 min	Thr 60 min
hsa-miR-376b	14	101506773	+	1.98	1.16
hsa-miR-376c	14	101506027	+	1.84	1.13
hsa-miR-376a	14	101506406	+	1.83	1.13
hsa-miR-376a	14	101507119	+	1.83	1.13
hsa-miR-377	14	101528387	+	1.76	1.21
hsa-miR-136	14	101351039	+	1.74	1.18
hsa-miR-889	14	101514238	+	1.68	1.22
hsa-miR-411	14	101489662	+	1.68	1.16
hsa-miR-136*	14	101351039	+	1.61	1.09
hsa-miR-337-5p	14	101340830	+	1.59	1.08
hsa-miR-369-3p	14	101531935	+	1.57	1.07
hsa-miR-410	14	101532249	+	1.46	1.10
hsa-miR-487a	14	101518783	+	1.45	1.02
hsa-miR-381	14	101512257	+	1.43	1.14
hsa-miR-376a-*	14	101507119	+	1.40	1.12
hsa-miR-654-3p	14	101506556	+	1.39	1.11
hsa-miR-411*	14	101489662	+	1.38	1.11
hsa-miR-154	14	101526092	+	1.36	1.05
hsa-miR-431	14	101347344	+	1.36	1.15
hsa-miR-451	17	27188387	-	1.33	1.04

Chr, chromosome; Thr, thrombine.

3.3.3.3 Profil d'expression des microARN lors de l'activation plaquettaire

Je me suis par la suite intéressée au devenir des microARN lors de l'activation plaquettaire. Pour cela, j'ai extrait les ARN de plaquettes purifiées, activées ou non à la thrombine (0,1 U/ml) pendant 15 ou 60 min. Pour chaque condition, la même quantité d'ARN, issu de chacun des 4 donneurs utilisés, a été combinée pour réaliser le profil de microARN sur la plateforme de biopuce LNA de la compagnie Exiqon. Cette expérience a

mis en évidence la grande stabilité des microARN plaquettaires suite à l'activation; aucun microARN ne variant plus de deux fois par rapport aux plaquettes au repos (**Tableau 9**).

Ce résultat est en contradiction avec les observations des Drs Osman et Falker (2011), qui rapportent une variation significative de 6 microARN allant jusque 6,5 fois lors de l'activation des plaquettes à la thrombine (0,1 U/ml) pendant 60 min. Cependant, les conditions d'activation (e.g., concentration de plaquettes, tampon), le mode de détection (qPCR), et la combinaison de l'ARN de plusieurs individus peuvent avoir contribué aux différences observées.

Tableau 10. Localisation génomique des 20 microARN variant le plus chez les individus dont les plaquettes sont hyper- ou hyporéactives à l'épinéphrine.

MicroARN	Localisation génomique			Variation Hyper vs Hypo
	Chr	Position	Brin	
hsa-miR-376c	14	101506027	+	2.39
hsa-miR-144	17	27188551	-	2.27
hsa-miR-337-5p	14	101340830	+	2.25
hsa-miR-411	14	101489662	+	2.07
hsa-miR-377	14	101528387	+	2.01
hsa-miR-376a*	14	101507119	+	2.00
hsa-miR-376a	14	101506406	+	1.98
hsa-miR-376b	14	101506773	+	1.94
hsa-miR-451	17	27188387	-	1.93
hsa-miR-337-3p	14	101340830	+	1.88
hsa-miR-654-3p	14	101506556	+	1.86
hsa-miR-369-3p	14	101531935	+	1.86
hsa-miR-144*	17	27188551	-	1.85
hsa-miR-136*	14	101351039	+	1.85
hsa-miR-190	15	63116156	+	1.75
hsa-miR-379*	14	101488403	+	1.74
hsa-miR-379	14	101488403	+	1.74
hsa-miR-493*	14	101335397	+	1.72
hsa-miR-495	14	101500092	+	1.68
hsa-miR-329	14	101493122	+	1.66

Chr, chromosome.

Données obtenues sur la base de données publique *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sous la référence GSE27917 (Nagalla et al., 2011).

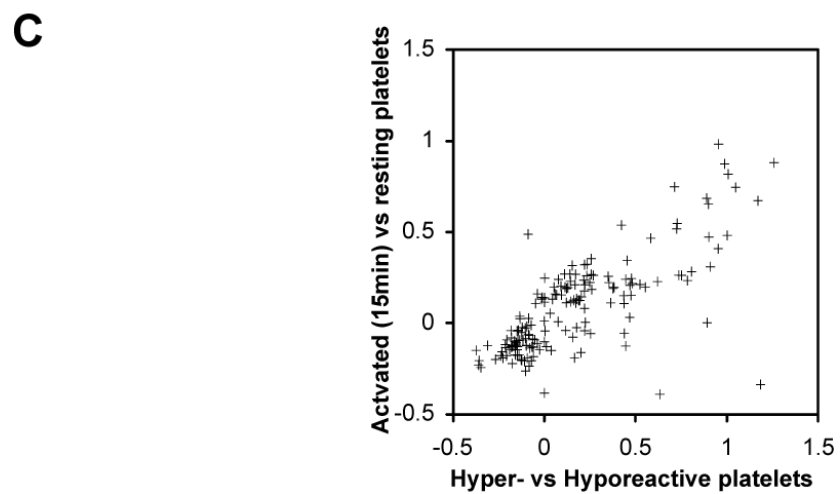
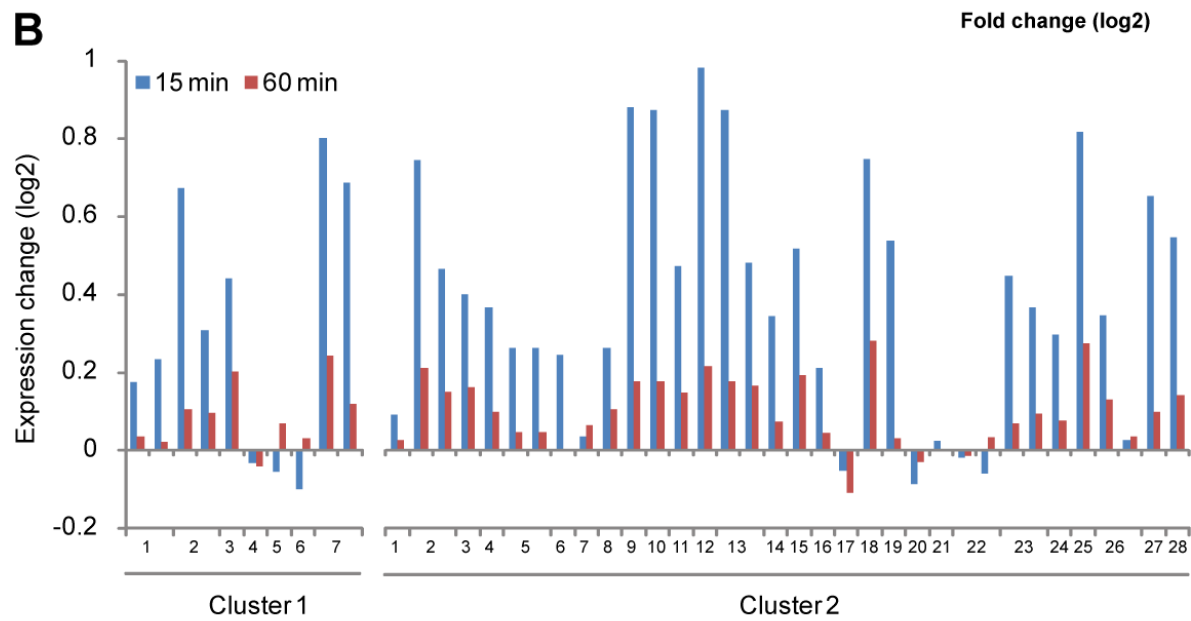
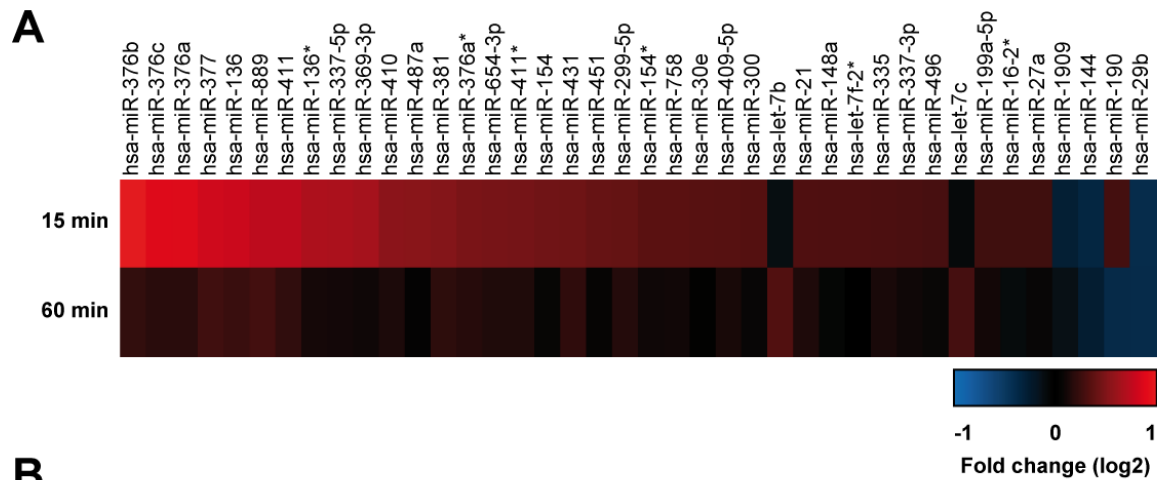


Figure 25. Analyse du profil de microARN plaquettaires au cours de l'activation.

(Figure à la page précédente)

Les ARN de plaquettes de quatre donneurs, stimulées ou non à la thrombine (Thr, 0,1 U/ml) pendant 15 à 60 min, ont été extraits et combinés afin d'analyser le profil de microARN au cours de l'activation plaquettaire. Les profils de microARN ont été réalisés sur la plateforme d'Exiqon utilisant les biopuces miRCURY™ *Locked Nucleic Acid* (LNA) Array (5^{ème} génération), couvrant les microARN enregistrés dans miRBase v15.0. (A) Les 40 microARN variant le plus suite à l'activation plaquettaire sont présentés. Les variations d'expression par rapport au profil des plaquettes au repos sont exprimées en valeurs de fluorescence transformées en log₂. La majorité des microARN montrent une augmentation de leur expression 15 min après leur activation et retournent à leur niveau de base après 60 min. (B) Expression des microARN situés sur les deux regroupements (*Cluster*) du chromosome 14 suite à 15 min ou 60 min d'activation. Pour la majorité des microARN situés sur ces regroupements, on observe une augmentation après 15 min d'activation plaquettaire. La numérotation utilisée pour les différents microARN compris dans ces clusters est définie dans le **Tableau 11**. (C) Comparaison de la variation du profil de microARN avant et après 15 min d'activation versus les variations obtenues entre les individus hyper- et hyporéactifs à l'épinéphrine. On observe que les microARN augmentant suite à l'activation (valeurs >0) sont aussi plus exprimés dans les plaquettes des individus montrant une hyper-réactivité à l'épinéphrine.

Tableau 11. Liste des pré-microARN présents sur les 2 regroupements (*clusters*) du chromosome 14.

Cluster 1		Cluster 2							
1	mir-493	1	mir-379	8	mir-495	16	mir-487b	n.d	mir-453
2	mir-337	2	mir-411	9	mir-376c	17	mir-539	23	mir-154
n.d	mir-665	3	mir-299	10	mir-376a-2	18	mir-889	24	mir-496
3	mir-431	n.d	mir-380	11	mir-654	n.d	mir-544	25	mir-377
4	mir-433	n.d	mir-1197	12	mir-376b	n.d	mir-655	n.d	mir-541
5	mir-127	n.d	mir-323	13	mir-376a-1	19	mir-487a	26	mir-409
6	mir-432	4	mir-758	14	mir-300	20	mir-382	n.d	mir-412
7	mir-136	5	mir-329-1	n.d	mir-1185-1	21	mir-134	27	mir-369
		6	mir-494	n.d	mir-1185-2	n.d	mir-668	28	mir-410
		7	mir-543	15	mir-381	22	mir-485	n.d	mir-656

La numérotation réfère à celle utilisée dans la **Figure 25B**. n.d., non détectés dans les plaquettes. La présence des pri- ou pré-microARN marqués en gras a été analysée par PCR (**Figure 26**).

Bien que faibles, les variations semblent plus marquées après 15 minutes d'activation plaquettaire qu'après 60 min (**Tableau 9** et **Figure 25A**), suggérant une variation transitoire du profil de microARN. Ces résultats ont été comparés avec ceux de Nagalla et al. (2011) qui ont réalisé le profil de microARN plaquettaires de 19 individus dont les plaquettes étaient soit hyper- ou hyporéactive à l'épinéphrine. Fait intéressant, les

variations d'expression entre les individus hyper- et hyporéactifs à l'épinéphrine corrèlent très bien avec celles obtenues après 15 min d'activation ($R=0.741$, test de Pearson) (**Figure 25C**).

Par ailleurs, j'ai pu observer que les microARN variant le plus suite à l'activation augmentent en expression, et sont, pour la grande majorité, situés dans la même région sur le chromosome 14 (**Figure 25B, Tableau 9**). Cette région correspond à deux clusters de microARN, comprenant 8 et 40 pré-microARN chacun (**Tableau 11**). De manière similaire, l'expression de ces microARN est augmentée chez les individus dont les plaquettes sont hyper-réactives à l'épinéphrine (**Tableau 10**), suggérant que ces microARN sont plus particulièrement impliqués dans la réactivité plaquettaire.

L'augmentation des microARN appartenant au même regroupement chromosomique, chez les individus hyper-réactifs à l'épinéphrine, peut aisément être expliquée par une induction de la transcription ou de la maturation par le Microprocesseur des pri-microARN au niveau des MK. Cependant, il est très intrigant d'observer une augmentation similaire dans les plaquettes activées, puisqu'elles ne peuvent pas transcrire de gènes nucléaires et ne possèdent pas les composants du Microprocesseur. Malgré l'absence de ce Microprocesseur, ces pri-microARN pourraient néanmoins être présents dans les plaquettes et être clivés par une voie alternative, indépendante de celui-ci. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai tenté de détecter ces pri-microARN par PCR classique dans les plaquettes purifiées, ainsi que dans d'autres types et lignées cellulaires (**Figure 26A**). La présence de quatre microARN primaires appartenant au cluster 2 a ainsi pu être mise en évidence dans la lignée mégacaryoblastique Meg-01. Cependant, aucun de ces microARN primaires n'a pu être détecté dans les plaquettes, indiquant que l'augmentation des microARN compris dans ce cluster suite à l'activation plaquettaire n'est pas liée à la maturation de leur pri-microARN. Ces pri-microARN ne sont pas non plus détectés dans les neutrophiles (PMN), qui sont les cellules nucléées les plus abondantes dans le sang, écartant du même coup la possible contribution de neutrophiles contaminants dans mes expériences. Étant donné l'absence de ces pri-microARN dans les plaquettes, la présence des pré-microARN correspondant au sein des plaquettes au repos a été envisagée. Afin de vérifier cette hypothèse, la présence dans les plaquettes non-activées de deux de ces pré-microARN, appartenant à chacun des 2 clusters, a été analysée par qPCR (**Figure 26B**).

Ces deux pré-microARN ont été détectés à partir du 35^{ème} cycle d'amplification (*Cycle threshold*, Ct) dans les plaquettes de 3 individus, signifiant qu'ils sont très peu abondants, ce qui rend imprécise leur quantification par cette méthode. À titre de comparaison, 3 autres gènes ont été analysés par qPCR. L'ARNm du marqueur leucocytaire CD45, utilisé pour analyser la pureté de nos préparations plaquettaires, est notamment détecté à des Ct plus faibles que ces deux pré-microARN. Bien qu'il soit malgré tout possible que ces pré-microARN puissent contribuer à l'augmentation des microARN matures suite à l'activation plaquettaire, on ne peut exclure, du moins pour l'instant, la contamination possible par un type de leucocytes autre que les neutrophiles (e.g., monocyte ou lymphocyte).

