

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ASSOCIATION FONCTIONNELLE DE LA LECTINE GALECTINE-1 AVEC LES
PROTÉINES D'ENVELOPPES RÉTROVIRALES ENDOGÈNES HUMAINES
DANS LE PLACENTA ET LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES
PLACENTAIRES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
CAROLINE, JULIE, GWÉNAËLLE TOUDIC

JUIN 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Un doctorat est un parcours de longue haleine qui nécessite un bon entourage, surtout lorsqu'on part à 6000 km de sa famille et ses amis et qu'on atterit à Montréal par -38°C!

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, Dr Benoit Barbeau, de m'avoir proposé et confié ce beau travail de recherche sur les rétrovirus endogènes. Merci de m'avoir guidé tout au long de ce parcours, pour vos conseils, votre disponibilité, votre écoute, vos nombreux encouragements et de me faire mille fois plus confiance que je ne le fais à moi-même.

Je remercie également ma codirectrice, Dre Julie Lafond, de sa bienveillance, sa disponibilité et ses encouragements tout au long de mon doctorat.

Ce projet de recherche n'aurait pas été possible sans l'aide de nos collaborateurs et de mes collègues de labeur et de labo. Un grand merci à Dr Sachiko Sato et à Guillaume St-Pierre pour les galectines et les discussions constructives. Un immense merci à Denis Flipo (mon fournisseur officiel en papier bulle) pour son aide précieuse avec le microscope confocal et les « Live ». Je remercie énormément mes collègues de travail présent et passé: Antoine, Clément, Kévin, Xavier, Yong et Zhenlong. Merci de votre soutien, de votre aide, pour la bonne humeur et surtout de votre patience! Je remercie tout particulièrement Xavier et le Dr Yong Xiao. Thank you Yong for your help, guidance and wisdom all along my PhD. You helped me and taught me a lot, not only in science! Merci, Xavier, pour ton immense aide avec les placentas dans le projet PE mais aussi pour tout ce que tu as fait pour m'aider dans mon travail.

Je remercie sincèrement tous les collègues des autres labo du 3^{ème} étage pour la bonne ambiance, l'entraide, la collaboration et les amitiés qui se sont créées. Merci,

Tati, de m'avoir sortie des résidences universitaires, pour ta bonne humeur, d'avoir sué à mes côtés au centre sportif et pour tes encouragements dans les moments de doutes.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux amies et mentors, Émilie et Cynthia. Merci, Émilie, de m'avoir guidé lors de mes débuts au labo, de m'avoir conseillé, aidé, et encouragé dans les moments difficiles. Et merci de m'avoir fait découvrir la bonne bouffe et les microbrasseries de Montréal! Ne serais-je pas venu faire cette thèse de doctorat au Québec si ce n'était grâce à toi Cynthia. Merci de m'avoir pris sous ton aile, pour tous les conseils que tu m'as donnés, de m'avoir emmené avec toi monter à cheval, d'avoir partagé tes expériences en recherche et au Québec. Merci à vous deux pour votre amitié et votre modèle.

Je tiens maintenant à remercier tous ceux qui m'ont accompagné personnellement, de près ou de loin, et soutenu durant cette aventure. À toi Angéline, mon guide dans la vie adulte. Je ne sais comment te remercier pour ta disponibilité, ta générosité et ta patience. Je m'excuse d'être partie aussi loin. À mes 'loosers' adorées (oui, on sait que ça ne s'écrit pas comme ça!), Anne et Amandine, merci de m'avoir supporté et épaulé toutes ces années. Surtout un grand merci pour tous les souvenirs qu'on s'est créés à Dinan, Rennes, Lyon et ailleurs! Aussi, merci à toutes les trois pour les rires, les pleures, les aventures, d'être venues me voir jusqu'à Montréal et de m'avoir accompagné durant cette grande aventure du doctorat (merci skype et whatsapp au passage). Merci à Priscilla, Aurélie et Solène, ensembles dans la galère des années médecines; Omar (feu Gonzague), Djé, Quentin, Pierrot, Phiphi et Guillaume pour les supers moments passés ensembles (et à venir) au St-Sauveur et ailleurs!

Un merci spécial à Dadou. Merci pour le soutien que tu m'a apporté au quotidien, pour ta bonne humeur et les rires (malgré toi), ta grande patience, pour tes conseils et toutes les discussions. Merci pour tes encouragements durant mon doctorat et de m'avoir rappelé qu'il y a une vie en dehors du labo!

