

Université de Sherbrooke

**Étude de l'interaction entre FMRP et le cytosquelette lors de l'activation plaquettaire**

Par  
Alexandre J. Meunier  
Programme de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin 2012

Membres du jury d'évaluation  
Dr François Corbin, Département de biochimie  
Dr Xavier Roucou, Département de biochimie  
Dr François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-93323-7*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93323-7*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

## **Étude de l'interaction entre FMRP et le cytosquelette lors de l'activation plaquettaire**

Alexandre J. Meunier  
Programme de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie,  
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le syndrome du X fragile, première cause monogénique de déficience intellectuelle héréditaire, découle de l'expansion du nombre de répétitions CGG dans le gène *FMR1* qui, accompagnée de sa méthylation, conduit à l'absence de la protéine correspondante : FMRP ou « Fragile X Mental Retardation Protein ». La fonction de cette protéine reste encore incertaine; FMRP est une protéine liant l'ARN qui serait impliqué au niveau de la synthèse protéique, mais d'autres fonctions ont également été proposées. La découverte de nouvelles observations dans un système biologique simplifié nous permettrait de mieux comprendre la contribution réelle de ces rôles. En fait, nous avons confirmé dans les plaquettes sanguines à l'état quiescent, qui sont caractérisées par un faible niveau de traduction, la présence de FMRP sous forme soluble, contrairement à la majorité des autres cellules et tissus étudiés. Puisque l'activation des plaquettes, étape incontournable de l'hémostase primaire, déclenche de nombreux processus intracellulaires telles une réorganisation du cytosquelette et une augmentation de la synthèse protéique, nous avons étudié le comportement de FMRP subséquent à l'activation plaquettaire. Des plaquettes humaines ont été activées par l'utilisation de différents agonistes et soumises à des protocoles de fractionnement afin de déterminer la localisation subcellulaire de FMRP. Lors de l'activation plaquettaire, nous avons observé une redistribution de FMRP, de la fraction soluble à celle contenant le cytosquelette, proportionnelle au pourcentage d'agrégation des plaquettes. Cette interaction de FMRP avec certains constituants de cette fraction a également été évaluée en présence de plusieurs agents chimiques influençant différents processus cellulaires. Nous avons mis en évidence que l'utilisation de substances exerçant une influence sur la polymérisation du réseau d'actine modifie le comportement de FMRP, suggérant que cette protéine puisse interagir avec un constituant des microfilaments. Dans la mesure où certaines équipes de recherche ont rapporté que les polyribosomes plaquettaires sont une partie intégrante du cytosquelette, et d'autres que les polyribosomes avaient la possibilité de lier spécifiquement le réseau d'actine, nous avons envisagé la présence dans les plaquettes d'une interaction entre FMRP et l'appareil traductionnel en interaction avec les microfilaments. Concrètement, nous avons mis en évidence par une approche classique d'isolation des polyribosomes, la présence de FMRP dans ces fractions, et ce, uniquement postactivation. La redistribution de FMRP, bien que compatible avec d'autres modèles cellulaires, lui suggère une nouvelle fonction au sein de la réorganisation du cytosquelette et du déclenchement de la synthèse protéique survenant lors de l'activation plaquettaire. Puisque ces phénomènes peuvent facilement être modulés dans les plaquettes sanguines, ces cellules humaines ont le potentiel de devenir un modèle plus que promoteur pour l'étude de FMRP et ainsi, du syndrome du X fragile.

Mots clés : syndrome du X fragile, FMRP, plaquette sanguine, cytosquelette, polyribosome

## **Study of the interaction between FMRP and the cytoskeleton upon platelet activation**

Alexandre J. Meunier  
Programme de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie,  
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Fragile X syndrome, the most common form of inherited intellectual disability, results from the expansion of CGG repeats in the *FMR1* gene which, together with its methylation, leads to the absence of the corresponding protein: FMRP or Fragile X Mental Retardation Protein. The function of this protein remains uncertain; FMRP, a protein showing sequence motifs characteristic of RNA-binding proteins, seems to participate in several cellular processes related to protein synthesis. Uncovering novel observations in a simpler human biological system, will allow us to better understand the real contribution of those suggested functions. In fact, we confirm in resting blood platelets, characterized by a limited translational activity, the presence of FMRP in a soluble form, unlike most other cells and tissues studied so far. Since platelet activation, a critical step in primary hemostasis, triggers many intracellular processes including cytoskeleton's reorganization and an increase in protein synthesis, we therefore investigated the behaviour of FMRP upon platelet activation. Human platelets were activated by means of different agonists and subjected to cell fractionation protocols in order to determine the subcellular localization of FMRP. Following activation, we observed a shift of FMRP from the soluble to the cytoskeleton fraction, which was proportional to the percentage of platelet aggregation. Moreover, this interaction of FMRP with certain components of this fraction was also assessed in the presence of various chemical agents that influence different cellular processes. We showed that agents affecting actin network polymerization modified FMRP's behavior, suggesting that FMRP might interact with components of the microfilaments. Some research groups have reported that platelet polyribosomes are an integral part of the cytoskeleton, and others that polyribosomes are able to specifically bind the actin network. We thus investigated the presence of an interaction of FMRP in platelets with the microfilament's bound translational apparatus. In fact, we have demonstrated by a classical approach of polyribosome isolation, the presence of FMRP in these fractions exclusively following activation. The resultant redistribution of FMRP, although consistent with other cellular models, suggests a new function for this protein in connection with the platelet cytoskeletal reorganization and the initiation of protein synthesis occurring during platelet activation. Since these processes can easily be modulated in blood platelets, these human cells have the potential to be a very promising model for studying FMRP and thus the fragile X syndrome.

Keywords: fragile X syndrome, FMRP, blood platelet, cytoskeleton, polyribosome

À tous ceux et celles qui m'ont soutenu tout  
au long de ma maîtrise, avec ma grande  
reconnaissance. Merci à vous tous!

**Le savant le plus grand est celui qui connaît les limites  
de son savoir, c'est-à-dire l'infini de son ignorance  
Serge Bouchard**

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS .....	II
RÉSUMÉ EN ANGLAIS .....	III
DÉDICACE .....	IV
ÉPIGRAPHE .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
1. Chapitre 1 : Introduction générale .....	1
1.1 Le syndrome du X fragile .....	1
1.1.1 Les manifestations cliniques .....	1
1.1.2 L'origine du syndrome .....	3
1.1.3 La génétique du syndrome .....	4
1.1.4 Le gène FMR1 .....	6
1.2 La protéine FMRP .....	7
1.2.1 La biologie de FMRP .....	7
1.2.1.1 L'expression tissulaire .....	8
1.2.1.2 La structure protéique .....	10
1.2.1.3 La famille des protéines FXR .....	11
1.2.2 Le rôle biologique de FMRP .....	14
1.2.2.1 La localisation subcellulaire .....	14
1.2.2.2 Les partenaires de FMRP .....	15
1.2.2.3 Les fonctions étudiées .....	18
1.2.3 Le modèle d'étude de la relation entre FMRP et le cytosquelette .....	23
1.3 Les plaquettes sanguines .....	25
1.3.1 Généralités sur les plaquettes .....	25
1.3.2 L'activation des plaquettes .....	27
1.3.2.1 L'adhésion plaquettaire .....	27
1.3.2.2 La sécrétion de granules .....	28
1.3.2.3 L'agrégation plaquettaire .....	30
1.3.2.4 La réorganisation du cytosquelette .....	32
1.3.2.5 L'initiation de la traduction .....	34
1.4 La justification de l'étude .....	36
1.4.1 Les objectifs de recherche .....	36
2. Chapitre 2 : Article scientifique .....	39
2.1 L'avant-propos .....	39

2.2	Le résumé en français.....	40
2.3	L'article.....	41
2.3.1	Abstract.....	41
2.3.2	Introduction.....	42
2.3.3	Materials and methods.....	44
2.3.3.1	Cellular extract preparation.....	44
2.3.3.2	Subcellular fractionation.....	45
2.3.3.3	Proteins and RNA studies.....	45
2.3.3.4	Immunofluorescence studies.....	46
2.3.4	Results.....	47
2.3.4.1	FMRP subcellular localization is modified following platelet activation ..	47
2.3.4.2	FMRP and polyribosomes in activated platelets.....	49
2.3.4.3	FMRP localized to the actin network core.....	50
2.3.4.4	FMRP cytoskeleton redistribution is agonist-independent.....	51
2.3.4.5	Platelet aggregation is the unique precursor of FMRP cytoskeleton shift..	53
2.3.4.6	FMRP shift is specifically affected by actin network dynamics.....	54
2.3.5	Discussion.....	59
2.3.6	Acknowledgments.....	62
2.3.7	Conflict of interest disclosure.....	62
2.3.8	References.....	63
3.	Chapitre 3 : Discussion.....	67
3.1	La localisation subcellulaire de FMRP.....	67
3.2	La redistribution de FMRP.....	68
3.3	La participation de FMRP à la spécialisation cellulaire.....	70
3.4	La relation entre FMRP et le cytosquelette.....	71
3.5	L'association de FMRP au cytosquelette via les polyribosomes.....	73
3.6	Le modèle d'étude plaquettaire.....	75
4.	Conclusion.....	78
5.	Remerciements.....	79
6.	Références.....	81
7.	Annexes.....	92
7.1	Liste des publications.....	92
7.2	Liste des communications par affiche.....	93
7.3	Liste des communications orales.....	94
7.4	Preuve de soumission de l'article.....	95
7.5	Autorisation d'intégration d'un article écrit en collaboration à un mémoire.....	97

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Identification sommaire des partenaires protéiques de FMRP dans des cellules de mammifères .....	16
Tableau 2. Identification des 14 ARNm interagissant avec FMRP et validé par une interaction biochimique directe .....	18
Tableau 3. Identification de certaines protéines en liaison avec le réseau d'actine lors de l'activation plaquettaire .....	34
Tableau 4. Corrélation de l'association de FMRP au cytosquelette avec différentes phases de l'activation plaquettaire .....	71

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Dysmorphie faciale d'individu avec le syndrome du X fragile.....	2
Figure 2. Exemple de la morphologie typique des dendrites chez le modèle murin du syndrome du X fragile (A) et chez la souris sauvage (B).....	3
Figure 3. Analyse d'un chromosome X comportant un site fragile par microscopie électronique .....	4
Figure 4. Représentation schématique du gène <i>FMR1</i> et des répétitions CGG.....	5
Figure 5. Le gène <i>FMR1</i> et son ARNm.....	6
Figure 6. Patron typique de FMRP et de ces isoformes mineurs.....	8
Figure 7. Distribution quasi ubiquitaire des membres de la famille FXR dans divers tissus et organes de la souris adulte.....	10
Figure 8. Comparaison structurale des membres de la famille des FXR.....	12
Figure 9. Comparaison des signaux observés par immunobuvardage des membres de la famille des FXR.....	14
Figure 10. L'association de FMRP aux polyribosomes est dépendante de la présence d'ARNm .....	15
Figure 11. Modèles des conséquences structurales de la synthèse protéique déclenchée lors de l'activation des récepteurs au glutamate .....	19
Figure 12. Modèle proposé du transport des ARNm sous forme réprimée par FMRP .....	21
Figure 13. Mécanisme de régulation de la traduction par FMRP .....	22
Figure 14. Étape de la production des plaquettes par les mégacaryocytes .....	26
Figure 15. Modèle de l'adhésion plaquettaire à la matrice extracellulaire sous-endothéliale au site de la lésion vasculaire et de la formation subséquente de l'agrégat.....	28
Figure 16. Sécrétion des granules plaquettaires consécutive à l'activation.....	29
Figure 17. Contenu des granules spécifiques aux plaquettes.....	30
Figure 18. Changements de la turbidimétrie d'une suspension plaquettaire suivant l'ajout d'un activateur.....	31

Figure 19. Changements morphologiques typiques du cytosquelette plaquettaire à la suite de l'activation.....	32
Figure 20. Association spécifique des polyribosomes du cytosquelette au réseau d'actine cellulaire.....	35
Figure 21. Présence de FMRP dans la fraction soluble des plaquettes sanguines.....	36

### **LISTE DES FIGURES DE L'ARTICLE**

Figure 1. FMRP mostly shift to the cytoskeletal fraction upon platelet activation .....	48
Figure 2. FMRP's shift is proportional to the extent of aggregation while being independent of the activation pathway.....	52
Supplementary figure 1. Aggregation can be blocked by different conditions during platelet activation.....	54
Figure 3. Cytoskeleton association of FMRP during activation seems to be related to microfilament dynamics .....	55
Supplementary figure 2. Cytoskeleton association of FMRP seems to be related to microfilament dynamics while being dependent on activation.....	57
Supplementary figure 3. Modulation of actin filament dynamics also affects the cytoskeleton association of FXR2P during activation .....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### Abréviations

### Significations

µm	Micromètre
17p13.1	Sous bande 1 de la bande 13 du bras court du chromosome 17
3q28	Bande 28 du bras long du chromosome 3
4E-BP1	<i>Factor 4E binding protein 1</i>
82-FIP	<i>82 kDa FMRP-interacting protein</i>
a.a.	Acides aminés
ABP	<i>Actin-binding protein</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AGO1	<i>Argonaute 1</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
Arc 34	<i>Arp 2/3 protein complex subunit 34</i>
Arc	<i>Activity-regulated-cytoskeleton-associated protein</i>
ARN	Acide ribonucléique messenger
ARNase	Ribonucléase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique messenger ribosomal
Arp 2/3	<i>Actin related proteins 2 and 3 complex</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CamKIIα	<i>Calcium/calmodulin-dependent kinase IIα</i>
CapZ	<i>Capping protein Z</i>
CCL17	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 17 (TARC)</i>
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3 (MIP1α)</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5 (RANTES)</i>
CCL7	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3 (MCP-3)</i>
CD62P	P-sélectine
CD63	Antigène CD63 (LAMP-3)
CGG	Cytosine-Guanine-Guanine
CLEC-2	<i>C-type lectin receptor</i>
Complexes RNP	Complexes ribonucléoprotéiques
C-terminale	Carboxy-terminale
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Gro-α)</i>
CXCL4	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 4 (PF4)</i>
CXCL5	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (ENA-78)</i>
CXCL7	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 7 (NAP-2)</i>
CXCL8	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (IL-8)</i>
CYFIP1/2	<i>Cytoplasmic FMRP-interacting protein 1 and 2</i>
ECM	Matrice extracellulaire sous-endothéliale
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EF-1A	<i>Elongation factor 1A</i>
eIF2C2	<i>Eukaryotic translation-initiation factor 2C,2</i>
eIF-4E	<i>Eukaryotic initiation factor 4E</i>
ENA-78	<i>Epithelial neutrophil-activating protein 78 (CXCL5)</i>

etc.	<i>Et caetera</i>
ex.	Exemple
F-actine	Actine en filament
fg	Femtogramme
fl	Femtolitre
<i>FMR1</i>	<i>Fragile X Mental Retardation 1 gene</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FRAXA	<i>FRAgile chromosome X site A</i>
FXR	<i>Fragile X Related</i>
FXR1	<i>Fragile X Related gene 1</i>
FXR1P	<i>Fragile X Related 1 Protein</i>
FXR2	<i>Fragile X Related gene 2</i>
FXR2P	<i>Fragile X Related 2 Protein</i>
FXS	<i>Fragile X Syndrome</i>
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GABA <sub>Aδ</sub>	Sous-unité δ du récepteur GABA <sub>A</sub>
G-actine	Actine globulaire
Gas6	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GluR <sub>1/2</sub>	Récepteur glutamate 1 et 2
GMP 33	<i>33 kDa platelet α-granule membrane protein</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GPI à VI	Glycoprotéine I à VI
GPIb-V-IX	Complexes des glycoprotéines GPIb <sub>α</sub> , GPIb <sub>β</sub> , GPV et GPIX
GPIIb/IIIa	Glycoprotéines IIb/IIIa (αIIbβ3)
G-quartet	<i>G-quadruplex</i>
Gro-α	<i>Growth-related oncogene α (CXCL1)</i>
hASH1	<i>Human achaete-scute homologue-1</i>
HSP27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
HSP90α	<i>Heat shock protein 90α</i>
I304N	<i>Isolucine to asparagines mutation</i>
IL-8	<i>Interleukin-8 (CXCL8)</i>
kb	Kilobases (10 <sup>3</sup> bases)
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDaltons (10 <sup>3</sup> Daltons)
KH1/2	<i>K homology 1 and 2</i>
KIF3C	<i>Kinesin-like protein</i>
KIF5	<i>Kinesin I heavy chain</i>
KO	<i>Knockout</i>
L26	<i>Ribosomal protein L26</i>
L7a	<i>Ribosomal protein L7a</i>
LAMP-3	Lysosome-associated membrane protein-3 (CD63)
Lg1	<i>Lethal giant larvae</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
Map1b	<i>Microtubule associated protein 1B</i>
mGluR	Récepteurs métabotropiques du glutamate

MIP1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein 1a (CCL3)</i>
MIP1 $\alpha$	<i>Monocyte-specific chemokine 3 (CCL7)</i>
MSP58	<i>Microspherule protein 58</i>
mStaufen	<i>Mammalian Staufen protein</i>
NAP-2	<i>Neutrophil-activating protein 2 (CXCL7)</i>
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
N-terminale	Amino-terminale
NUFIP1	<i>Nuclear FMRP-interacting protein 1</i>
p50	<i>50 kDa protein</i>
PABP1	<i>Poly(A)-binding protein 1</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PF4	<i>Platelet factor 4 (CXCL4)</i>
PhD	Domaine de phosphorylation
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol myristate acétate
PPID	Domaine d'interaction protéine-protéine
Psd95	<i>Postsynaptic density-95</i>
P-sélectine	Sélectine plaquettaire
Pur- $\alpha/\beta$	<i>Purine-rich single stranded DNA-binding protein <math>\alpha</math> and <math>\beta</math></i>
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitatif
Ran-BPM	<i>Ran-binding protein</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (CCL5)</i>
RGG	Séquence arginine (R) – glycine (G) – glycine (G)
Rgs5	<i>Regulation of G-protein signalling 5</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNP	Complexe ribonucléoprotéique
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
S	Unité de Svedberg
S6	<i>Ribosomal protein S6</i>
Sapap3/4	<i>SAP90/PSD-95-associated protein 3 and 4</i>
SCO	Système caniculaire ouvert
Sema3F	<i>Semaphorin 3F</i>
SM22 $\alpha$	<i>Smooth muscle 22 kDa cytoskeletal protein</i>
Sod1	<i>Superoxyde dismutase 1</i>
SoSLIP	<i>Sod1 mRNA stem loops interacting with FMRP</i>
TAP-technology	<i>Tandem affinity purification technology</i>
TARC	<i>Thymus and activation regulated chemokine (CCL17)</i>
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
Tyrosine kinase pp60 <sup>c-src</sup>	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
vWF	Facteur de von Willebrand

WGA  
Xq27.3  
YB-1  
 $\alpha 2\beta 1$   
 $\alpha \text{IIb}\beta 3$

*Wheat germ agglutinin*  
Sous bande 3 de la bande 27 du bras long du chromosome X  
*Y-box-binding protein 1*  
Glycoprotéines Ia/IIa  
Glycoprotéines IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)

# **1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## **1.1 Le syndrome du X fragile**

### **1.1.1 Les manifestations cliniques**

Le syndrome du X fragile représente la première cause monogénique de déficience intellectuelle héréditaire, affectant un homme sur 4000 et une femme sur 6000 (Crawford et al., 2001). Ce qui fait de ce syndrome la deuxième cause connue de déficience intellectuelle, derrière le syndrome de Down (trisomie 21). Concrètement, la déficience intellectuelle se présente initialement de modérée à sévère chez les individus de sexe masculin, se détériorant avec l'âge. Le syndrome s'accompagne également de différents troubles cognitifs tels que : l'hyperactivité, les déficits de l'attention, l'impulsivité, l'anxiété, les comportements moteurs répétés et un comportement autistique (Hagerman et al., 2009). On observe également un large éventail de caractéristiques physiques particulières, dont les plus fréquentes sont : une dysmorphie faciale (faciès long et étroit, oreilles de taille supérieure à la moyenne, front et menton proéminent (Figure 1)), une anomalie tissulaire (hyperélasticité ligamentaire, pieds plats et palais arqué) et une macroorchidie (élargissement testiculaire) (Meguid et al., 2012).

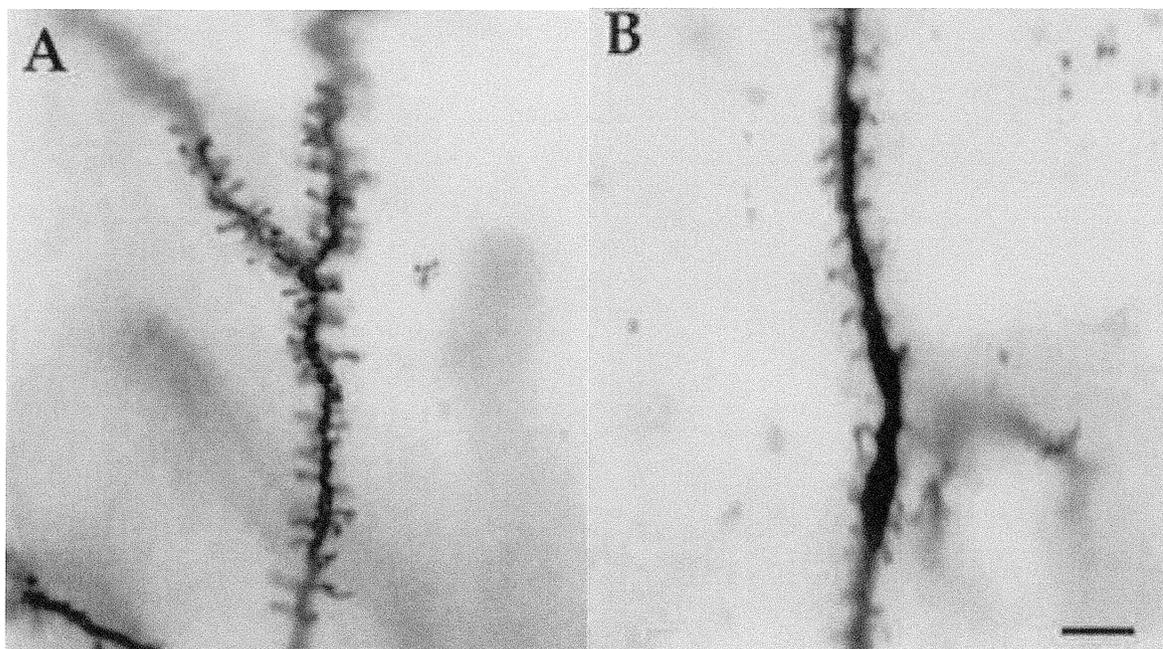
Alors que chez les individus de sexe féminin, comme dans la majorité des maladies reliées aux chromosomes sexuels, les problèmes comportementaux et cognitifs, ainsi que les caractéristiques morphologiques sont plus subtils et même absents. Cela est dû à l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X dans chacune des cellules et ainsi, l'allèle normal est exprimé dans des proportions variables. Une étude a même montré une inactivation préférentielle des allèles mutés dans certains types cellulaires avec l'âge, favorisant ainsi l'expression du gène normal (Rousseau et al., 1991). Les individus de sexe féminin avec le syndrome du X fragile sont caractérisés par une déficience intellectuelle de légère à modérée et sont susceptibles au développement de problèmes émotionnels, ainsi qu'à un retrait social (Chonchaiya et al., 2009). Étant donnée la grande variabilité phénotypique entre deux individus; le syndrome du X fragile est difficile à diagnostiquer, la première indication clinique étant souvent un retard de développement global. D'autant

plus que les caractéristiques physiques rencontrées dans ce syndrome vont plutôt s'accroître lors de la puberté, tel la macroorchidie.



**Figure 1. Dysmorphie faciale d'individu avec le syndrome du X fragile.** Comme illustré par les photographies des enfants, les caractéristiques morphologiques sont assez subtiles : un visage allongé, des oreilles décollées, un front et un menton saillants (Garber, Visootsak, & Warren, 2008).

Au niveau neuronal, les individus avec le syndrome du X fragile sont également caractérisés par une morphologie dendritique anormale. En effet, tant chez l'homme (Wisniewski et al., 1991) (Hinton et al., 1991), que chez le modèle murin (Comery et al., 1997), la densité des épines dendritiques anormalement longues et minces est augmentée (Figure 2). Cette anomalie structurale propre aux synapses présentes dans les premiers stades du développement cérébral implique une altération du processus de maturation neuronale. Ce dysfonctionnement serait à la base des troubles cognitifs rencontrés chez les individus avec le syndrome du X fragile, comme les problèmes d'apprentissage (Irwin et al., 2000).

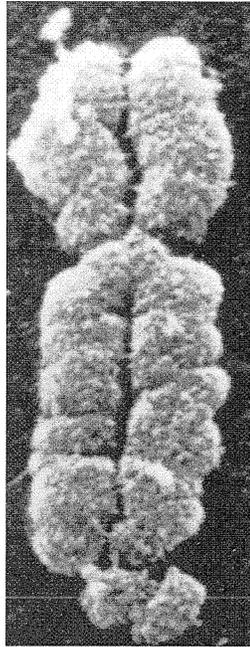


**Figure 2. Exemple de la morphologie typique des dendrites chez le modèle murin du syndrome du X fragile (A) et chez la souris sauvage (B).** Ces résultats montrent l'augmentation de la densité des épines dendritiques immatures, c'est-à-dire longues et minces, dans le cas du syndrome du X fragile. La barre du coin inférieur droit représente 10  $\mu\text{m}$  (Comery et al., 1997).

### 1.1.2 L'origine du syndrome

Le syndrome du X fragile a été décrit pour la première fois en 1943. En effet, J. P. Martin et J. Bell furent les premiers à mettre en évidence l'association d'une déficience intellectuelle et d'un ensemble de manifestations cliniques communes dans une étude portant sur 11 individus de sexe masculin d'une même famille. Ce syndrome fût donc nommé : le syndrome de Martin-Bell. Bien qu'ils n'aient pas clairement identifié le mode de transmission de ce syndrome, l'hypothèse d'un trouble cognitif lié au chromosome X fût posée (Martin & Bell, 1943). Cette hypothèse s'avéra par la suite exacte. En effet, H. A. Lubs observa en 1969 une anomalie locale de la condensation du bras long du chromosome X en métaphase d'individu avec le syndrome Martin-Bell (Figure 3) (Lubs, 1969). Cette zone de fragilité du chromosome X fût nommée FRAXA (*FRAG*ile *chromosome X site A*), une appellation à la base du nom actuel du syndrome du X fragile. En 1985, à l'aide d'une coloration de haute résolution des bandes G, ce site fragile fût localisé en Xq27.3 (Krawczun et al., 1985). Il fallut pourtant attendre en 1991 pour que le gène en cause dans ce syndrome, soit *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), fût identifié simultanément par

l'équipe de recherche de S. T. Warren (Verkerk et al., 1991) et de J.-L. Mendel (Oberle et al., 1991).