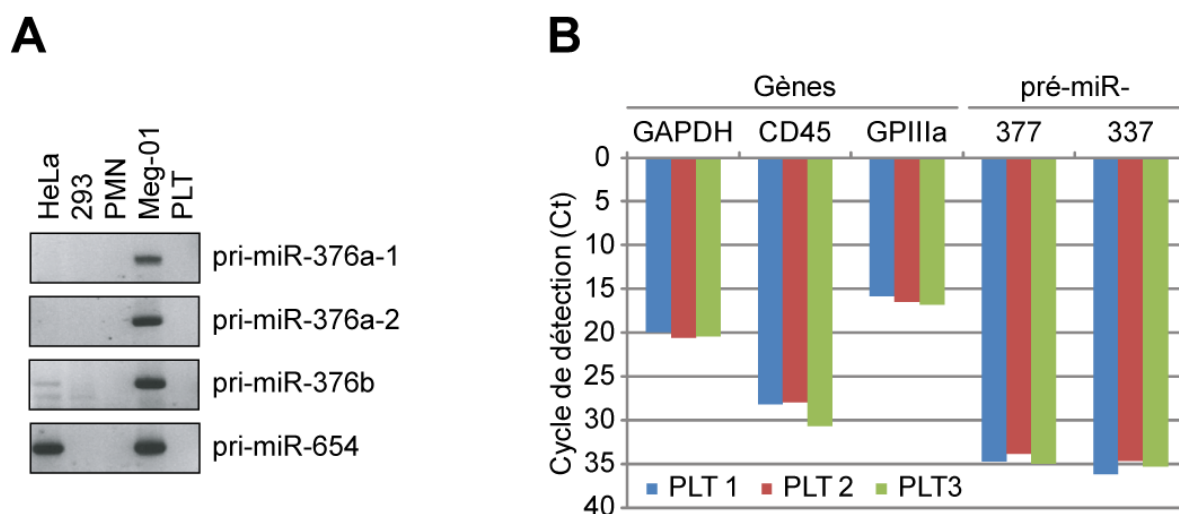


Figure 26. Détection des pri- et pré-microARN inclus dans les 2 regroupements (clusters) du chromosome 14 dans les plaquettes.

(A) La présence de pri-microARN inclus dans les 2 regroupements (*clusters*) du chromosome 14 a été analysée par PCR classique dans les lignées cellulaires humaines HeLa et HEK 293, les neutrophiles humains (PMN), la lignée mégacaryoblastique Meg-01 ainsi que dans les plaquettes humaines (PLT). Les 4 pri-microARN testés sont détectés seulement dans les cellules Meg-01. Seul le pri-miR-654 est détectable dans les cellules HeLa. (B) Analyse par qPCR de l'expression des ARNm GAPDH, CD45 et GPIIIa, ainsi que des pré-miR-377 et pré-miR-337 dans les plaquettes de 3 individus (PLT 1, PLT 2 et PLT 3).

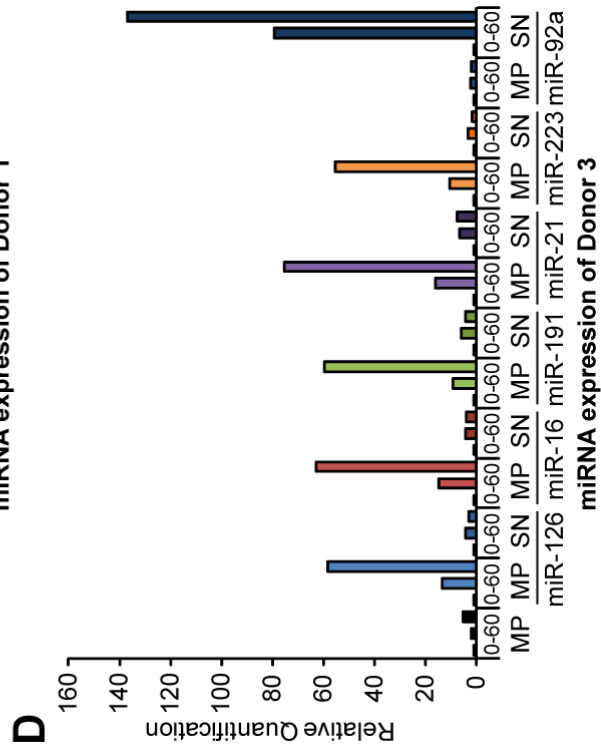
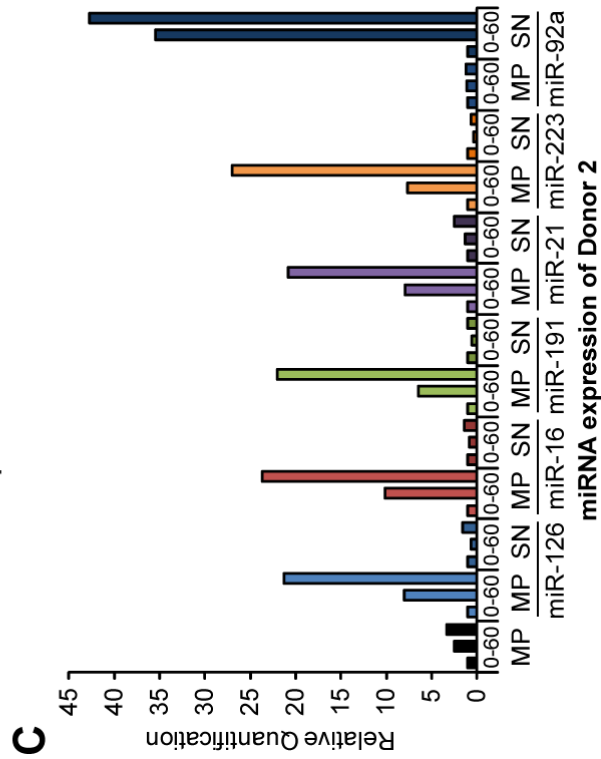
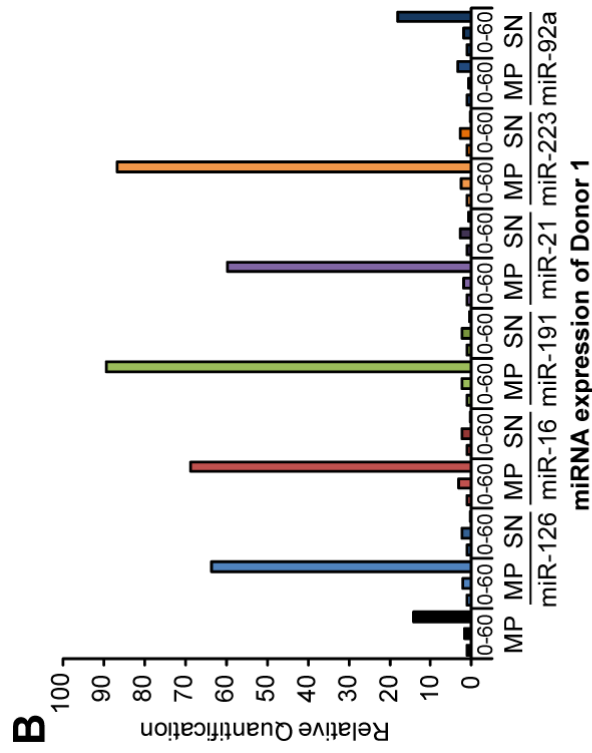
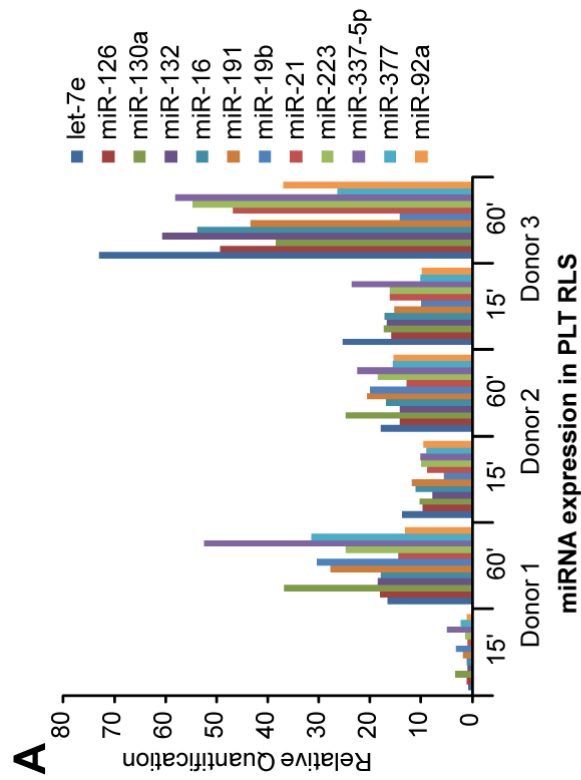


Figure 27. Analyse des microparticules et des microARN sécrétés par les plaquettes activées.

(Figure à la page précédente)

(A) Mesure de l'expression de 12 microARN par qPCR à partir de l'ARN extrait du surnageant (RLS) de plaquettes activées à la thrombine 15 ou 60 min, comparée au RLS de plaquettes non-stimulées. (B-D) Le RLS de ces plaquettes a été analysé par cytométrie de flux pour le décompte des MP (en noir). Bien que des MP soient détectables dans le RLS de plaquette au repos, leur nombre augmente suite à l'activation à la thrombine chez les 3 donneurs analysés (panneaux B, C et D). Après séparation des MP et de leur surnageant (SN), l'ARN total a été extrait de chaque fraction pour mesurer l'expression de microARN par qPCR. Cinq (5) des 6 microARN augmentent dans la fraction MP suite à l'activation, alors que miR-92a augmente dans leur SN, indiquant un mécanisme différent de sécrétion de ce microARN.

3.3.3.4 Sécrétion de microARN lors de l'activation plaquettaire

3.3.3.4.1 Les plaquettes activées sécrètent des MP et des microARN

Les microARN sont présents dans le milieu extracellulaire, et sont notamment compris dans les microparticules et les exosomes (Hunter et al., 2008; Valadi et al., 2007). Sachant que les plaquettes activées sécrètent à la fois des microparticules et des exosomes (Heijnen et al., 1999), j'ai voulu étudier leur capacité à sécréter des microARN. Pour cela, les plaquettes de 3 donneurs ont été purifiées, et activées ou non à la thrombine (0,1 U/ml) pendant 15 ou 60 min. Les ARN ont été extraits du surnageant plaquettaire (RLS) afin de mesurer l'expression de microARN par qPCR. Douze (12) microARN, exprimés à différents niveaux par les plaquettes, ont ainsi été analysés et sont présentés à la **Figure 27A**. Bien que faiblement exprimé, ces 12 microARN sont présents dans le RLS des plaquettes non-activées, indiquant que ceux-ci peuvent être transférés de manière passive à l'extérieur des plaquettes en absence de stimulations. Cependant, l'activation plaquettaire augmente drastiquement les niveaux de ces 12 microARN dans le RLS, avec une abondance plus de 10 fois supérieure suite à 60 min de stimulation à la thrombine. Une grande variation dans la cinétique et l'abondance relative des microARN sécrétés par les plaquettes a pu être observée entre les 3 donneurs, bien que les 12 microARN montrent un profil d'augmentation plutôt similaire pour chaque donneur.

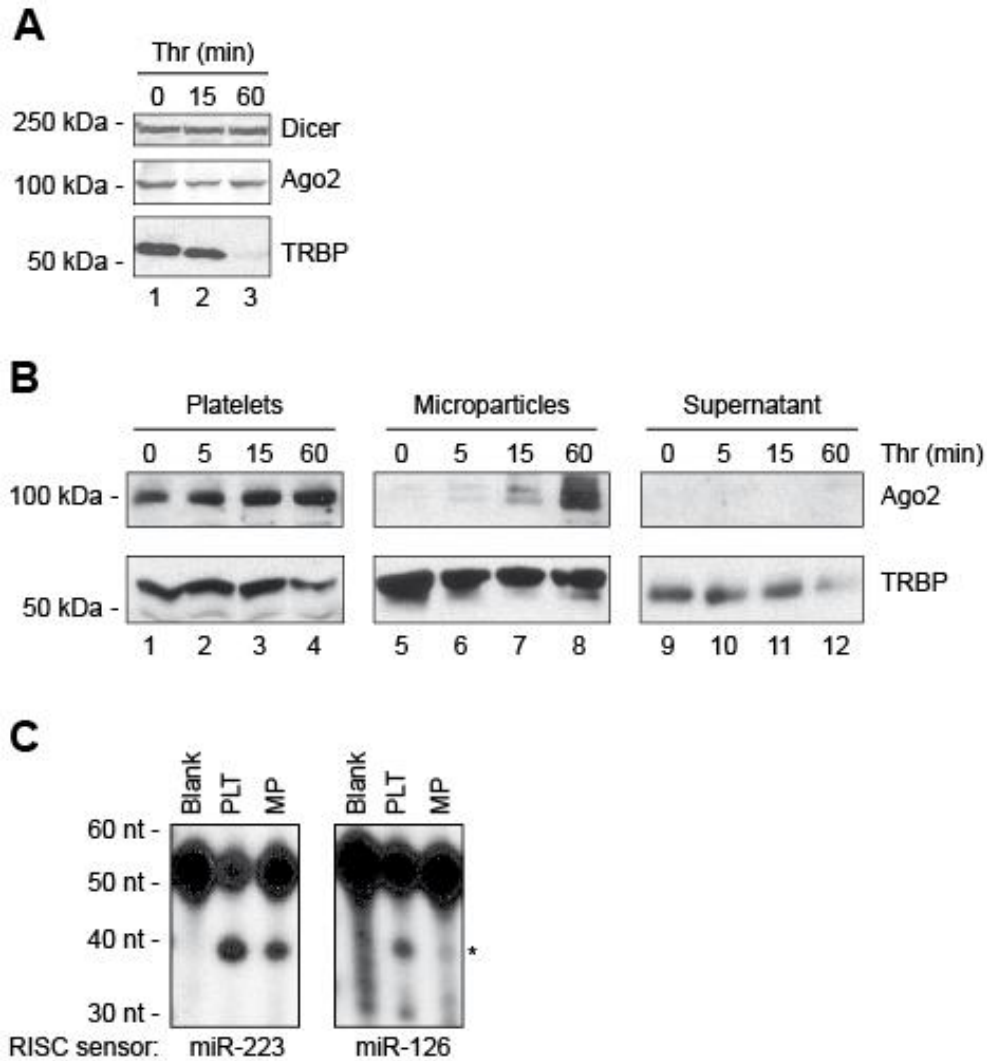


Figure 28. Devenir des complexes associés aux microARN suite à l'activation plaquettaire.

(A) Analyse par WB de l'expression des protéines Dicer, Ago2 et TRBP au cours de l'activation plaquettaire. Tandis que le niveau des protéines Dicer et Ago2 demeure stable, celui de TRBP est fortement diminué. (B) Détection par Western Blot des protéines Ago2 et TRBP dans les plaquettes, les MP et leur surnageant au cours de l'activation à la thrombine (0,1 U/ml). Alors que la protéine Ago2 semble strictement exportée dans les MP suite à l'activation plaquettaire, TRBP semble être exportée passivement en l'absence de stimulation. (C) Essai de clivage endonucléolytique par la protéine Ago2 dans des lysats de plaquettes et de MP. Le clivage spécifique de deux sondes parfaitement complémentaires aux microARN miR-223 et miR-126 indique que ces deux microARN sont associés à Ago2 dans les plaquettes et leurs MP produites au cours de l'activation.

3.3.3.4.2 Certains microARN sont sécrétés via les MP plaquettaires

Afin de déterminer si ces microARN étaient sécrétés à l'intérieur de MP, celles-ci ont été comptées par cytométrie de flux et isolées de leur surnageant (SN) à partir du RLS des mêmes donneurs. Le comptage des MP dans le RLS chez chacun des 3 donneurs montre que les plaquettes non stimulées produisent des MP spontanément, et confirme que leur production est augmentée suite à leur activation (**Figure 27B-D**, en noir). L'expression de six (6) microARN a été analysée à partir de l'ARN extrait de ces deux fractions, et est présentée pour chacun des donneurs dans les **Figure 27B**, **27C** et **27D**, respectivement. Excepté pour miR-92a, les 5 autres microARN n'augmentent pas ou peu dans le SN, et augmentent de manière très marquée dans les MP, indiquant que ces microARN sont sécrétés via les MP suite à l'activation plaquettaire. Leur augmentation est beaucoup plus forte que l'augmentation du nombre de MP, ce qui suggère que les MP sécrétées suite à l'activation sont enrichies en microARN, comparativement à celles produites par les plaquettes non stimulées. À l'opposé, le niveau de miR-92a suite à l'activation plaquettaire ne varie pas dans les MP, mais augmente très fortement dans leur SN. Ce résultat indique que, contrairement aux autres microARN, miR-92a n'est pas sécrété via les MP, mais est libéré dans le SN, probablement via un mécanisme différent, où il peut se retrouver libre ou dans de plus petites microvésicules non-sédimentées, telles que les exosomes.