Enfin un grand merci à ma famille (de sang et de cœur) pour tous les encouragements et bien plus : Astride et Jean, Marthe et Michel, auntie Joëlle & Michelle, Claudine et Owein. Merci à ma sœur, Isabelle, et à Rozenn. Il n'a pas de mots pour exprimer toute la reconnaissance et l'amour que je porte à mes parents, à qui je dois tout. Vous m'avez toujours soutenu même dans mon choix de partir à 6000 km. Thank you dad for everything, your patience and support all these years. Merci maman pour tout ce que tu as fait et continu de faire pour moi.

DÉDICACE

À mes parents et ma famille,

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xix
RÉSUMÉ	xxi
CHAPITRE I.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Les rétrovirus	1
1.1.1 Structure générale des particules rétrovirales	1
1.1.2 L'organisation du génome des rétrovirus.....	3
1.1.3 Taxonomie des rétrovirus.....	5
1.1.4 Le cycle de réplication des rétrovirus	5
1.2 Les rétrovirus endogènes	13
1.2.1 La découverte des rétrovirus endogènes	13
1.2.2 La classification des rétrovirus endogènes.....	14
1.3 Les rétrovirus endogènes humains dans le placenta	16
1.3.1 La structure du placenta humain	16
1.3.2 Les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.....	18
1.3.3 Le syncytiotrophoblaste	20
1.3.4 Les protéines rétrovirales endogènes humaines Syncytine-1 et Syncytine-2	23
1.3.5 Les protéines Syncytines chez les autres espèces	51
1.3.6 Les autres protéines rétrovirales endogènes humaines dans le placenta	53
1.4 Les vésicules extracellulaires	55
1.4.1 Les corps apoptotiques.....	55
1.4.2 Les microvésicules	56

1.4.3	Les exosomes	57
1.4.4	La voie d'internalisation des vésicules extracellulaires dans les cellules.....	59
1.4.5	La fonction des vésicules extracellulaires.....	60
1.4.6	Les vésicules extracellulaires placentaires.....	66
1.5	Les galectines.....	70
1.5.1	La N- et O-glycosylation des protéines chez les organismes eucaryotes.....	71
1.5.2	La découverte des galectines.....	73
1.5.3	La classification des galectines	73
1.5.4	La synthèse des galectines	74
1.5.5	Les fonctions biologiques des galectines	75
1.5.6	Le rôle des galectines dans le développement tumoral et les infections.....	78
1.5.7	La fonction des galectines dans le développement du placenta humain.....	83
PROBLÉMATIQUE.....		97
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....		99
CHAPITRE II		101
2 GALECTIN-1 INTERACTS WITH THE HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRAL ENVELOPE PROTEIN SYNCYTIN-2 AND POTENTIATES TROPHOBLAST CELL FUSION.....		103
2.1	Abstract.....	104
2.2	Introduction.....	105
2.3	Materials and Methods	108
2.3.1	Ethical approval	108
2.3.2	Primary cells and cell lines	108
2.3.3	Recombinant Galectin-1 and -3 production	109
2.3.4	Galectin-1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	110
2.3.5	Plasmids	111
2.3.6	Generation of stable MFSD2a-overexpressing HEK293T cell clones	112
2.3.7	Production of pseudotyped NL4.3 viruses and titration.....	112
2.3.8	Infection assay with pseudotyped virions	113
2.3.9	Cell fusion assay	114
2.3.10	Co-immunoprecipitation	116
2.3.11	Western-blot analysis.....	117
2.3.12	Reverse transcription analysis.....	118
2.3.13	Statistical analysis.....	118