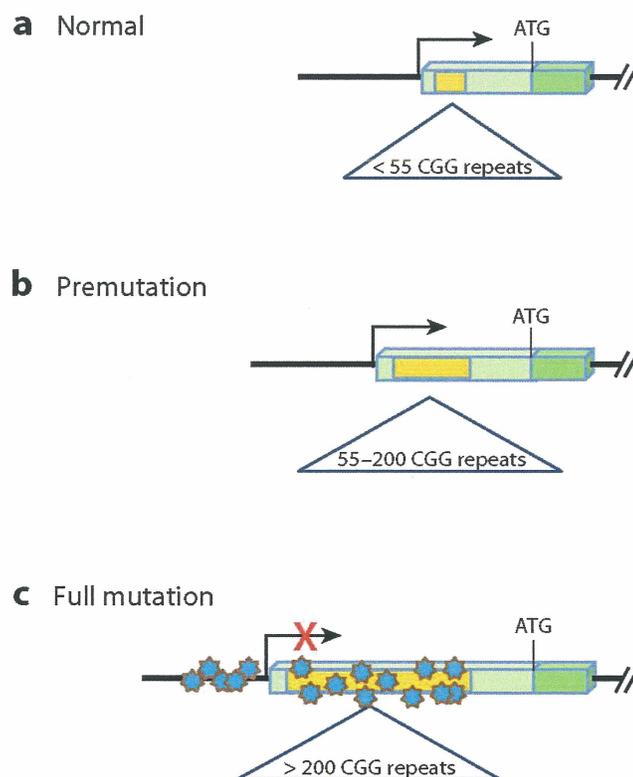
**Figure 3. Analyse d'un chromosome X comportant un site fragile par microscopie électronique.** Le site FRAXA se présente sous la forme d'une cassure de l'extrémité du bras long d'un ou des chromatides du chromosome X en métaphase, lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu sans acide folique ou thymidine (Harrison, Jack, Allen, & Harris, 1983).

### 1.1.3 La génétique du syndrome

L'identification du gène *FMRI* en 1991 a permis de mieux comprendre la génétique du syndrome et de mettre en évidence un nouveau type de mutation, les mutations dynamiques. Ce mécanisme mutationnel se caractérise par l'allongement d'une séquence répétée instable lors de sa transmission. Dans le cas du syndrome du X fragile, il s'agit d'une expansion du nombre de répétition des trinuécléotides CGG dans la région 5' non traduite du gène *FMRI* (Verkerk et al., 1991).

Dans la population générale, on assiste à une grande hétérogénéité du nombre de répétitions CGG s'échelonnant entre 5 et 54 répétitions (29 ou 30 triplets en moyenne) pour un allèle normal (Figure 4) (Peprah, 2012). Bien que le nombre de répétitions soit fidèlement transmis à sa descendance, pour des raisons encore mal comprises l'allèle peut devenir

instable et ainsi prendre de l'expansion. Les répétitions CGG d'un allèle stable ne sont pas pures; elles contiennent en fait des interruptions AGG. La perte de ces interruptions semble être une étape importante, mais non suffisante pour expliquer la transition vers un allèle instable pouvant prendre de l'expansion de génération en génération (Eichler et al., 1994). Les individus présentant un nombre de répétitions compris entre 55 et 199 sont considérés comme porteurs de l'allèle prémuté, mais ne présenteront pas de déficience intellectuelle. Tandis que les individus avec le syndrome du X fragile possèdent des allèles comprenant la mutation complète, soit excédant 200 répétitions; qui est accompagné d'une hyperméthylation des îlots CpG conduisant au silence transcriptionnel du gène *FMR1* (Jacobs et al., 1993).

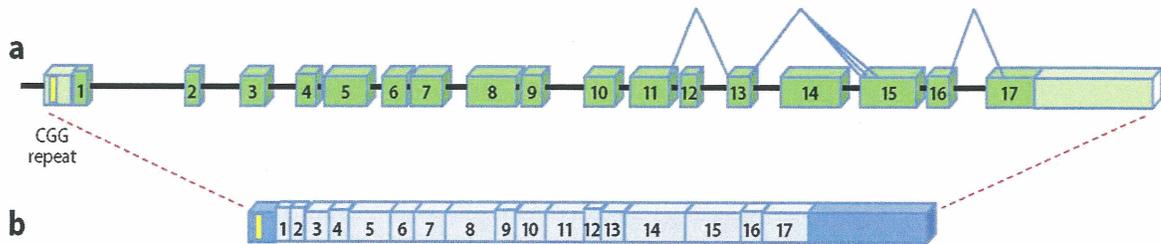


**Figure 4. Représentation schématique du gène *FMR1* et des répétitions CGG.** Dans la population générale (allèle normal), on observe un nombre de répétitions CGG inférieur à 55 (rectangle orange). Lorsque le nombre de répétitions est compris entre 55 et 200, on considère l'individu asymptomatique porteur d'une prémuation. Alors que, le gène est inactivé lors de la mutation complète (plus de 200 répétitions) et l'hyperméthylation des îlots CpG (représenté par les étoiles bleues) ce qui ce traduit par un individu avec le syndrome du X fragile (Santoro, Bray, & Warren, 2012).

Le diagnostic actuel du syndrome s'appuie sur la mise en évidence du nombre de ces répétitions, ainsi que de la présence de cette méthylation par une utilisation complémentaire d'un PCR et d'une hybridation de type Southern sensible à la méthylation. L'analyse directe de l'ADN a donc permis de remplacer l'ancien diagnostic fondé sur l'observation, lors du caryotype, d'une cassure du bras long du chromosome X (Rousseau et al., 1991). Nonobstant, d'autres mutations dans le gène *FMR1* peuvent également causer le syndrome du X fragile et ne sont donc pas détectables par cette technique (Coffee et al., 2008).

#### 1.1.4 Le gène *FMR1*

Le gène *FMR1* inactivé chez les individus avec le syndrome du X fragile est localisé en Xq27.3 et s'étend sur 38 kb. Ce gène encode un ARNm de 3,9 kb, comprenant : une région 5' non traduite de 0,2 kb, une région codante de 1,9 kb, ainsi qu'une région 3' non traduite de 1,8 kb (Verkerk et al., 1991). Selon certaines études de RT-PCR, ce gène comprenant 17 exons génère un transcrite primaire sujet à un épissage alternatif fort complexe (Figure 5) (Eichler et al., 1993). En effet, jusqu'à 48 transcrits distincts peuvent être produits et pourraient conduire à la synthèse d'autant de protéines différentes (C. T. Ashley et al., 1993). L'abondance des différents transcrits est variable selon les différents tissus étudiés, mais aucun n'est spécifique à un tissu en particulier (Verkerk et al., 1993).



**Figure 5. Le gène *FMR1* et son ARNm.** Le gène *FMR1* en (a) est composé de régions codantes (en vert foncé), d'introns (lignes noires) et de région non traduite (en vert pâle). Comme illustré par les lignes bleues chevauchant le gène, on observe un épissage alternatif fort complexe menant à l'ARNm en (b) (Santoro et al., 2012).

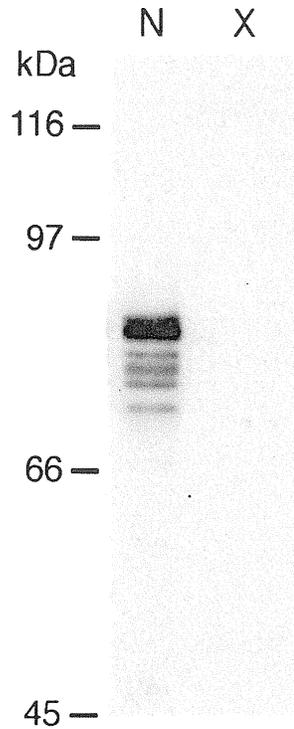
*FMR1* est un gène hautement conservé durant l'évolution, comme en témoigne sa caractérisation chez la souris (Eichler et al., 1993), la grenouille *Xenopus laevis* (Siomi et al., 1995) et le poulet (Price et al., 1996). D'autant plus que les pourcentages d'identité en acides aminés des protéines encodées sont très élevés, respectivement 97 %, 86 % et 31 %

d'homologie avec la protéine humaine pour la souris, le poulet et la grenouille. À dire vrai, des orthologues de *FMR1* ont également été identifiés au-delà du sous-embranchement des vertébrés. Effectivement, certaines études ont entre autres révélé la présence de *dFMR1* chez *Drosophila melanogaster* (Wan et al., 2000) et de *hyFMR1* chez *Hydractinia echinata*, un hydraire marin de l'embranchement des Cnidaria (Guduric-Fuchs et al., 2004). En fait, il s'agit d'un des plus anciens métazoaires vivants possédant un système nerveux, ce qui suggère que *FMR1* a été bien conservé au cours de l'évolution, ce qui lui suggère un rôle très important dans le développement du système nerveux.

## 1.2 La protéine FMRP

### 1.2.1 La biologie de FMRP

L'ARNm de *FMR1* mène à la synthèse de la protéine FMRP ou « *Fragile X Mental Retardation Protein* », dont la séquence complète comprend 631 a.a. L'étude de cette séquence a par la suite permis de mettre au point différents anticorps par le biais de peptide synthétique (C. T. Ashley et al., 1993). L'anticorps monoclonal 1C3 (anciennement nommé mAbl1a), qui reconnaît la partie N-terminale de FMRP, s'est avéré être d'une importante spécificité et sensibilité. Il est encore aujourd'hui reconnu mondialement à titre de référence (Devys et al., 1993). Par buvardage de type Western, il permet d'observer un groupe de 5-6 protéines entre 70 et 78 kDa, ainsi qu'un doublet majeur à 80 kDa (Figure 6). L'existence de différents isoformes n'est pas surprenante puisque comme décrit précédemment, l'épissage différentiel de l'ARNm de *FMR1* rend théoriquement possible l'obtention de nombreux transcrits et protéines correspondantes. La spécificité de cet anticorps a été démontrée par l'absence de la détection d'un signal dans des extraits cellulaires d'homme possédant la mutation complète (Khandjian, 1999). Par contre, les applications de cet anticorps sont limitées, il est en fait caractérisé par une incapacité à immunoprécipiter FMRP, un désavantage indéniable lors de l'étude de cette protéine (Davidovic et al., 2007).

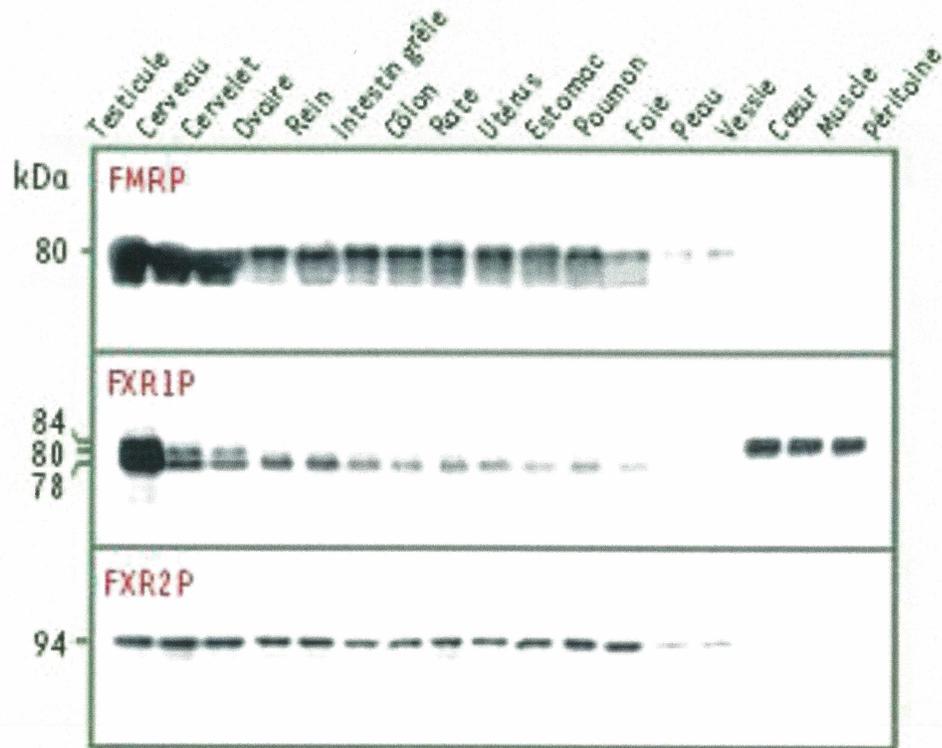


**Figure 6. Patron typique de FMRP et de ces isoformes mineurs.** Les extraits totaux protéiques de cellules lymphoblastoïdes d'un individu de sexe masculin avec le syndrome du X fragile (X) et d'un individu normal (N) ont été analysés par immunobuvardage avec l'anticorps 1C3. La protéine FMRP est présente uniquement chez l'individu contrôle (N) sous forme d'un doublet majeur à 80 kDa et d'isoformes mineurs compris entre 70 et 78 kDa (Khandjian, 1999).

#### 1.2.1.1 L'expression tissulaire

L'utilisation de buvardages de type Western avec l'anticorps 1C3 sur des extraits totaux provenant de différents tissus humains a montré que FMRP est caractérisée, de la même manière que l'ARNm de son gène encodeur *FMR1*, par une expression quasi ubiquitaire dans les tissus humains et murins, dont l'intensité varie selon les tissus en question (Figure 7). Plus encore, il a été remarqué que FMRP a une expression préférentielle au niveau du cerveau et des testicules (Davidovic et al., 2007). Dans le cerveau, FMRP est particulièrement abondant dans les régions riches en neurones comme le cervelet et les cellules de Purkinje, à l'interface des couches granulaires et moléculaires du cerveau; tandis que dans les testicules, FMRP est principalement détectée dans les spermatogonies.

Dans les tissus épithéliaux (peau, œsophage, estomac, intestin grêle, colon, etc.), on observe la formation d'un gradient décroissant d'expression de la protéine FMRP entre la couche basale (cellules en division rapide) et celle supérieure (cellules différenciées). Dans le même ordre d'idée, la protéine est également produite dans des tissus en réparation à la suite d'un traumatisme, et ce, même si ces cellules ne l'exprimaient pas initialement (Devys et al., 1993). L'immunobuvardage avec l'anticorps de référence permet également d'observer le signal de FMRP dans les cellules sanguines, comme les lymphocytes et les plaquettes (Lauziere et al., 2012). Quant aux autres tissus, l'expression de FMRP y est plus faible et même absente dans le cas des cellules cardiaques, musculaires et du péritoine (Davidovic et al., 2006).



**Figure 7. Distribution quasi ubiquitaire des membres de la famille FXR dans divers tissus et organes de la souris adulte.** Les niveaux les plus élevés de FMRP se retrouvent dans les testicules, le cerveau et le cervelet. Quoique retrouvée dans l'ensemble des tissus étudiés, à l'exception des muscles, ses niveaux d'expression semblent tissu spécifique. FXR1P suit une distribution similaire à FMRP; en revanche, on retrouve un enrichissement particulier au niveau du cœur, des muscles et du péritoine. FXR2P ne semble toutefois pas suivre le patron de ses homologues, avec une expression plus uniforme dans la majorité des tissus. Les poids moléculaires apparents (kDa) sont donnés vis-à-vis chacune des protéines (Davidovic et al., 2006).

#### 1.2.1.2 La structure protéique

L'expression quasi ubiquitaire de FMRP pourrait suggérer une ou des fonctions communes à toutes ces cellules. Étant donné que la fonction d'une protéine est intimement liée à sa structure, plusieurs études ont été effectuées sur la séquence primaire de cette protéine, révélant ainsi d'importants domaines consensus (Figure 8). Concrètement, FMRP possède les caractéristiques d'une protéine liant l'ARN; c'est-à-dire que la séquence protéique contient certains domaines de liaison à l'ARN : deux domaines KH ou « *K homology* » (KH1 et KH2) dans sa partie N-terminal reconnaissant la structure « *kissing complex* » des ARNm (Darnell et al., 2005), ainsi qu'un domaine riche en arginine et glycine appelé boîte

RGG en C-terminal liant spécifiquement le motif « *G-quartet* » des ARNm (Zanotti et al., 2006). L'importance de ces domaines consensus dans la liaison de FMRP à l'ARN a cependant été récemment remise en question par l'identification de certains ARN, qui seront abordés dans une section subséquente, interagissant avec FMRP via sa séquence non codante (Darnell et al., 2011).

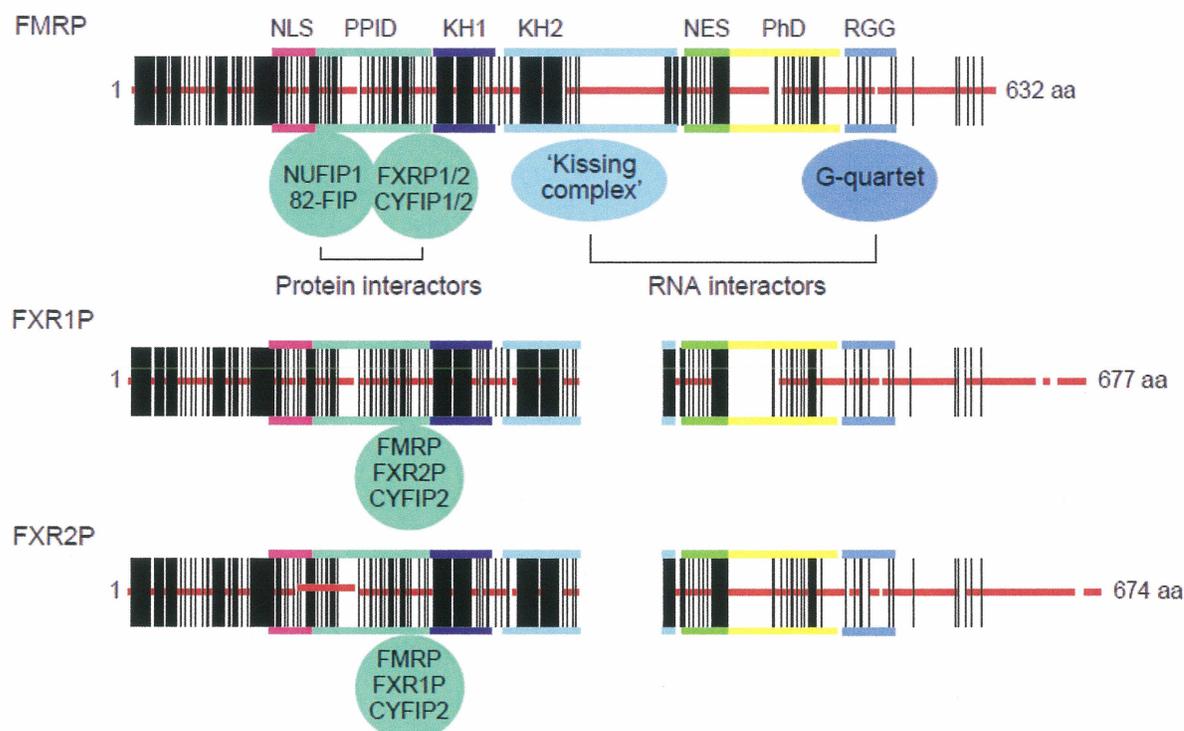
En plus de ces domaines de liaison à l'ARN, FMRP comporte également des signaux de localisation nucléaire (NLS) en N-terminal et d'exportation cytoplasmique (NES) en C-terminal, ce qui permet à la protéine de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules, et ce, via les pores nucléaires (Feng et al., 1997). FMRP possède également un domaine de phosphorylation (PhD) en C-terminal constitué de 3 sérines pouvant être phosphorylés, post-traduction (Ceman et al., 2003). L'étude de la séquence de FMRP a finalement permis d'identifier un domaine d'homo et d'hétérodimérisation ou d'interaction protéine-protéine (PPID) en N-terminale qui, comme son nom l'indique, permet à FMRP d'interagir directement avec différents partenaires (Bardoni et al., 2006).

### 1.2.1.3 La famille des protéines FXR

À dessein d'améliorer la compréhension de la fonction de FMRP, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur l'étude des différents partenaires de cette protéine, ce qui a mené à l'identification de deux paralogues, formant ainsi la famille de protéines nommée « *Fragile X Related* » ou FXR. Comprenant bien entendu FMRP, elle englobe également la « *Fragile X Related 1 Protein* » (FXR1P) de même que la « *Fragile X Related 2 Protein* » (FXR2P) (Khandjian, 1999). FXR1P et FXR2P sont encodées respectivement par les gènes « *Fragile X Related gene 1* » (FXR1) et « *Fragile X Related gene 2* » (FXR2). À l'instar de *FMR1*, ce sont des gènes autosomiques retrouvés, dans le même ordre, sur le chromosome 3 en 3q28 (Coy et al., 1995) et sur le chromosome 17 en 17p13.1 (Zhang et al., 1995); d'autant plus qu'aucune pathologie ne leur est encore associée (Bardoni et al., 2006).

Les protéines membres de la famille FXR présentent entre elles une forte homologie de séquence en acides aminés (Figure 8). En effet, on observe un pourcentage d'homologie de l'ordre de 70 % dans la région N-terminale et 86 % dans la portion centrale. Toutefois, la

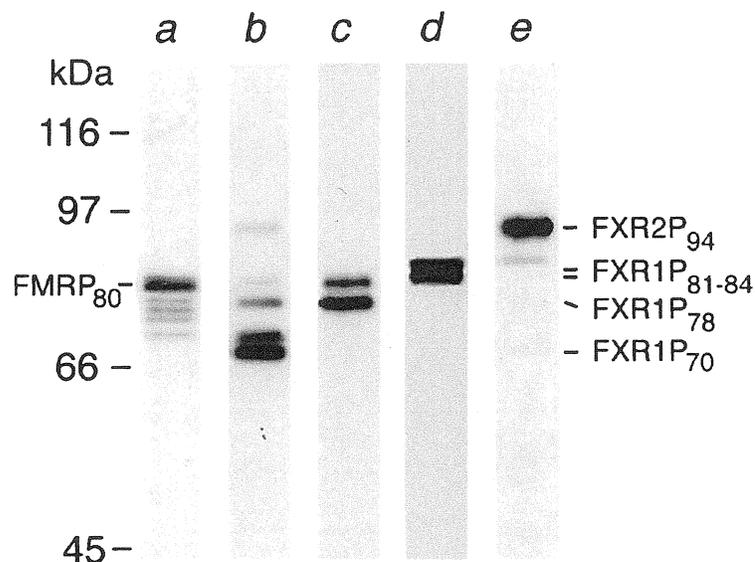
région C-terminale est quant à elle beaucoup plus divergente (6 % de similitude). D'autre part, les paralogues de FMRP conservent tous les mêmes domaines consensus, à savoir : deux domaines KH, une boîte RGG, les signaux NLS et NES, ainsi que les domaines PPID et PhD (Khandjian, 1999). D'ailleurs, l'utilisation des techniques de double hybride et d'immunoprécipitation ont rapidement mis en évidence l'interaction directe entre ces trois protéines, tant par homo que par hétérodimérisation (Siomi et al., 1996).



**Figure 8. Comparaison structurelle des membres de la famille des FXR.** FMRP, FXR1P et FXR2P, respectivement encodées par les gènes *FMRI*, *FXR1* et *FXR2*, sont tous des protéines de la famille FXR. Les lignes verticales noires indiquent les acides aminés identiques dans les trois protéines; les lignes horizontales rouges montrent les régions divergentes en acides aminés chez FXR1P et FXR2P par rapport à FMRP. Les domaines consensus KH (KH1 et KH2), la boîte RGG, les signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'exportation cytoplasmique (NES), le domaine de phosphorylation (PhD) ainsi que le domaine d'homo et d'interaction protéine-protéine (PPID) sont tous conservés. Certaines protéines reconnues pour interagir par le PPID sont représentées en turquoise, et les motifs spécifiques d'ARNm liés en bleu (Bardoni et al., 2006).

L'étude d'expression de ces paralogues a été possible grâce à la mise au point d'anticorps contre la portion C-terminale qui est moins conservée et ce qui semble donc limiter les réactions non spécifiques avec FMRP (Tamanini et al., 1997). Au moyen de buvardages de

type Western, deux isoformes FXR1P de 70 et de 78 kDa sont détectés (Figure 9). Le gène *FXR1* encode pour un transcrit primaire pouvant produire un ARNm de 3,2 ou de 2,4 kb (épissage alternatif) à l'origine respectivement du long et du court isoforme de FXR1P (Corbin et al., 1997). Ces deux isoformes sont détectés, comme FMRP, dans un large éventail de tissu (Figure 7). Étonnement, ils font plutôt place à un nouveau variant d'épissage plus long de 81 pb dans les cellules musculaires, cardiaques et du péritoine. Il a été montré que cet isoforme de 81 à 84 kDa remplaçait graduellement les autres formes préalablement observables dans les lignées cellulaires myoblastiques de souris, lors de leur différenciation en myotube (Khandjian et al., 1998). FXR1P serait particulièrement indispensable au tissu musculaire, puisque que les souris KO du gène *FXR1* décèdent peu de temps après la naissance, principalement à la suite de défaillance cardiaque ou respiratoire (Mientjes et al., 2004). Dans le cas de FXR2P, l'utilisation d'anticorps révèle une bande majeure de 94 kDa et un isoforme mineur de 86 kDa (Figure 9). Les études subséquentes ont montré que la distribution de FXR2P suivait celle observée chez FMRP. Au même titre que FMRP, les autres membres de la famille FXR sont exprimés dans un large éventail de tissu, mais on observe un enrichissement apparent au niveau testiculaire et cérébral, 2 organes largement affectés dans le syndrome du X fragile (Tamanini et al., 1997). Pourtant, les niveaux d'expression de ces paralogues ne semblent pas être altérés chez les individus avec le syndrome du X fragile. Dans l'ensemble, les protéines FXR, de par leur homologie et leurs domaines consensus auraient des fonctions communes qui pourraient se compenser dans certains tissus.



**Figure 9. Comparaison des signaux observés par immunobuvardage des membres de la famille des FXR.** Les puits a, b, c et e présentent des extraits totaux provenant de cellules lymphoblastoïdes humaines; tandis que l'extrait protéique du puits d vient de culture secondaire de myoblastes humains. Les différents membres de la famille FXR ont été révélés à partir d'anticorps spécifique de FMRP (a), de FXR1P (b à d) et de FXR2P (e) (Khandjian, 1999).

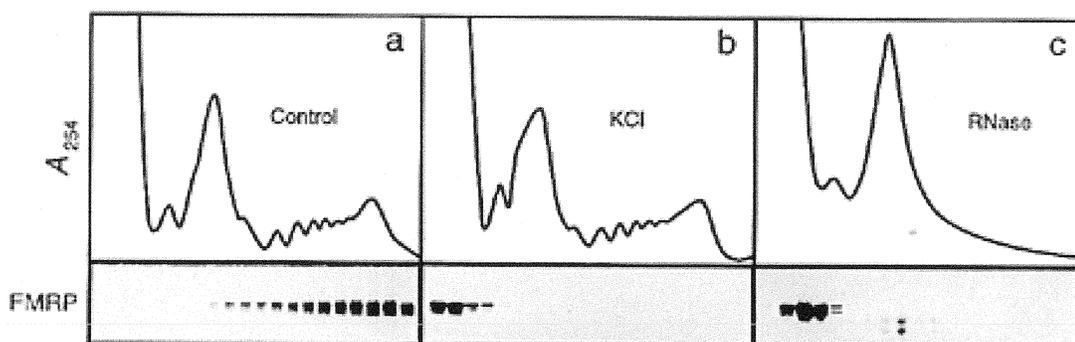
## 1.2.2 Le rôle biologique de FMRP

### 1.2.2.1 La localisation subcellulaire

Comme mentionné précédemment, la protéine FMRP possède, un signal de localisation nucléaire, ainsi qu'un signal d'export nucléaire; lui permettant ainsi de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que cette protéine était retrouvée à 95 % au niveau du cytoplasme et principalement autour du noyau (Verheij et al., 1993). Du côté neuronal, FMRP suit la même distribution; c'est-à-dire que cette protéine est retrouvée au niveau du cytoplasme et plus particulièrement dans le péricaryon, zone de cytoplasme riche en réticulum endoplasmique entourant le noyau des neurones (Feng et al., 1997).

Malgré cela, FMRP n'est pas libre pour autant dans le cytoplasme. En effet, cette protéine sédimente dans la fraction contenant classiquement les ribosomes (P100) suivant un protocole de fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles ou par centrifugation sur gradient de sucrose d'extraits totaux de la majorité des tissus étudiés à ce

jour. Ces résultats sont également corroborés par l'obtention en immunofluorescence de la même distribution à la fois pour FMRP et pour la protéine ribosomale L7a (Khandjian et al., 1996). L'association de FMRP avec les polyribosomes a été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires de référence, par exemple dans les cellules HeLa (Figure 10). En fait, il a été montré que l'association de FMRP était dépendante à la fois de la force ionique et de la présence d'ARNm (Corbin et al., 1997), des caractéristiques propres aux ribonucléoprotéines liant l'ARN.