3.3.3.4.3 Caractérisation des MP plaquettaires

Les microARN sont sécrétés suite à l'activation plaquettaire, notamment via les MP. J'ai donc voulu vérifier la présence et la fonctionnalité des complexes associés à la biogenèse et la fonction des microARN dans les MP libérées par les plaquettes activées. À l'intérieur des plaquettes, le niveau de la protéine Ago2 ne varie pas suite à la stimulation à la thrombine (**Figure 28A**, panneau central). De manière similaire, aucun changement dans le niveau de la protéine Dicer n'est observé (**Figure 28A**, panneau supérieur), alors que le niveau de protéines TRBP diminue très fortement (**Figure 28A**, panneau inférieur). Afin d'étudier la présence de ces protéines dans les MP, des plaquettes purifiées ont été activées ou non à la thrombine (0,1 U/ml) pendant 5 à 60 min, puis les MP ont été isolées de leur surnageant afin d'analyser leur contenu protéique par WB. Le niveau de la protéine Ago2 augmente dans la fraction MP, ce qui reflète bien la production de MP au cours de l'activation plaquettaire (**Figure 28B**, panneau supérieur). À l'opposé, TRBP est fortement présent

dans la fraction de MP en absence de stimulation, et n'augmente pas suite à l'activation (**Figure 28B**, panneau inférieur). À la lumière des résultats montrés à la **Figure 28A** (panneau inférieur), ce résultat indique que la diminution de cette protéine à l'intérieur des plaquettes n'est pas liée à son export, mais plus vraisemblablement à sa dégradation. Étant donné que la protéine Ago2 ainsi que les microARN sont présents à l'intérieur des MP plaquettaires, il est vraisemblable que les microARN soient associés à Ago2. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des essais enzymatiques de clivage *in vitro* à l'aide de sondes parfaitement complémentaires à deux microARN abondants dans les plaquettes et leurs MP, soit miR-223 et miR-126. En présence de lysat plaquettaire, ces deux sondes sont clivées de manière spécifique et libèrent un ARN, dont la taille correspond à celle attendue lors du clivage endonucléolytique de la protéine Ago2 (**Figure 28C**). Ces résultats démontrent que ces 2 microARN sont associés à Ago2 dans un complexe fonctionnel au sein des plaquettes. Tel qu'observé dans les lysats plaquettaires, ces deux sondes sont clivées de manière spécifique dans les lysats de MP de plaquettes activées (**Figure 28C**). Ces deux microARN sont donc associés à la protéine Ago2 à l'intérieur des MP dans un complexe fonctionnel, capable de cliver une sonde parfaitement complémentaire.

4. Discussion

Au cours de ce chapitre, je discuterai des implications des résultats présentés dans les chapitres précédents, ainsi que de leur mise en perspective par rapport à la littérature actuelle. La discussion sera subdivisée en trois parties, correspondant à chacun des deux articles publiés ainsi que ceux obtenus dans l'étude de l'activation plaquettaire.

4.1. Analyse des microARN par séquençage à haut débit

4.1.1 Analyse du profil d'expression des microARN plaquettaires

L'analyse par HTS a permis une caractérisation complète et détaillée des microARN plaquettaires humains. Afin d'obtenir des données représentatives des microARN présents dans les plaquettes humaines, une stratégie de combinaison des ARN de plusieurs individus a été utilisée. Cependant, les donneurs ont été recrutés localement, dans la région de Québec, résultant en une cohorte d'adultes d'origine ethnique majoritairement caucasienne. Étant donné qu'il a été démontré que le compte plaquettaire varie avec l'ethnie, l'âge et le sexe (Segal and Moliterno, 2006), il est possible que le profil de microARN plaquettaire soit lui aussi influencé par ces facteurs. Cette étude globale ne permet donc pas de déterminer l'influence de ces différents paramètres, et les résultats présentés ici ne sont probablement pas représentatifs de cohortes issues d'autres ethnies ou de catégories d'âges différentes. Mes travaux sur les patients en insuffisance rénale (Plé et al., 2012b), ainsi que d'autres études (Duttagupta et al., 2012; Sondermeijer et al., 2011; Xu et al., 2012), démontrent que le profil de microARN plaquettaire est influencé par différentes pathologies. Avant de pouvoir utiliser ces profils à des fins diagnostiques, il est nécessaire de déterminer l'influence de ces différents paramètres (âge, ethnie, sexe) sur le profil de microARN plaquettaire par des études individuelles à plus grande échelle, que ce soit sur biopuce ou par HTS.

L'une des observations importantes effectuées au cours de cette étude est que, malgré la détection de nombreux microARN, un nombre restreint de microARN représente 90 %, en abondance, des microARN retrouvés dans les plaquettes. Parmi ces microARN, l'expression des microARN de la famille let-7 est particulièrement forte, représentant presque 50 % des microARN en abondance relative. Cette forte expression dans les

plaquettes, issues de la différenciation terminale des MK, est en accord avec le rôle de cette famille de microARN dans la différenciation cellulaire (Boyerinas et al., 2010). Son augmentation a notamment été observée au cours de la différenciation neuronale (Skreka et al., 2012) et du développement du système nerveux central chez la souris (Wulczyn et al., 2007). D'autres microARN présents abondamment dans les plaquettes ont été précédemment impliqués dans la myélopoïèse et la mégacaryopoïèse. C'est le cas, par exemple, du microARN miR-223, qui est spécifique aux cellules des lignées myéloïdes. Ce microARN est diminué lors de la différenciation érythrocytaire, mais augmente lors de l'engagement des progéniteurs myéloïde vers la lignée MK (Chen et al., 2004; Felli et al., 2009; Garzon et al., 2006). De manière similaire, d'autres microARN, détectés à des niveaux élevés par HTS dans les plaquettes, diminuent lors de la différenciation érythrocytaire : c'est le cas notamment de miR-103 (Yang et al., 2009) et de miR-221 (Felli et al., 2005). De plus, les microARN du cluster miR-23a/27/24-2, aussi présents à des niveaux élevés dans les plaquettes, sont sous le contrôle du facteur de transcription PU.1, et sont impliqués dans l'engagement des progéniteurs vers la lignée myéloïde (Kong et al., 2010). Ainsi, nombre de microARN fortement exprimés par les plaquettes sont caractéristiques de cellules différenciées de manière terminale, et reflètent l'expression des microARN nécessaires à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en MK. Bien que l'hypothèse d'une origine plasmatisque de ces microARN ne puisse être totalement écartée, ce profil suggère une origine majoritairement mégacaryocytaire pour les microARN présents dans les plaquettes, et résulteraient donc de leur export des MK vers les plaquettes.

Cependant, l'exactitude des profils d'expression de microARN obtenus par séquençage à haut débit a été remise en cause (Linsen et al., 2009). En effet, la ligation de certains microARN est facilitée ou, au contraire, défavorisée par la structure du microARN et, surtout, par son interaction avec les séquences adaptatrices, ce qui amène un biais non négligeable dans la détection des microARN par HTS (Hafner et al., 2011; Jayaprakash et al., 2011; Sorefan et al., 2012; Sun et al., 2011). Ces résultats indiquent que la quantification de l'abondance des microARN présentée ici ne constitue pas un reflet fidèle de l'expression des microARN dans les plaquettes. L'approche par HTS demeure

néanmoins un bon outil pour analyser les microARN les plus abondants, dont la majorité est retrouvée à des niveaux élevés dans les expériences réalisées sur biopuce.

Une autre caractéristique marquante des ARN plaquettaires est la forte abondance des microARN relativement aux ARNm, dont l'expression est plus restreinte. Ce déséquilibre entre l'expression des microARN et des ARNm dans les plaquettes soulève de nombreuses questions, notamment sur leur fonction. Différentes hypothèses peuvent être envisagées. Tout d'abord, cette forte expression peut être le résultat d'un envoi dirigé et préférentiel des microARN des MK vers les pro-plaquettes, puis les plaquettes. Cette hypothèse suggère un rôle spécifique pour ces microARN au sein même des plaquettes, comme dans la régulation de la traduction des ARNm, et ne serait pas le résultat de leur accumulation au terme du processus de différenciation menant à leur formation. L'excès de microARN plaquettaire par rapport aux ARNm présents indique que ces microARN plaquettaires ont probablement un rôle additionnel, qui va au-delà de la régulation de la traduction. Ces microARN pourraient également exercer une fonction extra-plaquettaire ou encore contribuer à la stabilité des ARNm plaquettaires, puisque le niveau de ceux-ci ne peut être maintenu par la transcription *de novo*. D'autre part, cette forte expression des microARN pourrait s'expliquer par la différence de stabilité entre les microARN et ARNm. En effet, les travaux en cours au laboratoire, portant sur le stockage des plaquettes (Patricia Landry, données non-publiées), démontrent une plus grande stabilité des microARN comparativement aux ARNm. Puisque les plaquettes analysées représentent la population globale des plaquettes circulantes, dont la durée de vie va jusqu'à 8 jours, l'âge moyen des plaquettes utilisées est donc de plusieurs jours, ce qui pourrait être suffisant pour observer un tel enrichissement en microARN par rapport aux ARNm. Cette très forte abondance des microARN dans les plaquettes comparativement aux ARNm pourrait donc être le résultat d'un envoi dirigé et spécifique, combiné à une plus grande stabilité comparée aux ARNm.

Les microARN ont une demi-vie pouvant aller jusqu'à plusieurs jours dans les cellules nucléées (Bail et al., 2010; Winter and Diederichs, 2011); cette grande stabilité, observée pour la majorité des microARN, est une caractéristique générale de ces petits ARN non-codants, et n'est donc pas propre aux plaquettes. La stabilité des microARN est dépendante de leur incorporation à une protéine Argonaute (Diederichs and Haber, 2007), qui pourrait favoriser leur protection contre la dégradation par des RNAses. Par ailleurs,

l'association des complexes Ago•microARN avec leurs ARNm cibles pourrait accentuer la stabilité des microARN, comme il a pu être démontré chez le ver (Chatterjee and Grosshans, 2009). Il est donc intéressant de se demander si la présence d'ARNm dans les plaquettes permettrait de stabiliser le niveau des microARN ou si, au contraire, ceux-ci sont régulés par les microARN, que ce soit au niveau de leur stabilité ou de leur traduction.

4.1.2 Identification de nouveaux microARN

Contrairement aux approches par biopuce ou par qPCR, l'avantage majeur de la technologie HTS est qu'elle procure la séquence complète des microARN. Cela nous a permis d'identifier plus de 40 microARN, qui étaient jusqu'alors inconnus, élevant ainsi le nombre total de microARN matures détectés dans les plaquettes à 532. D'autres microARN plaquettaires n'ont probablement pas été détectés en raison du biais induit par le séquençage, ou ont échappé à leur identification en tant que nouveaux microARN, et restent donc à découvrir.

Certains de ces nouveaux microARN sont issus de pré-microARN connus, et correspondent aux brins passagers. La présence de ces nouveaux microARN ainsi que d'autres brins passagers dans les plaquettes est un fait particulièrement remarquable. Contrairement aux cellules nucléées, leur présence transitoire, entre la maturation des pré-microARN et leur dégradation est peu probable dans les plaquettes; les pré-microARN sont peu abondants et ne peuvent pas être renouvelés. Leur présence peut provenir de l'absence de mécanismes de dégradations dans les plaquettes ou, plus vraisemblablement, de leur protection de la dégradation par leur incorporation au sein des complexes miRNP. Cette dernière hypothèse suggère un rôle fonctionnel de ces microARN issus du brin passager, ce qui a déjà été mis en évidence auparavant (Yang et al., 2011).

En outre, l'analyse de nos données de HTS a permis de mettre en évidence une autre source de diversité des microARN matures. Quel que soit leur brin d'origine (5p ou 3p), l'extrémité 5' des microARN plaquettaires est très conservée, alors qu'on observe beaucoup plus de variations au niveau de l'extrémité 3'. Cette variabilité peut s'expliquer par une plus grande variabilité au niveau des sites de clivage et/ou par l'accessibilité de l'extrémité 3' aux exonucléases (Juvvuna et al., 2012) et aux nucléotidyl-transférases (Wyman et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec ce qui a précédemment été observé dans les cellules nucléées (Guo et al., 2012). Cependant, pour une minorité de microARN,

certaines isoformes (isomiR), issues d'un décalage en 5', sont exprimées à des niveaux similaires, voire supérieurs, à la séquence du microARN de référence. C'est le cas notamment de miR-140-3p, dont l'isomiR majoritaire est décalé d'un nt par rapport à la séquence de miR-140-3p déposée dans miRBase. Ce décalage n'est pas négligeable, puisqu'il modifie la région seed du microARN et, par ce fait même, le répertoire d'ARNm qu'il peut réguler, tel que démontré expérimentalement. Cette isoforme décalée en 5', ne ciblant pas les mêmes ARNm, peut donc être considérée comme un nouveau microARN, permettant ainsi d'augmenter la diversité des microARN matures produits à partir d'un même pré-microARN. Ces résultats rejoignent les observations faites sur miR-142 et miR-342 dans les lymphocytes T (Wu et al., 2009), où plusieurs isoformes décalées en 5' coexistent, et sont issues d'un clivage alternatif par Drosha. De manière similaire, une étude par HTS des microARN exprimés dans les cardiomyocytes de rats a démontré que certaines isoformes majoritaires, décalées en 5', ont un répertoire différent d'ARNm cibles (Humphreys et al., 2012). Ainsi, la présence de ces isomiRs, issus du clivage alternatif par Drosha et/ou Dicer, pourrait avoir un rôle majeur dans la fonction des microARN et, en conséquence, être impliquée dans des processus pathologiques.

4.1.3 Modifications des microARN plaquettaires

Comme dans les cellules nucléées, les microARN plaquettaires sont très fréquemment modifiés en 3', par addition terminale de A ou de U. L'étude de ces modifications en fonction de l'origine (5p ou 3p) des microARN, montre que les microARN sont modifiés quelle que soit leur origine, indiquant que la majorité des modifications des microARN surviennent après la maturation des microARN. Cependant, les microARN 3p semblent plus fréquemment adénylés, alors qu'à l'inverse, les microARN 5p semblent plus fréquemment uridylés. Cette observation suggère que l'adénylation se produirait plutôt après la maturation des pré-microARN, tandis que l'uridylation pourrait survenir plus fréquemment au niveau des pré-microARN. Ces résultats concordent avec l'étude des pré-microARN par HTS issus de différentes lignées cellulaires et tissus murins, qui a révélé leur très fréquente uridylation comparé aux autres modifications (Newman et al., 2011).

Afin de déterminer si ces microARN modifiés sont exportés tels quels des MK, ou sont modifiés directement au sein des plaquettes, j'ai réalisé des essais d'adénylation et

d'uridylation de microARN synthétiques *in vitro*. Ces expériences ont mis en évidence une forte activité d'uridylation de petits ARN simple brins par les plaquettes, qui diffère de celle de la lignée mégacaryoblastique humaine Meg-01; celle-ci uridyant de façon préférentielle les duplex de petits ARN. Ces résultats démontrent la capacité des plaquettes à modifier leurs microARN par uridylation, et suggèrent la présence d'enzymes différentes au sein des Meg-01 et des plaquettes. Cette activité d'uridylation pourrait notamment être catalysée par l'uridyl-transférase TUT4, qui est détectée dans les plaquettes par immunobuvardage; TUT4 semble cependant absente, ou présente à de très faibles niveaux dans les Meg-01. D'autres uridyl-transférases sont capables de modifier les microARN (Wyman et al., 2011), et pourraient donc participer à la modification des microARN plaquettaires. Cependant, leur présence dans les plaquettes reste à déterminer, de même que leur contribution aux modifications des microARN plaquettaires.

À l'opposé, aucune activité d'adénylation *in vitro* de microARN synthétiques n'a pu être détectée dans des extraits protéiques de plaquettes humaines. Cependant, il n'est pas exclu que les conditions dans lesquelles les essais enzymatiques ont été réalisés ne soient pas optimales avec les adényl-transférases présentes dans les plaquettes. En effet, la présence de l'adényl-transférase GLD-2 a pu être détectée dans les plaquettes, suggérant que ces dernières ont la capacité d'adényler leurs microARN. Cette enzyme semble être plus exprimée dans les Meg-01 que dans les plaquettes, ce qui pourrait expliquer les différences observées dans les essais enzymatiques.

La fonction des modifications des microARN est, pour le moment, peu connue, et pourrait dépendre du microARN étudié. Cependant, l'implication de l'uridylation des pré-microARN de la famille let-7 dans leur biogenèse a été démontrée. Tandis que l'oligo-uridylation empêche la maturation des pré-microARN et induit leur dégradation dans les cellules souches (Heo et al., 2008), la mono-uridylation de pré-let-7b crée une extrémité protubérante de 2 nt, ce qui facilite sa maturation par le complexe Dicer•TRBP (Heo et al., 2012). Certaines modifications peuvent, par ailleurs, modifier la stabilité des microARN. C'est le cas notamment de miR-122, dont la stabilité dépend de son adénylation par GLD-2 dans les hépatocytes murins (Katoh et al., 2009). De plus, la capacité des microARN à réguler leurs ARNm cibles peut également être affectée par ces modifications, comme c'est le cas pour miR-26, dont l'activité de répression de l'ARNm de Il-6 est levée lorsqu'il est

uridylylé (Jones et al., 2009). L'altération de la biogenèse des pré-microARN à l'intérieur des plaquettes n'est probablement pas critique, car ils semblent très peu abondants comparativement aux microARN matures (Landry et al., 2009). Il se peut donc que la capacité d'uridylation et d'adénylation des microARN, à l'intérieur même des plaquettes, permette à ces dernières de moduler la fonction et la stabilité de leurs microARN.

4.2. Altération du transcriptome plaquettaire chez les patients en insuffisance rénale chronique

4.2.1 Identification de gènes altérés dans les plaquettes de patients en insuffisance rénale chronique

Dans cette étude, le transcriptome plaquettaire a été analysé sur biopuce à ADN en combinant l'ARN de 5 individus en santé, en insuffisance rénale (stade 4) ou sous hémodialyse. Du fait de la diversité génétique ainsi que des multiples pathologies associées à l'insuffisance rénale chronique, les altérations observées ne sont peut-être pas directement en lien avec la pathologie. Il serait donc nécessaire de réaliser une étude similaire en analysant plusieurs donneurs individuellement, et à plus grande échelle, afin de mieux discriminer les gènes altérés dans l'insuffisance rénale, de ceux impliqués dans les pathologies associées (e.g., diabète, hypertension), issus de la variabilité génétique, de facteurs environnementaux, de leurs modes de vie ou de leur médication.

Du fait de leur fonction, certains gènes ont néanmoins attiré mon attention, car leur altération pourrait contribuer aux désordres plaquettaires et à l'augmentation des risques cardiovasculaires. Les gènes codants pour les métallothionéines, telles que MT1X, augmentent chez les patients urémiques et dialysés. L'analyse par qPCR de MT1X, réalisée de manière individuelle, a confirmé l'augmentation de l'expression de ce gène, dont les niveaux sont 5 à 10 fois supérieurs chez certains des patients urémiques ou dialysés, comparés à ceux des donneurs sains. Les gènes codants pour cette famille de protéines sont induits par la présence de métaux lourds (e.g., zinc, cadmium, cuivre, argent, mercure) (Heuchel et al., 1994), lors d'un stress oxydatif (Dalton et al., 1994) et d'inflammation (Ghoshal and Jacob, 2000). Ces protéines, riches en cystéines, lient de nombreux métaux, et sont impliquées dans l'homéostasie des éléments traces (e.g., zinc, cuivre), la

détoxification des métaux lourds (e.g., cadmium, mercure) et la réponse au stress oxydatif (Coyle et al., 2002). Le stress oxydatif (Witko-Sarsat et al., 1996) et l'inflammation (Stenvinkel et al., 1999) sont accrus chez les patients urémiques, et contribuent ainsi à accentuer le risque de complications cardiovasculaires chez ces patients. L'induction de ces gènes dans les plaquettes, et donc probablement au niveau des MK, pourrait donc refléter l'état de stress oxydatif et d'inflammation chronique chez ces patients. En plus des gènes codant pour les métallothionéines, d'autres gènes potentiellement impliqués dans la réponse inflammatoire semblent augmenter, tels que les gènes de la famille *interferon induced transmembrane proteins* (IFITM2 et 3) (voir **Figure 17**). Ces résultats suggèrent que l'inflammation chronique chez les patients urémiques et hémodialysés peut influencer le profil d'expression génique des MK et des plaquettes qui en dérivent.

L'analyse du transcriptome plaquettaire a aussi permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, tels que la *glycine N-acyltransferase-like 2* (GLYATL2), la phospholipase C éta 1 (PLCH1), la *phosphatidylcholine transfer protein* (PCTP), OSBP2 et SERINC1, dont les niveaux semblent altérés en conditions urémiques. Les variations d'expression de ces différents gènes pourraient contribuer à l'altération de la synthèse de lipides bioactifs (Di Minno et al., 1985; Vecino et al., 2002) et de la composition lipidique des membranes (Bonomini et al., 2004; Vecino et al., 1998) observées dans les plaquettes des patients urémiques.

4.2.2 Altération des microARN dans les plaquettes de patients urémiques

L'expression et la fonctionnalité *in vitro* de la protéine Ago2 sont très stables entre tous les sujets testés, en insuffisance rénale ou non. Au contraire, l'expression de TRBP et de Dicer est plus variable, de même que la capacité de clivage de Dicer *in vitro*. Toutefois, la présence et la fonctionnalité de Dicer ont pu être observées chez tous les individus, et ne semble pas altérées par l'insuffisance rénale. Ainsi, l'expression des protéines Dicer et Ago2, et la fonctionnalité de leur complexe *in vitro* dans les plaquettes ne sont pas influencées par l'insuffisance rénale chronique. Ces résultats indiquent que la biogenèse et la fonction des microARN ne sont pas globalement modifiées chez ses patients, et que la voie des microARN demeure fonctionnelle.

De manière similaire aux ARNm, le profil d'expression de microARN dans les plaquettes des patients urémiques et dialysés a été réalisé sur biopuce. Ici encore, les ARN

de 5 donneurs de chaque groupe ont été combinés. Bien que cette stratégie comporte certains avantages indéniables, dont une réduction des coûts, on ne peut cependant pas exclure la possibilité que les résultats obtenus aient été influencés par un sujet, une composante génétique ou une pathologie associée à l'insuffisance rénale en particulier, qui nécessiterait une analyse individuelle, sur un plus grand nombre de donneurs.

L'expression de nombreux microARN semble, malgré tout, altérée dans le groupe de patients urémiques. En effet, parmi les 247 microARN plaquettaires détectés, 21 microARN montraient une élévation ou une diminution de leur expression de plus de 2 fois chez les patients urémiques comparés aux niveaux obtenus chez le groupe de donneurs sains. Les mécanismes de régulation de l'expression des microARN sont multiples : de la transcription à la biogenèse des microARN, en passant par la sélection du brin guide et la stabilité des microARN matures (Krol et al., 2010). De plus, dans le cas des plaquettes, il est possible que l'export des microARN des mégacaryocytes vers les plaquettes, ou l'import du plasma vers les plaquettes, soit aussi régulé (et altéré), ce qui aurait pour effet d'influencer le profil d'expression des microARN plaquettaires. Il est donc difficile de déterminer quels sont les mécanismes qui jouent un rôle prépondérant dans ce processus.

Pour certains microARN, l'expression des deux brins issus d'un même pré-microARN varie dans des sens opposés, ce qui suggère une altération du processus de sélection du brin guide. À l'opposé, les deux brins issus d'un même pré-microARN varient dans un sens similaire pour certains microARN, indiquant que la modification de l'expression de ces microARN est due à des mécanismes de régulation antérieurs à la séparation des deux brins. Les mécanismes impliqués pourraient donc concerner la régulation de la transcription ou de la biogenèse de ces microARN, ou encore l'export du pré-microARN vers les plaquettes. De plus, des microARN appartenant à la même famille, tels que miR-33a et miR-33b, varient de manière concomitante. Étant donné la très grande similarité de séquence des microARN matures appartenant à la même famille, ceux-ci partagent un grand nombre d'ARNm cibles, ce qui suggère un rôle particulier de l'expression de ces microARN. En effet, ces deux microARN, contenus dans les introns de deux facteurs de transcriptions, nommés *sterol regulatory element binding proteins* (SRBP1 et SRBP2), sont, tout comme leurs gènes hôtes, impliqués dans le métabolisme des lipides, plus particulièrement dans l'homéostasie du cholestérol (Rayner et al., 2010).

Ainsi, plusieurs étapes de la voie des microARN pourraient être affectées par les conditions biochimiques sous-jacentes à l'urémie et/ou les pathologies observées chez les patients urémiques, qui contribuent, du même coup, à l'altération du profil de leurs microARN plaquettaires.

De manière remarquable, les profils d'expression des microARN plaquettaires des patients dialysés semblent très peu affectés, contrairement aux patients urémiques. Un seul microARN varie plus de deux fois dans le groupe des patients dialysés comparés au groupe contrôle de donneurs sains, suggérant que la dialyse permet de rétablir efficacement le profil de microARN des patients urémiques. Afin de confirmer ce résultat, il serait intéressant de suivre l'évolution du profil d'expression de microARN, chez des patients urémiques débutant un traitement par dialyse. Par ailleurs, l'accumulation de substances urémiques chez ces patients pourrait influencer la stabilité des microARN plaquettaires. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en incubant des plaquettes de donneurs sains dans du plasma de patients urémiques, afin d'analyser par la suite le profil d'expression des microARN plaquettaires.

4.2.3 Une régulation des ARNm plaquettaires par les microARN?

L'expression des microARN plaquettaires, contrairement à celle des ARNm, semble être corrigée par la dialyse. Cette observation indique que les profils de microARN et d'ARNm plaquettaires varient de manière indépendante. Les microARN ne constituent donc pas un facteur déterminant dans le profil d'expression global des ARNm plaquettaires, indiquant que d'autres mécanismes de régulation sont probablement impliqués. Ceci est en accord avec le mode de fonctionnement des microARN, qui permet une régulation fine de l'expression des gènes et la répression de la traduction de leurs ARNm cibles, sans toutefois mener à leur dégradation. J'ai néanmoins essayé de tirer avantage de ces observations afin d'identifier des ARNm potentiellement régulés par les microARN plaquettaires. Pour cela, la présence des sites de liaison potentiels pour les microARN altérés en condition urémique a été analysée par bioinformatique sur les ARNm dont les niveaux sont restaurés dans le groupe des patients dialysés. Cette stratégie a mené à l'identification de 8 ARNm, dont 6 variaient de manière opposée à l'expression des microARN les ciblant potentiellement, en accord avec la capacité des microARN à déstabiliser leurs ARNm cibles. Parmi ces 6 gènes, je me suis intéressée à la régulation, par

miR-599, de l'ARNm codant pour la *phosphatidylcholine transfer protein* (PCTP). Les essais de gènes rapporteurs ont permis de démontrer la présence d'élément(s) régulateur(s) dans le 3'UTR de ce gène permettant sa répression par miR-599. Quoique faible, cette régulation de PCTP par miR-599 pourrait contribuer à la diminution de l'expression de ce gène observée dans le groupe des patients urémiques. Étant donné que les ARNm peuvent être régulés par plusieurs microARN, qui peuvent varier de manière différente, il est difficile d'identifier des couples microARN:ARNm par cette méthode. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les microARN puissent avoir un rôle stabilisateur des ARNm dans les plaquettes, et pourrait donc au contraire favoriser l'expression de leurs ARNm cibles.

La régulation d'un ARNm par les microARN implique généralement la répression de sa traduction, mais n'induit pas nécessairement sa dégradation (Olsen and Ambros, 1999). Ainsi, l'expression de certaines protéines peut être régulée à la baisse par les microARN, sans que le niveau d'expression de leur ARNm soit diminué. C'est ce qu'ont pu observer Xu et al (2012) dans les plaquettes de patients souffrant de thrombocythémie essentielle. En effet, les auteurs ont observé que, chez ces patients, l'augmentation de l'expression de miR-490-5p est concomitante à la diminution de l'expression protéique de son gène cible *dishevelled associated activator of morphogenesis 1* (DAAM1), sans pour autant altérer l'expression de son ARNm. Les études protéomiques réalisées sur les plaquettes des patients urémiques ou dialysés ont mis en évidence l'altération de certaines protéines chez ces patients (Marques et al., 2010; Walkowiak et al., 2007; Walkowiak et al., 2012). Parmi ces protéines, WDR1 possède un site de liaison pour miR-19b, dont la fonctionnalité a été validée par des essais de gènes rapporteurs. Cette protéine est impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine (Rodal et al., 1999), et son expression est diminuée chez les patients urémiques montrant une faible réactivité plaquettaire (Marques et al., 2010). Bien que les niveaux d'expression de l'ARNm de WDR1 ne soient pas affectés, ni chez les patients urémiques ni chez les patients dialysés, miR-19b augmente de manière marquée chez certains des patients urémiques, ce qui peut mener à la répression de la traduction de l'ARNm de WDR1. Impliqué dans la réactivité plaquettaire à l'épinéphrine (Nagalla et al., 2011), ce microARN pourrait contribuer à l'altération de la réactivité plaquettaire observée chez les patients urémiques.

Nos expériences démontrent donc que miR-19b et miR-599 peuvent réguler l'expression de WDR1 et PCTP respectivement. Cependant, la régulation de ces 2 gènes par ces microARN reste à être démontrée dans les plaquettes, de même qu'au niveau de leurs cellules progénitrices, les MK.

4.3. Caractérisation des microARN et des complexes associés dans les plaquettes au repos et activées

4.3.1 Implication des microARN dans la régulation des ARNm plaquettaires

Afin de pouvoir réguler leurs ARNm cibles, les microARN doivent être incorporés à une protéine Ago et être associés à leurs ARNm via un complexe miRNP. L'association de plusieurs microARN avec Ago2 dans les plaquettes a pu être démontrée, confirmant les résultats obtenus précédemment (Landry et al., 2009). De plus, j'ai pu mettre en évidence l'association de cette protéine avec des ARNm dans les plaquettes *in vitro*, que ce soit par isolation des ARNm par oligo(dT) et détection de la protéine ou, inversement, par la détection d'ARNm suite à l'isolation de la protéine Ago2 par IP. Ces résultats suggèrent que les ARNm plaquettaires sont associés avec les miRNP. Cependant, il est important de préciser que ces expériences ont été réalisées à partir de lysats plaquettaires : l'association de la protéine Ago2 avec les microARN et les ARNm après la lyse ne peut donc pas être totalement exclue. D'autant plus que l'association post-lyse de petits ARN exogènes avec Ago2 a pu être démontrée (Riley et al., 2012). L'association de la protéine Ago2 avec les microARN au sein des plaquettes reste donc à être validée *in vivo*.

Par ailleurs, j'ai démontré que les ARNm codants pour GPIIIa et Cox-1, qui sont synthétisés *de novo* au sein des plaquettes, peuvent être régulés par des microARN plaquettaires parmi les plus abondants. Ces résultats ouvrent donc la possibilité de leur régulation par des microARN au sein même des plaquettes. En accord avec les résultats obtenus par d'autres groupes, j'ai d'ailleurs identifié des gènes dont l'expression protéique ou de l'ARNm au sein des plaquettes varie de manière inverse à l'expression de microARN capables de les réguler (Kondkar et al., 2010; Nagalla et al., 2011; Plé et al., 2012b; Xu et al., 2012). Ces résultats indiquent une possible contribution de ces microARN dans

l'altération de l'expression de ces gènes, mais ne permettent pas de tirer une conclusion quant au rôle des microARN dans la régulation traductionnelle au sein des plaquettes. En effet, la régulation exercée par ces microARN peut aussi être réalisée en amont, au sein des MK.

Quoiqu'avec une très faible efficacité (~8 %), des siARN ont pu être transfectés dans des plaquettes avec succès (Hong et al., 2011). Fait particulièrement intéressant, l'expression de l'ARNm de GAPDH est spécifiquement réduite dans les plaquettes transfectées avec un siARN anti-GAPDH. Ces résultats signifient donc que le siARN exogène a pu être incorporé à l'intérieur d'une protéine Ago au sein des plaquettes, et que ce complexe RISC s'est associé à son ARNm cible pour en diminuer l'expression. Ces résultats indiquent la possible association des complexes miRNP endogènes avec leurs ARNm à l'intérieur des plaquettes, en faveur d'un rôle des microARN dans la régulation des ARNm plaquettaires.

La protéine GW182 est un élément essentiel du complexe effecteur des microARN. Requisite pour permettre la régulation de la traduction par les microARN, la présence de GW182 au sein des plaquettes humaines reste à être démontrée. Cette protéine semble nécessaire pour la répression de gènes par les siARN (Jakymiw et al., 2005). La capacité d'un siARN de cibler un ARNm dans les plaquettes suggère donc la présence de la protéine GW182 ou, alternativement, d'une autre protéine pouvant exercer la même fonction. Ces résultats sont donc en faveur de la présence de complexes ou miRNP fonctionnels, capable de réguler des ARNm au sein des plaquettes.

4.3.2 Rôle extracellulaire des microARN au cours de l'activation plaquettaire

L'analyse des protéines de la voie des microARN a mis en évidence la stabilité de l'expression des protéines Dicer et Ago2 au cours de l'activation plaquettaire, tandis que TRBP diminue très fortement et semble dégradé. Les pré-microARN semblent peu abondants dans les plaquettes, et la majorité des microARN sont sous forme mature, incorporés à une protéine Argonaute; il donc est peu probable que la dégradation de la protéine TRBP, essentiellement impliquée dans la biogenèse des microARN et leur incorporation dans le miRNP, influence beaucoup la fonction des microARN dans les

plaquettes. Cependant, la protéine TRBP est aussi impliquée dans la signalisation cellulaire, notamment par l'inhibition de la PKR (Benkirane et al., 1997). Bien que la présence de cette kinase dans les plaquettes n'ait pas été démontrée jusqu'à maintenant, il reste néanmoins possible que la dégradation de TRBP soit impliquée dans la signalisation au cours de l'activation plaquettaire.