**Figure 10. L'association de FMRP aux polyribosomes est dépendante de la présence d'ARNm.** Des aliquots d'environ 10 unités d'absorbance à 260 nm d'extraits cytoplasmiques de cellule Hela ont été analysés par sédimentation sur gradient de sucrose 15-45 % (p/p) avant (a) et après l'ajout de 0,5 M KCl (b) ou le traitement avec 100 µg/ml d'ARNase (c). La présence de FMRP dans chacune des fractions a ensuite été révélée par buvardages de type Western avec l'anticorps 1C3 (Corbin et al., 1997).

### 1.2.2.2 Les partenaires de FMRP

FMRP est l'une des nombreuses composantes des complexes ribonucléoprotéiques (RNP), un assemblage de protéines et d'ARN jouant un rôle important dans la transcription, dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (épissage, stabilité des ARN, routage et compartimentation des ARN), ainsi que dans la traduction (Hugo & Bouvet, 2003) (Davidovic et al., 2005).

En ce sens, le fait que la majorité des protéines interagissant avec FMRP sont des protéines, qui comme FMRP, possèdent les caractéristiques intrinsèques des protéines liant l'ARN n'a rien de surprenant. On note par exemple (Tableau1): 82-FIP, NUFIP1, MSP58, nucléoline, p50, mStaufen, Pur- $\alpha$  et les membres de la famille FXR (Bardoni et al., 2006). Ces partenaires pourraient par exemple avoir la possibilité, par le biais de changement de

conformation, de moduler l'affinité de FMRP pour différentes classes d'ARNm ou encore de lui permettre d'interagir avec un plus grand nombre d'entre eux.

Protéine interagissant avec FMRP	Processus cellulaires associés
82-FIP	Transport des ARNm
CYFIP1	Réorganisation du cytosquelette (voie Rho/Rac GTPase)
CYFIP2	Réorganisation du cytosquelette (voie Rho/Rac GTPase)
Dicer	Voie des microARN
Dynéine (chaîne intermédiaire)	Protéine motrice et transport rétrograde
eIF2C2 (AGO1)	Voie des microARN
FMRP	Régulation de la traduction
FXR1P	Régulation de la traduction
FXR2P	Régulation de la traduction
KIF3C	Protéine motrice et adressage dendritique
KIF5	Protéine motrice et transport dendritique
Lg1	Suppression de tumeur
MSP58	Facteur de transcription nucléolaire, biogénèse des RNP, régulation de la transcription
mStaufen	Transport des ARN aux dendrites, transport des granule neuronaux d'ARN et entreposage des ARNm réprimés des cellules germinales et régulation de la traduction
Myosine Va	Protéine motrice du réseau d'actine, transport des vésicules synaptiques et régulation de l'exocytose des vésicules
Nucléoline	Structure de la chromatine, biogénèse des ribosomes et navette nucléocytoplasmique
NUFIP1	Lien entre la transcription et l'export des ARNm
p50 (YB-1)	Facteur de transcription, entreposage des ARNm réprimés des cellules germinales et régulation de la traduction
PABP1	Synthèse protéique
Pur- $\alpha$	Réplication de l'ADN, transcription des gènes, transport et traduction des ARNm dendritiques
Pur- $\beta$	Transport des ARN
Ran-BPM	Transport nucléaire, migration cellulaire et régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs stéroïdiens

**Tableau 1. Identification sommaire des partenaires protéiques de FMRP dans des cellules de mammifères.** Les partenaires de FMRP ont été identifiés par l'utilisation de différentes techniques : le système de double-hybride, la coimmunoprécipitation, la Tap-technology et l'immunoprécipitation. Les rôles supposés des protéines interagissant avec FMRP sont fournis à titre d'indication. Les abréviations ont été définies dans la liste des abréviations. Le tableau a été basé sur plusieurs références. (Bardoni et al., 2006) (Bagni & Greenough, 2005) (Davidovic et al., 2007).

Les complexes RNP contiennent également différents ARN recrutés par FMRP. FMRP est une protéine très sélective, ne liant que 4 % des ARNm dans le cerveau des mammifères (C. T. Ashley Jr, Wilkinson, Reines, & Warren, 1993). Alors que plus de 400 ARNm pouvant s'associer avec FMRP ont été identifiés par les techniques de puce à ARN et de système de triple hybride, seulement 14 d'entre eux ont été validés par une interaction biochimique directe (Tableau 2). Ces ARNm encodent des protéines qui sont au cœur des fonctions neuronales, de la plasticité synaptique et de la maturation des neurones (Santoro et al., 2012). Plus encore, il a été montré que FMRP interagissait avec ces ARNm cible via certaines molécules adaptatrices, comme BC1, un petit ARN non-codant (Zalfa et al., 2003). Ces résultats ont toutefois rencontré une vive contestation quant à la spécificité de la réaction. En outre, il a été montré récemment par séquençage à haut débit des transcrits d'ARN coimmunoprécipités par « *cross-linking* » avec FMRP, que ces ARNm interagissaient à la fois dans la région codante que dans celle non-codante et donc que la reconnaissance des ARNm n'était pas limitée à leur motif « *G-quartet* » et « *kissing complexe* », mais la fonctionnalité de tels mécanismes demeurent encore inconnue (Darnell et al., 2011). Du même point de vue, un regroupement de chercheurs a permis d'identifier récemment un nouveau motif ARN, le SoSLIP, qui serait à la base de l'interaction entre FMRP et l'ARN Sod1 (Bechara et al., 2009b).

ARNm interagissant avec FMRP	Processus cellulaires associés
APP	Formation des synapses dans le cerveau en développement
Arc	Plasticité synaptique (potentialisation à long terme)
CamKII $\alpha$	Plasticité synaptique (activité kinase)
EF-1A	Suppression non-sens
FMR1	Régulation de la traduction
GABA <sub>A<math>\delta</math></sub>	Récepteur synaptique (récepteur GABA)
GluR <sub>1/2</sub>	Récepteur synaptique (récepteur glutamate)
hASH1	Différenciation neuronale
Map1b	Modulation de la dynamique des microtubules (extension des neurites et développement des synapse)
Psd95	Signalisation synaptique
Rgs5	Régulation de la signalisation des récepteurs post-synaptiques
Sapap3/4	Régulation de la signalisation des récepteurs post-synaptiques
Sema3F	Migration neuronale et guidance des axones
Sod1	Stress oxydatif

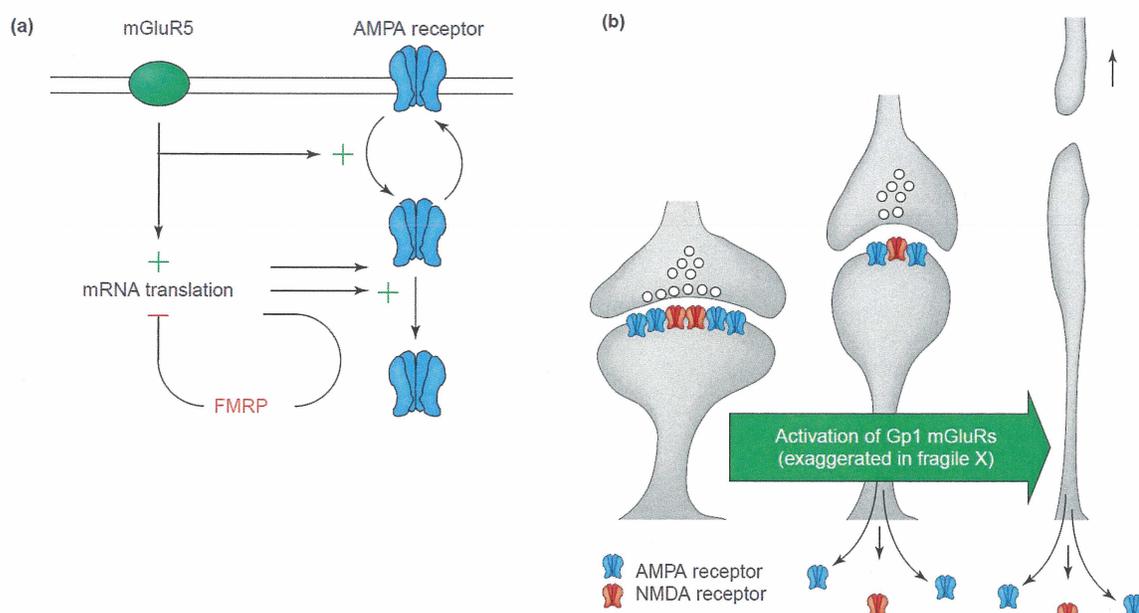
**Tableau 2. Identification des 14 ARNm interagissant avec FMRP et validé par une interaction biochimique directe.** Les rôles supposés des protéines interagissant avec FMRP sont fournis à titre d'indication. Les abréviations ont été définies dans la liste des abréviations. Ce tableau a été traduit librement de la référence (Santoro et al., 2012).

Néanmoins, la fonction de FMRP ne semble pas restreinte à ses propriétés de protéine liant l'ARN. En effet, de plus en plus d'études s'intéressent à une nouvelle catégorie de protéine interagissant avec FMRP, soit les protéines associées au cytosquelette (Tableau 1). Pour en nommer que quelques-unes : Lgl1, Ran-BPM, myosin Va, KIF5, KIF3C, etc. (Bardoni et al., 2006). Alors que la signification fonctionnelle de ces associations reste encore à élucider, leur identification permet d'accroître la compréhension de la participation de FMRP à la morphologie neuronale. FMRP s'associe également avec les protéines CYFIP1 et CYFIP2, deux protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette des structures dendritiques par la voie Rho/Rac GTPase pour assurer à la fois la maturation et le maintien des épines dendritiques (Schenck et al., 2001).

### 1.2.2.3 Les fonctions étudiées

Comme mentionné précédemment, FMRP est impliqué dans la maturation des synapses neuronales. En fait, l'activité synaptique déclenche des changements dans la force d'interaction des synapses, appelés potentialisation à long terme (LTP) et dépression à long terme (LTD). Ces deux phénomènes entraînent respectivement un maintien des synapses

naissantes ou une élimination de ces derniers, un principe à la base de l'apprentissage (Huber, Gallagher, Warren, & Bear, 2002). Et bien, il a été remarqué chez les individus avec le syndrome du X fragile une phase LTD exagérée qui limite la formation des connectivités nerveuses (Figure 11b). Concrètement dans les synapses, FMRP a pour fonction, en inhibant la synthèse protéique, de limiter l'internalisation de certains récepteurs post-synaptique se produisant à la suite de l'activation des récepteurs au glutamate (mGluR) et ainsi d'inverser la LTD (Figure 11a) (Bear et al., 2004). Cette révolution de la compréhension du rôle synaptique de FMRP se base sur l'ensemble des propriétés cellulaires de cette protéine.

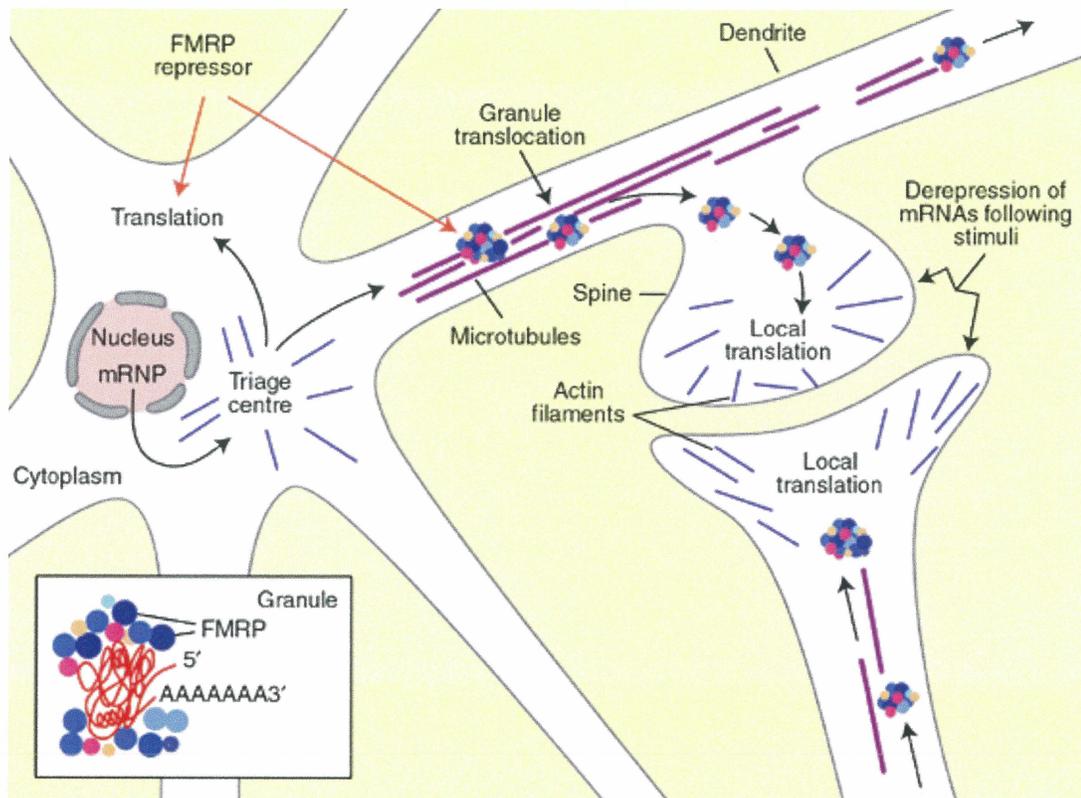


**Figure 11. Modèles des conséquences structurales de la synthèse protéique déclenchée lors de l'activation des récepteurs au glutamate.** (a) L'activation des mGluR entraîne une augmentation de la synthèse protéique, qui comme l'activation des récepteurs au glutamate elle-même, entraîne l'internalisation des récepteurs AMPA. Cette internalisation est limitée par FMRP qui agit à titre de répresseur traductionnel. (b) La perte des récepteurs membranaires AMPA, ainsi que NMDA, à la suite de l'activation des mGluR cause l'affaiblissement des synapses. Ce phénomène exagéré chez les individus avec le syndrome du X fragile explique la présence d'épine dendritique allongée immature (Bear et al., 2004).

Tout d'abord, bien que FMRP est une protéine cytoplasmique, des analyses d'immunolocalisation de formes tronquées de FMRP, ainsi que de nouvelles constructions ont rapidement permis de mettre en évidence la possibilité de cette protéine de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau et ainsi de poser l'hypothèse d'un rôle dans

l'exportation cytoplasmique d'ARN (Eberhart et al., 1996). Néanmoins, puisque FMRP est retrouvé à 95 % au niveau du cytoplasme, il semble que cette protéine y exerce sa principale fonction.

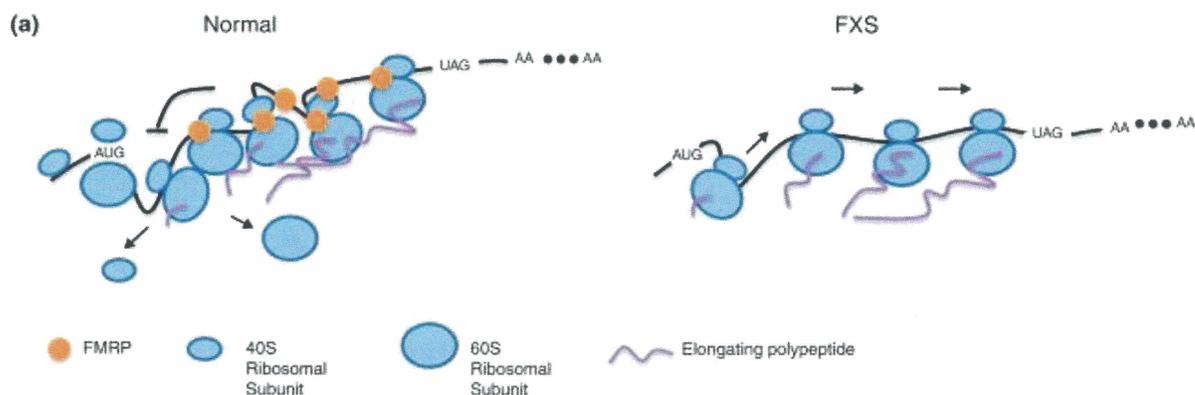
Dans le cytoplasme, FMRP est majoritairement associée aux polyribosomes par le biais de complexes RNP (Corbin et al., 1997), des complexes participant au transport des ARN. Le cytosquelette est bien entendu au centre de ce transport, et plus particulièrement les microtubules (15-20 % des protéines neuronales) qui représentent la structure majeure des axones (Laferriere et al., 1997). De par son interaction avec différentes protéines motrices de ce réseau, FMRP participe également à ce transport neuronal dépendant des microtubules (Figure 12). En effet, les complexes RNP contenant FMRP colocalisent avec les microtubules axonaux et l'utilisation d'agent affectant l'intégrité du réseau de tubuline affecte également de manière significative la portion synaptique de FMRP (De Diego Otero et al., 2002). Dans les épines dendritiques, les filopodes, ainsi que dans les cônes de croissance, les complexes RNP sont plutôt compartimentés dans les filaments d'actine (Antar et al., 2005). Cette association au cytosquelette semble même être au cœur de la répression traductionnelle de FMRP. En effet, le groupe de recherche du Dr Feng a mis en évidence que les polyribosomes cytoplasmiques associés à FMRP étaient en traduction active, alors que ceux en interaction avec le cytosquelette étaient plutôt majoritairement retenus en état de dormance (H. Wang et al., 2008).



**Figure 12. Modèle proposé du transport des ARNm sous forme réprimée par FMRP.** FMRP entre dans le noyau et interagit avec les complexes pré-RNP pour escorter les ARNm au cytoplasme. Les complexes RNP sont ensuite dirigés vers un centre de triage où la décision de traduction des ARNm ou de transport vers les sites de traduction localisée. Les granules résultantes sont par la suite transportées le long des dendrites via le réseau de microtubules jusqu'aux épines dendritiques cibles. Les ARNm réprimés sont réactivés suivant le stimulus adéquat pour une synthèse localisée dans le réseau d'actine très développé de ces structures (Bardoni et al., 2006).

Effectivement, plusieurs évidences suggèrent que FMRP y causerait la répression des ribosomes (Figure 13). En fait, l'utilisation d'agent chimique causant la dissociation des ribosomes en traduction active, par exemple la puromycine, permet d'identifier certains polyribosomes résistants, donc bloqués dans un état inactif. Comme FMRP est partie intégrante de ces complexes résistants, il ne serait pas surprenant qu'il en soit le responsable (Stefani et al., 2004). D'ailleurs, la présence de FMRP dans un système de traduction *in vitro* augmente le nombre de polyribosomes bloqués sur des ARNm cibles de FMRP, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle de répresseur traductionnel (Darnell et al., 2011). Le blocage des polyribosomes semble donc être la clé de la répression traductionnelle sur les ARNm cibles de FMRP, ce qui pourrait par exemple servir à la

traduction localisée de ces ARNm. D'autant plus que l'absence de FMRP entraîne l'augmentation de la traduction de ces ARNm cibles (T. Wang et al., 2012).



**Figure 13. Mécanisme de régulation de la traduction par FMRP.** (a) FMRP inhibe la traduction des ARNm cibles par le blocage des ribosomes. Chez les cellules d'individu avec le syndrome du X fragile, cette répression traductionnelle est absente (T. Wang et al., 2012).

Alors que de plus en plus d'évidences renforcent le rôle de répresseur traductionnel de FMRP, dans certaines situations elle semble agir, à l'opposé, à titre d'activateur. C'est le cas de *Sod1*, un ARNm démontrant une très haute affinité spécifique pour FMRP, important dans la réponse au stress oxydatif. Il se trouve que l'absence de FMRP conduit inexorablement à une diminution importante de l'expression de cet ARN (Bechara et al., 2009a). Dans le même ordre d'idée, FMRP peut également favoriser la stabilité et ainsi augmenter l'expression de certains ARN. En fait, il a été montré que FMRP pouvait reconnaître une région riche en guanine dans la région 3' de l'ARNm PSD-95, et par le fait même le protéger de la dégradation (Zalfa et al., 2007).

La synthèse protéique dans les cellules hautement spécialisées comme les neurones est hautement contrôlée, afin de permettre une traduction localisée. Les synapses en sont un bel exemple où l'on retrouve à la fois des polyribosomes, des facteurs d'initiation de la traduction, ainsi que plusieurs ARNm spécifiques; ce qui permet de répondre rapidement et distinctement à différents signaux neuronaux et d'assurer la plasticité neuronale (Bramham & Wells, 2007). En fait, plusieurs observations de localisation ont montré qu'une FMRP était majoritairement distribuée au niveau des complexes RNP dans les synapses,

soit des granules composées d'ARNm, de ribosomes et de protéine liant l'ARN (Antar et al., 2004). L'activation des récepteurs synaptiques de glutamate cause par la suite l'enrichissement de FMRP, ainsi que de ces ARNm cibles au niveau des synapses, par exemple : Map1b, CamKII $\alpha$  et Sapap4 (Dictenberg et al., 2008). Il a également été observé chez le modèle murin que le transport de l'ARNm du gène FMR1 est augmenté suivant la stimulation neuronale, ce qui permet en plus une synthèse accrue de FMRP dans les synapses (Kao et al., 2010).

Bref, la fonction cellulaire exacte de FMRP est encore à définir; des études récentes ne cessent de découvrir de nouvelles propriétés et fonctions de FMRP. De plus en plus de groupes de recherche croient que FMRP serait un répresseur traductionnel de ces ARNm cibles au niveau des synapses des neurones, et jouerait un rôle crucial dans la plasticité synaptique (T. Wang et al., 2012). Néanmoins, la relation entre FMRP et le cytosquelette est encore mal comprise et sa réelle contribution à la plasticité neuronale l'est encore moins.

### **1.2.3 Le modèle d'étude de la relation entre FMRP et le cytosquelette**

En effet, des études approfondies sont nécessaires pour saisir l'importance biologique de FMRP dans l'organisation structurale des épines dendritiques, la manifestation pathologique clé chez les individus avec le X fragile. Bien sûr l'utilisation de différentes lignées cellulaires, telles les lignées fibroblastiques, épithéliales et lymphocytaires, est largement répandue pour étendre notre compréhension de la fonction de FMRP. Par contre, ces cellules roturières ont une morphologie et un fonctionnement hautement éloignés des cellules hautement spécialisées comme le sont les neurones, où FMRP y est fortement exprimée (Davidovic et al., 2006). C'est sans oublier la rareté du matériel neuronal humain frais en quantité suffisante pour survenir aux différentes recherches; propulsant ainsi l'essor de modèles mieux adaptés aux phénomènes spécifiques ayant lieu dans les synapses neuronales.

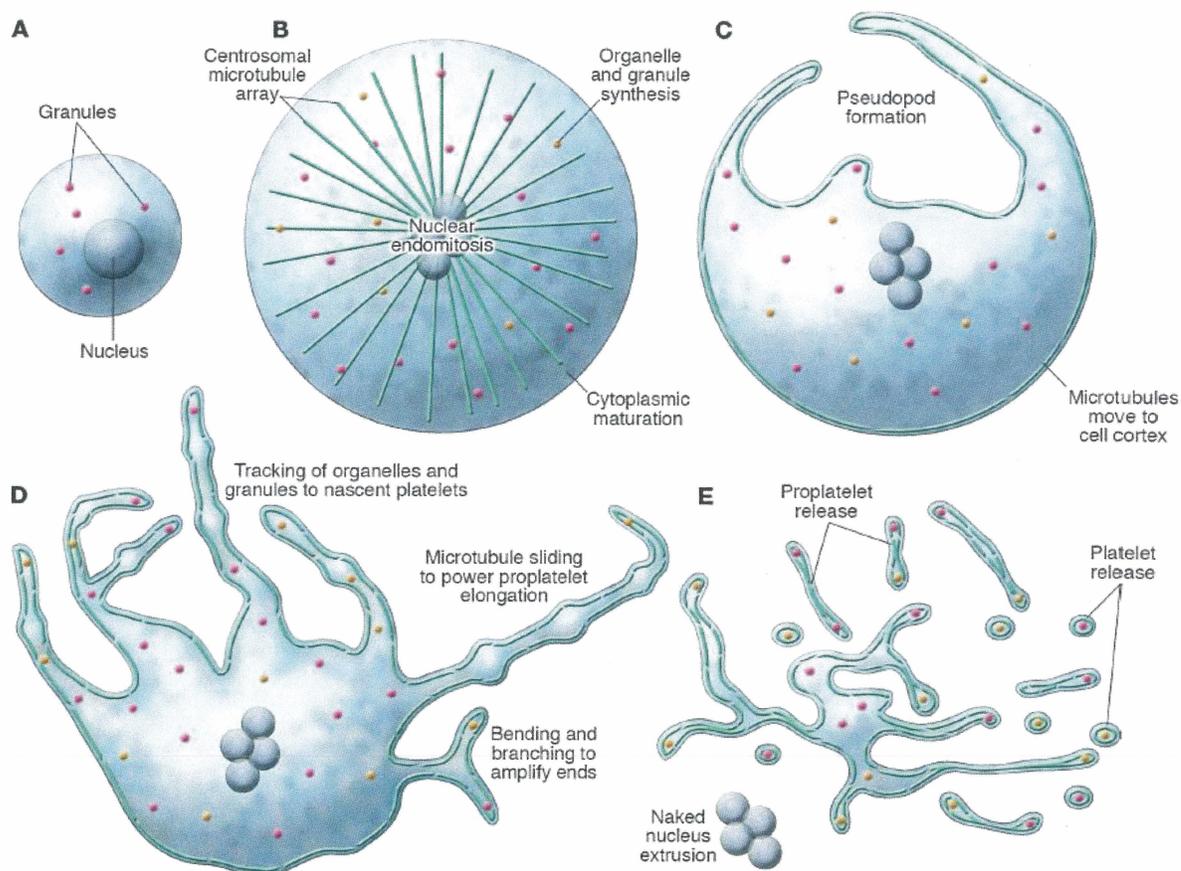
Notre laboratoire a récemment mis en évidence un tout nouveau modèle d'étude offrant plusieurs avantages innovateurs, soit les plaquettes sanguines (Lauziere et al., 2012).

L'utilisation des plaquettes comme modèles d'étude neuronaux n'en est pas à ses débuts; dès les années 80, plusieurs groupes de recherche sont intéressés à cette ressemblance cellulaire (Rotman, 1983) (Pletscher & Laubscher, 1980) (Barradas & Mikhailidis, 1993). En fait, les plaquettes, tout comme les neurones, présentent un haut niveau de spécialisation, partageant même de nombreuses autres caractéristiques semblables. Pour n'en nommer que quelques-unes : certains messagers seconds (ex. glutamate) et récepteurs membranaires communs (ex. mGluR), une synthèse protéique locale caractérisée par une moindre influence du noyau, une importante sécrétion de granules, etc. (Dreux & Launay, 1985). Néanmoins, puisque le syndrome du X fragile est une maladie structurelle des dendrites et par conséquent d'une anomalie du cytosquelette, la plus importante ressemblance entre les plaquettes et les neurones demeure leur cytosquelette hautement développé. En effet, bien que les plaquettes soient des cellules avec un métabolisme minimal à l'état quiescent, leur activation, comme vous le constaterez à la lecture de la prochaine section, déclenche de nombreux phénomènes de spécialisation axés sur la réorganisation du cytosquelette (Thon & Italiano, 2010).