L'analyse du profil d'expression des microARN par biopuce a montré une grande stabilité des microARN plaquettaires au cours de l'activation. Ce résultat, en désaccord avec les résultats obtenus par d'autres groupes (Osman and Falker, 2011), pourrait être lié à l'utilisation de techniques de mesure d'expression différentes. Les conditions expérimentales, dans lesquelles a été réalisée l'activation plaquettaire, ont pu aussi influencer les résultats obtenus. Cependant, le profil de microARN des plaquettes activées corrèle très bien avec ceux d'individus dont les plaquettes sont hyper-réactives à l'épinéphrine (Nagalla et al., 2011). J'ai d'ailleurs observé que les microARN qui varient le plus augmentaient, et appartenaient à deux *clusters* situés sur le chromosome 14. Cependant, leurs pri-microARN ne sont pas détectés dans les plaquettes, et les pré-microARN correspondants se retrouvent à de très faibles niveaux. Ces pré-microARN pourraient néanmoins contribuer à l'augmentation de leurs microARN matures, car ceux-ci sont faiblement exprimés par les plaquettes. L'analyse de ces microARN dans le RLS des plaquettes démontre que ceux-ci sont aussi sécrétés au cours de l'activation. Ces résultats indiquent que leur augmentation n'est pas liée à un enrichissement relatif du fait de leur maintien au sein des plaquettes, contrairement aux autres microARN. Malgré l'utilisation de préparations plaquettaires purifiées pour nos expériences, l'induction de ces microARN dans des leucocytes contaminants pourrait être à l'origine de nos observations. Néanmoins, nous n'avons pas pu détecter les pri-microARN correspondants dans les PMN, qui correspondent aux leucocytes les plus abondants dans le sang.

Par la sécrétion de multiples médiateurs, les plaquettes activées jouent un rôle majeur dans la communication intercellulaire. C'est pourquoi j'ai étudié la capacité des plaquettes à sécréter des microARN au cours de leur activation. Pour la totalité des microARN analysés, une forte augmentation de leur sécrétion suite à la stimulation des plaquettes a pu être mise en évidence. Les plaquettes activées sécrètent notamment des MP et des exosomes (Heijnen et al., 1999), à l'intérieur desquels la présence de microARN a pu

être mise en évidence (Hunter et al., 2008; Valadi et al., 2007). Mes expériences démontrent en effet que les microARN plaquettaires sécrétés sont, pour la majorité, présents dans des MP sédimentables à 20 000 g. La présence de microARN dans les MP dérivées de plaquettes est en accord avec les observations réalisées par un autre groupe (Diehl et al., 2012). Mes travaux démontrent également que la majorité des microARN sont spécifiquement sécrétés par les MP suite à l'activation, car bien que détectables, leur abondance n'augmente pas dans le surnageant de ces MP.

À l'opposé, miR-92a a un profil de sécrétion très différent des autres microARN, puisqu'il ne semble pas être présent dans les MP, mais plutôt dans leur surnageant, suite à l'activation plaquettaire. Sa présence au sein des exosomes dérivés de cellules souches cancéreuses rénales (Grange et al., 2011), suggère que celui-ci pourrait aussi être libéré par les exosomes plaquettaires. Il serait donc très intéressant de réaliser l'analyse différentielle des microARN plaquettaires sécrétés via les MP et les exosomes. Si ce microARN est contenu dans des exosomes, celui-ci provient alors de corps multivésiculaires. S'il est sécrété sous forme libre, il proviendrait de vésicules fusionnant avec la membrane plasmique ou utiliserait un transporteur spécifique. À l'opposé, les microARN contenus dans les MP doivent être localisés à proximité de la membrane plasmique pour être incorporés dans les MP formées par bourgeonnement. Dans un cas comme dans l'autre, ceci suggère un ciblage et une localisation spécifique de ce microARN au sein des plaquettes, qui mériteraient d'être analysés plus en détail.

De plus, la protéine Ago2 est présente dans les MP produites par les plaquettes activées. Cette présence de Ago2 à l'intérieur de ces MP est en accord avec sa localisation périphérique à l'intérieur des plaquettes (Landry et al., 2009). Les essais enzymatiques RISC réalisés sur les MP démontrent par ailleurs que les microARN miR-223 et miR-126 sont associés à Ago2 dans des complexes fonctionnels. Cette association des microARN avec Ago2 pourrait à la fois protéger les microARN de la dégradation, et aussi permettre leur fonctionnalité directement dans les cellules cibles incorporant ces MP. En effet, le transfert horizontal de microARN via les microparticules a pu être démontré. Ainsi, la lignée monocytique THP-1 produit des microparticules enrichies en miR-150, qui régule l'expression de c-Myb et induit la migration des cellules endothéliales HMEC (Zhang et al.,

2010). De manière similaire, les microARN plaquettaires pourraient jouer un rôle majeur dans la communication intercellulaire, via leur sécrétion dans les MP.

5. Perspectives

Suggérant un rôle pour les microARN dans la régulation des ARNm plaquettaires et dans la communication entre les plaquettes et les cellules environnantes, mes travaux soulèvent de nombreuses questions quant à l'origine et à la fonction des microARN à l'intérieur et à l'extérieur des plaquettes.

5.1 Origine des microARN plaquettaires

L'analyse des profils de microARN plaquettaires démontre que beaucoup des microARN très abondants sont caractéristiques de la lignée myéloïde et sont donc probablement issus des MK. Cependant, les plaquettes peuvent incorporer des ARNm exogènes contenus dans des MP (Nilsson et al., 2011), ce qui laisse entrevoir la possibilité d'une origine plasmatisque de certains microARN.

L'analyse du profil de microARN dans des plaquettes obtenues *in vitro* à partir de cellules souches CD34+ ombilicales (Reems et al., 2010), permettrait de discriminer les microARN d'origine plasmatisque des microARN mégacaryocytaires. Bien que la production de plaquettes *in vitro* par cette méthode soit pour le moment restreinte, son utilisation pourrait permettre de répondre à différentes questions soulevées par la présence de microARN au sein des plaquettes, notamment concernant leur enrichissement relatif. En effet, ce système permettrait de déterminer si les microARN sont enrichis par rapport aux ARNm dans les plaquettes naissantes, ou si l'enrichissement en microARN résulte de la dégradation rapide des ARNm. Une autre approche consisterait à utiliser des souris transgéniques, dans lesquelles le gène codant pour Dicer est inactivé par *knock-out*.

L'utilisation de ces cellules CD34+ pourrait de plus permettre d'analyser les mécanismes d'envoi des microARN dans les plaquettes en analysant notamment leur localisation au cours de leur production, par des techniques d'hybridation *in situ* basées sur des sondes LNA (Nelson et al., 2006). De plus, la sélectivité de ce processus vis-à-vis de certains microARN pourrait être déterminée en analysant les profils de microARN au sein des MK matures et des plaquettes produites *in vitro*.

Par ailleurs, nous ne savons pas à ce jour sous quelle forme sont envoyés ces microARN des MK dans les pro-plaquettes, puis dans les plaquettes. La présence de ces pré-microARN, bien que très peu abondants, ainsi que celle du complexe Dicer•TRBP,

ouvre la possibilité d'un envoi des microARN sous forme de pré-microARN, dont la maturation pourrait se dérouler dans les pro-plaquettes et les plaquettes naissantes, du moins pour certains microARN.

5.2 Fonction des microARN à l'intérieur des plaquettes

À l'intérieur des plaquettes, les complexes impliqués dans la fonction des microARN n'ont pas été complètement caractérisés. Grâce à l'acquisition récente d'un anticorps anti-Ago1 (Beitzinger et al., 2007), j'ai pu démontrer que cette protéine était également présente dans les plaquettes humaines (données non-présentées). Mes premières expériences semblent indiquer que cette protéine n'est pas exportée dans les MP de plaquettes activées. Ce résultat, à confirmer, soulève la possibilité d'une fonction différente des protéines Ago1 et Ago2 au sein des plaquettes. Alors qu'Ago2 est présent à la périphérie, proche de la membrane plasmique des plaquettes (Landry et al., 2009), la localisation de la protéine Ago1 n'a pas été étudiée et pourrait être très différente. De plus, la présence de la protéine GW182 n'a pas été élucidée. Sa présence et son association aux ARNm et aux protéines Ago sont fondamentales pour que les microARN puissent exercer leur fonction répressive. Cela mériterait d'être étudié de plus près, afin de confirmer la possible implication des microARN plaquettaires dans la régulation de la traduction. De même, la présence et la fonctionnalité des protéines effectrices de la répression par les microARN, telles que les déadénylases, les enzymes de *decapping* et les exonucléases, au sein des plaquettes humaines, demeurent à explorer.

Bien que de nombreuses évidences soient en faveur d'une fonction des microARN dans la régulation des ARNm plaquettaires, celle-ci reste à démontrer. Différentes pistes sont envisageables pour déterminer le rôle des microARN au sein des plaquettes.

Afin d'étudier la fonction des microARN de manière globale, ou la fonction d'un microARN en particulier, on a généralement recours à des techniques génétiques permettant d'empêcher leur fonction (e.g. Antagomirs, ARNi ou délétion de gènes). Afin de déterminer si les microARN régulent effectivement la traduction des ARNm au sein des plaquettes, il serait intéressant d'avoir recours à ces techniques. Cependant, elles sont difficilement applicables aux plaquettes, qui sont anucléées, mais pourraient être appliquées aux MK produits à partir de cellules CD34⁺ ou induit dans des MK de souris mutantes.

Cependant, la suppression des protéines impliquées dans la voie des microARN, pourrait elle-même altérer la production des plaquettes, étant donné le rôle central des microARN dans la différenciation et la maturation des MK (Garzon et al., 2006). L'inhibition spécifique de certains microARN dans les MK de souris pourrait de plus permettre d'identifier le rôle spécifique de chacun de ces microARN. Cependant, ces techniques ne permettraient pas de discriminer la fonction des microARN dans la régulation protéique à l'intérieur des plaquettes de leur fonction dans les MK.

Les travaux de transfection de siARN dans les plaquettes ouvrent la voie à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des microARN, tels que les antagomirs (Hutvagner et al., 2004; Meister et al., 2004a), afin d'étudier la fonction des microARN de manière individuelle, directement au sein des plaquettes. Cependant, l'efficacité de la transfection est à ce jour trop limitée, et son effet sur la fonction plaquettaire reste à déterminer (Hong et al., 2011).

Il serait aussi possible d'utiliser des molécules chimiques ayant la propriété d'altérer la voie des microARN. Certaines de ces molécules inhibent l'incorporation des microARN ou siARN au sein des protéines Argonaute, telles que l'*aurintricarboxylic acid* (ATA) (Tan et al., 2012) ou la tryptaflavine (Watashi et al., 2010). D'autres altèrent la biogenèse des microARN : tandis que la poly-L-lysine inhibe l'interaction entre Dicer et les pré-microARN (Watashi et al., 2010), l'enonaxine est un agoniste de la biogenèse des microARN (Shan et al., 2008). L'utilisation de ces molécules, au cours de la production de plaquettes *in vitro*, permettrait de voir si l'import des microARN dépend de leur incorporation au sein de miRNP, ou se fait à des étapes plus précoces (e.g. pré- ou primicroARN). Cependant, il n'existe pas à ma connaissance de molécules inhibant directement l'action des miRNP matures. La découverte de telles molécules permettrait une grande avancée dans la compréhension du rôle de ces miRNP au sein des plaquettes.

5.3 Fonction extraplaquettaire des microARN

La capacité des plaquettes à sécréter des microARN a été mise en évidence au cours de ces travaux. Ces microARN sont principalement exportés via des MP, dans lesquels ils peuvent être associés à Ago2. L'aspect de la bande correspondant à Ago2 observée par WB dans les plaquettes et les MP est un peu différent. Il est possible que seule une sous-

population d'Ago2, modifiée de manière post-traductionnelle soit envoyée dans ces MP. La phosphorylation (Rüdel et al., 2011), la prolyl-hydroxylation (Qi et al., 2008) et l'ubiquitination (Rybak et al., 2009) de Ago2 ont pu être démontrées. L'une de ces modifications, ou bien une autre (e.g. acétylation, glycosylation, sumoylation), pourrait être nécessaire au ciblage de la protéine Ago2 dans les MP. L'analyse des modifications post-traductionnelles de la protéine Ago2 dans les plaquettes et les MP permettrait de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, mes résultats suggèrent que miR-92a est sécrété par un mécanisme différent des autres microARN, puisqu'il est retrouvé dans le surnageant, et non dans les MP. La sécrétion de ce microARN sous forme libre ou dans des vésicules plus petites, telles que les exosomes, reste à déterminer. De plus, le contenu en microARN de ces différentes fractions mériterait d'être analysé de manière exhaustive. La comparaison des microARN plaquettaires contenus dans les MP, les exosomes et sous forme libre pourrait permettre d'identifier des rôles différents de ces microARN. En effet, ces microARN sécrétés sont certainement impliqués dans la régulation de l'expression génique des cellules environnantes, notamment les cellules endothéliales et les leucocytes. Leur sécrétion sous différentes formes pourrait faciliter le ciblage et leur incorporation préférentielle dans certains types cellulaires.

L'implication des microARN plaquettaires dans la régulation de l'expression et la fonction des cellules environnante serait une voie très intéressante à poursuivre, car elle représente une nouvelle forme de communication entre les plaquettes et leur environnement.

6. Conclusion

Au cours de ce projet, je me suis concentrée à mieux caractériser les microARN plaquettaires, afin de déterminer leur rôle dans un contexte pathologique et physiologique. L'analyse par HTS a permis à la fois d'identifier de nouveaux microARN et de montrer la diversité de ces microARN plaquettaires. Le profil de microARN plaquettaires est caractérisé par la très forte abondance de microARN impliqués à différentes étapes de la différenciation des cellules hématopoïétiques vers la formation de MK matures, ce qui est favorable à une origine majoritairement mégacaryocytaire des microARN plaquettaires. J'ai, par ailleurs, mis en évidence la présence de nucléotidyl-transférases au sein des plaquettes, ce qui suggère leur capacité à moduler la fonction et la stabilité de ces microARN par leur modification terminale.

Désirant transposer ces observations dans un contexte pathologique, je me suis intéressée au transcriptome plaquettaire des patients en insuffisance rénale. Bien que les complexes impliqués dans la biogenèse et la fonction des microARN soient fonctionnels, une forte altération du profil de microARN chez les patients urémiques a pu être observée, contrairement au groupe des patients dialysés. Les profils d'ARNm sont aussi altérés chez les patients en insuffisance rénale, qu'ils soient dialysés ou non. Néanmoins, deux couples de microARN:ARNm altérés chez les patients urémiques ont pu être mis en évidence, suggérant la possible contribution des microARN dans la régulation des ARNm et les troubles de la fonction plaquettaire associés à l'urémie.

J'ai pu également mettre en évidence l'association des complexes miRNP avec les ARNm dans les plaquettes *in vitro*, ce qui milite en faveur de leur rôle dans la régulation des ARNm plaquettaires. Au cours de l'activation plaquettaire, le profil des microARN demeure stable. Néanmoins, les plaquettes activées sécrètent des microARN, essentiellement via des MP. Ces microARN sécrétés, associés à Ago2 dans un complexe fonctionnel, pourraient réguler l'expression génique de cellules cibles, ouvrant la voie à un nouveau mode de communication entre les plaquettes et les cellules environnantes. Globalement, mes résultats laissent entrevoir deux rôles majeurs pour les microARN plaquettaires, soit dans la régulation de ses ARNm et dans la communication intercellulaire, du fait de leur sécrétion.

7. Bibliographie

- Aggarwal, A., Kabbani, S.S., Rimmer, J.M., Gennari, F.J., Taatjes, D.J., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2002). Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis* 40, 315-322.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Allen, R.D., Zacharski, L.R., Widirstky, S.T., Rosenstein, R., Zaitlin, L.M., and Burgess, D.R. (1979). Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 83, 126-142.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., *et al.* (2003). A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9, 277-279.
- Aqel, N.M., Ball, R.Y., Waldmann, H., and Mitchinson, M.J. (1984). Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 53, 265-271.
- Arinobu, Y., Mizuno, S.-i., Chong, Y., Shigematsu, H., Iino, T., Iwasaki, H., Graf, T., Mayfield, R., Chan, S., Kastner, P., *et al.* (2007). Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell* 1, 416-427.
- Arthur, J.F., Gardiner, E.E., Matzaris, M., Taylor, S.G., Wijeyewickrema, L., Ozaki, Y., Kahn, M.L., Andrews, R.K., and Berndt, M.C. (2005). Glycoprotein VI is associated with GPIb-IX-V on the membrane of resting and activated platelets. *Thromb Haemost* 93, 716-723.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10, 64-71.
- Bach, R.R. (2006). Tissue Factor Encryption. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 456-461.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., and Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16, 1032-1039.
- Bailey, K., Bettelheim, F.R., Lorand, L., and Middlebrook, W.R. (1951). Action of Thrombin in the Clotting of Fibrinogen. *Nature* 167, 233-234.

- Baillat, D., and Shiekhatar, R. (2009). Functional Dissection of the Human TNRC6 (GW182-Related) Family of Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 29, 4144-4155.
- 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.
- 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. *Int Rev Cytol* 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.
- Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J.Y., Kremmer, E., and Meister, G. (2007). Identification of Human microRNA Targets From Isolated Argonaute Protein Complexes. *RNA Biology* 4, 76-84.
- Benigni, A., Boccardo, P., Galbusera, M., Monteagudo, J., De Marco, L., Remuzzi, G., and Ruggeri, Z.M. (1993). Reversible activation defect of the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex in patients with uremia. *Am J Kidney Dis* 22, 668-676.
- Benkirane, M., Neuveut, C., Chun, R.F., Smith, S.M., Samuel, C.E., Gatignol, A., and Jeang, K.-T. (1997). Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 16, 611-624.
- Bennett, J.S., and Vilaire, G. (1979). Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *The Journal of Clinical Investigation* 64, 1393-1401.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell* 28, 328-336.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36, D149-153.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. (1984). Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* 160, 618-623.
- 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.

- Blakaj, A., and Lin, H. (2008). Piecing Together the Mosaic of Early Mammalian Development through MicroRNAs. *Journal of Biological Chemistry* 283, 9505-9508.
- Blake, R.A., Schieven, G.L., and Watson, S.P. (1994). Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 2 but not phospholipase C- γ 1 in human platelets. *FEBS Letters* 353, 212-216.
- BMJ (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324, 71-86.
- Boccardo, P., Remuzzi, G., and Galbusera, M. (2004). Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost* 30, 579-589.
- Boilard, 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.
- Bonomini, M., Dottori, S., Amoroso, L., Arduini, A., and Sirolli, V. (2004). Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2, 1275-1281.
- Booyse, F., and Rafelson, M., E. (1967). In vitro Incorporation of Amino-acids into the Contractile Protein of Human Blood Platelets. *Nature* 215, 283.
- Booyse, F.M., and Rafelson, M.E., Jr. (1968). Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 166, 689-697.
- Bouchard, B.A., Krudysz-Amblo, J., and Butenas, S. (2012). Platelet tissue factor is not expressed transiently after platelet activation. *Blood* 119, 4338-4339.
- Bouchard, B.A., Mann, K.G., and Butenas, S. (2010). No evidence for tissue factor on platelets. *Blood* 116, 854-855.
- Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer* 17, F19-36.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brase, J., Wuttig, D., Kuner, R., and Sultmann, H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular Cancer* 9, 306.
- Brass, L.F., and Joseph, S.K. (1985). A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. *Journal of Biological Chemistry* 260, 15172-15179.
- Brass, L.F., Shaller, C.C., and Belmonte, E.J. (1987). Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *The Journal of Clinical Investigation* 79, 1269-1275.

- Briddell, R.A., Brandt, J.E., Straneva, J.E., Srour, E.F., and Hoffman, R. (1989). Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* *74*, 145-151.
- Broekman, M.J., Handin, R.I., and Cohen, P. (1975). Distribution of fibrinogen, and platelet factors 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets. *Br J Haematol* *31*, 51-55.
- Brogren, H., Karlsson, L., Andersson, M., Wang, L., Erlinge, D., and Jern, S. (2004). Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* *104*, 3943-3948.
- Broos, K., De Meyer, S.F., Feys, H.B., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2012). Blood platelet biochemistry. *Thrombosis Research* *129*, 245-249.
- Brummel, K.E., Paradis, S.G., Butenas, S., and Mann, K.G. (2002). Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* *100*, 148-152.
- Bugert, P., Dugrillon, A., Gunaydin, A., Eichler, H., and Kluter, H. (2003). Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization. *Thromb Haemost* *90*, 738-748.
- 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.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biology* *8*, 158-177.
- Buscaglia, L.E., and Li, Y. (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer* *30*, 371-380.
- Butenas, S., Mann, K.G., and Butenas, B. (2002). Blood Coagulation. *Biochemistry (Moscow)* *67*, 3-12.
- 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.
- 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.
- Castillo, R., Lozano, T., Escolar, G., Revert, L., Lopez, J., and Ordinas, A. (1986). Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* *68*, 337-342.
- Cecchetti, L., Tolley, N.D., Michetti, N., Bury, L., Weyrich, A.S., and Gresele, P. (2011). Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood* *118*, 1903-1911.

- Cermak, J., Key, N.S., Bach, R.R., Balla, J., Jacob, H.S., and Vercellotti, G.M. (1993). C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* *82*, 513-520.
- Cesarman-Maus, G., and Hajjar, K.A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* *129*, 307-321.
- Chakravarthy, S., Sternberg, S.H., Kellenberger, C.A., and Doudna, J.A. (2010). Substrate-Specific Kinetics of Dicer-Catalyzed RNA Processing. *Journal of Molecular Biology* *404*, 392-402.
- Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *461*, 546-549.
- 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.-Y.A., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.-B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1160-1166.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* *303*, 83-86.
- Chen, H., and Kahn, M.L. (2003). Reciprocal signaling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 4764-4777.
- Chen, J., Lai, F., and Niswander, L. (2012). The ubiquitin ligase mLin41 temporally promotes neural progenitor cell maintenance through FGF signaling. *Genes & Development* *26*, 803-815.
- Chendrimada, T.P., Gregory Richard I., Kumaraswamy Easwari, Norman Jessica, Cooch Neil, Nishikura Kazuko, Shiekhatar Ramin (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.
- Chesney, C.M., Pifer, D., and Colman, R.W. (1981). Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 5180-5184.
- Cheung, A.K., Sarnak, M.J., Yan, G., Dwyer, J.T., Heyka, R.J., Rocco, M.V., Teehan, B.P., and Levey, A.S. (2000). Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* *58*, 353-362.
- Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* *460*, 479-486.
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.-y., Lau, T.-k., Chiu, R.W.K., and Dennis Lo, Y.M. (2008). Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* *54*, 482-490.
- Chu, C.-y., and Rana, T.M. (2006). Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLoS Biol* *4*, e210.

- 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.
- Clemetson, K.J. (2012). Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research* *129*, 220-224.
- Cleveland, W.S. (1979). Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* *74*, 829-836.
- Collins, A.J., Li, S., Ma, J.Z., and Herzog, C. (2001). Cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis* *38*, S26-29.
- Coppinger, J.A., Cagney, G., Toomey, S., Kislinger, T., Belton, O., McRedmond, J.P., Cahill, D.J., Emili, A., Fitzgerald, D.J., and Maguire, P.B. (2004). Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* *103*, 2096-2104.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., and Rofe, A.M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* *59*, 627-647.
- Cramer, E.M., Meyer, D., le Menn, R., and Breton-Gorius, J. (1985). Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* *66*, 710-713.
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., and Pinto, Y.M. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* *110*, 483-495.
- Creighton, C.J., Benham, A.L., Zhu, H., Khan, M.F., Reid, J.G., Nagaraja, A.K., Fountain, M.D., Dziadek, O., Han, D., Ma, L., *et al.* (2010). Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One* *5*, e9637.
- Creighton, C.J., Reid, J.G., and Gunaratne, P.H. (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform* *10*, 490-497.
- Cui, M.Z. (2011). Lysophosphatidic acid effects on atherosclerosis and thrombosis. *Clin Lipidol* *6*, 413-426.
- Cutler, L., Rodan, G., and Feinstein, M.B. (1978). Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* *542*, 357-371.
- Dalton, T., Palmiter, R.D., and Andrews, G.K. (1994). Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Research* *22*, 5016-5023.
- Davie, E.W., and Ratnoff, O.D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* *145*, 1310-1312.
- 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., Carver-Moore, K., Luoh, S.M., Ryan, A., Dowd, M., Eaton, D.L., and Moore, M.W. (1996). Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *The Journal of Experimental Medicine* *183*, 651-656.
- 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.
- Debili, N., Coulombel, L., Croisille, L., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1996). Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* *88*, 1284-1296.
- Denis, M.M., Tolley, N.D., Bunting, M., Schwertz, H.r., 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.
- Di Minno, G., Martinez, J., McKean, M.-L., De La Rosa, J., Burke, J.F., and Murphy, S. (1985). Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *The American Journal of Medicine* *79*, 552-559.
- Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell* *131*, 1097-1108.
- Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J.B.M., *et al.* (2012). Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular Research* *93*, 633-644.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. *Science* *336*, 237-240.
- Dopheide, S.M., Maxwell, M.J., and Jackson, S.P. (2002). Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* *99*, 159-167.
- Drake, T.A., Morrissey, J.H., and Edgington, T.S. (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American journal of pathology* *134*, 1087-1097.
- 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.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., and Furie, B.C. (2006). Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* *107*, 3902-3906.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Research* *40*, 9850-9862.
- Duttagupta, R., DiRienzo, S., Jiang, R., Bowers, J., Gollub, J., Kao, J., Kearney, K., Rudolph, D., Dawany, N.B., Showe, M.K., *et al.* (2012). Genome-Wide Maps of Circulating miRNA Biomarkers for Ulcerative Colitis. *PLoS One* *7*, e31241.

Eaton, D., Rodriguez, H., and Vehar, G.A. (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 25, 505-512.

Edelstein, L.C., and Bray, P.F. (2011). MicroRNAs in platelet production and activation. *Blood* 117, 5289-5296.

Eknoyan, G., and Brown, C.H., 3rd (1981). Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. Evidence for decreased platelet serotonin, adenosine diphosphate and Mg-dependent adenosine triphosphatase. *Am J Nephrol* 1, 17-23.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15, 188-200.

Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, Astrid D., Greene, Emily M., Hannon, Gregory J., and Joshua-Tor, L. (2012). The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* 150, 100-110.

Escolar, G., Diaz-Ricart, M., Cases, A., Castillo, R., Ordinas, A., and White, J.G. (1993). Abnormal cytoskeletal assembly in platelets from uremic patients. *Am J Pathol* 143, 823-831.

Escolar, G., and White, J.G. (1991). The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* 17, 467-485; discussion 486-495.

Evangelista, V., Manarini, S., Di Santo, A., Capone, M.L., Ricciotti, E., Di Francesco, L., Tacconelli, S., Sacchetti, A., D'Angelo, S., Scilimati, A., *et al.* (2006). De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res* 98, 593-595.

Eystathioy, T., Chan, E.K.L., 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., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., *et al.* (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1211-1217.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351-379.

Fabre, J.-E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M., and Koller, B.H. (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 5, 1199-1202.

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/EBP α Regulates Human Granulopoiesis. *Cell* 123, 819-831.

- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., *et al.* (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18081-18086.
- Felli, N., Pedini, F., Romania, P., Biffoni, M., Morsilli, O., Castelli, G., Santoro, S., Chicarella, S., Sorrentino, A., Peschle, C., *et al.* (2009). MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* *94*, 479-486.
- Fesler, P., and Mimran, A. (2011). Estimation of Glomerular Filtration Rate: What Are the Pitfalls? *Current Hypertension Reports* *13*, 116-121.
- 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.
- 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.
- Fleck, R.A., Rao, L.V.M., Rapaport, S.I., and Varki, N. (1990). Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thrombosis Research* *59*, 421-437.
- Flores-jasso, C.F., Arenas-huerta, C., Jose Luis, R., Contreras-cubas, C., Alejandra, C., and Vaca, L. (2009). First step in pre-miRNAs processing by human Dicer. *Acta Pharmacol Sin* *30*, 1177-1185.
- Foley, R.N., Murray, A.M., Li, S., Herzog, C.A., McBean, A.M., Eggers, P.W., and Collins, A.J. (2005). Chronic Kidney Disease and the Risk for Cardiovascular Disease, Renal Replacement, and Death in the United States Medicare Population, 1998 to 1999. *Journal of the American Society of Nephrology* *16*, 489-495.
- Förstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2007). *Drosophila* microRNAs Are Sorted into Functionally Distinct Argonaute Complexes after Production by Dicer-1. *Cell* *130*, 287-297.
- Foster, M., and Samman, S. (2010). Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* *13*, 1549-1573.
- Frank, F., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2010). Structural basis for 5[prime]-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* *465*, 818-822.
- Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., and Wagner, D.D. (2000). P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (Psgl-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* *191*, 1413-1422.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* *19*, 92-105.
- Fujii, H., Nakai, K., and Fukagawa, M. (2011). Role of Oxidative Stress and Indoxyl Sulfate in Progression of Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* *15*, 125-128.

- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, 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. *Nat Cell Biol* 9, 604-611.
- Fukunaga, R., Han, Bo W., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., and Zamore, Phillip D. (2012). Dicer Partner Proteins Tune the Length of Mature miRNAs in Flies and Mammals. *Cell* 151, 533-546.
- Furie, B., and Furie, B.C. (2008). Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine* 359, 938-949.
- Gailani, D., and Broze, G.J. (1991). Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 253, 909-912.
- Garcia, A., Quinton, T.M., Dorsam, R.T., and Kunapuli, S.P. (2005a). Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood* 106, 3410-3414.
- Garcia, B.A., Smalley, D.M., Cho, Shabanowitz, J., Ley, K., and Hunt, D.F. (2005b). The Platelet Microparticle Proteome. *Journal of Proteome Research* 4, 1516-1521.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., *et al.* (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5078-5083.
- Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schömig, A., and Neumann, F.-J. (2000). Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148, 75-85.
- Gerrard, J.M., White, J.G., and Peterson, D.A. (1978). The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thromb Haemost* 40, 224-231.
- Ghani, S., Riemke, P., Schönheit, J., Lenze, D., Stumm, J., Hoogenkamp, M., Lagendijk, A., Heinz, S., Bonifer, C., Bakkers, J., *et al.* (2011). Macrophage development from HSCs requires PU.1-coordinated microRNA expression. *Blood* 118, 2275-2284.
- Ghoshal, K., and Jacob, S.T. (2000). Regulation of metallothionein gene expression. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Academic Press), pp. 357-384.
- Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol* 14, 1314-1321.
- Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11, 1143-1149.
- Giesen, P.L.A., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roqué, M., Fallon, J.T., Badimon, J.J., Himber, J., Riederer, M.A., and Nemerson, Y. (1999). Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 2311-2315.

- Glass, A., Henning, J., Karopka, T., Scheel, T., Bansemer, S., Koczan, D., Gierl, L., Rolfs, A., and Gimsa, U. (2005). Representation of individual gene expression in completely pooled mRNA samples. *Biosci Biotechnol Biochem* *69*, 1098-1103.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* *18*, 1692-1701.
- Gnatenko, D.V., Dunn, J.J., McCorkle, S.R., Weissmann, D., Perrotta, P.L., and Bahou, W.F. (2003). Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* *101*, 2285-2293.
- González-González, E., López-Casas, P.P., and del Mazo, J. (2008). The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* *1779*, 306-311.
- Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M.C., Tetta, C., Bussolati, B., and Camussi, G. (2011). Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer Research* *71*, 5346-5356.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* *123*, 631-640.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* *32*, D109-111.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* *36*, D154-158.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., 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.
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J.J., and Kay, M.A. (2011). Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 9208-9213.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* *466*, 835-840.
- Guo, L., Li, H., Lu, J., Yang, Q., Ge, Q., Gu, W., Bai, Y., and Lu, Z. (2012). Tracking miRNA precursor metabolic products and processing sites through completely analyzing high-throughput sequencing data. *Molecular Biology Reports* *39*, 2031-2038.
- Hafner, M., Renwick, N., Brown, M., Mihailović, A., Holoch, D., Lin, C., Pena, J.T.G., Nusbaum, J.D., Morozov, P., Ludwig, J., *et al.* (2011). RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA* *17*, 1697-1712.

- Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1021-1025.
- 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.
- Hartwig, J., and Italiano, J. (2003). The birth of the platelet. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1, 1580-1586.
- Hassan, M.I., Saxena, A., and Ahmad, F. (2012). Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 23, 11-22.
- Hatsukami, T.S., Ross, R., Polissar, N.L., and Yuan, C. (2000). Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* 102, 959-964.
- Hawker, R.J., Hawker, L.M., and Wilkinson, A.R. (1980). Indium (111In)-labelled human platelets: optimal method. *Clinical science (London, England : 1979)* 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.
- Heijnen, H.F.G., 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 α -Granules. *Blood* 94, 3791-3799.
- Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., and Kroczeck, R.A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-594.
- Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.-J., Park, J.-E., Kwon, S.C., Chang, H., and Kim, V.N. (2012). Mono-Uridylation of Pre-MicroRNA as a Key Step in the Biogenesis of Group II let-7 MicroRNAs. *Cell* 151, 521-532.
- 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.
- Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 696-708.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., and Schaffner, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO journal* 13, 2870.
- Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S., and Narumiya, S. (1991). Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* 349, 617-620.