### **1.3 Les plaquettes sanguines**

#### **1.3.1 Généralités sur les plaquettes**

Les plaquettes sont, au même titre que les globules rouges et blancs, des cellules en circulation dans le système sanguin. Elles sont produites par leur précurseur immédiat les mégacaryocytes, issus de la différenciation des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse. La production de plaquette ou thrombopoïèse correspond à la phase finale du développement mégacaryocytaire, un système unique en soi qui se divise en deux parties (Patel et al., 2005). Tout d'abord, les mégacaryocytes deviennent polyploïdes par endomitose, une variante du cycle cellulaire qui permet la réplication de l'ADN nucléaire sans division de la cellule elle-même (Figure 14). Selon certaines études, l'amplification des gènes fonctionnels pourrait faciliter la production protéique massive, ainsi que la synthèse de membrane nécessaire à la thrombopoïèse (Raslova et al., 2003). Au cours de la maturation cytoplasmique et membranaire survenant à la suite de la polyploïdisation, il y a emmagasinage des différents éléments plaquettaires qui seront par la suite transférés aux extrémités donnant naissance aux plaquettes, suivant l'expulsion des noyaux des mégacaryocytes (Youssefian & Cramer, 2000). Le mécanisme exact de la production finale, ainsi que le relâchement des plaquettes dans la circulation est encore inconnu, bien que deux modèles aient été proposés : le modèle de fragmentation et le modèle de formation des proplaquettes (Figure 14).



**Figure 14. Étape de la production des plaquettes par les mégacaryocytes.** La transition entre le mégacaryocyte immature (A) et le relâchement des plaquettes (E) se produit via une suite systématique d'évènements. (B) Les cellules entrent premièrement en endomitose qui permet une synthèse d'organelles, ainsi qu'une maturation et expansion drastique du cytoplasme. Apparaît également la complexification du réseau de microtubule à partir des centrosomes. (C) Avant la formation des proplaquettes, les centrosomes sont désassemblés et les microtubules migrent au cortex cellulaire. La formation des proplaquettes débute avec le développement de pseudopodes épais. (D) Pendant que les organelles sont déplacées dans l'extrémité des pseudopodes, le glissement des microtubules permet l'élongation des proplaquettes. L'intensification de la formation de pseudopodes dans la cellule permet de maximiser les extrémités proplaquettaires. (E) L'entièreté du cytoplasme du mégacaryocyte est convertie en un grand nombre de proplaquettes, qui sont libérées de la cellule. Les noyaux sont expulsés des proplaquettes et les plaquettes individuelles sont relâchées à l'extrémité des proplaquettes (Patel et al., 2005).

Alors que les mégacaryocytes représentent moins d'un pourcent des cellules myéloïdes, ils sont à l'origine d'une production journalière avoisinant les  $10^{11}$  plaquettes au niveau basal (Kaushansky, 2008). Les nouvelles plaquettes de forme discoïde ainsi formées prennent la direction de la circulation sanguine ( $150$  à  $400 \times 10^9/L$ ) pour une durée de vie avoisinant les 8 à 10 jours. Les plaquettes représentent les plus petits éléments figurés du sang avec un

diamètre de 2 à 4  $\mu\text{m}$ , une épaisseur de 0,5  $\mu\text{m}$  et un volume moyen de 6 à 10 fl. Alors qu'elles sont à l'état circulatoire en période de latence (activité cellulaire minimale), leur activation et leur accumulation subséquente au site de lésion vasculaire sont les étapes clés de l'hémostase primaire (Angiolillo et al., 2010).

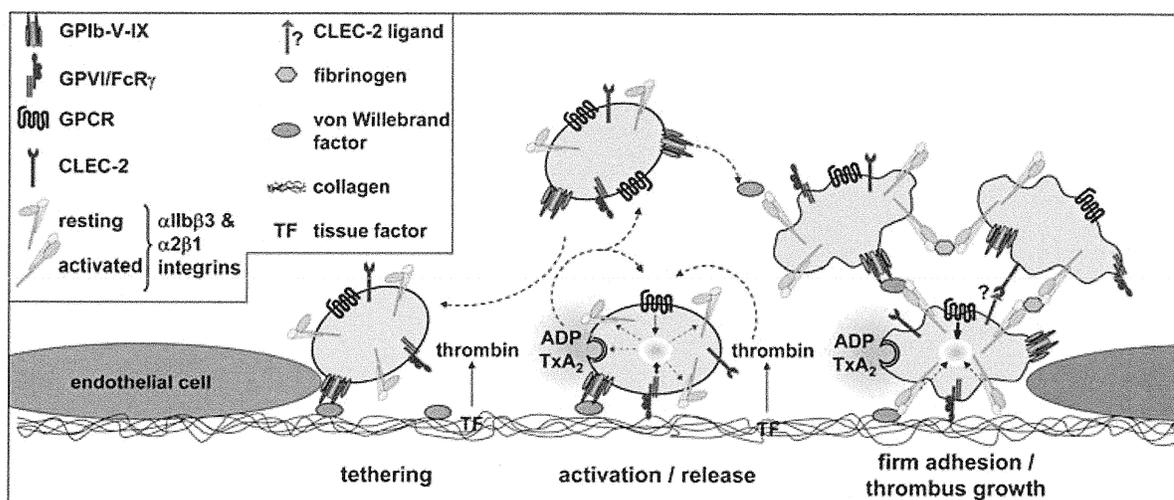
En fait, l'hémostase englobe l'ensemble des étapes qui contribuent à l'arrêt des saignements à la suite d'une brèche dans une paroi sanguine, mais également le maintien de la fluidité du sang et des propriétés des vaisseaux. Elle se subdivise en trois étapes successives : l'hémostase primaire (constriction du vaisseau lésé et formation du clou plaquettaire), la coagulation (renforcement du clou plaquettaire par la formation d'un caillot de fibrine) et la fibrinolyse (dissolution du caillot). C'est l'hémostase primaire, ou la formation de l'agrégat plaquettaire qui sera au cœur de la présente étude. Afin de permettre l'agrégation, les plaquettes subissent différentes transformations physiologiques, dont un changement de forme drastique, conséquence de la reconnaissance de la brèche et de la transmission du signal (Angiolillo et al., 2010).

### **1.3.2 L'activation des plaquettes**

#### **1.3.2.1 L'adhésion plaquettaire**

Effectivement, l'exposition de la matrice extracellulaire sous-endothéliale (ECM) lors d'une lésion vasculaire permet l'interaction des différents récepteurs membranaires avec certaines composantes de l'ECM, dont le collagène qui est un puissant activateur plaquettaire. En fait, la membrane plaquettaire, une bicouche lipidique typique, est parsemée de différents récepteurs : les sélectines (P-sélectine), les glycoprotéines ou intégrines (ex. GPI, GPII, GPIII, GPIV et GPV), les immunoglobulines, de même que les récepteurs des agonistes plaquettaires (ex. collagène, thrombine, adénosine diphosphate (ADP), thromboxane  $A_2$  (Tx $A_2$ )) (Kamath et al., 2001). Chez les plaquettes, c'est l'intégrine GPIIb/IIIa ( $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ) qui est considérée la plus importante, de par son niveau d'expression élevé dans la membrane des plaquettes, mais également pour son rôle indispensable dans la formation de l'agrégat plaquettaire qui sera discuté dans une section ultérieure (Stegner & Nieswandt, 2011).

Donc lors d'une lésion vasculaire, ces récepteurs permettent aux plaquettes d'interagir directement avec les différentes protéines d'adhésion de l'ECM. En fait, ce sont les complexes GPIb-V-IX et l'intégrine GPVI qui prédominent au niveau de l'adhérence des plaquettes, interagissant respectivement avec le facteur de von Willebrand (vWF) et le collagène (Figure 15) (Nuyttens et al., 2011). La stimulation de ces récepteurs active les cascades de signalisation qui mène à une augmentation du calcium cytoplasmique, ainsi qu'une stimulation des protéines kinases, des étapes au cœur de l'activation (Jennings, 2009).

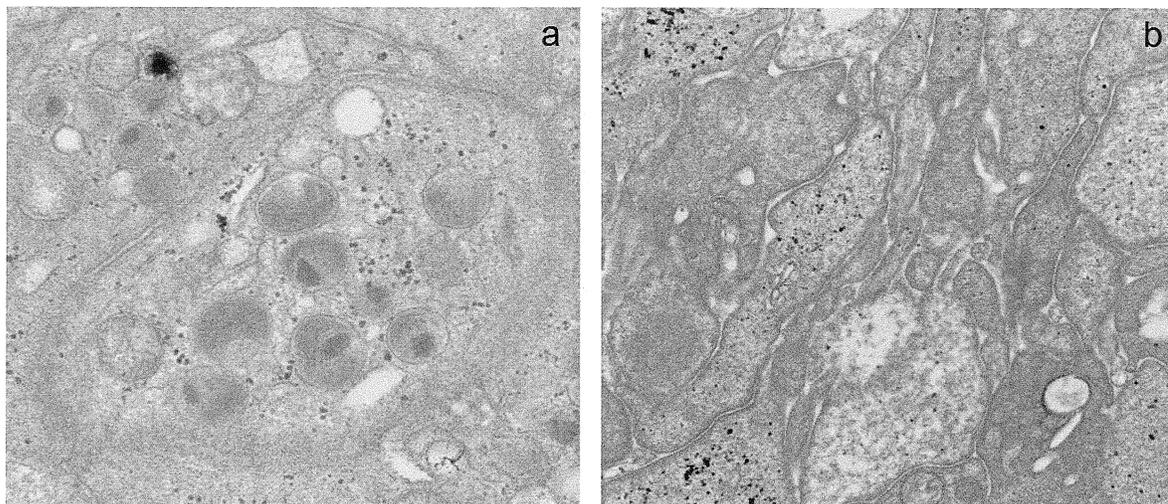


**Figure 15. Modèle de l'adhésion plaquettaire à la matrice extracellulaire sous-endothéliale au site de la lésion vasculaire et de la formation subséquente de l'agrégat.** Le premier contact est principalement assuré par l'interaction du récepteur GPIb-V-IX avec le facteur von Willebrand. Par la suite, la reconnaissance du collagène par l'intégrine GPVI initie l'activation plaquettaire, nécessaire à la relâche de rétroactivateurs, principalement l'ADP, l'ATP et la TxA<sub>2</sub>. Cette activation est consolidée par la thrombine générée par la production locale du facteur tissulaire (TF). Puis, l'adhésion stable des plaquettes au collagène grâce aux intégrines  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (directement) et  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (indirectement par l'intermédiaire du vWF ou d'autres ligands) accentue le relâchement des agonistes solubles. Finalement, l'agrégat plaquettaire initié à l'aide des intégrines des différentes plaquettes est renforcé par le récepteur CLEC-2, dont le ligand reste encore à déterminer (Stegner & Nieswandt, 2011).

### 1.3.2.2 La sécrétion de granules

Lors de l'activation, les granules centralisées fusionnent avec le système caniculaire ouvert (SCO), un système membranaire consistant en des invaginations profondes de la membrane externe au niveau du cytoplasme (Figure 16). Cette exocytose permet un déversement de plus de 300 protéines et facteurs qui se retrouveront à la membrane cytoplasmique ou dans

l'environnement extracellulaire (Smyth et al., 2009). Les plaquettes sont caractérisées par la présence de deux types de granules spécifiques: les granules  $\alpha$  et les granules denses.



**Figure 16. Sécrétion des granules plaquettaire consécutive à l'activation.** Des plaquettes quiescentes (a) ou activées au collagène (b) ont été analysées par microscopie électronique. La présence de granules (cercles opaques) est observable uniquement chez les plaquettes quiescentes.

Les granules  $\alpha$  sont les plus abondantes (de 50 à 80 par cellule), représentant 10 % du volume plaquettaire (Blair & Flaumenhaft, 2009). Elles contiennent à la fois des protéines exprimées à la membrane et à la surface membranaire (ex. intégrines et récepteurs), des protéines solubles impliquées entre autres dans le processus de coagulation et d'inflammation, ainsi que des facteurs favorisant la cicatrisation (Figure 17). Les granules denses sont environ dix fois moins nombreuses (de 4 à 8 par cellule), mais facilement identifiables par leur intense opacité électronique. Ces granules relâchent de petites molécules, tels certains nucléotides, l'ADP et le calcium (Cerecedo et al., 2010). Le processus de sécrétion des granules plaquettaire permet d'augmenter le recrutement et l'activation d'autres plaquettes par différentes voies de signalisation et d'ainsi favoriser l'agrégation.

$\alpha$ -Granules	Dense bodies
Platelet-specific proteins	ADP
Platelet factor 4	ATP
$\beta$ -Thromboglobulin family*	Calcium
Multimerin	Serotonin
Adhesive glycoproteins	Pyrophosphate
Fibrinogen	GDP
von Willebrand factor	Magnesium
von Willebrand factor propeptide	Other secreted or released proteins
Fibronectin	Protease nexin I
Thrombospondin-1	Gas6
Vitronectin	Amyloid $\beta$ -protein precursor (protease nexin II)
Coagulation factors	Tissue factor pathway inhibitor
Factor V	Factor XIII
Protein S	$\alpha_1$ -Protease inhibitor
Factor XI	Complement I inhibitor
Mitogenic factors	High molecular weight kininogen
Platelet-derived growth factor	$\alpha_2$ -Macroglobulin
Transforming growth factor- $\beta$	Vascular permeability factor
Endothelial cell growth factor	Interleukin-1 $\beta$
Epidermal growth factor	Histidine-rich glycoprotein
Insulin-like growth factor I	Chemokines
Angiogenic factors	MIP-1 $\alpha$ (CCL3)
Vascular endothelial growth factor	RANTES (CCL5)
Platelet factor 4 (inhibitor)	MCP-3 (CCL7)
Fibrinolytic inhibitors	Gro- $\alpha$ (CXCL1)
$\alpha_2$ -Plasmin inhibitor	Platelet factor 4 (CXCL4)
Plasminogen activator inhibitor-1	ENA-78 (CXCL5)
Albumin	NAP-2 (CXCL7)
Immunoglobulins	Interleukin-8 (CXCL8)
Granule membrane-specific proteins	TARC (CCL17)
P-selectin (CD62P)	
CD63 (LAMP-3)	
GMP 33	

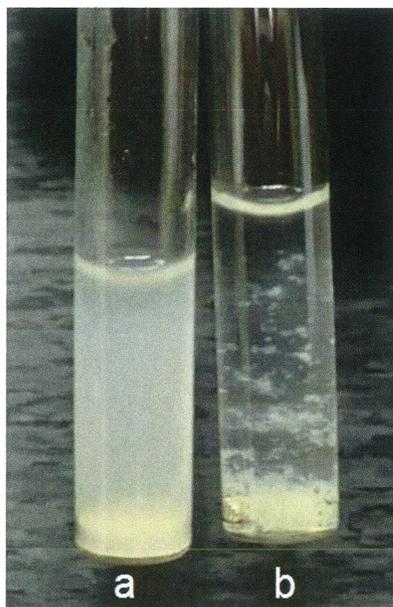
**Figure 17. Contenu des granules spécifiques aux plaquettes.** Les abréviations ont été définies dans la liste des abréviations (Smyth et al., 2009).

### 1.3.2.3 L'agrégation plaquettaire

Bien que la sécrétion ne soit pas nécessaire à l'agrégation, la dégranulation permet, par l'amplification du signal d'activation (ADP et TxA<sub>2</sub>), de déclencher l'agrégation irréversible. Le principal médiateur de l'agrégation plaquettaire est l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, un hétérodimère transmembranaire dont la formation est engendrée par l'activation des plaquettes. Une fois activé, ce complexe lie le fibrinogène et permet les interactions entre plaquettes, soit la formation du thrombus (Kamath et al., 2001).

*In vitro*, ces interactions entre plaquettes, ou agrégation, peuvent être suivie par l'utilisation du principe de turbidimétrie (BORN, 1962). Lors de l'agrégation plaquettaire, le nombre de particules diminue causant ainsi une augmentation de la transmission du rayon lumineux (Figure 18). De la sorte, en utilisant un agrégomètre, on peut suivre en direct la formation du caillot et obtenir un pourcentage d'agrégation maximal reflétant la force de l'agoniste

utilisé. Cet appareil compare donc la différence d'absorbance d'une suspension plaquettaire à celle d'une solution de référence, le tampon de réaction puisque les plaquettes sont lavées (fibrinogène nécessaire à l'agrégation présent dans les granules  $\alpha$ ).

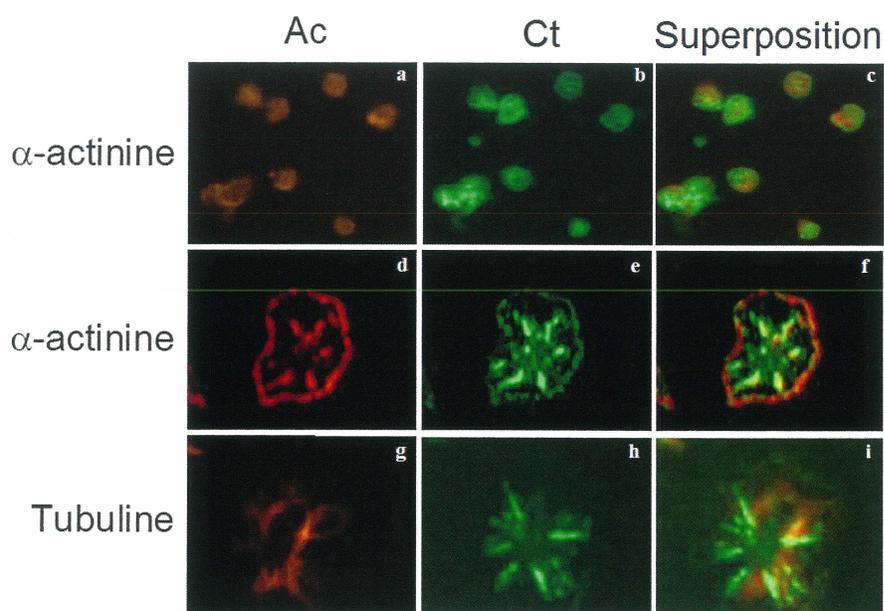


**Figure 18. Changements de la turbidimétrie d'une suspension plaquettaire suivant l'ajout d'un activateur.** Le déclenchement de l'activation des plaquettes quiescentes lavées (a) mène à la formation d'agrégat (b), ce qui permet une diminution de la densité des particules en suspension.

Lors de l'étude de la fonction plaquettaire, le choix de l'activateur est crucial. En effet, bien qu'il existe plusieurs molécules causant l'activation des plaquettes, ils sont tous caractérisés par une force d'activation (agrégation maximale) qui leur est propre. Par exemple, la thrombine (signalisation basée sur la phospholipase C) représente un des agonistes les plus puissants, alors que l'ADP (signalisation basée sur la phospholipase  $A_2$ ) est considéré comme un agoniste faible. Le collagène, constituant de la matrice extracellulaire, est également caractérisé par une forte activation basée à la fois sur la PLC et la  $PLA_2$ . Comme il existe plusieurs types de collagène avec différente affinité pour leurs récepteurs, la réponse des plaquettes au collagène est dépendante de sa provenance. Comme mentionné précédemment, tant le processus de sécrétion que celui de l'agrégation découlent tous deux d'une réorganisation du cytosquelette des plaquettes.

### 1.3.2.4 La réorganisation du cytosquelette

L'un des premiers évènements tangibles consécutifs de l'activation est le changement de forme radicale que subissent les plaquettes. En fait, les plaquettes de forme discoïde à l'état quiescent deviennent tout d'abord de forme sphérique puis étendent rapidement plusieurs filopodes (Hartwig, 2006). Bien que l'anneau interne sous-membranaire de microtubules soit au cœur du maintien de la forme discoïde, c'est la réorganisation des microfilaments qui est l'origine de la formation de ces extensions cellulaires permettant l'étalement des plaquettes (Figure 19).



**Figure 19. Changements morphologiques typiques du cytosquelette plaquettaire à la suite de l'activation.** Des plaquettes quiescentes (a à c) ou activées au collagène (d à i) ont été fixées au paraformaldéhyde. Les plaquettes ont par la suite été colorées par immunofluorescence avec les anticorps ciblés (Ac): l' $\alpha$ -actinine, une protéine associée au réseau d'actine, et la tubuline. Les cellules ont également été contre-colorées (Ct) avec le WGA (colore les phospholipides) chez les plaquettes quiescentes et la phalloïdine (colore les microfilaments) chez les plaquettes activées. Une superposition du signal détecté avec l'anticorps spécifique et de la contre-coloration est présentée.

L'actine est la protéine plaquettaire la plus abondante, soit près de 30 % du contenu protéique total (Harris & Weeds, 1978). L'actine est retrouvée dans la cellule sous deux formes : les monomères d'actine globulaire (G-actine) ou l'actine polymérisée en filament (F-actine). Dans les plaquettes quiescentes, ces filaments (30 à 40 %) sont dans un équilibre dynamique avec les monomères, leur dépolymérisation est donc équivalente à leur

polymérisation. Par contre dans les premiers moments suivant l'activation, cet équilibre est dramatiquement modifié permettant ainsi un réarrangement du réseau en deux phases : la dépolymérisation et l'assemblage progressif des microfilaments restructurés qui totaliseront près de 70 % de l'actine cellulaire (Fox, 1993). Brièvement, l'inactivation de l'adducine, par la phosphorylation de la protéine kinase C ou la liaison de la calcium-calmoduline avec le calcium, permet de libérer le cytosquelette membranaire et de permettre son recueillement au centre de la plaquette. Par la suite, l'élévation du taux de calcium cytoplasmique active également la gelsoline et la cofiline; des protéines qui coopèrent afin de fragmenter les microfilaments. L'assemblage du réseau d'actine est initié par la rencontre de ces fragments avec le complexe protéique Arp 2/3 activé. Ce complexe lie les fragments près de leur extrémité et initie la formation d'un second filament; un processus exponentiel qui se concrétise par une interaction finale de près de 80 % de la quantité totale de ce complexe (Hartwig, 2006).

Cette restructuration du cytosquelette et plus particulièrement du réseau d'actine permet à la fois de former l'appareil contractile nécessaire à la sécrétion des différents types de granule plaquettaire (Flaumenhaft et al., 2005), mais également de former un important réseau de raccordement de plusieurs protéines impliquées dans différents processus cellulaires (Fox, 1993). En effet, plusieurs protéines se déplacent au réseau d'actine lors de l'activation plaquettaire, et la liste de ces différents partenaires est en constante progression (Tableau 3).

Protéines interagissant avec le réseau d'actine		
Filamine	HSP90 $\alpha$	Protéine C-terminal du domaine LIM
Vinculine	GPIIb/IIIa	Fibrinogène $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$
ABP	CapZ- $\alpha$	Chaîne lourde de myosine
Gelsoline	Arc 34	Chaîne légère de myosine
Cofiline	Tropomyosine	Protéine semblable à la coronine
Arp 3	Cortactine	Protéine de 78 kDa régulé par le glucose
Caldesmone	SM22 $\alpha$ (homologue)	Tyrosine kinase pp60 <sup>c-src</sup>
$\alpha$ -actinine	Fascin	VASP

**Tableau 3. Identification de certaines protéines en liaison avec le réseau d'actine lors de l'activation plaquettaire.** La liste présentée n'est aucunement exhaustive, mais présentée à titre d'exemple. Les abréviations ont été définies dans la liste des abréviations (Gevaert, Eggermont, Demol, & Vandekerckhove, 2000) (Bertagnolli & Beckerle, 1993).

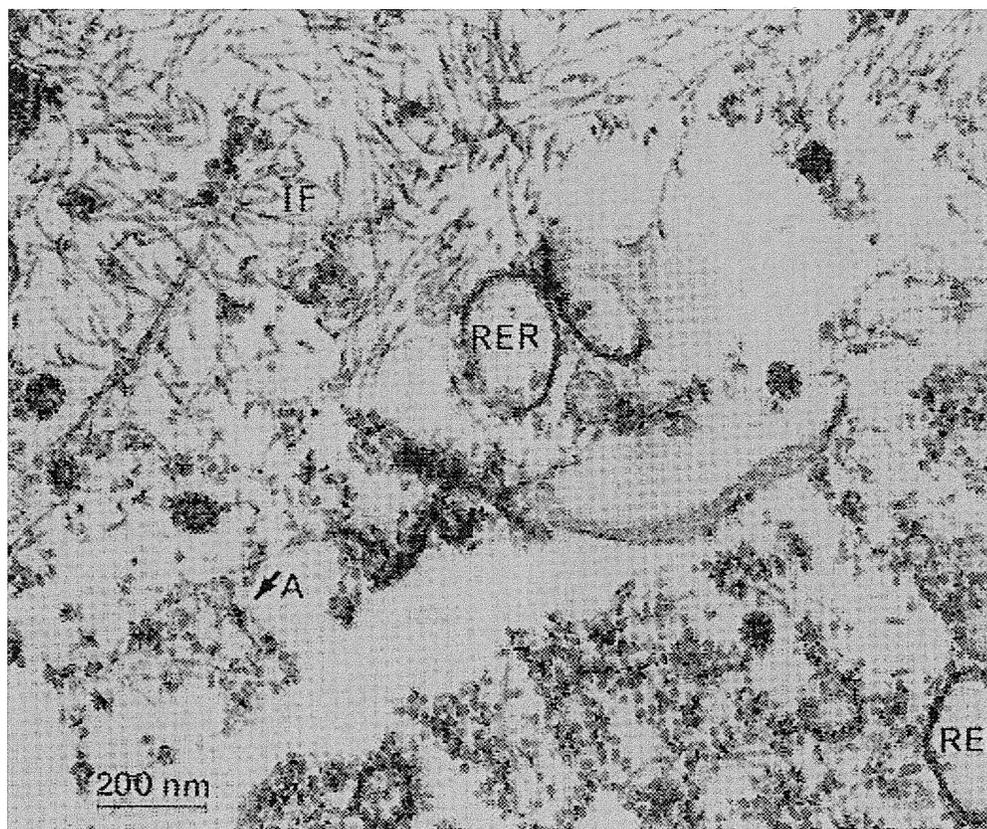
Ces protéines se déplacent au cytosquelette pour moduler les propriétés de ce réseau ou pour être transportées vers leur localisation respective. Tandis que certaines protéines et ARN vont se retrouver au cytosquelette afin de prendre part à des processus cellulaires localisés, telle la traduction (Fox, 1993).

### 1.3.2.5 L'initiation de la traduction

Lors de l'activation, les ARNm sont transférés au cytosquelette qui sert chez les plaquettes de support alternatif à la synthèse protéique. De ce fait, plusieurs protéines nécessaires à la traduction sont également rapidement transportées vers le cytosquelette, par exemple eIF-4E. Ce facteur d'initiation, comme son nom l'indique, permet la liaison entre l'ARNm et les ribosomes. Dans les plaquettes quiescentes, eIF-4E interagit avec son répresseur protéique 4E-BP1, alors que la phosphorylation de ce dernier lors de la cascade d'activation permet de favoriser l'interaction du facteur d'initiation aux ARNm (Lindemann & Gawaz, 2007).

Par ailleurs, les ribosomes plaquettaires sont également retrouvés, suivant un protocole de fractionnement cellulaire, dans la fraction contenant le cytosquelette (Weyrich et al., 2004). Plusieurs groupes de recherches se sont intéressés à ce phénomène de proximité d'une partie des polyribosomes et du cytosquelette de différentes cellules. L'utilisation de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence que les polyribosomes interagissaient spécifiquement avec les microfilaments (Figure 20) (Hesketh & Pryme,

1991). Comme le réseau d'actine représente l'élément principal du cytosquelette plaquettaire, il serait fort probable que cette spécificité soit également présente dans ces cellules. En effet, l'utilisation chez les plaquettes de la cytochalasine D, un agent favorisant la dépolymérisation des microfilaments, entraîne une sévère diminution de la synthèse protéique (Lindemann & Gawaz, 2007).