- 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. *EMBO J* *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.
- Hu, H., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y., Chen, W., and Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* *10*, 413.
- Huang, Z., Rahman, M.F.U., Jiang, L., Xie, H., Hu, H., Lui, W.O., and Li, N. (2012). Thrombin induces de novo protein synthesis of stromal cell-derived factor-1 α but not angiostatin in human platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *10*, 2202-2205.
- 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., Hynes, C.J., Patel, H.R., Wei, G.H., Cannon, L., Fatkin, D., Suter, C.M., Clancy, J.L., and Preiss, T. (2012). Complexity of Murine Cardiomyocyte miRNA Biogenesis, Sequence Variant Expression and Function. *PLoS One* *7*, e30933.
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., *et al.* (2008). Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One* *3*, e3694.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* *12*, 99-110.
- Hutvagner, G. (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters* *579*, 5850-5857.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function. *PLoS Biol* *2*, e98.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Ichinohe, T., Takayama, H., Ezumi, Y., Arai, M., Yamamoto, N., Takahashi, H., and Okuma, M. (1997). Collagen-stimulated Activation of Syk but Not c-Src Is Severely Compromised in Human Platelets Lacking Membrane Glycoprotein VI. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 63-68.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Dean, W.L., Frampton, J., and Watson, S.P. (2003). Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC $\gamma 2$. *The Journal of Cell Biology* *160*, 769-780.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O.J.T., Moroi, M., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., Ozaki, Y., and Watson, S.P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6\beta 1$ -dependent activation of GPVI. *Blood* *107*, 1405-1412.

- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Italiano Jr, J.E., and Battinelli, E.M. (2009). Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 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.
- 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.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Jantzen, H.M., Gousset, L., Bhaskar, V., Vincent, D., Tai, A., Reynolds, E.E., and Conley, P.B. (1999). Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost* 81, 111-117.
- Jayaprakash, A.D., Jabado, O., Brown, B.D., and Sachidanandam, R. (2011). Identification and remediation of biases in the activity of RNA ligases in small-RNA deep sequencing. *Nucleic Acids Research* 39, e141.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
- Johnston, M., Geoffroy, M.-C., Sobala, A., Hay, R., and Hutvagner, G. (2010). HSP90 Protein Stabilizes Unloaded Argonaute Complexes and Microscopic P-bodies in Human Cells. *Molecular Biology of the Cell* 21, 1462-1469.
- 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 Mol Biol* 788, 341-366.
- Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S., Ivanov, A.R., Wolf, D.A., and Mizgerd, J.P. (2009). Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol* 11, 1157-1163.
- Jung, S.M., and Moroi, M. (2000). Signal-transducing Mechanisms Involved in Activation of the Platelet Collagen Receptor Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Journal of Biological Chemistry* 275, 8016-8026.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A., *et al.* (2007). Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science* 317, 1767-1770.
- Juvvuna, P.K., Khandelia, P., Lee, L.M., and Makeyev, E.V. (2012). Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Research* 40, 6808-6820.

- Kabbani, S.S., Watkins, M.W., Ashikaga, T., Terrien, E.F., Holoch, P.A., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2001). Platelet reactivity characterized prospectively: a determinant of outcome 90 days after percutaneous coronary intervention. *Circulation* *104*, 181-186.
- Kadota, Y., Suzuki, S., Ideta, S., Fukinbara, Y., Kawakami, T., Imai, H., Nakagawa, Y., and Sato, M. (2010). Enhanced metallothionein gene expression induced by mitochondrial oxidative stress is reduced in phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-overexpressed cells. *European Journal of Pharmacology* *626*, 166-170.
- Kahn, M.L., Zheng, Y.-W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V., Tam, C., and Coughlin, S.R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* *394*, 690-694.
- Kaplan, Z.S., and Jackson, S.P. (2011). The Role of Platelets in Atherothrombosis. *ASH Education Program Book 2011*, 51-61.
- Karpatkin, S., and Charnatz, A. (1969). Heterogeneity of human Platelets: I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *The Journal of Clinical Investigation* *48*, 1073-1082.
- Kasirer-Friede, A., Cozzi, M.R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z.M., and Shattil, S.J. (2004). Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors. *Blood* *103*, 3403-3411.
- Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., and Baba, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* *23*, 433-438.
- Kaw, D., and Malhotra, D. (2006). Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial* *19*, 317-322.
- Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2007a). RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep* *8*, 763-769.
- Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2007b). Redirection of Silencing Targets by Adenosine-to-Inosine Editing of miRNAs. *Science* *315*, 1137-1140.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrieling, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., *et al.* (2007). RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.
- Kelen, K.V.D., Beyaert, R., Inzé, D., and Veylder, L.D. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* *44*, 143-168.
- Kendzierski, C., Irizarry, R.A., Chen, K.S., Haag, J.D., and Gould, M.N. (2005). On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4252-4257.
- Kendzierski, C.M., Zhang, Y., Lan, H., and Attie, A.D. (2003). The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* *4*, 465-477.

- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J.-P., Vainchenker, W., and Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry* 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.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26, 775-783.
- Kisiel, W. (1979). Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by α -thrombin. *Journal of Clinical Investigation* 64, 761.
- 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* 8, 369-378.
- Kong, K.Y., Owens, K.S., Rogers, J.H., Mullenix, J., Velu, C.S., Grimes, H.L., and Dahl, R. (2010). MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development. *Experimental hematology* 38, 629-640 e621.
- Koscianska, E., Starega-Roslan, J., and Krzyzosiak, W.J. (2011). The Role of Dicer Protein Partners in the Processing of MicroRNA Precursors. *PLoS One* 6, e28548.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., *et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 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.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology* 12, 735-739.

- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., *et al.* (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* *129*, 1401-1414.
- Landry, P., Plante, I., Ouellet, D.L., Perron, M.P., Rousseau, G., and Provost, P. (2009). Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 961-966.
- 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. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 436-440.
- Lee, H.-C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S.K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z.A., Freitag, M., Selker, E.U., Mello, C.C., *et al.* (2010). Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. *Molecular Cell* *38*, 803-814.
- Lee, H.Y., and Doudna, J.A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA* *18*, 2012-2019.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 862-864.
- 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. *EMBO J* *25*, 522-532.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylation, and Exonucleolytic Activities. *Molecular Cell* *12*, 675-687.
- Lenting, P.J., Donath, M.J., van Mourik, J.A., and Mertens, K. (1994). Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 7150-7155.
- Lentz, B.R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in Lipid Research* *42*, 423-438.
- Léon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor-null mice. *The Journal of Clinical Investigation* *104*, 1731-1737.
- Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* *130*, 461-470.

- Levin, A., Hemmelgarn, B., Culleton, B., Tobe, S., McFarlane, P., Ruzicka, M., Burns, K., Manns, B., White, C., Madore, F., *et al.* (2008). Guidelines for the management of chronic kidney disease. *Canadian Medical Association Journal* *179*, 1154-1162.
- 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, H., Zhao, H., Wang, D., and Yang, R. (2011). microRNA regulation in megakaryocytopoiesis. *British Journal of Haematology* *155*, 298-307.
- Li, S.C., Liao, Y.L., Ho, M.R., Tsai, K.W., Lai, C.H., and Lin, W.C. (2012a). miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. *BMC Genomics* *13 Suppl 1*, S13.
- Li, Y., Zhang, Z., Liu, F., Vongsangnak, W., Jing, Q., and Shen, B. (2012b). Performance comparison and evaluation of software tools for microRNA deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* *40*, 4298-4305.
- Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *30*, 2341-2349.
- Libetta, C., Sepe, V., Esposito, P., Galli, F., and Dal Canton, A. (2011). Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clinical Biochemistry* *44*, 1189-1198.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Eyre, J.R., Kraiss, L.W., Mahoney, T.M., and Weyrich, A.S. (2001). Integrins Regulate the Intracellular Distribution of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Platelets: A CHECKPOINT FOR TRANSLATIONAL CONTROL. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 33947-33951.
- Linden, M.D., Tran, H., Woods, R., and Tonkin, A. (2012). High Platelet Reactivity and Antiplatelet Therapy Resistance. *Semin Thromb Hemost* *38*, 200-212.
- Linsen, S.E.V., de Wit, E., Janssens, G., Heater, S., Chapman, L., Parkin, R.K., Fritz, B., Wyman, S.K., de Bruijn, E., and Voest, E.E. (2009). Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nature methods* *6*, 474-476.
- Liu, C., Zhang, X., Huang, F., Yang, B., Li, J., Liu, B., Luo, H., Zhang, P., and Zhang, H. (2012a). APOBEC3G Inhibits MicroRNA-mediated Repression of Translation by Interfering with the Interaction between Argonaute-2 and MOV10. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 29373-29383.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., and Hannon, G.J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* *7*, 1261-1266.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012b). Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* *2012*, 251364.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., Kramer, J.M., *et al.* (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* *369*, 565-568.

- López, J.J., Redondo, P.C., Salido, G.M., Pariente, J.A., and Rosado, J.A. (2009). N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine induces apoptosis through the activation of caspases-3 and -8 in human platelets. A role for endoplasmic reticulum stress. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 992-999.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 112, 3164-3174.
- 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.
- Luciano, D.J., Mirsky, H., Vendetti, N.J., and Maas, S. (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* 10, 1174-1177.
- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5[prime]-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666-670.
- Macfarlane, R.G. (1964). An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 202, 498-499.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 512-517.
- MacRae, I.J., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 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.
- 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.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development* 19, 2979-2990.
- Marciniak, E. (1973). Factor-Xa Inactivation by Antithrombin III. *British Journal of Haematology* 24, 391-400.
- Marguerie, G.A., Plow, E.F., and Edgington, T.S. (1979). Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* 254, 5357-5363.
- Marques, M., Sacristan, D., Mateos-Caceres, P.J., Herrero, J., Arribas, M.J., Gonzalez-Armengol, J.J., Villegas, A., Macaya, C., Barrientos, A., and Lopez-Farre, A.J. (2010). Different protein expression in normal and dysfunctional platelets from uremic patients. *J Nephrol* 23, 90-101.
- 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.

Martí, E., Pantano, L., Bañez-Coronel, M., Llorens, F., Miñones-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.

Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., and Konrad, I. (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.

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

McEver, R.P. (1991). GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 45, 156-161.

McEver, R.P., and Martin, M.N. (1984). A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *Journal of Biological Chemistry* 259, 9799-9804.

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. *Mol Cell Proteomics* 3, 133-144.

Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., and Tuschl, T. (2004a). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 10, 544-550.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004b). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.

Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins. *Current Biology* 15, 2149-2155.

Melkonyan, H.S., Feaver, W.J., Meyer, E., Scheinker, V., Shekhtman, E.M., Xin, Z., and Umansky, S.R. (2008). Transrenal Nucleic Acids: From Proof of Principle to Clinical Tests. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137, 73-81.

Melton, C., Judson, R.L., and Belloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621-626.

Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1011-1018.

Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Cáceres, J.F. (2008). Posttranscriptional Regulation of miRNAs Harboring Conserved Terminal Loops. *Molecular Cell* 32, 383-393.

- Modzelewski, Andrew J., Holmes, Rebecca J., Hilz, S., Grimson, A., and Cohen, Paula E. (2012). AGO4 Regulates Entry into Meiosis and Influences Silencing of Sex Chromosomes in the Male Mouse Germline. *Developmental Cell* 23, 251-264.
- Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., *et al.* (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 18, 610-621.
- Moroi, M., Jung, S.M., Okuma, M., and Shinmyozu, K. (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *The Journal of Clinical Investigation* 84, 1440-1445.
- 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., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Development* 16, 720-728.
- Muddashetty, Ravi S., Nalavadi, Vijayalaxmi C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, Stephen T., and Bassell, Gary J. (2011). Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Molecular Cell* 42, 673-688.
- Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M., and Okajima, F. (2000). Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochemical Journal* 352, 809.
- 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.
- Nelson, P.T., Baldwin, D.A., Kloosterman, W.P., Kauppinen, S., Plasterk, R.H.A., and Mourelatos, Z. (2006). RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA* 12, 187-191.
- Newman, M.A., Mani, V., and Hammond, S.M. (2011). Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA* 17, 1795-1803.
- Nilsson, R.J.A., Balaj, L., Hulleman, E., van Rijn, S., Pegtel, D.M., Walraven, M., Widmark, A., Gerritsen, W.R., Verheul, H.M., Vandertop, W.P., *et al.* (2011). Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 118, 3680-3683.
- Noland, Cameron L., Ma, E., and Doudna, Jennifer A. (2011). siRNA Repositioning for Guide Strand Selection by Human Dicer Complexes. *Molecular Cell* 43, 110-121.
- Nutt, S.L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 201, 221-231.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology* 216, 671-680.

Ørom, 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.

Osterud, B., and Rapaport, S.I. (1977). Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5260-5264.

Ouellet, D.L., Plante, I., Landry, P., Barat, C., Janelle, M.E., Flamand, L., Tremblay, M.J., and Provost, P. (2008). Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res* 36, 2353-2365.

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.

Pabla, R., Weyrich, A.S., Dixon, D.A., Bray, P.F., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1999). Integrin-dependent Control of Translation: Engagement of Integrin α IIb β 3 Regulates Synthesis of Proteins in Activated Human Platelets. *The Journal of Cell Biology* 144, 175-184.

Pall, G.S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., and Hamilton, A. (2007). Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35, e60.

Pamuklar, Z., Lee, J.S., Cheng, H.-Y., Panchatcharam, M., Steinhubl, S., Morris, A.J., Charnigo, R., and Smyth, S.S. (2008). Individual Heterogeneity in Platelet Response to Lysophosphatidic Acid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 555-561.

Pan, X., Wang, Z.-X., and Wang, R. (2011). MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biology & Therapy* 10, 1224-1232.

Pap, E., Pállinger, É., Pásztói, M., and Falus, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation Research* 58, 1-8.

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

Pépin, 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.

Perez-Pujol, S., Marker, P.H., and Key, N.S. (2007). Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: Studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry Part A* 71A, 38-45.

- Perron, M.P., Boissonneault, V., Gobeil, L.A., Ouellet, D.L., and Provost, P. (2007). Regulatory RNAs: future perspectives in diagnosis, prognosis, and individualized therapy. *Methods Mol Biol* *361*, 311-326.
- Perron, M.P., Landry, P., Plante, I., and Provost, P. (2011). Detection of human Dicer and Argonaute 2 catalytic activity. *Methods Mol Biol* *725*, 121-141.
- Perron, M.P., and Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* *13*, 2537-2547.
- Peyvandi, F., Jayandharan, G., Chandy, M., Srivastava, A., Nakaya, S.M., Johnson, M.J., Thompson, A.R., Goodeve, A., Garagiola, I., Lavoretano, S., *et al.* (2006). Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* *12*, 82-89.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., *et al.* (2004). Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* *304*, 734-736.
- 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.
- Pillitteri, D., Bassus, S., Boller, K., Mahnel, R., Scholz, T., Westrup, D., Wegert, W., and Kirchmaier, C.M. (2007). Thrombin-induced interleukin 1 β synthesis in platelet suspensions: Impact of contaminating leukocytes. *Platelets* *18*, 119-127.
- Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, James E., LaPierre, Robert J., Pothoulakis, C., Hagan, John P., Iliopoulos, D., and Gregory, Richard I. (2011). Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell* *147*, 1066-1079.
- Plante, I., Davidovic, L., Ouellet, D.L., Gobeil, L.A., Tremblay, S., Khandjian, E.W., and Provost, P. (2006). Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs. *J Biomed Biotechnol* *2006*, 64347.
- Plé, 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.
- Plé, H., Maltais, M., Corduan, A., Rousseau, G., Madore, F., and Provost, P. (2012b). Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease. *Thromb Haemost* *108*, 605-615.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* *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.
- Quinton, T.M., Ozdener, F., Dangelmaier, C., Daniel, J.L., and Kunapuli, S.P. (2002). Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. *Blood* *99*, 3228-3234.

- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* *123*, 621-629.
- Rao, L.V., Kothari, H., and Pendurthi, U.R. (2012). Tissue factor: mechanisms of decryption. *Front Biosci (Elite Ed)* *4*, 1513-1527.
- 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.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., and Baulcombe, D.C. (1999). Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *The Plant Cell Online* *11*, 1207-1215.
- Rayner, K.J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science Signalling* *328*, 1570.
- RCITO (2008). Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada 1997 to 2006 (2008 Annual Report).
- RCITO (2012). Treatment of end-stage organ failure in Canada. In *Healthc Q*, pp. 84.
- Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Papadopoulos, G.L., and Hatzigeorgiou, A.G. (2011). Accurate microRNA Target Prediction Using Detailed Binding Site Accessibility and Machine Learning on Proteomics Data. *Frontiers in genetics* *2*, 103.
- Reems, J.-A., Pineault, N., and Sun, S. (2010). In Vitro Megakaryocyte Production and Platelet Biogenesis: State of the Art. *Transfusion Medicine Reviews* *24*, 33-43.
- Rehwinkel, J.A.N., 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.
- Reid, J.G., Nagaraja, A.K., Lynn, F.C., Drabek, R.B., Muzny, D.M., Shaw, C.A., Weiss, M.K., Naghavi, A.O., Khan, M., Zhu, H., *et al.* (2008). Mouse let-7 miRNA populations exhibit RNA editing that is constrained in the 5'-seed/ cleavage/anchor regions and stabilize predicted mmu-let-7a:mRNA duplexes. *Genome Res* *18*, 1571-1581.
- Reinhardt, C., von Brühl, M.-L., Manukyan, D., Grahl, L., Lorenz, M., Altmann, B., Dlugai, S., Hess, S., Konrad, I., Orschiedt, L., *et al.* (2008). Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of Clinical Investigation* *118*, 1110-1122.
- 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.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* *110*, 513-520.
- Ribatti, D., and Crivellato, E. (2007). Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets. *Leukemia research* *31*, 1339-1341.
- Riley, K.J., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2012). Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis. *RNA* *18*, 1581-1585.
- Rink, T.J., Smith, S.W., and Tsien, R.Y. (1982). Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Letters* *148*, 21-26.
- Rios, D.R., Carvalho, M.G., Lwaleed, B.A., Simoes e Silva, A.C., Borges, K.B., and Dusse, L.M. (2010). Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Clin Chim Acta* *411*, 135-139.
- 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.
- Rodal, A.A., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G., and Amberg, D.C. (1999). Aip1p Interacts with Cofilin to Disassemble Actin Filaments. *The Journal of Cell Biology* *145*, 1251-1264.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* *14*, 1902-1910.
- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* *6*, 3343-3353.
- Rosenberg, J.S., McKenna, P.W., and Rosenberg, R.D. (1975). Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. *Journal of Biological Chemistry* *250*, 8883-8888.
- Rosenberg, R.D., and Damus, P.S. (1973). The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. *Journal of Biological Chemistry* *248*, 6490-6505.
- Rosenwald, I.B., Pechet, L., Han, A., Lu, L., Pihan, G., Woda, B., Chen, J.J., and Szymanski, I. (2001). Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost* *85*, 142-151.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* *340*, 115-126.
- Roth, G.J., Hickey, M.J., Chung, D.W., and Hickstein, D.D. (1989). Circulating human blood platelets retain appreciable amounts of poly (A)⁺ RNA. *Biochem Biophys Res Commun* *160*, 705-710.

- Roth, G.J., Stanford, N., and Majerus, P.W. (1975). Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 3073-3076.
- Rottiers, V., and Näär, A.M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 239-250.
- 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.
- Rüdel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Körner, 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., Bader, R., and de Marco, L. (1982). Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6038-6041.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol* 11, 1411-1420.
- Saelman, E.U., Nieuwenhuis, H.K., Hese, K.M., de Groot, P.G., Heijnen, H.F., Sage, E.H., Williams, S., McKeown, L., Gralnick, H.R., and Sixma, J.J. (1994). Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83, 1244-1250.
- Saj, A., and Lai, E.C. (2011). Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways. *Current Opinion in Genetics & Development* 21, 504-510.
- Sako, D., Chang, X.-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., *et al.* (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75, 1179-1186.
- Salzman, E.W., and Weisenberger, H. (1972). Role of cyclic AMP in platelet function. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1, 231-247.
- 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.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82, 323-330.
- Savage, B., Saldívar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 84, 289-297.
- Savi, P., Herbert, J.M., Pflieger, A.M., Dol, F., Delebasse, D., Combalbert, J., Defreyn, G., and Maffrand, J.P. (1992). Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochemical Pharmacology* 44, 527-532.
- Savi, P., Laplace, M.C., Maffrand, J.P., and Herbert, J.M. (1994). Binding of [3H]-2-methylthio ADP to rat platelets--effect of clopidogrel and ticlopidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269, 772-777.

- 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.
- Schonrock, N., Matamales, M., Ittner, L.M., and Götz, J. (2012). MicroRNA networks surrounding APP and amyloid- β metabolism - Implications for Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 235, 447-454.
- Schoorl, M., and Bartels, P.C.M. (2008). Changes in platelet volume, morphology and RNA content in subjects treated with haemodialysis. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 68, 335-342.
- Schubert, P., and Devine, D.V. (2010). De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 99, 112-122.
- Schubert, S., Schwertz, H., Weyrich, A.S., Franks, Z.G., Lindemann, S., Otto, M., Behr, H., Loppnow, H., Schlitt, A., Russ, M., *et al.* (2011). Staphylococcus aureus alpha-Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets. *Toxins (Basel)* 3, 120-133.
- Schulze, H., Korpál, 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.
- Schwarz, D.S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199-208.
- Schwertz, H.r., Tolley, N.D., Foulks, J.M., Denis, M.M., Risenmay, B.W., Buerke, M., Tilley, R.E., Rondina, M.T., Harris, E.M., Kraiss, L.W., *et al.* (2006). Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2433-2440.
- Segal, J.B., and Moliterno, A.R. (2006). Platelet Counts Differ by Sex, Ethnicity, and Age in the United States. *Annals of Epidemiology* 16, 123-130.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-636.
- Shan, G., Li, Y., Zhang, J., Li, W., Szulwach, K.E., Duan, R., Faghihi, M.A., Khalil, A.M., Lu, L., Paroo, Z., *et al.* (2008). A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotech* 26, 933-940.
- Shashkin, P.N., Brown, G.T., Ghosh, A., Marathe, G.K., and McIntyre, T.M. (2008). Lipopolysaccharide Is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing. *The Journal of Immunology* 181, 3495-3502.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805-808.

Shin, C. (2008). Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals. *Mol Cells* 26, 308-313.

Siasos, G., Tousoulis, D., Michalea, S., Oikonomou, E., Kolia, C., Kioufis, S., Synetos, A., Vlasis, K., Papavassiliou, A.G., and Stefanadis, C. (2012). Biomarkers determining cardiovascular risk in patients with kidney disease. *Curr Med Chem* 19, 2555-2571.

Sidhu, M.S., and Dellsperger, K.C. (2011). Cardiovascular problems in dialysis patients: impact on survival. *Adv Perit Dial* 26, 47-52.

Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., and Ataullakhanov, F.I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007 Mar;97(3):425-34.

Skreka, K., Schafferer, S., Nat, I.-R., Zywicki, M., Salti, A., Apostolova, G., Griehl, M., Rederstorff, M., Dechant, G., and Hüttenhofer, A. (2012). Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation. *Nucleic Acids Research* 40, 6001-6015.

Sloand, E.M., Sloand, J.A., Prodouz, K., Klein, H.G., Yu, M.W., Harvath, L., and Fricke, W. (1991). Reduction of platelet glycoprotein Ib in uraemia. *Br J Haematol* 77, 375-381.

Sondermeijer, B.M., Bakker, A., Halliani, A., de Ronde, M.W.J., Marquart, A.A., Tijssen, A.J., Mulders, T.A., Kok, M.G.M., 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.

Sorefan, K., Pais, H., Hall, A.E., Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., Moulton, V., and Dalmay, T. (2012). Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing. *Silence* 3, 4.

Sreedhara, R., Itagaki, I., and Hakim, R.M. (1996). Uremic patients have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Am J Kidney Dis* 27, 355-364.

Stachura, D.L., Chou, S.T., and Weiss, M.J. (2006). Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood* 107, 87-97.

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* 93, 10212-10216.

Stegner, D., and Nieswandt, B. (2011). Platelet receptor signaling in thrombus formation. *Journal of Molecular Medicine* 89, 109-121.

Stein, I.H., Ketil, D., Cecilia, M.O., Diana, C.G., Arne, A., Jostein, H., and Friedo, W.D. (2006). Screening strategies for chronic kidney disease in the general population: follow-up of cross sectional health survey. *BMJ* 333, 1047.

Stenberg, P.E., and Levin, J. (1989). Mechanisms of platelet production. *Blood Cells* 15, 23-47.

- Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., and Bainton, D.F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of Cell Biology* *101*, 880-886.
- Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Paultre, F., Diczfalusy, U., Wang, T., Berglund, L., and Jogestrand, T. (1999). Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* *55*, 1899-1911.
- 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. *Thromb Haemost* *107*, 634-641.
- Sun, G., Wu, X., Wang, J., Li, H., Li, X., Gao, H., Rossi, J., and Yen, Y. (2011). A bias-reducing strategy in profiling small RNAs using Solexa. *RNA* *17*, 2256-2262.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529-533.
- Suzuki, K., Dahlbäck, B., and Stenflo, J. (1982). Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *Journal of Biological Chemistry* *257*, 6556-6564.
- 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.
- Tan, G.S., Chiu, C.-H., Garchow, B.G., Metzler, D., Diamond, S.L., and Kiriakidou, M. (2012). Small Molecule Inhibition of RISC Loading. *ACS Chemical Biology* *7*, 403-410.
- Tantry, U.S., Budaj, A., and Gurbel, P.A. (2012). Antiplatelet therapy beyond 2012: role of personalized medicine. *Pol Arch Med Wewn* *122*, 298-305.
- Tassies, D., Reverter, J.C., Cases, A., Escolar, G., Villamor, N., Lopez-Pedret, J., Castillo, R., and Ordinas, A. (1995). Reticulated platelets in uremic patients: effect of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Hematol* *50*, 161-166.
- Thaulow, E., Erikssen, J., Sandvik, L., Stormorken, H., and Cohn, P.F. (1991). Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* *84*, 613-617.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* *2*, 569-579.
- Thon, Jonathan N., and Devine, Dana V. (2007). Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets. *Transfusion* *47*, 2260-2270.
- Thornton, J.E., Chang, H.-M., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2012). Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA* *18*, 1875-1885.
- 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., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010-1014.
- Trip, M.D., Cats, V.M., van Capelle, F.J., and Vreeken, J. (1990). Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 322, 1549-1554.
- Ts'ao, C.H. (1971). Rough endoplasmic reticulum and ribosomes in blood platelets. *Scand J Haematol* 8, 134-140.
- Tubek, S., Grzanka, P., and Tubek, I. (2008). Role of Zinc in Hemostasis: A Review. *Biological Trace Element Research* 121, 1-8.
- 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., Langhein, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research* 39, 7223-7233.
- Uff, S., Clemetson, J.M., Harrison, T., Clemetson, K.J., and Emsley, J. (2002). Crystal Structure of the Platelet Glycoprotein Ib α N-terminal Domain Reveals an Unmasking Mechanism for Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35657-35663.
- Umez, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M., and Ohyashiki, J.H. (2012). Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*.
- 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. *Nat Cell Biol* 9, 654-659.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Seraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* 21, 6915-6924.
- Vanholder, R., Cornelis, R., Dhondt, A., and Lameire, N. (2002). The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 2, 2-8.
- Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105-1118.
- Vaziri, N.D., and Norris, K. (2011). Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood Purif* 31, 189-196.
- Vecino, A., Navarro-Antolin, J., Teruel, J., Navarro, J., and Cesar, J. (1998). Lipid composition of platelets in patients with uremia. *Nephron* 78, 271-273.
- Vecino, A.M., Teruel, J.L., Navarro, J.L., and Cesar, J.M. (2002). Phospholipase A2 activity in platelets of patients with uremia. *Platelets* 13, 415-418.
- Vesely, C., Tauber, S., Sedlazeck, F.J., von Haeseler, A., and Jantsch, M.F. (2012). Adenosine deaminases that act on RNA induce reproducible changes in abundance and sequence of embryonic miRNAs. *Genome Research* 22, 1468-1476.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2010). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13, 423-433.

- 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.
- Vlachoyannis, J., and Schoeppe, W. (1982). Adenylate cyclase activity and cAMP content of human platelets in uraemia. *Eur J Clin Invest* *12*, 379-381.
- von Hundelshausen, P., Weber, K.S.C., Huo, Y., Proudfoot, A.E.I., Nelson, P.J., Ley, K., and Weber, C. (2001). RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation* *103*, 1772-1777.
- Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I., and Coughlin, S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* *64*, 1057-1068.
- Walkowiak, B., Kaminska, M., Okroj, W., Tanski, W., Sobol, A., Zbrog, Z., and Przybyszewska-Doros, I. (2007). The blood platelet proteome is changed in UREMIC patients. *Platelets* *18*, 386-388.
- Walkowiak, B., Sobol, A.B., Walczynska, M., and Kaminska, M. (2012). Effect of Uremia and Hemodialysis on Proteome Profile of Blood Platelets and Plasma. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*.
- Warshaw, A.L., Laster, L., and Shulman, N.R. (1966). The stimulation by thrombin of glucose oxidation in human platelets. *The Journal of Clinical Investigation* *45*, 1923-1934.
- Warshaw, A.L., Laster, L., and Shulman, N.R. (1967). Protein synthesis by human platelets. *J Biol Chem* *242*, 2094-2097.
- Watashi, K., Yeung, M.L., Starost, M.F., Hosmane, R.S., and Jeang, K.-T. (2010). Identification of Small Molecules That Suppress MicroRNA Function and Reverse Tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 24707-24716.
- Weber, C. (2005). Platelets and Chemokines in Atherosclerosis: Partners in Crime. *Circulation Research* *96*, 612-616.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., and Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry* *56*, 1733-1741.
- Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Florindo, C., Teepe, M., Titeux, M., Methia, N., Breton-Gorius, J., Cosman, D., and Vainchenker, W. (1994). cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* *369*, 571-574.
- Weyrich, A.S., Denis, M.M., Schwertz, H., Tolley, N.D., Foulks, J., Spencer, E., Kraiss, L.W., Albertine, K.H., McIntyre, T.M., and Zimmerman, G.A. (2007). mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets. *Blood* *109*, 1975-1983.
- Weyrich, A.S., Dixon, D.A., Pabla, R., Elstad, M.R., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1998). Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5556-5561.
- White, J.G. (1968). The Substructure of Human Platelet Microtubules. *Blood* *32*, 638-648.

White, J.G., and Krumwiede, M. (2007). Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thromb Haemost* 98, 69-72.

WHO (2011). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control (Geneva :, Published by the World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization).

Williamson, D., Pikovski, I., Cranmer, S.L., Mangin, P., Mistry, N., Domagala, T., Chehab, S., Lanza, F., Salem, H.H., and Jackson, S.P. (2002). Interaction between Platelet Glycoprotein Ib α and Filamin-1 Is Essential for Glycoprotein Ib/IX Receptor Anchorage at High Shear. *Journal of Biological Chemistry* 277, 2151-2159.

Winter, J., and Diederichs, S. (2011). Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biology* 8, 1149-1157.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., and Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international* 49, 1304-1313.

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* 13, 269-288.

Wolfe, S.M., and Shulman, N.R. (1969). Adenyl cyclase activity in human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 35, 265-272.

Wright, J.H. (1906). The origin and nature of the blood plates. *The Boston Medical and Surgical Journal* 154, 643-645.

Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B.N., Qi, H.H., Bloch, D.B., Shi, Y., Lagna, G., and Hata, A. (2011). Hypoxia Potentiates MicroRNA-Mediated Gene Silencing through Posttranslational Modification of Argonaute2. *Molecular and Cellular Biology* 31, 4760-4774.

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.

Wulczyn, F.G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., and Nitsch, R. (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *The FASEB Journal* 21, 415-426.

Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J., and Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Research* 21, 1450-1461.

Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X., and Li, T. (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 37, D105-110.

- 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 thrombocytic platelets using integrated platforms. *Blood* *120*, 3575-3585.
- Xue, J.L., Frazier, E.T., Herzog, C.A., and Collins, A.J. (2005). Association of heart disease with diabetes and hypertension in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* *45*, 316-323.
- Yang, G.H., Wang, F., Yu, J., Wang, X.S., Yuan, J.Y., and Zhang, J.W. (2009). MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. *J Cell Biochem* *107*, 548-556.
- Yang, J.-S., and Lai, Eric C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular Cell* *43*, 892-903.
- Yang, J.S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 15163-15168.
- Yang, J.S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* *17*, 312-326.
- Yang, W., Chendrimada, T.P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P.H., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 13-21.
- 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 Dev* *17*, 3011-3016.
- Young, L.E., Moore, A.E., Sokol, L., Meisner-Kober, N., and Dixon, D.A. (2012). The mRNA Stability Factor HuR Inhibits MicroRNA-16 Targeting of COX-2. *Molecular Cancer Research* *10*, 167-180.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* *101*, 25-33.
- Zbidi, H., Redondo, P.C., Lopez, J.J., Bartegi, A., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2010). Homocysteine induces caspase activation by endoplasmic reticulum stress in platelets from type 2 diabetics and healthy donors. *Thromb Haemost* *103*, 1022-1032.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, 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.
- 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, L., Orban, M., Lorenz, M., Barocke, V., Braun, D., Urtz, N., Schulz, C., von Brühl, M.-L., Tirniceriu, A., Gaertner, F., *et al.* (2012). A novel role of sphingosine 1-phosphate

receptor *S1pr1* in mouse thrombopoiesis. *The Journal of Experimental Medicine* *209*, 2165-2181.

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.

Zheng, Y.-M., Liu, C., Chen, H., Locke, D., Ryan, J.C., and Kahn, M.L. (2001). Expression of the Platelet Receptor GPVI Confers Signaling via the Fc Receptor γ -Chain in Response to the Snake Venom Convulxin but Not to Collagen. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 12999-13006.

Zhou, Q., Wang, Z., Zhang, J., Meng, H., and Huang, B. (2012). Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biology* *116*, 1156-1162.

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.