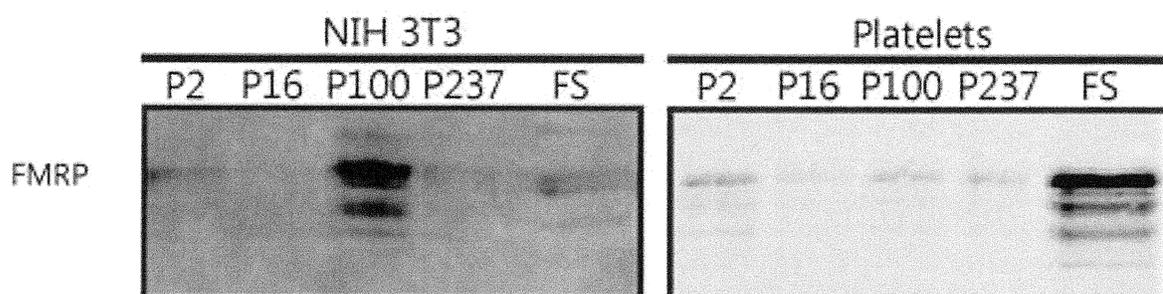


**Figure 20. Association spécifique des polyribosomes du cytosquelette au réseau d'actine cellulaire.** L'analyse des images de microscopie électronique de cellule de la lentille de l'œil permet de mettre en évidence que le réseau d'actine (A, flèche) est en contact étroit avec les polyribosomes (points noirs), au même titre que le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Alors que ces polyribosomes sont absents des autres constituants du cytosquelette (IF) (Ramaekers et al., 1983).

#### 1.4 La justification de l'étude

À la lecture des précédentes sections, les plaquettes représentent un modèle cellulaire unique en soi pour l'étude de la spécialisation du cytosquelette et plus particulièrement du réseau d'actine. Un processus sévèrement affecté chez les individus avec le syndrome du X fragile, où la présence d'épines dendritiques immatures est flagrante. Bien que les études suggérant de nouvelles fonctions à FMRP se succèdent, leur importance relative se doit d'être étudiée afin de statuer irrévocablement sur l'impact de l'absence de cette protéine dans les neurones.

Comme FMRP semble être impliqué au niveau de la traduction localisée, sa présence dans les plaquettes sanguines, un modèle de faible synthèse protéique à l'état quiescent, pourrait être remise en question. Néanmoins, la présence de FMRP dans des extraits protéiques plaquettaires a récemment été confirmée (Lauziere et al., 2012). De plus, contrairement à la majorité des autres cellules et tissus étudiés à ce jour, il a été mis en évidence que dans les plaquettes circulantes, FMRP n'est pas constitutivement associée à des particules de haut poids moléculaire, comme les polyribosomes, mais est plutôt récupérée dans la fraction soluble des plaquettes (Figure 21).



**Figure 21. Présence de FMRP dans la fraction soluble des plaquettes sanguines.** Les extraits protéiques de fibroblaste de souris (NIH 3T3) et de plaquettes (platelets) ont été centrifugés à différentes vitesses afin d'obtenir quatre culots : le P2 (2 400 g), le P16 (16 000 g), le P100 (100 000 g) et le P237 (237 000 g), ainsi qu'un surnageant final (FS). La présence de FMRP dans chacune des fractions a ensuite été révélée par immunobuvardages avec l'anticorps 1C3 (Lauziere et al., 2012).

##### 1.4.1 Les objectifs de recherche

Les précédents résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que FMRP a une distribution cellulaire inhabituelle dans les plaquettes quiescentes (Lauziere et al., 2012).

Comme la fonction physiologique de ces cellules, c'est-à-dire leur rôle crucial dans l'hémostase primaire, n'a lieu que suivant leur activation en réponse à une brèche des vaisseaux sanguins; ce dernier processus pourrait avoir un impact important sur la localisation subcellulaire de FMRP. Une des approches les plus répandues pour mesurer cette activation est la mesure de l'agrégation des plaquettes. Grâce à l'acquisition d'un agrégomètre à 8 canaux, un appareil rendant possible cette mesure de la turbidimétrie, nous pouvions donc mesurer de façon simultanée l'agrégation plaquettaire sous plusieurs conditions. Les agrégations ont été effectuées avec des plaquettes lavées afin d'éliminer la contamination de nos analyses protéiques subséquentes par les très abondantes protéines sériques ( $85 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Par la suite, le comportement de FMRP subséquent à l'activation plaquettaire a été étudié par l'utilisation de différentes approches biochimiques et biophysiques telles que les centrifugations différentielles et sur gradients de sucroses, la microscopie par immunofluorescence et la microscopie électronique.

Chez les plaquettes, plusieurs protéines impliquées dans l'activation sont relocalisées au réseau du cytosquelette afin de participer au bon déroulement de la spécialisation cellulaire. Nous croyons donc que FMRP, une protéine qui semble impliquée dans la synthèse protéique, sera en étroite relation avec le cytosquelette plaquettaire. Dans le but de valider cette hypothèse, nous avons utilisé un protocole largement reconnu qui permet d'isoler spécifiquement le cytosquelette des plaquettes activées (Fox & Phillips, 1983). Nous avons également utilisé différents agents modulateurs de la réorganisation du cytosquelette lors de l'activation, afin de caractériser les répercussions sur le comportement de FMRP : le nocodazole, le taxol, la cytochalasine D et la jasplakinolide, qui permettent respectivement de diminuer ou d'augmenter la polymérisation des filaments de tubuline et de diminuer ou d'augmenter la polymérisation des filaments d'actine. Étant donné que FMRP pourrait participer au processus de traduction plaquettaire localisé au cytosquelette (absence du réticulum endoplasmique rugueux dans les plaquettes), il sera également question de vérifier une possible interaction entre FMRP et les polyribosomes accrochés au cytosquelette suivant l'activation plaquettaire.

Bref, il s'agit en fait d'étudier globalement les impacts de l'activation plaquettaire sur la protéine d'intérêt, FMRP; et ce, afin de poser les premières bases de la compréhension de la fonction de FMRP dans les plaquettes, qui pourront ensuite être transposées aux neurones.

## **2. CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE**

### **2.1 L'avant-propos**

**Titre de l'article :** Microfilament-dependent cytoskeletal translocation of the fragile X mental retardation protein (FMRP) upon platelet aggregation

**Auteurs de l'article :** Alexandre J. Meunier; Lucien Junior Bergeron; Clémence Guiraut; Karolyn Forget; Véronique Lauzière; François Corbin

**Titre du journal :** Journal of Cellular Physiology

**Statut de l'article :** Soumis

**Avant-propos :** Bien que la première observation du déplacement de FMRP lors de l'activation plaquettaire ait été effectuée par Véronique Lauzière, l'article scientifique contenu dans ce chapitre présente les résultats de mon projet de recherche. J'ai personnellement mis au point et optimisé les différents protocoles nécessaires, pour ensuite exécuter la partie expérimentale. À l'exception du buvardage de type Western de l'actine à la figure 3 (c et d), qui a été réalisé par Clémence Guiraut. J'ai pleinement contribué à la rédaction de cet article en écrivant la première version du manuscrit, de même qu'en participant avec mon directeur de recherche, François Corbin, à sa révision.

## 2.2 Le résumé en français

Les plaquettes sont de petites cellules anucléées dédiées à la formation d'un clou plaquettaire suivant l'activation par l'agoniste correspondant. Au cours de leur activation, de nombreux changements morphologiques, la sécrétion, ainsi que l'agrégation se produisent et sont tous dépendants de la réorganisation du cytosquelette des plaquettes. La « fragile X mental retardation protein » (FMRP), une protéine influençant la plasticité synaptique de par son rôle dans la régulation de la traduction, est également détectable dans la fraction soluble des plaquettes. La présente étude analyse les impacts possibles de l'activation plaquettaire et de la réorganisation du cytosquelette sur la distribution subcellulaire de FMRP. Nous montrons un déplacement de la protéine FMRP de la fraction soluble obtenue à la suite d'une lyse avec un détergent dans les plaquettes circulantes à la fraction enrichie de cytosquelette des plaquettes agrégées. Comme il a été montré dans d'autres cellules, la force ionique affecte la sédimentation de FMRP dans cette fraction qui contient également les composantes des polyribosomes. Cette redistribution de FMRP est incontestablement proportionnelle au pourcentage d'agrégation et indépendante de la voie biologique d'activation déclenchée par l'utilisation d'agoniste. Des expériences supplémentaires utilisant des modulateurs de la polymérisation des microfilaments (comme la cytochalasine [-] et la jasplakinolide [+]) ou des microtubules (comme le nocodazole [-] ou le taxol [+]) suggèrent une relation étroite entre FMRP et la dynamique de la polymérisation du réseau d'actine. En résumé, ce rapport propose les plaquettes en tant que modèle d'induction du déplacement de FMRP, un modèle qui pourrait être utilisé pour renforcer notre compréhension de la maturation des épines dendritiques, de la réorganisation du cytosquelette et des effets de FMRP sur la synthèse protéique suivant l'activation par les neurotransmetteurs.

## **2.3 L'article**

### **2.3.1 Abstract**

Platelets are small anucleated cells dedicated to the formation of a haemostatic plug upon activation by a proper agonist. During their activation, morphological changes, secretion and aggregation phenomena occur, which are dependent on cytoskeleton reorganization. The fragile X mental retardation protein (FMRP), a protein influencing synaptic plasticity through its role in regulating translation, is also detectable in the soluble fraction of these cells. The present study investigated whether platelet activation and cytoskeleton reorganization affect subcellular distribution of FMRP. We show the translocation of FMRP from the detergent-soluble fraction in circulating platelets to the cytoskeleton-enriched fraction in aggregated platelets. As shown in other cells, the ionic strength affects the sedimentation of FMRP to this fraction that also includes polyribosomes components. This redistribution of FMRP is undoubtedly proportional to the percentage of aggregation and unrelated to the biological activation pathway triggered by the used agonist. Additional experiments using modulators of microfilament (such as Cytochalsin [-] and Jasplakinolide [+]) or microtubule (Nocodazole [-] and Taxol [+]) polymerization suggest a close relationship between FMRP and actin polymerization dynamics. In summary, this report proposes platelets as an inducible FMRP translocation model, which could be used to strengthen our comprehension of spine maturation, cytoskeletal organization and FMRP's effect on protein synthesis upon neurotransmitter activation.

### 2.3.2 Introduction

Circulating human platelets are small anucleated megakaryocyte-derived having an essential role in primary haemostasis (Clemetson, 2011). In fact, when platelets are in close contact with damaged blood vessels, they become activated which will ultimately lead to clot formation. Their activation also triggers various signalling pathways leading to many intracellular processes including granule secretion, aggregation, pseudopodal formations, shape changes, RNA metabolism and protein synthesis (Broos et al., 2011). Cytoskeletal reorganization is one of the earliest manifestation and an essential step for the majority of processes occurring during platelet activation (Hartwig, 1992; White, 1984). This is true even for translation where the actin-based cytoskeletal core serves as an endoplasmic reticulum-alternative template for protein synthesis (Weyrich et al., 2004).

Fragile X syndrome is the most common form of genetically inherited intellectual disability and results from the expansion of CGG repeats in the FMR1 gene which, together with its methylation, leads to the absence of the corresponding protein: Fragile X mental retardation protein (FMRP) (Pieretti et al., 1991). FMRP, a protein showing sequence motifs that characterize RNA-binding proteins (KH domains and an RGG box), associates with polyribosomes (Corbin et al., 1997; Khandjian et al., 2004) and regulates the translation of certain mRNAs which are important for synaptic plasticity and neuronal maturation (Penagarikano et al., 2007). Moreover, additional implications have been proposed such as an involvement in the microRNA pathway (Cheever and Ceman, 2009), a mediation of mRNA trafficking (Kao et al., 2010) or a role in the modulation of actin dynamics (Castets et al., 2005).

Overall, the precise function of FMRP remains uncertain, whereas these results suggest that its functions are not restricted to its RNA-binding properties. Further studies using novel as well as simpler human biological systems will consolidate FMRP comprehension. Recently, we showed the presence of FMRP in a soluble form within resting blood platelets, which are characterized by low rates of translation (Lauziere et al., 2012; Lessard et al., 2011). This contrast to most other cells and tissues studied where this protein was

rather found in the polyribosomal fraction (Corbin et al., 1997). In this report, we demonstrate that FMRP, although completely detergent-soluble in circulating platelets, mostly associates with the Triton-insoluble core material upon platelet activation. This interaction of FMRP with proteins of the cytoskeletal network is dependent on platelet aggregation and seems to be related to microfilament dynamics. Our findings suggest a functional role for the association of FMRP with the cytoskeleton in platelet physiology.

### 2.3.3 Materials and methods

#### 2.3.3.1 Cellular extract preparation

Platelets were isolated from healthy adult volunteers and washed as previously described (Lauziere et al.). They ( $1 \times 10^9$  platelets/ml) were then either left quiescent or activated with agonists (100  $\mu$ M ADP (Calbiochem), 2  $\mu$ M A23187 (Sigma-Aldrich), 2.5  $\mu$ g/mL collagen (Chrono-Log) or 1 unit/mL thrombin (Calbiochem)) for 10 minutes. Aggregation was monitored using an 8-channel aggregometer (PAP-8E). In some experiments, platelets were stimulated in the presence of 5 mM EDTA or in the absence of stirring. In other experiments, platelets were preincubated for 4 minutes with cytoskeleton polymerization modulators such as 10  $\mu$ M nocodazole (Sigma-Aldrich), 25  $\mu$ M taxol (Calbiochem), 5  $\mu$ M cytochalasin D (Calbiochem) or 5  $\mu$ M jasplakinolide (Invitrogen) before adding the agonist.

Platelets were lysed as described by Fox et al. (Fox and Phillips, 1983). Briefly, platelets were rapidly placed on ice and lysed following the addition of an equal volume of a buffer containing 2 % Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH 7.4 and 10 mM EGTA and where indicated 1 M KCl or 200  $\mu$ g/mL RNase A (USB) were added.

For sucrose density ultracentrifugation, resting and activated platelets were centrifuged at 750 g for 15 minutes. Since the composition of platelets is quite different from other cells due to their complex cytoskeleton; we thus performed a protocol that has been adapted for platelets (Lindemann et al., 2001). Pellets were resuspended in 750  $\mu$ l of low-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and 50 U/ml RNasin) and kept for 10 minutes at room temperature. Thereafter, platelets were lysed with 250  $\mu$ l of high-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 9.0, 520 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40 (Nonidet P-40), 200 mM sucrose, 1 mM DTT and 50U/ml RNasin). The two buffers were supplemented with an inhibitory cocktail (100 mM NaF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM AEBSF and 2 mM DFP) to avoid FMRP degradation.

### 2.3.3.2 Subcellular fractionation

Differential centrifugations were performed as previously described with minor modifications (Lauziere et al.). Briefly, resting or activated platelet lysates were sequentially centrifuged to obtain three pellets: P2 (2,400 g for 5 min), P16 (16,000 g for 15 min) and P100 (100,000 g for 60 min) as well as a final supernatant (FS). In some experiments, soluble and cytoskeletal materials were separated following a single centrifugation at 16,000 g for 15 min (P16) (Wang et al., 2008).

Sucrose density ultracentrifugations were performed on whole platelet lysates loaded onto 15-45 % (w/w) linear sucrose gradients and centrifuged in a Beckman SW41-Ti rotor at 247,000 g for 2 hours at 4°C. Sucrose gradients were then hand-fractionated and pellets were also recovered.

### 2.3.3.3 Proteins and RNA studies

Proteins from samples were denatured in SDS as described previously (Corbin et al., 1997). Immunoblot analyses were performed using the relevant primary antibody: anti-FMRP (clone 1C3, Chemicon), anti-FXR2P (clone A42, Sigma-Aldrich), anti- $\alpha$ -actinin (clone AT6.172, Chemicon) or anti-actin (clone AC-15, Sigma-Aldrich). Fluorescence-labelled (IR800 or AlexaFluor 680, LI-COR) secondary antibodies were used afterwards. Bands were visualized and their intensity was measured using the Odyssey software and the LiCor infrared imager. Relative shifts were calculated using the ratio of cytoskeletal FMRP on total amount of FMRP.

RNA was extracted from pellets as recommended by the manufacturer with TRIzol reagent (Invitrogen), while using phenol/chloroform for FS and gradient fractions. cDNA synthesis was carried out using random hexamer primers. PCR for P-selectin cDNA were performed using Pfu DNA polymerase enzyme, 5'-ACCAACGAGGCTGAGAAGT-3' as the forward primer and 5'-GGAAGCTGCACTGCGAGTTA-3' as the reverse primer. For 18S rRNA PCR, 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' was used as a forward primer and 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' as a reverse primer. Amplified DNA was separated

through a 1 % agarose gel and bands were visualized using a high-performance UV transilluminator (DIGI DOC-IT System, UVP) following ethidium bromide coloration.

#### **2.3.3.4 Immunofluorescence studies**

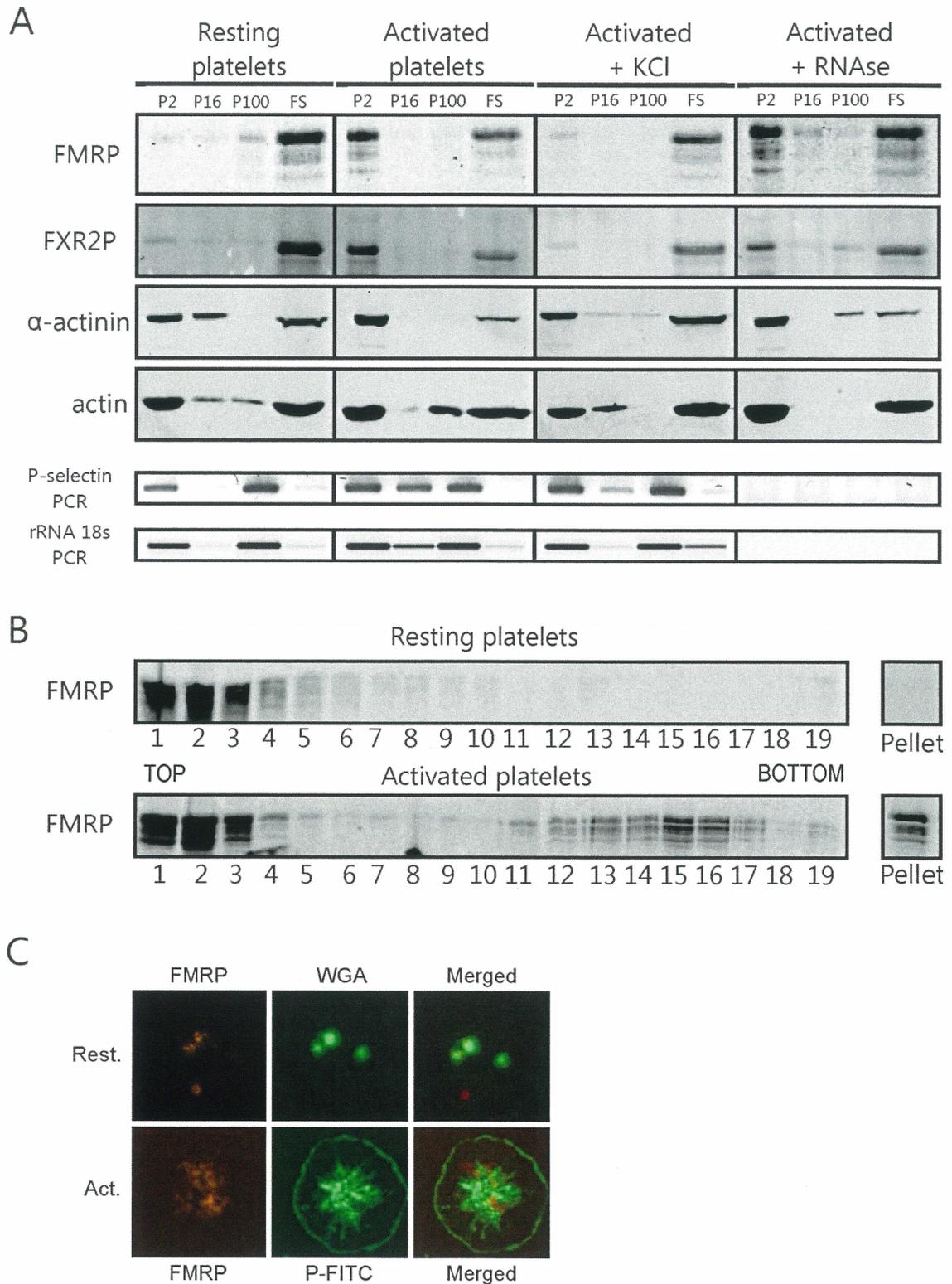
Washed platelets were resuspended in HBSS, supplemented with 200nM PGE1 for resting platelets, and left 30 minutes at room temperature. Resting blood platelets were fixed with 1 % paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) and layered on poly-L-lysine coated cover slips. For activation experiments, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub> were added to the platelet suspension prior to stimulation with 2.5 µg/ml collagen. Thereafter, platelets were allowed to spread on the cover slip for 30 minutes and then fixed with 1 % PFA. PFA-fixed platelets were sequentially permeabilized with 0.05 % tween 20, 1 % saponin and 0.1 % triton X-100. Immunofluorescence was performed, following milk-BSA blocking, with IC3 antibodies. Samples were simultaneously stained with fluorescent wheat germ agglutinin (WGA) to label plasma membranes or phalloidin-FITC (FITC) to reveal actin-based microfilaments.

## 2.3.4 Results

### 2.3.4.1 FMRP subcellular localization is modified following platelet activation

One particular and important aspect of blood platelets is their ability to modify their morphology and to trigger many biochemical processes following their stimulation by a proper activator leading to the formation of a haemostatic plug. In order to assess whether platelet activation affects the subcellular localization of FMRP, we performed differential centrifugations specially designed for platelet cytoskeleton extraction. Microfilaments, microtubules and proteins interacting with these cytoskeletal structures (such as  $\alpha$ -actinin) can be sedimented at a low speed (2,400 g, P2) corresponding to the cytoskeletal fraction. Whereas filaments that are linked to plasma membrane glycoproteins or polyribosomes require higher g-forces to be sedimented (100,000 g, P100) and represent the fraction of membrane-associated filaments. These two fractions were split up by centrifugation at 16,000 g (mitochondrial fraction, P16). A final supernatant (FS) was also obtained.

As reported recently (Lauziere et al.), FMRP was almost entirely found in the soluble fraction (FS) of resting platelets (Fig. 1A). A similar result was obtained for its paralog, FXR2P. Actin and  $\alpha$ -actinin, an actin-binding protein, are evenly distributed between the membrane-bound and cytoskeleton-bound fractions. However, following platelet activation with collagen (~50% of aggregation), cytoskeletal reorganization occurs and the latter proteins were mainly recovered in the cytoskeletal fraction (P2, Fig. 1A). Astonishingly, 95% of FMRP and FXR2P were also redistributed to this fraction and were still absent from the polyribosomal fraction (P100). Remaining FMRP and FXR2P signals were still detected in the FS fraction (Fig. 1A).



**Figure 22. FMRP mostly shift to the cytoskeletal fraction upon platelet activation.** A) Platelets ( $9 \times 10^8$ ) were either left quiescent, activated solely with 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  collagen or together with 500 mM KCl or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A. Differential centrifugations were performed in order to obtain three pellets: P2 (2,400 g for 5 min), P16 (16,000 g for 15

min), P100 (100,000 g for 90 min) and a final supernatant (FS). Proteins were separated by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analyses were performed to reveal the presence of FMRP, FXR2,  $\alpha$ -actinin and actin. RT-PCR for P-selectin, a platelet-specific mRNA, was carried out for each fraction. B) Resting or activated platelets were resuspended in a low-salt buffer and lysed with a high-salt buffer. Total platelet extracts were layered on a 15-45 % (w/w) linear sucrose gradient and centrifuged at 247,000 g for 2 hours at 4°C. Following centrifugation, sucrose gradients were hand-fractionated and pellets were also recovered. The 20 fractions obtained were tested for the presence of FMRP by Western blot. Top and bottom of the gradient are indicated, as well as the pellet fraction. C) Resting or activated blood platelets were fixed with 1 % PFA and immunofluorescence was carried out using an anti-FMRP antibody (left panel). Samples were simultaneously stained with fluorescent wheat germ agglutinin (WGA) to label plasma membrane or phalloidin-FITC (FITC) to reveal the actin-based microfilaments (center panel). Typical fluorescence signals were merged in the right panel. Specificity of the staining was confirmed by an absence of signal when platelets were incubated with an isotype antibody control or with a secondary antibody only (data not shown).

#### **2.3.4.2 FMRP and polyribosomes in activated platelets**

FMRP is an RNA-binding protein that was shown to associate with 150 to 500S polyribosomes in all tissue culture and cell lines studied so far (Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997; Khandjian et al., 2004) with the exception of circulating platelets (Lauziere et al., 2012). It is well-known that platelet activation triggers several mechanisms including protein synthesis (Majek et al., 2010). Since platelet polyribosomes are mostly found associated with the cytoskeleton, this may explain the redistribution of FMRP to P2 (Weyrich et al., 2004). Polyribosomes are scarce in platelets (Kieffer et al., 1987) and consequently, clear polyribosomes UV profile as well as ribosomal proteins could not be detected (Lauziere et al., 2012). Nevertheless, other strategies were performed to determine the subcellular distribution of polyribosomes components. RT-PCR of the platelet-specific P-selectin mRNA and 18S rRNA were performed in order to determine the subcellular distribution of mRNAs and the ribosome small subunit in these different conditions. In resting platelets, mRNAs and ribosomes were mainly detected in P2 and P100 fractions (Fig. 1A, lower panels). Following platelet activation, the translational machinery and its mRNAs were also enriched in P2 while also being detectable in P16. As expected, 0,5 M KCl treatment had no effect on their distribution (Fig. 1A, lower panels). Similar results were obtained using GPIIIa mRNA RT-PCR (data not shown). Likewise, RNase addition and high-KCl conditions are two classic known treatments that release FMRP from polyribosomes structures (Corbin et al., 1997). As shown in Figure 1A-B, KCl but not

RNAse A was able to release FMRP from its association complex in P2. Similar results were obtained for FXR2P,  $\alpha$ -actinin and actin. Classic polyribosomes preparations were also performed using 15-45% (w/w) linear sucrose gradients in platelets left quiescent or stimulated with collagen. In resting platelets, as previously described (Lauziere et al., 2012), FMRP was recovered at the top of the gradient confirming its non-association with polyribosomes (Fig. 1B). In activated platelets, FMRP was recovered mainly in both top and in the pellet corresponding respectively to FS and P2 fractions (Fig. 1B). Interestingly, a significant proportion of FMRP was also detected in fractions 11 to 17 which correspond to 150S to 500S polyribosomes fractions (Fig. 1B). These results suggest that FMRP might shift to the P2 fraction while being associated with polyribosomes.

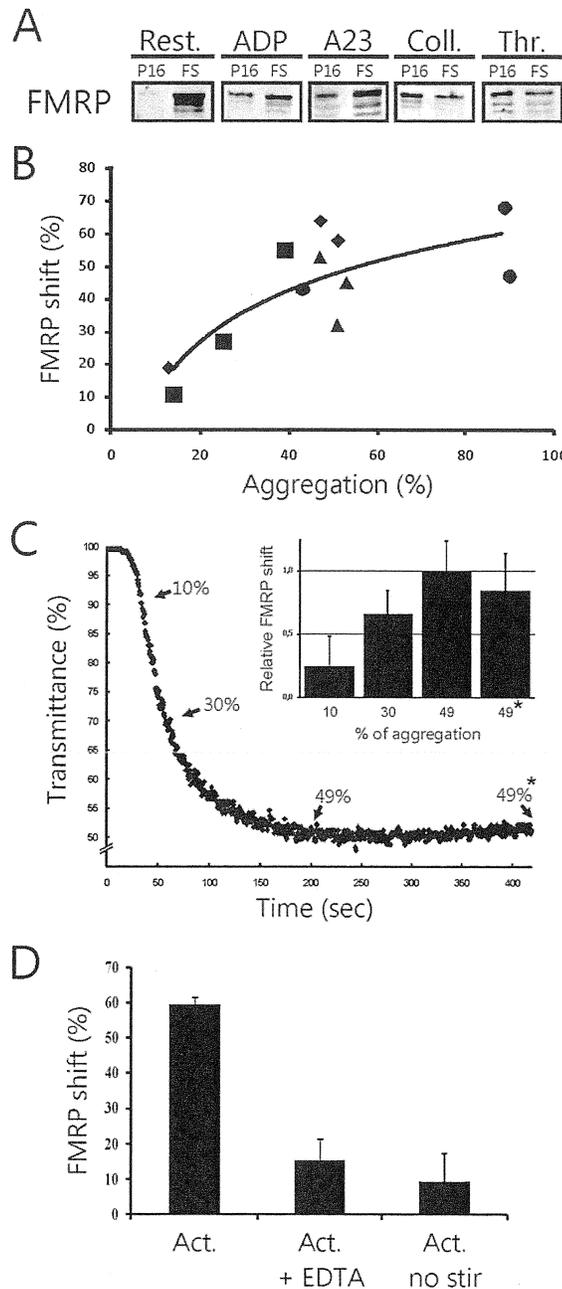
#### **2.3.4.3 FMRP localized to the actin network core**

In order to further investigate the subcellular localization of FMRP, we undertook indirect immunofluorescence assays in resting and activated platelets. Resting platelets were counterstained with wheat germ agglutinin (WGA) which has a high affinity for plasma membrane glycoproteins allowing a clear visualization of this structure. FMRP in resting PFA-fixed platelets showed a diffuse cytoplasmic signal within the delimitation of WGA. (Fig. 1C, upper panels).

Following their activation with collagen, platelets were allowed to spread on cover slips and reached 3-5 times their initial size facilitating the identification of intracellular structures. These platelets were simultaneously counterstained with phalloidin-FITC which highlights actin-based filaments. Phalloidin-FITC showed a star-shaped signal where the intensity increased toward the center of the cell, which corresponds to the cytoskeletal core (Fig. 1C, lower panels). Similar results were obtained with  $\alpha$ -actinin (data not shown). In activated platelets, FMRP had a granular aspect localized close to the center of the cell (Fig. 1C, lower panels). Moreover, when looking at several actin-immunostained platelet pictures, we saw a tendency for FMRP to overflow from a specific cytoskeletal component, the actin network. FMRP remained cytoplasmic and wasn't secreted like PF4, a control for platelet granule secretion (data not shown).

#### **2.3.4.4 FMRP cytoskeleton redistribution is agonist-independent**

To determine which mechanisms are involved in FMRP redistribution, several protocols were designed. Firstly, platelets were activated with a multitude of agonists promoting platelet aggregation by distinct signal pathways. FMRP's cytoskeletal shifts following platelet aggregation induced by ADP (adenosine diphosphate), A23187 (calcium ionophore) and thrombin were therefore compared to the shift of FMRP obtained with collagen (Fig. 2A). A single centrifugation at 16,000 g was selected to allow the separation of the cytoskeletal fraction (P16) from the soluble fraction (FS) in each condition.



**Figure 23. FMRP's shift is proportional to the extent of aggregation while being independent of the activation pathway.** A) Platelets ( $4.5 \times 10^8$ ) were either left quiescent or activated for 10 minutes with 100  $\mu$ M ADP, 2  $\mu$ M A23187 (A23), 2.5  $\mu$ g/ml collagen (Coll.) or 1 U/ml thrombin (Thr.). B) Schematic representation of the average platelet aggregation compared to the FMRP shift level for each agonist: ADP (■), A23187 (◆), collagen (▲) and thrombin (●). The values were normalized with the shift of FMRP in resting cells. C) Typical aggregation curve obtained upon collagen-induced activation of platelets. The inset box shows the relative percentage of shift correlating with the percentage of aggregation, which has been labelled directly along the curve. The star indicates the 49 % platelet aggregation obtained after 7 minutes. D) Two conditions were

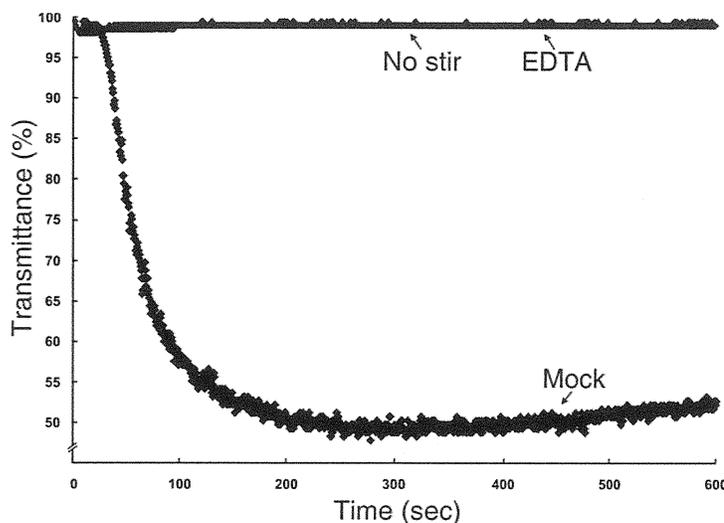
used to inhibit aggregation occurring during platelet activation with collagen activation which are activation in the presence of 5 mM of EDTA or without stirring. These results were obtained from at least two sets of independent experiments.

In collagen-activated platelets, we observed a FMRP shift of 51 % (Fig. 2A). Similar redistributions of FMRP were observed in each condition, being higher (59%) with the most potent agonist (thrombin) and much lower (19%) with the weaker one (ADP) while being moderate (39%) with the intermediate activator (A23187). Therefore, the shift is independent of the activation pathway. However, since stronger agonists induced higher aggregation percentages, we hypothesized a relationship between the shift of FMRP and the extent of the aggregation. We accumulated aggregation and FMRP shift data from 11 independent experiments. A clear relationship between the extent of aggregation and FMRP shift is observed, while still remaining independent of the agonist used (Fig. 2B). After comparing all of these agonists, we selected collagen, a natural activator which gives highly reproducible aggregation curves.

#### **2.3.4.5 Platelet aggregation is the unique precursor of FMRP cytoskeleton shift**

The aggregation-dependence of FMRP redistribution was characterized with a time-course of collagen-induced platelet aggregation (Fig. 2C). The time-course was performed over a 7-minute time-frame, twice the time required to reach maximal aggregation. At different levels of aggregation, platelet aliquots were harvested and FMRP shift was calculated. As depicted in Figure 2C, as aggregation progresses (transmittance decline), FMRP shift increased. Furthermore, when the collagen-induced aggregation is maximal (49% for that specific experiment), the shift of FMRP remained unchanged even when the time-course was maintained for an additional 4 minutes. This result supports a relationship between the percentage of aggregation and the FMRP shift and eliminates time-dependence, since a longer exposure to the agonist did not enhance the shift.

Moreover, to clarify if FMRP shift relies on aggregation, platelets were activated with collagen in conditions where aggregation was inhibited; i.e. in the presence of EDTA (5 mM) or without stirring (Figure 2D and Supplementary Fig. 1). In both conditions, activation without aggregation was not sufficient to promote FMRP redistribution, this confirms that aggregation is a pre-requisite for FMRP shift.

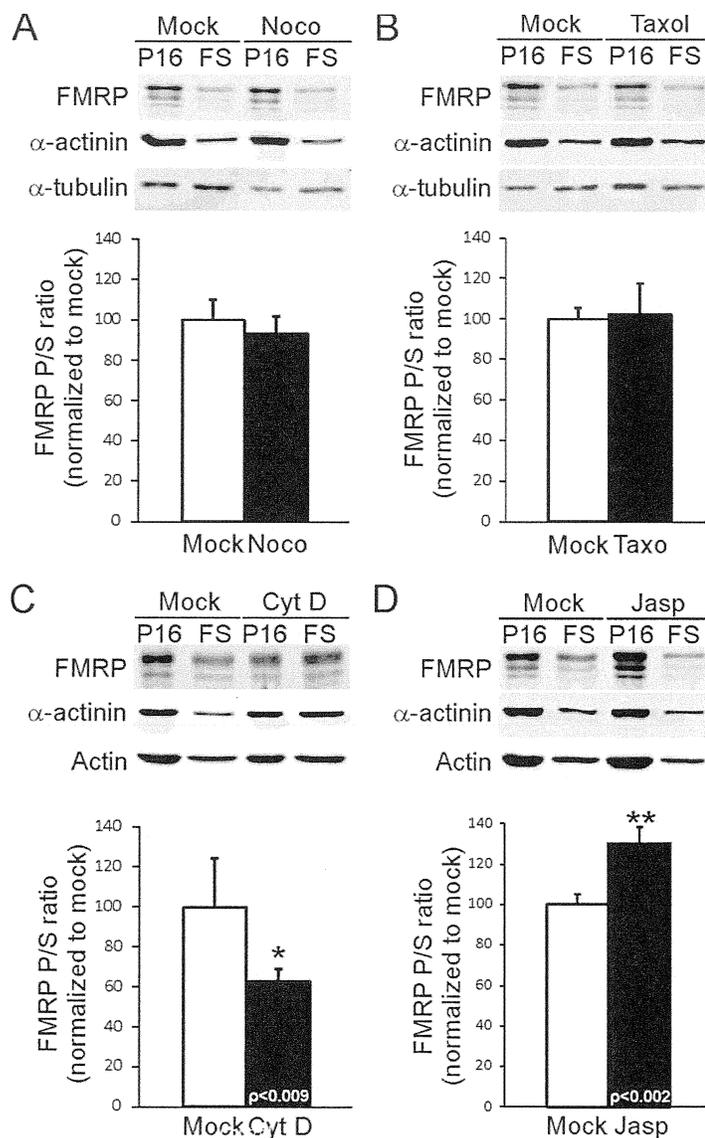


**Supplementary figure 24. Aggregation can be blocked by different conditions during platelet activation.** Platelets were normally activated with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  collagen for 10 minutes (mock) and with either 5 mM EDTA or without stirring. Aggregation was monitored by a Chrono-Log® aggregometer and typical aggregation curves obtained are represented.

#### 2.3.4.6 FMRP shift is specifically affected by actin network dynamics

Large cellular structures exclusively sediment in P2 fraction. In the absence of a nucleus, it is tempting to speculate that an interaction occurs between FMRP and the polymerized cytoskeleton following platelet aggregation. Platelet cytoskeleton is further divided into two major networks: microtubules and microfilaments (Cerecedo et al., 2002).

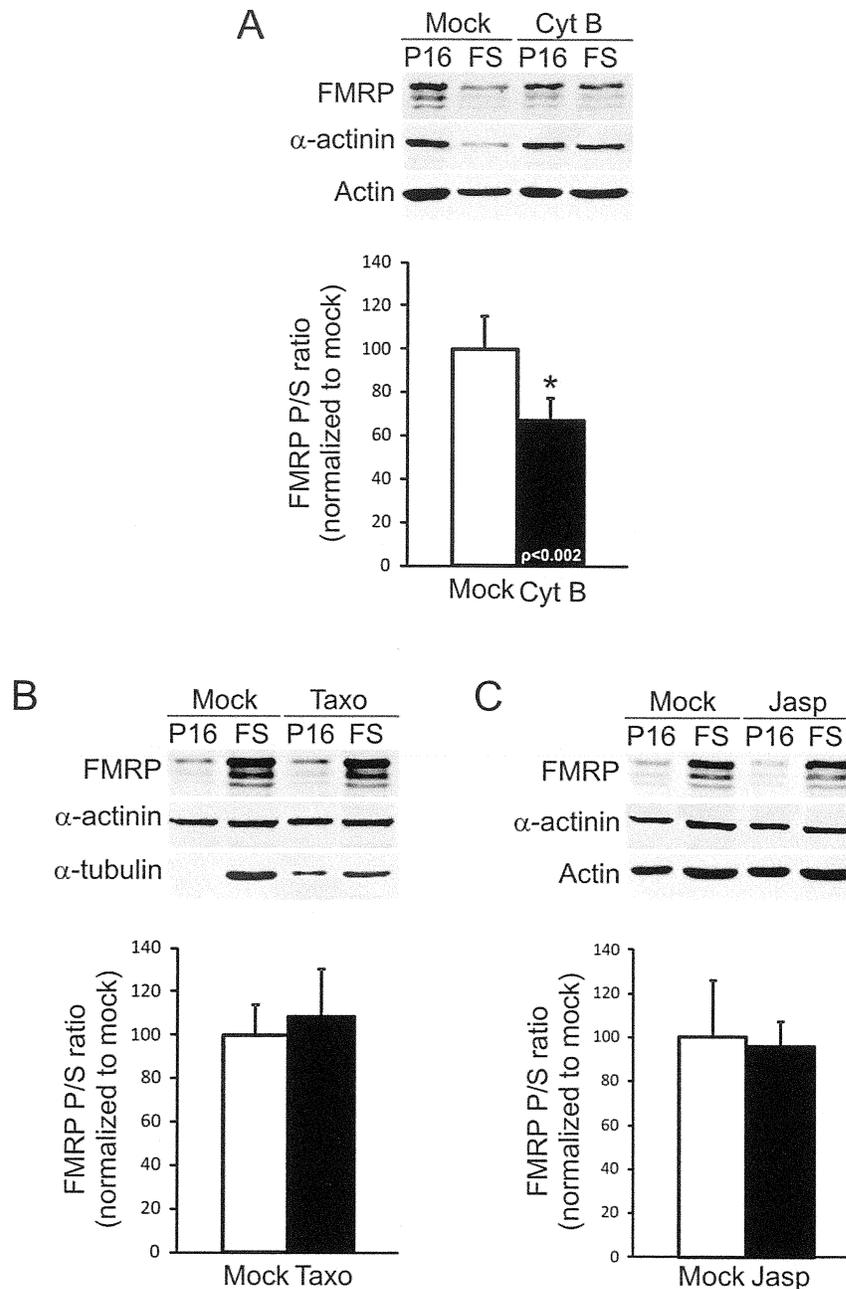
In order to determine if FMRP interacts with these structures, collagen-stimulated FMRP shift to P2 was studied in the presence of different chemical agents which influence the dynamic equilibrium of cytoskeletal components (polymerization and depolymerization cycles). FMRP interaction with the microtubule network was first challenged by preincubating platelets with either nocodazole, which rapidly binds microtubule subunits (prevent repolymerization), taxol, a drug that binds microtubules, causing their stabilization (promotes polymerization), or their vehicle, DMSO. In all of the tested conditions, we ascertained that the extent of the aggregation was identical ( $\pm 5\%$ ). Our results showed that FMRP shifts measured after platelet aggregation were similar in the presence of these drugs or the vehicle (mock) (Fig. 3A-B).



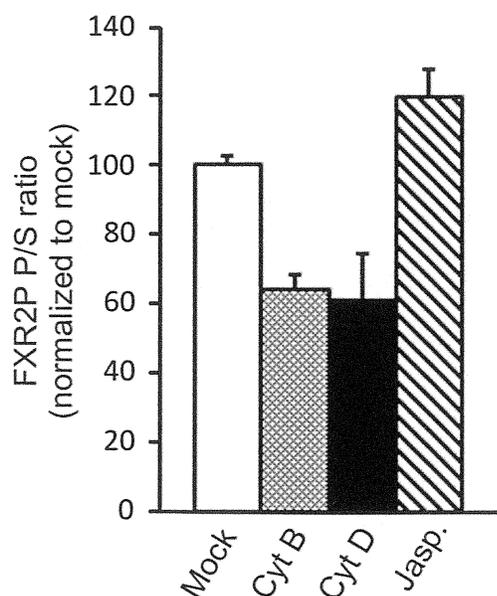
**Figure 25. Cytoskeleton association of FMRP during activation seems to be related to microfilament dynamics.** Platelets were treated for 4 minutes with either (A) 10  $\mu$ M nocodazole, (B) 25  $\mu$ M taxol, (C) 5  $\mu$ M cytochalasin D, or (D) 5  $\mu$ M jasplakinolide prior to activation with 2.5  $\mu$ g/ml collagen. Platelets were resuspended in lysis buffer and their cellular components were separated following a centrifugation at 16,000 g. The obtained fractions were tested by Western blot for the presence of FMRP,  $\alpha$ -actinin (an actin-binding protein),  $\alpha$ -tubulin and actin. Shift of FMRP for each condition, normalized with a normal activation (mock), is represented. Statistical analysis was performed and  $p$ -values of  $< 0.009$  (\*) and  $< 0.002$  (\*\*) were obtained. These results were obtained from at least five sets of independent experiments and  $p$ -values are present in the graph.

Similar protocols were carried out for the microfilament network, where platelets were preincubated with either cytochalasin D, a drug binding the barbed end of F-actin to avoid

the addition of monomers (prevents repolymerization), jasplakinolide, which binds microfilaments, causing their stabilization (promotes polymerization), or their vehicle, DMSO. For similar levels of aggregation in each condition, modulation of microfilament polymerization greatly affects the cytoskeletal shift of FMRP (Fig. 3C-D). Actually, in conditions where actin network depolymerization was altered (cytochalasin D) the shift of FMRP decreased by 40 % compared to the mock activation (Fig. 3C). Similar results were obtained with cytochalasin B which has equivalent properties (Supplementary Fig. 2A). Contrariwise, when microfilament polymerization was promoted (jasplakinolide) the FMRP shift to P16 was further increased by 30% compared to the control (mock) (Fig. 3D). Interestingly, a similar behaviour was observed for the actin-binding protein  $\alpha$ -actinin (Fig. 3C-D, Supplementary Fig. 2A) and for the FMRP paralog FXR2P in all conditions tested (Supplementary Fig. 3). However, in absence of platelet's aggregation, none of these cytoskeleton modulators solely affected FMRP's sedimentation profile (Supplementary Fig. 2B-C).



**Supplementary figure 26. Cytoskeleton association of FMRP seems to be related to microfilament dynamics while being dependent on activation.** Platelets were treated for 4 minutes with either (A) 100  $\mu$ M cytochalasin B (Calbiochem), (B) 25  $\mu$ M taxol or (C) 5  $\mu$ M jasplakinolide. Platelets were either left quiescent (B-C) or activated with 2.5  $\mu$ g/ml collagen (A). They were then resuspended in lysis buffer and their cellular components were separated following a centrifugation at 16,000 g. The obtained fractions were tested by Western blot for the presence of FMRP,  $\alpha$ -actinin (an actin-binding protein),  $\alpha$ -tubulin and actin. Shift of FMRP for each condition, normalized with a normal activation (mock), is represented. Statistical analysis was performed and  $p$ -values of  $< 0.002$  (\*) were obtained.



**Supplementary figure 27. Modulation of actin filament dynamics also affects the cytoskeleton association of FXR2P during activation.** Platelets were treated for 4 minutes with either 5  $\mu$ M cytochalasin D, 100  $\mu$ M cytochalasin B or 5  $\mu$ M jasplakinolide prior to activation with 2.5  $\mu$ g/ml collagen. Platelets were resuspended in lysis buffer and their cellular components were separated following a centrifugation at 16,000 g. The obtained fractions were tested by Western blot for the presence of FXR2P and shift for each condition, normalized with a normal activation (mock), are represented.

### 2.3.5 Discussion

Platelets represent a fascinating biological system which plays an important role in haemostasis and thrombosis upon activation, involving several important cellular processes. The present study shows the shift of FMRP to the cytoskeletal fraction following platelet stimulation, and thus, this protein should be involved in these activated processes. The cytoskeleton, and particularly the microfilament network, is required for morphological changes while serving as a scaffold for other important proteins and functions. Consequently, similar shifts were also observed for proteins interacting with the cytoskeleton, such as alpha-actinin and cortactin (Lopez et al., 2001), membrane glycoproteins (GPIIb-IIIa) (Bertagnolli and Beckerle, 1993), lipid metabolizing enzymes (Fox et al., 1993) and protein-tyrosine kinases pp60c-src (Horvath et al., 1992). For protein-tyrosine kinases pp60c-src, the analogy with FMRP behaviour extends to the same proportionality and dependency to aggregation. However, even when aggregation is maximized, a certain amount of FMRP remains in the soluble fraction. This could be related to the heterogeneity of the platelet population where aggregation and translation potentials are decreased in older ones (Weyrich et al., 2009). Consequently, the shift of FMRP in these aged platelets would also be decreased. Therefore, further investigations with specific subpopulations will be necessary to answer this important question. Nevertheless, since FMRP levels are similar in resting and activated platelets, we believe that the pool of FMRP moving to the cytoskeleton does not come from de novo synthesis during translation, unlike Bcl-3 and IL-1 $\beta$  (Weyrich et al., 2009), but would rather represent an evolving role in activated platelets.

As previously described, the composition of platelets is quite different from other cells. Upon activation, they develop a complex cytoskeleton network recovered in the P2 fraction. Therefore, FMRP may directly interact with components of the cytoskeleton upon platelet aggregation. A hypothesis supported by our immunofluorescence studies showing the topological localization of FMRP, overflowing from the actin core. Likewise, FMRP was already shown to interact with several cytoskeleton-linked proteins such as Lg1, Ran-BPM, myosin Va, KIF5, KIF3C and dynein heavy chain, although no consensus

cytoskeleton-associated domain was identified (Bardoni et al., 2006; Davidovic et al., 2007).

Platelet activation also triggers protein synthesis and an interaction was shown between polyribosomal components (ribosomes, mRNAs) and the cytoskeleton (Weyrich and Zimmerman, 2004). The detected presence of mRNA and ribosomal subunits in P2 of quiescent as well as activated platelets supports these observations. Likewise, translational factors such as eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E), a protein involved in the recruitment of ribosomes to the mRNA, was shown to redistribute to the cytoskeleton along with mRNA (Lindemann et al., 2001). FMRP redistribution occurred also from the soluble, barely detectable RNA, to the cytoskeleton fraction, massively populated by mRNA where translational activity is likely to occur. During our experiments, a small amount of polyribosomes was spontaneously released from the cytoskeleton and would explain the detection of a small amount of FMRP in its classic sucrose gradient fractions corresponding to 150–500S (Corbin et al., 1997). Moreover, high ionic strength released FMRP from the cytoskeleton-bound polyribosomes fraction similarly to that obtained from polyribosomes in cultured cells. We therefore believe that FMRP might associate itself with cytoskeleton-linked polyribosomes. These results would be compatible with the well-documented association of FMRP with polyribosomes in many cells or tissues including the brain (Davidovic et al., 2005). However, the interaction of FMRP with cytoskeleton-linked polyribosomes was resistant to RNase A treatment. Whether or not their structural conformation was able to resist RNase digestion remains an open question. FMRP regulates translation of its mRNA targets, thus dynamic association of FMRP could therefore be the initial step of an involvement in the regulation of platelet translation (Bechara et al., 2009; Lagerbauer et al., 2001).

Blood platelets and neurons are extremely specialized cells sharing many similarities including: a highly architectural cytoskeleton, storage and release of neurotransmitters, expression of some transporters and neurotransmitter receptors, local translation that is independent of the nucleus and undoubtedly the formation of cellular extensions (Casoli et al., 2008). Dendritic spines, similarly to platelets, undergo cellular specialization upon the

activation of neurotransmitter receptors; thus learning and experiences can influence morphological changes and alter the functional connectivity between neurons (Hering and Sheng, 2001). Presynaptic and postsynaptic terminals are actin-rich synaptic structures and they are altered by drugs interfering with actin polymerization, thus actin is poised to play a particularly important role in neuronal morphogenesis and connectivity (Luo, 2002).

Rho GTPases have been shown to play important roles in many aspects of neuronal morphogenesis, notably: they control the formation, maturation and maintenance of dendritic spines (Redmond and Ghosh, 2001). Actually, GTPases are key regulators of actin cytoskeleton remodelling in many cell types studied so far, even platelets (Higashi et al., 2008). Interestingly, CYFIP1, CYFIP2, NUFIP1 and 82-FIP, well-known partners of FMRP, interact physically with Rac1 a small Rho GTPase (Castets et al., 2005) that also play an important role in platelets (Pleines et al., 2009). Based on all these characteristics, platelets represent an interesting model to study neuronal metabolic pathways.

In conclusion, although functional properties of FMRP have been extensively studied, its precise mechanism of action and the pathways linking activation, protein synthesis and cytoskeletal reorganization remain poorly understood and need further investigation. Our data proposed platelets as an inducible FMRP translocation model, which could be used to strengthen our comprehension of different events of neuronal morphology occurring during the activation of neurotransmitter receptors.

**2.3.6 Acknowledgments**

This work was supported by the Foundation of the Stars and the Université de Sherbrooke.

F. Corbin is a Junior 1 research scholar from the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS).

**2.3.7 Conflict of interest disclosure**

The authors declare no conflict of interest of any sort.

### 2.3.8 References

- Bardoni B, Davidovic L, Bensaid M, Khandjian EW. 2006. The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert reviews in molecular medicine* 8(8):1-16.
- Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H, Bardoni B. 2009. A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS biology* 7(1):e16.
- Bertagnolli ME, Beckerle MC. 1993. Evidence for the selective association of a subpopulation of GPIIb-IIIa with the actin cytoskeletons of thrombin-activated platelets. *The Journal of cell biology* 121(6):1329-1342.
- Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. 2011. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 25(4):155-167.
- Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Baliotti M, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Bernardini G, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C. 2008. Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer beta-amyloid peptide production. *Mech Ageing Dev* 129(3):154-162.
- Castets M, Schaeffer C, Bechara E, Schenck A, Khandjian EW, Luche S, Moine H, Rabilloud T, Mandel JL, Bardoni B. 2005. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet* 14(6):835-844.
- Cerecedo D, Stock R, Gonzalez S, Reyes E, Mondragon R. 2002. Modification of actin, myosin and tubulin distribution during cytoplasmic granule movements associated with platelet adhesion. *Haematologica* 87(11):1165-1176.
- Cheever A, Ceman S. 2009. Translation regulation of mRNAs by the fragile X family of proteins through the microRNA pathway. *RNA biology* 6(2):175-178.
- Clemetson KJ. 2011. The role of platelets in defence against pathogens. *Hamostaseologie* 31(4):264-268.
- Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. 1997. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)<sup>+</sup> mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet* 6(9):1465-1472.
- Davidovic L, Huot ME, Khandjian EW. 2005. Lost once, the Fragile X Mental Retardation protein is now back onto brain polyribosomes. *RNA biology* 2(1):1-3.
- Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW. 2007. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor

between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* 16(24):3047-3058.

Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. 1997. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Molecular cell* 1(1):109-118.

Fox JE, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS. 1993. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *The Journal of biological chemistry* 268(34):25973-25984.

Fox JE, Phillips DR. 1983. Polymerization and organization of actin filaments within platelets. *Semin Hematol* 20(4):243-260.

Hartwig JH. 1992. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *The Journal of cell biology* 118(6):1421-1442.

Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2(12):880-888.

Higashi T, Ikeda T, Shirakawa R, Kondo H, Kawato M, Horiguchi M, Okuda T, Okawa K, Fukai S, Nureki O, Kita T, Horiuchi H. 2008. Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDial and Daam1, in platelets. *The Journal of biological chemistry* 283(13):8746-8755.

Horvath AR, Muszbek L, Kellie S. 1992. Translocation of pp60c-src to the cytoskeleton during platelet aggregation. *EMBO J* 11(3):855-861.

Kao DI, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. 2010. Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35):15601-15606.

Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B. 2004. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36):13357-13362.

Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. 1987. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 164(1):189-195.

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* 10(4):329-338.

Lauziere V, Lessard M, Meunier AJ, McCoy M, Bergeron LJ, Corbin F. 2012. Unusual subcellular confinement of the fragile X mental retardation protein (FMRP) in circulating human platelets: Complete polyribosome dissociation. *Biochimie* 94(4):1069-1073.

- Lessard M, Chouiali A, Drouin R, Sebire G, Corbin F. 2011. Quantitative measurement of FMRP in blood platelets as a new screening test for fragile X syndrome. *Clinical genetics*.
- Lindemann S, Tolley ND, Eyre JR, Kraiss LW, Mahoney TM, Weyrich AS. 2001. Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control. *The Journal of biological chemistry* 276(36):33947-33951.
- Lopez I, Duprez V, Melle J, Dreyfus F, Levy-Toledano S, Fontenay-Roupie M. 2001. Thrombopoietin stimulates cortactin translocation to the cytoskeleton independently of tyrosine phosphorylation. *Biochem J* 356(Pt 3):875-881.
- Luo L. 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Majek P, Reicheltova Z, Stikarova J, Suttner J, Sobotkova A, Dyr JE. 2010. Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. *Proteome Sci* 8:56.
- Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. 2007. The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annual review of genomics and human genetics* 8:109-129.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66(4):817-822.
- Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Nieswandt B. 2009. Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch* 457(5):1173-1185.
- Redmond L, Ghosh A. 2001. The role of Notch and Rho GTPase signaling in the control of dendritic development. *Curr Opin Neurobiol* 11(1):111-117.
- Wang H, Dictenberg JB, Ku L, Li W, Bassell GJ, Feng Y. 2008. Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Molecular biology of the cell* 19(1):105-114.
- Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND, Kraiss LW, Dixon DA, Mahoney TM, Prescott SP, McIntyre TM, Zimmerman GA. 2004. Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 30(4):491-498.
- Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. 2009. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost* 7(2):241-246.
- Weyrich AS, Zimmerman GA. 2004. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 25(9):489-495.

White JG. 1984. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. *The American journal of pathology* 117(2):207-217.

### **3. CHAPITRE 3 : DISCUSSION**

L'inactivation du gène FMR1 mène, chez les individus avec le syndrome du X fragile, à une dépréciation considérable des connexions neuronales, ainsi qu'à une importante diminution de la plasticité synaptique. Alors qu'au fil des années plusieurs groupes de recherches ont tenté de comprendre la fonction cellulaire de FMRP; les conséquences de son absence au niveau de l'organisation structurelle des cellules sont encore à élucider.

Dans le but de mieux comprendre l'importance de FMRP dans ce processus, nous avons émis l'hypothèse que l'étude d'un modèle cellulaire simple dont nous pouvions déclencher la réorganisation et la spécialisation du cytosquelette pourrait nous révéler de nouvelles informations. En fait, l'activation plaquettaire pourrait s'avérer représenter un modèle d'étude de l'activation postsynaptique. En ce sens, l'objectif de mes travaux de recherches était donc d'étudier les conséquences de l'activation des plaquettes sur le comportement de FMRP et sa participation au processus de spécialisation cellulaire.

#### **3.1 La localisation subcellulaire de FMRP**

Puisque FMRP est une protéine quasi ubiquitaire, il n'est pas surprenant que sa présence ait tout récemment été confirmée dans les plaquettes sanguines, et ce, dans notre laboratoire (Lauziere et al., 2012). Bien que chez les individus avec le syndrome du X fragile, FMRP soit également absente de leurs plaquettes, il n'y a à ce jour aucune documentation concernant une prévalence plus élevée de thrombopathies chez ces personnes. Et ce, malgré que leur niveau intraplaquettaire d'AMPc soit sous les niveaux observés dans la population générale (Berry-Kravis et al., 1995). Toutefois, ces dysfonctionnements plaquettaires sont plutôt rares dans la population en général et passent souvent inaperçus dans la majorité des cas. De plus, l'inexistence de conséquence plaquettaire mesurable de l'absence de FMRP n'est pas synonyme d'inutilité cellulaire. En effet, plusieurs études ont avancé une certaine redondance entre la fonction de FMRP et celles de ces paralogues FXR1 et FXR2; ce qui pourrait expliquer ce phénomène (Bagni & Greenough, 2005).

Alors que la présence de cette protéine pouvait être attendu dans ces cellules, considérant le caractère ubiquitaire de FMRP, l'inusité de la découverte concerne plutôt la localisation subcellulaire de cette protéine. En effet, bien que FMRP soit habituellement retrouvée liée aux polyribosomes, nous avons plutôt montré que cette protéine n'était pas constitutivement associée à des particules de haut poids moléculaire dans les plaquettes (Lauziere et al., 2012). Comme mentionné précédemment, FMRP avait toujours été retrouvée associée à l'ARNm des polyribosomes dans tous les tissus ou types cellulaires étudiés; les plaquettes représentent donc le premier modèle cellulaire où ce comportement inhabituel de FMRP est observé (Khandjian et al., 2004). Cela pourrait être expliqué par le faible niveau de traduction, et par conséquent de polyribosomes, dans les plaquettes circulantes. Il est toutefois bien connu que l'activation plaquettaire déclenche la synthèse de nombreuses protéines, induisant ainsi la formation d'un appareil de traduction efficace et le recrutement des protéines régulatrices (Weyrich et al., 2009).

### **3.2 La redistribution de FMRP**

En effet, l'activation est le déclencheur de plusieurs changements morphologiques et biochimiques nécessaire à la formation et au maintien du caillot sanguin, tels le changement de forme, l'extension de filopodes, la sécrétion de granule, la synthèse protéique, la réorganisation du cytosquelette, etc. FMRP semble également y prendre part, puisque l'activation plaquettaire modifie radicalement le profil de sédimentation de FMRP. En effet, FMRP est redistribuée de la fraction contenant le matériel cellulaire soluble à celle contenant des particules de haut poids moléculaire. Une telle redistribution protéique a souvent été rapportée, par exemple pour la caspase 3 et 9, où elle impliquait une interaction avec des protéines qui ont un coefficient de sédimentation élevé, le cytosquelette dans le cas présent (Amor et al., 2006). Plusieurs autres protéines influençant la structure du cytosquelette, principalement le réseau d'actine, se déplacent également dans cette fraction lors de l'activation, comme la vinculine (Serrano & Devine, 2004), la cortactine (Lopez et al., 2001), la HSP27 (Zhu, 1994) et le GPIIb-IIIa (Bertagnolli & Beckerle, 1993). Des déplacements semblables ont également été observés chez différentes protéines impliquées dans plusieurs processus cellulaires, entre autres dans les voies de signalisation, comme certaines tyrosines kinases (Kralisz & Cierniewski, 2000) et phospholipases (Banno et al., 1996).

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le déplacement de FMRP, diverses expériences ont été successivement réalisées et ont permis de mettre en évidence que cette redistribution de FMRP n'est pas propre à une voie d'activation particulière. Concrètement, elle a été observée par l'utilisation d'une vaste gamme d'agonistes : le collagène, la thrombine, l'ADP, le PMA, le PAF, la  $T_XA_2$ , la thapsigargine, et l'épinéphrine pour n'en nommer que quelques-uns. En fait, le même phénomène est aussi obtenu avec l'ionophore de calcium A23187. Puisque ce dernier est un activateur n'utilisant pas de messagers seconds, on peut déduire que le déplacement de FMRP est indépendant de la voie de signalisation et résulte plutôt d'un élément suivant l'augmentation du niveau calcique intracellulaire (Rasheed & Saeed, 2004). En ce sens, il n'est pas surprenant de remarquer que l'importance du déplacement de FMRP (%) est fortement corrélée à la force de l'agoniste utilisé ou plutôt en fonction de l'agrégation maximale mesurée.

Étant donné cette corrélation avec l'agrégation, cela pourrait être dû à un trappage passif dans les agrégats plaquettaires, mais plusieurs raisons nous portent à croire qu'il n'en est rien. Premièrement, une coloration au bleu de Coomassie de la migration d'échantillon provenant d'une centrifugation différentielle montre que ce n'est pas l'ensemble des protéines du même poids moléculaire de FMRP qui se redistribue au cytosquelette. Deuxièmement, ce déplacement est observé suivant l'utilisation d'agoniste faible comme l'ADP qui entraîne la formation d'une faible quantité de minuscules agrégats qui sont rapidement solubilisés par le tampon de lyse utilisé. Troisièmement, nous avons remarqué grâce à une cinétique de ce déplacement que la redistribution de FMRP était plus rapide que l'agrégation (résultats non présentés), et ce, même s'il y est relié. Quatrièmement, l'utilisation d'agent modulateur du cytosquelette, à savoir la famille des cytochalasines, causant une diminution de la polymérisation du réseau d'actine renverse le déplacement de FMRP sans engendrer d'impact sur les niveaux d'agrégations résultants. Dans l'ensemble, il semble donc que la redistribution de FMRP suivant l'agrégation plaquettaire est spécifique à l'activation.

Cependant, ce n'est pas la totalité de FMRP qui est récupérée dans la fraction du cytosquelette. Une des possibilités est que le déplacement de FMRP soit complet dans une

partie des plaquettes et incomplet dans une autre. Les plaquettes humaines peuvent être divisées en sous-population selon leur volume et leur potentiel de synthèse protéique, deux principes en relation étroite : les plaquettes de dimension supérieure ont un potentiel de traduction plus élevé (Weyrich et al., 2009). Certaines études tendent à montrer une relation entre le volume moyen plaquettaire et l'âge de la plaquette, mais ces résultats suscitent la controverse. Cette hétérogénéité pourrait influencer la redistribution globale de FMRP, une protéine qui participerait à la régulation de la traduction. Ainsi, nous avons pour objectif de mettre en place une expérimentation qui nous permettrait de comparer le déplacement de FMRP entre différentes sous-populations de plaquette séparées selon leur volume par cytométrie de flux (Mangalpally et al., 2010). Par ailleurs, certains artefacts de laboratoire pourraient également être en cause. En effet, suivant l'activation un traitement mécanique est nécessaire afin d'assurer une lyse adéquate des agrégats plaquettaires. Puisque l'interaction de FMRP est sensible à ces traitements, une partie de FMRP pourrait se retrouver dans la fraction soluble.

### **3.3 La participation de FMRP à la spécialisation cellulaire**

Nos résultats décrivent une redistribution inductible de FMRP qui débute dans les premiers moments de l'activation. FMRP semble donc être impliquée dans les premiers stades de la réponse à la stimulation, comme le changement de forme, l'extension des pseudopodes et la sécrétion d'ATP qui se produisent tous en très peu de temps (Lefebvre et al., 1993). Afin d'approfondir la compréhension de la participation de FMRP à ces changements morphologiques et biochimiques, nous avons mis en évidence les différences entre certains types d'activations utilisés (Tableau 4). L'activation induite par le PMA, bien que menant à la réorganisation des microfilaments, n'entraîne pas la formation de gel contractile, résultant à un faible taux de sécrétion (Chen & Liang, 1998). Étant donné que nous avons observé dans nos expérimentations une redistribution massive dans la fraction du cytosquelette suivant l'utilisation de cet agoniste, FMRP ne peut être impliqué dans le processus de sécrétion. Par ailleurs, l'activation au collagène de plaquettes prétraitées avec les cytochalasines, bien que conduisant à l'agrégation, prévient la formation de pseudopodes de même que la dégranulation (Diaz-Ricart et al., 2002). Puisque le déplacement de FMRP est sévèrement affecté dans ces conditions et que cette protéine ne semble pas impliquée dans la sécrétion, FMRP participerait donc à l'extension des

pseudopodes. La formation de ces prolongements cellulaires, rendue possible par l'accélération de la polymérisation du cytosquelette, augmente la surface membranaire et permet donc de faciliter l'interaction entre les plaquettes, élément crucial pour l'assemblage, puis la stabilisation de l'agrégat. Ainsi, ces conclusions menant à la participation de FMRP à un processus de spécialisation cellulaire en lien avec la formation des pseudopodes sont d'autant plus soutenues par la corrélation entre le niveau d'agrégation et le déplacement résultant de FRMP.

Agoniste	Réponse plaquettaire			Association de FRMP au cytosquelette
	Changements morphologiques	Agrégation	Sécrétion	
Aucun	-	-	-	-
Collagène	+	+	+	+
PMA	+	+	↓↓	+
Collagène (cytochalasine)	-	+	↓	↓↓

**Tableau 4. Corrélation de l'association de FMRP au cytosquelette avec différentes phases de l'activation plaquettaire.** Les différents symboles représentent une absence (-), une présence (+), une diminution (↓) ou une diminution sévère (↓↓). Les abréviations ont été définies dans la liste des abréviations.

### 3.4 La relation entre FMRP et le cytosquelette

Le déplacement de FMRP vers la fraction contenant les particules de coefficient de sédimentation élevé lors de l'activation suggère une association avec les structures qui y sont habituellement récupérées, à savoir : les rares cellules non lysées, les noyaux et le cytosquelette polymérisé. Puisque les plaquettes sont des cellules anucléées, cette observation suggère une interaction directe ou indirecte avec le cytosquelette plaquettaire. Cette interaction serait en accord avec de précédents résultats publiés, où de 5 à 15 % des complexes comprenant FRMP était associés au cytosquelette dans les neurones (H. Wang et al., 2008). Puisqu'il y a absence de réticulum endoplasmique au niveau des plaquettes et que le réseau d'actine agit à titre de support alternatif à la traduction (Weyrich et al., 2004), nous croyons que cette proportion de FMRP associée au cytosquelette est normalement plus élevée dans les plaquettes.

Le cytosquelette plaquettaire est composé de deux constituants majeurs : les microtubules ou filaments de tubuline et les microfilaments ou filaments d'actine. Alors que des études antérieures ont montré que FMRP interagissait avec les microtubules (H. Wang et al., 2008), nos modulations de la polymérisation de ces constituants n'affectent en rien le déplacement de FMRP dans les plaquettes. Curieusement, la redistribution de FMRP semble plutôt dépendante de la polymérisation des microfilaments déclenchée lors de l'activation. Cette observation n'est pas surprenante puisque chez les plaquettes, comme au niveau des synapses, le réseau d'actine est celui qui est le plus développé. Ces résultats sont même soutenus par nos études d'immunofluorescence, où FMRP, bien que le signal soit faible, superpose le réseau d'actine dans les plaquettes activées. Néanmoins, l'utilisation de ces agents modulateurs en immunofluorescence nous permettrait de confirmer cette relation par la visualisation directe des impacts sur la localisation subcellulaire de FMRP. En ce sens, puisque nous croyons que l'interaction entre FMRP et le réseau d'actine est rendu possible par les polyribosomes (voir section suivante), il serait intéressant d'également utiliser ces modulateurs de polymérisation des microfilaments dans les protocoles de centrifugation sur gradient de sucrose. Ainsi, nous pourrions évaluer l'importance de l'état du réseau d'actine pour l'interaction entre FMRP et les polyribosomes suivant l'activation des plaquettes.

FMRP semble donc interagir avec le réseau d'actine suivant l'activation. Par contre, malgré les nombreuses études de la structure protéique des membres de la famille FXR, il n'y a à ce jour aucune identification d'un domaine de liaison au cytosquelette (Bardoni et al., 2006). Néanmoins, puisque FMRP s'associe avec plusieurs protéines liées au cytosquelette comme Lg1, Ran-BPM, KIF5, KIF3C, la myosine Va et la chaîne intermédiaire de la dynéine, l'hypothèse d'une interaction indirecte demeure envisageable (Bardoni et al., 2006). Nos résultats suggèrent également que la redistribution de FMRP est dépendante de la force ionique et donc d'une association ionique avec son ou ses partenaires. L'identification des partenaires de FMRP au sein du cytosquelette des plaquettes nous permettrait d'avoir un aperçu de sa fonction cellulaire. L'immunoprécipitation de FMRP serait une méthode efficace pour identifier ces partenaires dans les plaquettes activées; malheureusement, aucun anticorps spécifique pour FMRP n'a montré une capacité à

immunoprécipiter cette protéine. Et ce, même pour l'anticorps 1C3, soit l'anticorps de référence en ce qui concerne FMRP.

### **3.5 L'association de FMRP au cytosquelette via les polyribosomes**

Puisque chez les plaquettes activées le réseau d'actine, structure du cytosquelette la plus développée, représente la structure sur laquelle repose l'appareil de traduction (absence de réticulum endoplasmique rugueux); FMRP pourrait vraisemblablement y prendre part. Effectivement, plusieurs groupes de recherches ont démontré que FMRP faisait partie intégrante des complexes ribonucléoprotéiques, qui ont la capacité d'interagir avec ces composantes (Miyashiro et al., 2003). Ces complexes RNP sont des assemblages macromoléculaires dynamiques à la fois de protéines et d'ARN jouant un rôle important dans la transcription, les mécanismes de régulation posttranscriptionnels (épissage, stabilité des ARN, routage et compartimentation des ARN), ainsi que lors de la traduction elle-même (Hugo & Bouvet, 2003). Curieusement, on observe également, parallèlement au déplacement de FMRP, une redistribution des ARNm spécifiques aux plaquettes (P-sélectine et GPIIIa) vers la fraction contenant le cytosquelette. Puisque FMRP se retrouve dans la même fraction que les ARNm, nous pouvons évoquer la possibilité que cette protéine possédant les caractéristiques des protéines liant l'ARN interagisse avec ces ARNm. Toutefois, le traitement à l'ARNase ne parvient pas à prévenir le déplacement de FMRP; pourtant, ce résultat ne remet pas en cause cette hypothèse. En fait, cette observation appuie plutôt l'idée d'une interaction protéine-protéine avec une composante du réseau du cytosquelette qui ne serait pas dû à la liaison d'un ARNm; ou bien l'activation entraîne la formation de complexes protéines-ARN caractérisés par une conformation qui protégerait les ARNm de l'ARNase. Alors que de nombreux ARNm cibles de FMRP ont été identifiés (Santoro et al., 2012), compte tenu de notre récente découverte de la présence de FMRP dans les plaquettes (Lessard et al., 2011), la spécificité de l'interaction de ces partenaires reste à confirmer dans ces cellules.

Ces complexes RNP, une fois assemblés, interagissent avec les polyribosomes liés au réseau d'actine pour assurer la synthèse protéique localisée, qui est nécessaire à la formation de pseudopodes. Cette redistribution est clairement observable lorsqu'on

considère qu'à la suite de l'activation FMRP se redistribue dans les fractions contenant théoriquement les polyribosomes (Corbin et al., 1997). La confirmation de la présence des polyribosomes dans ces fractions, par immunobuvardage des protéines ribosomales, est toutefois impossible, puisque dans nos conditions de laboratoires, nous avons été incapables d'obtenir un signal avec différents anticorps ciblant ces protéines (L7a, L26 et S6). De plus, alors que nous avons obtenu une courbe de la présence de polyribosomes dans les plaquettes quiescentes par qPCR de l'ARNr 18S (Lauziere et al., 2012), des optimisations sont encore nécessaires pour transposer l'expérience sur des plaquettes activées, et ainsi isoler les polyribosomes à partir des fractions contenant le cytosquelette. Nous avons donc essayé à de maintes reprises de mettre en évidence cette relation entre FMRP et les polyribosomes, mais aucun résultat concluant n'a été obtenu dans les plaquettes activées. Les difficultés à obtenir ces résultats peuvent s'expliquer par la faible quantité d'acides ribonucléiques et de protéines ribosomales présents dans les plaquettes. L'activité traductionnelle, et non la présence de polyribosome, a bien entendu été mise en évidence dans les plaquettes grâce à des méthodes très sensibles par exemple l'incorporation de radioactivité (résultats non présentés). Alors que nous avons obtenu un tracé de l'amplification des ARNr dans les plaquettes quiescentes (Lauziere et al., 2012), des optimisations sont encore nécessaires pour obtenir ce résultat avec des plaquettes activées, et ainsi isoler les polyribosomes à partir des fractions contenant le cytosquelette. Néanmoins, nous pourrions visualiser indirectement l'association de FMRP aux polyribosomes dans les plaquettes activées en utilisant un tampon de lyse contenant de l'EDTA ou une grande concentration de KCl, tous deux reconnus pour déstabiliser les polyribosomes (Corbin et al., 1997). Ainsi, nous serions en mesure d'évaluer l'impact d'un tel traitement sur le déplacement de FMRP dans les fractions contenant classiquement les polyribosomes. Puisque l'utilisation du KCl a montré dans une précédente expérience que la redistribution de FMRP au cytosquelette était sévèrement affectée en sa présence, nous sommes en mesure de croire qu'il en sera de même pour cette expérience, étant donné que FMRP semble être en relation avec le cytosquelette par le biais des polyribosomes.

Dans le but de visualiser cette interaction entre FMRP et les polyribosomes, nous avons également entamé des expérimentations de microscopie électronique en collaboration avec

le service offrant cette expertise à l'Université de Sherbrooke. Effectivement, la présence de polyribosomes plaquettaires avait déjà été rapportée par cette technique (Kieffer et al., 1987). Alors que les études morphologiques des plaquettes quiescentes et activées sont saisissantes, nous n'avons pas encore réussi, malgré nos efforts, à obtenir un signal clair de FMRP par microscopie électronique, nous permettant ainsi de visualiser cette proximité (résultats non présentés). Cette difficulté est due à la faible présence de FMRP dans les plaquettes où l'on retrouve selon nos résultats que 0,03 fg de FMRP, comparativement à 1,4 fg chez les lymphocytes. Plusieurs étapes pourraient s'avérer problématiques : la préparation de l'échantillon suivant la purification, la fixation, la déshydratation, l'incorporation dans la résine ou encore la coupe; et se doivent d'être vérifiées afin d'optimiser le protocole permettant l'observation de FMRP.

### **3.6 Le modèle d'étude plaquettaire**

Des études récentes ne cessent de continuellement découvrir de nouveaux aspects de la fonction de FMRP dans la régulation de la traduction, mais aussi dans d'autres fonctions neuronales. Cependant, plusieurs lacunes caractérisent encore l'amélioration de notre compréhension de l'importance biologique de FMRP. Dans la mesure où *FMR1* est un gène hautement conservé durant l'évolution, cela a permis la découverte de nouvelles observations sur la protéine FMRP dans une grande variété de modèles d'études. Toutefois, la spécialisation cellulaire mène à d'importantes différences avec les cellules typiques; à mesure que leurs composants et leurs fonctions deviennent davantage spécialisés, ils perdent certaines capacités basales. Ainsi, les neurones, des cellules hautement spécialisées, sont éloignés des autres types cellulaires servant de modèle d'étude.

Comme il a été mentionné précédemment, la composition des plaquettes est quelque peu différente des autres cellules; ce sont des cellules anucléés contenant trois types de granules ( $\alpha$ , denses et lysosomales) sans réticulum endoplasmique et présentant un cytosquelette très développé. Conséquemment, en tenant compte de l'évolution de la spécificité des plaquettes, la présence de FMRP dans ces cellules semble donc significative, au même titre que dans les neurones. Plus encore, le déclenchement de l'activation plaquettaire et des processus reliés ressemblent en plusieurs points à la plasticité neuronale. Tout d'abord, les

plaquettes entreposent des granules et libèrent certaines molécules semblables aux neurotransmetteurs (ex. glutamate) par exocytose, un phénomène qu'on peut comparer à la libération de neuromédiateurs dans la fente synaptique (Sherif, 1994). Puis, ces transmetteurs sont captés par différents récepteurs et transporteurs, dont certains sont même communs, par exemple les récepteurs au glutamate. Cette activation déclenche dans les deux cas une réponse qui se traduit par une modification de la régulation de la synthèse protéique localisée se produisant au cœur du réseau d'actine et en absence d'influence directe du noyau. Finalement, ce processus enclenche des changements morphologiques; les plaquettes forment de longs prolongements cellulaires où le réseau d'actine joue un rôle prédominant, de manière similaire aux dendrites neuronales.

Néanmoins, le modèle plaquettaire est caractérisé par certaines limites qu'on ne peut ignorer. Les plaquettes sont des constituants sanguins, au même titre que les globules blancs (leucocytes). Alors même suivant une purification facile atteignant un taux de pureté supérieur à 99 %, il y a encore présence d'une certaine contamination leucocytaire. Puisque les plaquettes ont une machinerie traductionnelle beaucoup moins développée que les leucocytes, cette contamination pourrait affecter dans une certaine mesure nos résultats de synthèse protéique (Pillitteri et al., 2007). Les expérimentations avec du matériel humain occasionnent également une grande variabilité entre les différents individus dont on doit tenir compte. De plus, l'absence de noyau empêche les études de transformation qui pourraient faciliter la mise en évidence de la fonction de FMRP. Finalement, bien que les plaquettes partagent de nombreuses caractéristiques avec les neurones, il n'est ainsi pas possible d'étudier des protéines, des ARN ou des interactions propres aux neurones.

Par contre, les plaquettes sanguines sont des cellules humaines récoltées de façon non invasive qui ont l'avantage de ne pas avoir été affectées par la mise en culture. Bien que discutable, l'utilisation des plaquettes comme modèle de désordres neurologiques et neuropsychiatriques est assez répandue : les troubles de l'humeur (Modai, Zemishlany, & Jerushalmy, 1984), l'autisme (Safai-Kutti et al., 1988), le Parkinson (Ferrarese et al., 1999), l'Alzheimer (Davies et al., 1997) et plusieurs autres. Pour le syndrome du X fragile, une maladie structurelle des dendrites (Schenck et al., 2001), le plus grand avantage de

l'utilisation des plaquettes demeure toutefois leur possibilité d'activation, c'est-à-dire la possibilité en laboratoire d'induire la réorganisation du cytosquelette. Sans oublier que nous pourrions plus aisément travailler avec des plaquettes provenant d'individu avec le syndrome du X fragile et ainsi vérifier par exemple la présence d'anomalies dans la formation des pseudopodes dans ces cellules.

#### 4. CONCLUSION

Les plaquettes sanguines ont souvent été négligées de par leur aspect simpliste, mais de plus en plus d'études tendent à démontrer le contraire, ne serait-ce que par leur réel métabolisme de l'ARN (Weyrich et al., 2009). Alors que ce modèle cellulaire est caractérisé par certaines limites, les plaquettes offrent plusieurs avantages pour débrouiller la physiopathologie du syndrome du X fragile; bien que ces pistes devront ensuite être vérifiées dans les neurones.

Dès lors que l'augmentation du nombre de répétitions CGG, ainsi que la méthylation du gène *FMR1* conduisent à son silence transcriptionnel, l'étude de la protéine correspondante : FMRP ou « *Fragile X Mental Retardation Protein* », devient un incontournable. *A priori*, FMRP, une protéine possédant les caractéristiques intrinsèques d'une protéine liant l'ARN, serait impliquée au niveau de la synthèse protéique, mais d'autres fonctions ont également été proposées. Ces découvertes ont surtout contribué à placer quelques pièces du puzzle, qui est encore à compléter, le rôle précis de FMRP dans la traduction n'ayant encore jamais été complètement élucidé.

Les travaux présentés dans ce mémoire indiquent clairement une redistribution de FMRP inductible lors de l'activation plaquettaire et plusieurs éléments suggèrent qu'elle serait due à une interaction entre FMRP et le réseau d'actine par le biais des polyribosomes. Considérés dans l'ensemble, ces résultats innovateurs semblent mettre en évidence une nouvelle fonction ou plutôt un rôle plus global dans la spécialisation cellulaire et plus particulièrement dans la formation de pseudopodes. Cette fonction pourrait être à la base des problèmes du maintien de la structure des épines dendritiques tant chez la souris KO que chez les individus avec le syndrome du X fragile. Nous sommes confiants que nos recherches futures nous fourniront un aperçu du mécanisme conduisant à ces manifestations cliniques, ouvrant la voie à des avancées significatives au niveau des traitements envisageables qui pourront remplacer le traitement symptomatique actuel du syndrome du X fragile.

## **5. REMERCIEMENTS**

Mes remerciements vont tout d'abord au professeur François Corbin, qui m'a non seulement accueilli au sein de son laboratoire en tant que stagiaire, mais qui m'a également proposé un projet de maîtrise captivant qui a su consolider ma passion pour la recherche scientifique. De par ses conseils avisés, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer malgré ses charges académiques et professionnelles, il fut pour moi un directeur d'étude dévoué.

Un grand merci à Sylvie Auger et Lucien Junior Bergeron qui m'ont ouvert les portes du laboratoire et m'on fournit de judicieux conseils pour la réalisation de mon projet de recherche; ainsi qu'à tous les stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer durant ma maîtrise. Je remercie spécialement Véronique Lauzière, ma mentore, qui m'a transmis tout son savoir et dont le travail de maîtrise a été la pierre angulaire de mon projet. L'intransigeance de ses critiques s'est révélée très bénéfique et même inspirante. De la même manière, je ne pourrais taire mon importante reconnaissance à Mandy Lessard, une collègue qui a énormément contribué à l'avancement de mes travaux. Son incroyable personnalité a rendu mon séjour inoubliable au sein du laboratoire.

Je profite aussi de cette occasion pour remercier Nathalie Guay pour sa grande disponibilité, une aide précieuse dans la réalisation de mes expérimentations. J'exprime également ma gratitude aux professeurs Xavier Roucou et François Boudreau qui ont accepté avec enthousiasme de siéger sur mon jury d'évaluation, afin de poser un regard extérieur sur mon mémoire. Je dois aussi remercier la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke, la Fondation des étoiles et les Fonds de la Recherche du Québec (FRQS) pour leur soutien financier sans lequel je n'aurai eu la chance de poursuivre mes études.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches, familles et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles. Vous m'avez donné le goût de me surpasser et de persévérer; c'est à vous que je dois la réussite de ma maîtrise.

Merci à vous tous et toutes qui avez contribué de près ou de loin à la réussite de ce projet de recherche!

## 6. RÉFÉRENCES

- Amor, N. B., Pariente, J. A., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Bartegi, A. (2006). Thrombin-induced caspases 3 and 9 translocation to the cytoskeleton is independent of changes in cytosolic calcium in human platelets. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *36*(3), 392-401. doi:10.1016/j.bcmd.2006.03.002
- Angiolillo, D. J., Ueno, M., & Goto, S. (2010). Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *74*(4), 597-607.
- Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C., & Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(11), 2648-2655. doi:10.1523/JNEUROSCI.0099-04.2004
- Antar, L. N., Dichtenberg, J. B., Plociniak, M., Afroz, R., & Bassell, G. J. (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes, Brain, and Behavior*, *4*(6), 350-359. doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00128.x
- Ashley, C. T., Jr, Wilkinson, K. D., Reines, D., & Warren, S. T. (1993). FMR1 protein: Conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5133), 563-566.
- Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Kunst, C. B., Leiner, H. A., Eichler, E. E., Nelson, D. L., & Warren, S. T. (1993). Human and murine FMR-1: Alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nature Genetics*, *4*(3), 244-251. doi:10.1038/ng0793-244
- Bagni, C., & Greenough, W. T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: The roots of fragile X syndrome. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(5), 376-387. doi:10.1038/nrn1667
- Banno, Y., Nakashima, S., Ohzawa, M., & Nozawa, Y. (1996). Differential translocation of phospholipase C isozymes to integrin-mediated cytoskeletal complexes in thrombin-stimulated human platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(25), 14989-14994.
- Bardoni, B., Davidovic, L., Bensaid, M., & Khandjian, E. W. (2006). The fragile X syndrome: Exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *8*(8), 1-16. doi:10.1017/S1462399406010751

- Barradas, M. A., & Mikhailidis, D. P. (1993). The use of platelets as models for neurons: Possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 47(1), 11-18.
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 370-377. doi:10.1016/j.tins.2004.04.009
- Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., . . . Bardoni, B. (2009a). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biology*, 7(1), e16. doi:10.1371/journal.pbio.1000016
- Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., . . . Bardoni, B. (2009b). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biology*, 7(1), e16. doi:10.1371/journal.pbio.1000016
- Berry-Kravis, E., Hicar, M., & Ciurlionis, R. (1995). Reduced cyclic AMP production in fragile X syndrome: Cytogenetic and molecular correlations. *Pediatric Research*, 38(5), 638-643.
- Bertagnolli, M. E., & Beckerle, M. C. (1993). Evidence for the selective association of a subpopulation of GPIIb-IIIa with the actin cytoskeletons of thrombin-activated platelets. *The Journal of Cell Biology*, 121(6), 1329-1342.
- Blair, P., & Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, 23(4), 177-189. doi:10.1016/j.blre.2009.04.001
- BORN, G. V. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194, 927-929.
- Bramham, C. R., & Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: Transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 776-789. doi:10.1038/nrn2150
- Ceman, S., O'Donnell, W. T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J., & Warren, S. T. (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3295-3305. doi:10.1093/hmg/ddg350
- Cerecedo, D., Cisneros, B., Mondragon, R., Gonzalez, S., & Galvan, I. J. (2010). Actin filaments and microtubule dual-granule transport in human adhered platelets: The role of alpha-dystrobrevins. *British Journal of Haematology*, 149(1), 124-136. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08085.x
- Chen, R., & Liang, N. (1998). Cytoskeletal changes in platelets induced by thrombin and phorbol myristate acetate (PMA). *Cell Biology International*, 22(6), 429-435. doi:10.1006/cbir.1998.0271

- Chonchaiya, W., Schneider, A., & Hagerman, R. J. (2009). Fragile X: A family of disorders. *Advances in Pediatrics*, *56*, 165-186. doi:10.1016/j.yapd.2009.08.008
- Coffee, B., Ikeda, M., Budimirovic, D. B., Hjelm, L. N., Kaufmann, W. E., & Warren, S. T. (2008). Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: A case report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *146A*(10), 1358-1367. doi:10.1002/ajmg.a.32261
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: Maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(10), 5401-5404.
- Corbin, F., Bouillon, M., Fortin, A., Morin, S., Rousseau, F., & Khandjian, E. W. (1997). The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)<sup>+</sup> mRNA in actively translating polyribosomes. *Human Molecular Genetics*, *6*(9), 1465-1472.
- Coy, J. F., Sedlacek, Z., Bachner, D., Hameister, H., Joos, S., Lichter, P., . . . Poustka, A. (1995). Highly conserved 3' UTR and expression pattern of FXR1 points to a divergent gene regulation of FXR1 and FMR1. *Human Molecular Genetics*, *4*(12), 2209-2218.
- Crawford, D. C., Acuna, J. M., & Sherman, S. L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *3*(5), 359-371.
- Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., & Darnell, R. B. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes & Development*, *19*(8), 903-918. doi:10.1101/gad.1276805
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., . . . Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, *146*(2), 247-261. doi:10.1016/j.cell.2011.06.013
- Davidovic, L., Huot, M. E., & Khandjian, E. W. (2005). Lost once, the fragile X mental retardation protein is now back onto brain polyribosomes. *RNA Biology*, *2*(1), 1-3.
- Davidovic, L., Jaglin, X. H., Lepagnol-Bestel, A. M., Tremblay, S., Simonneau, M., Bardoni, B., & Khandjian, E. W. (2007). The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Human Molecular Genetics*, *16*(24), 3047-3058. doi:10.1093/hmg/ddm263
- Davidovic, L., Tremblay, S., Gravel, M., De Koninck, P., & Khandjian, E. W. (2006). The fragile X syndrome: One protein missing and 1001 disoriented mRNAs. [Le syndrome de l'X fragile: une protéine absente et 1001 ARNm déboussoles] *Medicine Sciences : M/S*, *22*(1), 41-46. doi:10.1051/medsci/200622141

- Davies, T. A., Long, H. J., Tibbles, H. E., Sgro, K. R., Wells, J. M., Rathbun, W. H., . . . Simons, E. R. (1997). Moderate and advanced alzheimer's patients exhibit platelet activation differences. *Neurobiology of Aging*, *18*(2), 155-162.
- De Diego Otero, Y., Severijnen, L. A., van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B., & Willemsen, R. (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(23), 8332-8341.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., & Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genetics*, *4*(4), 335-340. doi:10.1038/ng0893-335
- Diaz-Ricart, M., Arderiu, G., Estebanell, E., Perez-Pujol, S., Lozano, M., White, J. G., . . . Ordinas, A. (2002). Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. *The American Journal of Pathology*, *160*(1), 329-337. doi:10.1016/S0002-9440(10)64376-3
- Dicthenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H., & Bassell, G. J. (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental Cell*, *14*(6), 926-939. doi:10.1016/j.devcel.2008.04.003
- Dreux, C., & Launay, J. M. (1985). Blood platelets: Neuronal model in psychiatric disorders. [La plaquette sanguine: un modele neuronal dans les affections psychiatriques] *L'Encephale*, *11*(2), 57-64.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., & Warren, S. T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Human Molecular Genetics*, *5*(8), 1083-1091.
- Eichler, E. E., Holden, J. J., Popovich, B. W., Reiss, A. L., Snow, K., Thibodeau, S. N., . . . Nelson, D. L. (1994). Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genetics*, *8*(1), 88-94. doi:10.1038/ng0994-88
- Eichler, E. E., Richards, S., Gibbs, R. A., & Nelson, D. L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Human Molecular Genetics*, *2*(8), 1147-1153.
- Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T., & Hersch, S. M. (1997). Fragile X mental retardation protein: Nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(5), 1539-1547.
- Ferrarese, C., Zoia, C., Pecora, N., Piolti, R., Frigo, M., Bianchi, G., . . . Frattola, L. (1999). Reduced platelet glutamate uptake in parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *106*(7-8), 685-692.

- Flaumenhaft, R., Dilks, J. R., Rozenvayn, N., Monahan-Earley, R. A., Feng, D., & Dvorak, A. M. (2005). The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*, *105*(10), 3879-3887. doi:10.1182/blood-2004-04-1392
- Fox, J. E. (1993). The platelet cytoskeleton. *Thrombosis and Haemostasis*, *70*(6), 884-893.
- Fox, J. E., & Phillips, D. R. (1983). Polymerization and organization of actin filaments within platelets. *Seminars in Hematology*, *20*(4), 243-260.
- Garber, K. B., Visootsak, J., & Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *16*(6), 666-672. doi:10.1038/ejhg.2008.61
- Gevaert, K., Eggermont, L., Demol, H., & Vandekerckhove, J. (2000). A fast and convenient MALDI-MS based proteomic approach: Identification of components scaffolded by the actin cytoskeleton of activated human thrombocytes. *Journal of Biotechnology*, *78*(3), 259-269.
- Guduric-Fuchs, J., Mohrlen, F., Frohme, M., & Frank, U. (2004). A fragile X mental retardation-like gene in a cnidarian. *Gene*, *343*(2), 231-238. doi:10.1016/j.gene.2004.10.007
- Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Kaufmann, W. E., Ono, M. Y., Tartaglia, N., Lachiewicz, A., . . . Tranfaglia, M. (2009). Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*, *123*(1), 378-390. doi:10.1542/peds.2008-0317
- Harris, H. E., & Weeds, A. G. (1978). Platelet actin: Sub-cellular distribution and association with profilin. *FEBS Letters*, *90*(1), 84-88.
- Harrison, C. J., Jack, E. M., Allen, T. D., & Harris, R. (1983). The fragile X: A scanning electron microscope study. *Journal of Medical Genetics*, *20*(4), 280-285.
- Hartwig, J. H. (2006). The platelet: Form and function. *Seminars in Hematology*, *43*(1 Suppl 1), S94-100. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.11.004
- Hesketh, J. E., & Pryme, I. F. (1991). Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *The Biochemical Journal*, *277* ( Pt 1)(Pt 1), 1-10.
- Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., & Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *41*(3), 289-294. doi:10.1002/ajmg.1320410306
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T., & Bear, M. F. (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7746-7750. doi:10.1073/pnas.122205699

- Hugo, N., & Bouvet, P. (2003). Assembly of ribonucleoparticle complexes. [Assemblage des complexes ribonucleoproteiques] *Medecine Sciences : M/S*, 19(12), 1271-1279. doi:10.1051/medsci/200319121271
- Irwin, S. A., Galvez, R., & Greenough, W. T. (2000). Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(10), 1038-1044.
- Jacobs, P. A., Bullman, H., Macpherson, J., Youings, S., Rooney, V., Watson, A., & Dennis, N. R. (1993). Population studies of the fragile X: A molecular approach. *Journal of Medical Genetics*, 30(6), 454-459.
- Jennings, L. K. (2009). Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(2), 248-257. doi:10.1160/TH09-03-0192
- Kamath, S., Blann, A. D., & Lip, G. Y. (2001). Platelet activation: Assessment and quantification. *European Heart Journal*, 22(17), 1561-1571. doi:10.1053/euhj.2000.2515
- Kao, D. I., Aldridge, G. M., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (2010). Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15601-15606. doi:10.1073/pnas.1010564107
- Kaushansky, K. (2008). Historical review: Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 111(3), 981-986. doi:10.1182/blood-2007-05-088500
- Khandjian, E. W. (1999). Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 77(4), 331-342.
- Khandjian, E. W., Bardoni, B., Corbin, F., Sittler, A., Giroux, S., Heitz, D., . . . Mandel, J. (1998). Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Human Molecular Genetics*, 7(13), 2121-2128.
- Khandjian, E. W., Corbin, F., Woerly, S., & Rousseau, F. (1996). The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nature Genetics*, 12(1), 91-93. doi:10.1038/ng0196-91
- Khandjian, E. W., Huot, M. E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R., & Bardoni, B. (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13357-13362. doi:10.1073/pnas.0405398101

- Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J. P., Vainchenker, W., & Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 164(1), 189-195.
- Kralisz, U., & Cierniewski, C. S. (2000). Activity of pp60c-src and association of pp60c-src, pp54/58lyn, pp60fyn, and pp72syk with the cytoskeleton in platelets activated by collagen. *IUBMB Life*, 49(1), 33-42. doi:10.1080/713803580
- Krawczun, M. S., Jenkins, E. C., & Brown, W. T. (1985). Analysis of the fragile-X chromosome: Localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Human Genetics*, 69(3), 209-211.
- Laferriere, N. B., MacRae, T. H., & Brown, D. L. (1997). Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 75(2), 103-117.
- Lauziere, V., Lessard, M., Meunier, A. J., McCoy, M., Bergeron, L. J., & Corbin, F. (2012). Unusual subcellular confinement of the fragile X mental retardation protein (FMRP) in circulating human platelets: Complete polyribosome dissociation. *Biochimie*, 94(4), 1069-1073. doi:10.1016/j.biochi.2011.12.014
- Lefebvre, P., White, J. G., Krumwiede, M. D., & Cohen, I. (1993). Role of actin in platelet function. *European Journal of Cell Biology*, 62(2), 194-204.
- Lessard, M., Chouiali, A., Drouin, R., Sebire, G., & Corbin, F. (2011). Quantitative measurement of FMRP in blood platelets as a new screening test for fragile X syndrome. *Clinical Genetics*, doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01798.x; 10.1111/j.1399-0004.2011.01798.x
- Lindemann, S., & Gawaz, M. (2007). The active platelet: Translation and protein synthesis in an anucleate cell. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 33(2), 144-150. doi:10.1055/s-2007-969027
- Lopez, I., Duprez, V., Melle, J., Dreyfus, F., Levy-Toledano, S., & Fontenay-Roupie, M. (2001). Thrombopoietin stimulates cortactin translocation to the cytoskeleton independently of tyrosine phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 356(Pt 3), 875-881.
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *American Journal of Human Genetics*, 21(3), 231-244.
- Mangalpally, K. K., Siqueiros-Garcia, A., Vaduganathan, M., Dong, J. F., Kleiman, N. S., & Guthikonda, S. (2010). Platelet activation patterns in platelet size sub-populations: Differential responses to aspirin in vitro. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 30(3), 251-262. doi:10.1007/s11239-010-0489-x

- Martin, J. P., & Bell, J. (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *Journal of Neurology and Psychiatry*, 6(3-4), 154-157.
- Meguid, N. A., Fahim, C., Sami, R., Nashaat, N. H., Yoon, U., Anwar, M., . . . Evans, A. C. (2012). Cognition and lobar morphology in full mutation boys with fragile X syndrome. *Brain and Cognition*, 78(1), 74-84. doi:10.1016/j.bandc.2011.09.005; 10.1016/j.bandc.2011.09.005
- Mientjes, E. J., Willemsen, R., Kirkpatrick, L. L., Nieuwenhuizen, I. M., Hoogeveen-Westerveld, M., Verweij, M., . . . Nelson, D. L. (2004). Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: Implications for Fxr1p function in vivo. *Human Molecular Genetics*, 13(13), 1291-1302. doi:10.1093/hmg/ddh150
- Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., . . . Eberwine, J. (2003). RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron*, 37(3), 417-431.
- Modai, I., Zemishlany, Z., & Jerushalmy, Z. (1984). 5-hydroxytryptamine uptake by blood platelets of unipolar and bipolar depressed patients. *Neuropsychobiology*, 12(2-3), 93-95.
- Nuytens, B. P., Thijs, T., Deckmyn, H., & Broos, K. (2011). Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis Research*, 127 Suppl 2, S26-9. doi:10.1016/S0049-3848(10)70151-1
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., . . . Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5010), 1097-1102.
- Patel, S. R., Hartwig, J. H., & Italiano, J. E., Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3348-3354. doi:10.1172/JCI26891
- Peprah, E. (2012). Fragile X syndrome: The FMR1 CGG repeat distribution among world populations. *Annals of Human Genetics*, 76(2), 178-191. doi:10.1111/j.1469-1809.2011.00694.x; 10.1111/j.1469-1809.2011.00694.x
- Pillitteri, D., Bassus, S., Boller, K., Mahnel, R., Scholz, T., Westrup, D., . . . Kirchmaier, C. M. (2007). Thrombin-induced interleukin 1beta synthesis in platelet suspensions: Impact of contaminating leukocytes. *Platelets*, 18(2), 119-127. doi:10.1080/09537100600800792
- Pletscher, A., & Laubscher, A. (1980). Blood platelets as models for neurons: Uses and limitations. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (16)(16), 7-16.

- Price, D. K., Zhang, F., Ashley, C. T., Jr, & Warren, S. T. (1996). The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CCT 5'-untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. *Genomics*, *31*(1), 3-12.
- Ramaekers, F. C., Benedetti, E. L., Dunia, I., Vorstenbosch, P., & Bloemendal, H. (1983). Polyribosomes associated with microfilaments in cultured lens cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *740*(4), 441-448.
- Rasheed, H., & Saeed, S. A. (2004). Involvement of thromboxane A2 and tyrosine kinase in the synergistic interaction of platelet activating factor and calcium ionophore A23187 in human platelet aggregation. *Experimental & Molecular Medicine*, *36*(3), 220-225.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J. P., Brison, O., Metivier, D., . . . Vainchenker, W. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, *101*(2), 541-544. doi:10.1182/blood-2002-05-1553
- Rotman, A. (1983). Blood platelets in psychopharmacological research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *7*(2-3), 135-151.
- Rousseau, F., Heitz, D., Oberle, I., & Mandel, J. L. (1991). Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: Inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation. *Journal of Medical Genetics*, *28*(12), 830-836.
- Safai-Kutti, S., Denfors, I., Kutti, J., & Wadenvik, H. (1988). In vitro platelet function in infantile autism. *Folia Haematologica (Leipzig, Germany : 1928)*, *115*(6), 897-901.
- Santoro, M. R., Bray, S. M., & Warren, S. T. (2012). Molecular mechanisms of fragile X syndrome: A twenty-year perspective. *Annual Review of Pathology*, *7*, 219-245. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132457
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., & Mandel, J. L. (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8844-8849. doi:10.1073/pnas.151231598
- Serrano, K., & Devine, D. V. (2004). Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *58*(4), 242-252. doi:10.1002/cm.20011
- Sherif, F. M. (1994). GABA-transaminase in brain and blood platelets: Basic and clinical aspects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *18*(8), 1219-1233.

- Siomi, M. C., Siomi, H., Sauer, W. H., Srinivasan, S., Nussbaum, R. L., & Dreyfuss, G. (1995). FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *The EMBO Journal*, *14*(11), 2401-2408.
- Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H., & Dreyfuss, G. (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(7), 3825-3832.
- Smyth, S. S., McEver, R. P., Weyrich, A. S., Morrell, C. N., Hoffman, M. R., Arepally, G. M., . . . 2009 Platelet Colloquium Participants. (2009). Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *7*(11), 1759-1766. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x
- Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C., & Darnell, R. B. (2004). Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(33), 7272-7276. doi:10.1523/JNEUROSCI.2306-04.2004
- Stegner, D., & Nieswandt, B. (2011). Platelet receptor signaling in thrombus formation. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *89*(2), 109-121. doi:10.1007/s00109-010-0691-5
- Tamanini, F., Willemsen, R., van Unen, L., Bontekoe, C., Galjaard, H., Oostra, B. A., & Hoogeveen, A. T. (1997). Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Human Molecular Genetics*, *6*(8), 1315-1322.
- Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2010). Platelet formation. *Seminars in Hematology*, *47*(3), 220-226. doi:10.1053/j.seminhematol.2010.03.005
- Verheij, C., Bakker, C. E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J., . . . Oostra, B. A. (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*, *363*(6431), 722-724. doi:10.1038/363722a0
- Verkerk, A. J., de Graaff, E., De Boule, K., Eichler, E. E., Konecki, D. S., Reyniers, E., . . . Nelson, D. L. (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Human Molecular Genetics*, *2*(4), 399-404.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., . . . Zhang, F. P. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, *65*(5), 905-914.

- Wan, L., Dockendorff, T. C., Jongens, T. A., & Dreyfuss, G. (2000). Characterization of dFMR1, a drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. *Molecular and Cellular Biology*, 20(22), 8536-8547.
- Wang, H., Dichtenberg, J. B., Ku, L., Li, W., Bassell, G. J., & Feng, Y. (2008). Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 105-114. doi:10.1091/mbc.E07-06-0583
- Wang, T., Bray, S. M., & Warren, S. T. (2012). New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Current Opinion in Genetics & Development*, doi:10.1016/j.gde.2012.02.002
- Weyrich, A. S., Lindemann, S., Tolley, N. D., Kraiss, L. W., Dixon, D. A., Mahoney, T. M., . . . Zimmerman, G. A. (2004). Change in protein phenotype without a nucleus: Translational control in platelets. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30(4), 491-498. doi:10.1055/s-2004-833484
- Weyrich, A. S., Schwertz, H., Kraiss, L. W., & Zimmerman, G. A. (2009). Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 7(2), 241-246. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03211.x
- Wisniewski, K. E., Segan, S. M., Mizejeski, C. M., Sersen, E. A., & Rudelli, R. D. (1991). The fra(X) syndrome: Neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *American Journal of Medical Genetics*, 38(2-3), 476-480.
- Youssefian, T., & Cramer, E. M. (2000). Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*, 95(12), 4004-4007.
- Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K. S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., . . . Bagni, C. (2007). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nature Neuroscience*, 10(5), 578-587. doi:10.1038/nn1893
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., . . . Bagni, C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, 112(3), 317-327.
- Zanotti, K. J., Lackey, P. E., Evans, G. L., & Mihailescu, M. R. (2006). Thermodynamics of the fragile X mental retardation protein RGG box interactions with G quartet forming RNA. *Biochemistry*, 45(27), 8319-8330. doi:10.1021/bi060209a
- Zhang, Y., O'Connor, J. P., Siomi, M. C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R. L., & Dreyfuss, G. (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *The EMBO Journal*, 14(21), 5358-5366.

## 7. ANNEXES

### 7.1 Liste des publications

1. Lauzière, V., Lessard, M., **Meunier, Alexandre J.**, McCoy, M., Bergeron, L. J. & Corbin, F. (2012). Unusual subcellular confinement of the fragile X mental retardation protein (FMRP) in circulating human platelets: Complete polyribosome dissociation. *Biochimie*, 94(2012), 1069-1073.

## 7.2 Liste des communications par affiche

1. 12<sup>th</sup> International congress of human genetics & 61<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of human genetics – ICHG & ASHG (Montréal). *Blood platelet as a new model to study the interactions of the fragile X mental retardation protein with the cytoskeleton*. **Meunier, Alexandre J.** et Corbin, F. Octobre 2011.
2. 7<sup>e</sup> édition des Journées scientifiques du 1<sup>er</sup> cycle de la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke (Sherbrooke). *Changes in subcellular distribution and behaviour of FMRP during differentiation of megakaryocytes into platelets induced by TPO and PMA*. Mc Coy, M., Matteau, D., **Meunier, Alexandre J.** et Corbin, F. Septembre 2011.
3. 40<sup>e</sup> édition des Journées scientifiques de la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke (Sherbrooke). *FMRP et cytosquelette : partenaires lors de l'activation plaquettaire?* **Meunier, Alexandre J.**, Lauzière, V., Bergeron, L. J. et Corbin, F. Mars 2011.
4. 39<sup>e</sup> édition des Journées scientifiques de la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke (Sherbrooke). *FMRP serait-elle impliquée lors de l'activation plaquettaire?* **Meunier, Alexandre J.**, Lauzière, V., Bergeron, L. J. et Corbin, F. Mars 2010.

### 7.3 Liste des communications orales

1. 79<sup>e</sup> congrès de l'Association francophone pour le savoir – ACFAS (Sherbrooke). *Les plaquettes sanguines, un modèle innovateur pour l'étude de l'interaction entre FMRP et le cytosquelette*. **Meunier, Alexandre J.**, Bergeron, L. J. et Corbin, F. Mai 2011.
2. 52<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec – CRCQ (Bromont). *Les plaquettes humaines comme nouveau modèle d'étude su syndrome du X fragile*. **Meunier, Alexandre J.**, Lauzière, V., McCoy, M., Bergeron, L. J. et Corbin, F. Septembre 2010.

## **7.4 Preuve de soumission de l'article**

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as François Corbin

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Cellular Physiology*.

Manuscript ID: JCP-12-0324

Title: MICROFILAMENT-DEPENDENT CYTOSKELETAL TRANSLOCATION OF THE  
FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN (FMRP) UPON PLATELET  
AGGREGATIONAuthors: Meunier, Alexandre J.  
Bergeron, Lucien Junior  
Guiraut, Clémence  
Forget, Karolyn  
Lauzière, Véronique  
Corbin, François

Date Submitted: 18-Jun-2012



Print



Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.9.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.



Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

## **7.5 Autorisation d'intégration d'un article écrit en collaboration à un mémoire**

**AUTORISATION D'INTÉGRATION  
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION  
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussigné(e)s, soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : Microfilament-dependent cytoskeletal translocation of the fragile X mental retardation protein (FMRP) upon platelet aggregation  
reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire  de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Alexandre S. Meunier

inscrit(e) au programme de maîtrise en biochimie

de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires\*

Signature \_\_\_\_\_ Date : 2012/06/07

Nom VÉRONIQUE LAUZÈRE

Coordonnées \_\_\_\_\_  
SAI OC H3L 2R7  
veronique.lauzere@USherbrooke.ca

Signature \_\_\_\_\_ Date : 2012/06/18

Nom CLÉMENTINE GUIRAUT

Coordonnées \_\_\_\_\_  
20220000 CIC, J1H1Y6  
clémence.guiraut@usherbrooke.ca

Signature \_\_\_\_\_ Date : 2012/06/18

Nom KLOTEN IR BERGERON

Coordonnées U. de S. FMSSS - sciences cliniques  
27-1019

Signature \_\_\_\_\_ Date : 18 juin 2012

Nom Karolyn Forget

Coordonnées \_\_\_\_\_  
Sherbrooke, Qc J1E 1T3

\* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION  
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION  
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : Microfilament-dependent cytoskeletal translocation of the fragile X mental retardation protein (FMRP) upon platelet aggregation

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire  de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Alexandre J. Meunier

inscrit(e) au programme de maîtrise en biochimie

de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires\*

Signature \_\_\_\_\_

Date : 18/6/2010

Nom \_\_\_\_\_

François Corbin

Coordonnées \_\_\_\_\_

CHUS - Pleurinet

Dép. Biochimie

Signature \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Nom \_\_\_\_\_

Coordonnées \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Nom \_\_\_\_\_

Coordonnées \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Nom \_\_\_\_\_

Coordonnées \_\_\_\_\_

\* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).