2.4	Results	118
2.4.1	Galectin-1 is involved in the syncytialisation of trophoblastic cells but acts in combination with other fusogenic factors	118
2.4.2	Galectin-1 does not induce BeWo cell fusion and is not modulated by forskolin	120
2.4.3	Analysis of the infection of Syncytin-2-pseudotyped viruses	121
2.4.4	Galectin-1 but not Galectin-3 increases the binding of Syncytin-2 to MFSD2a	122
2.4.5	Syncytin-1 and -2 respond differently to the presence of Galectin-1 ...	123
2.4.6	Galectin-1 potentiate the attachment of Syncytin-2 pseudotyped viruses to the cell surface	124
2.4.7	Higher association between Galectin-1 and viral particles in the presence of Syncytin-2	125
2.5	Discussion	126
2.6	Acknowledgments and funding	130
2.7	Figures	131
2.8	Supplementary materials	141
CHAPITRE III		143
3	GALECTIN-1 MODULATES THE FUSOGENIC ACTIVITY OF THREE PLACENTAL ENDOGENOUS RETROVIRAL ENVELOPES	145
3.1	Abstract	146
3.2	Introduction	147
3.3	Materials and Methods	150
3.3.1	Cell lines	150
3.3.2	Plasmids	151
3.3.3	Recombinant Galectin-1 and -3 production	152
3.3.4	Production of pseudotyped NL4.3 viruses and titration	153
3.3.5	Infections with pseudotyped viruses	154
3.3.6	Computational analysis of MFSD2a transcript expression in human cell lines	154
3.3.7	Viability MTT Assay	155
3.3.8	Cell fusion assay	155
3.3.9	Immunolocalization of MFSD2a proteins	156
3.3.10	Western-blot analysis	157
3.3.11	Statistical Analysis	157

3.4	Results	158
3.4.1	Galectin-1 increases the fusion capacity of the endogenous retroviral envelope Syncytin-2.....	158
3.4.2	Env-control, Syncytin-1, Syncytin-2 and VSV-G-pseudotyped viruses differentially infect human and simian cell lines	159
3.4.3	Galectin-1-dependent increase of the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses relies on MFSD2a expression but not on the N-glycosylations of the receptor.....	160
3.4.4	Galectin-1-dependent increase of the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses is reproduced on different human cell lines	161
3.4.5	Galectin-1 differently affects Syncytin-1 according to cell type	162
3.4.6	Galectin-3 does not increase the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses but affects Syncytin-1-pseudotyped viruses in certain cell lines.....	163
3.4.7	Galectin-1 affects the fusion activity of the endogenous retroviral envelope EnvP(b)	164
3.5	Discussion.....	165
3.6	Conclusion	169
3.7	Acknowledgements.....	170
3.8	Figures	171
3.9	Supplementary material	178
CHAPITRE IV		181
4	THE ROLE OF THE ENDOGENOUS RETROVIRAL PROTEIN SYNCYTIN-2 AND OF GALECTIN-1 IN THE UPTAKE OF PLACENTAL EXTRACELLULAR VESICLES IN ENDOTHELIAL CELLS	183
4.1	Abstract.....	184
4.2	Introduction.....	184
4.3	Material and Methods	188
4.3.1	Ethical Statement	188
4.3.2	Primary cells and cell lines	188
4.3.3	Plasmids and recombinant Galectin-1.....	189
4.3.4	Production and isolation of extracellular vesicles.....	189
4.3.5	Electron Microscopy analyses.....	190
4.3.6	Extracellular vesicles labelling	190
4.3.7	Live cell imaging and confocal microscopy	191
4.3.8	Flow cytometry	191

4.3.9	Western blot	192
4.3.10	Statistical analysis	193
4.4	Results	193
4.4.1	Characterization of the extracellular vesicles isolated from villous cytotrophoblast supernatants.....	193
4.4.2	Placental extracellular vesicles are internalised in endothelial cells.....	194
4.4.3	Syncytin-2 is expressed on extracellular vesicles produced in HEK293T cells and enhances their uptake in endothelial cells.....	195
4.4.4	The expression of Syncytin-2 on extracellular vesicles enhances their uptake in endothelial cells, an uptake that is further increased by extracellular Galectin-1	196
4.5	Discussion.....	197
4.6	Acknowledgements.....	200
4.7	Figures	200
CHAPITRE V		211
5	DISCUSSION DES RÉSULTATS	212
5.1	Les Galectine-1 et -3 comme potentiels facteurs de régulation des activités fusogéniques de certaines protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes.....	212
5.2	La Galectine-1, un facteur extracellulaire qui optimise la capacité fusogénique de la protéine Syncytine-2.....	213
5.3	Les Galectine-1 et -3 comme modulateurs de l'activité fusogénique de la Syncytine-1	214
5.4	L'association de la Galectine-1 avec EnvP(b).....	217
5.5	Les implications des interactions Galectine-1 et -3 avec les enveloppes rétrovirales endogènes.....	218
5.5.1	Dans les pathologies.....	218
5.5.2	Dans les processus de fusion en dehors du placenta	220
5.5.3	Perspectives.....	222
5.6	La Syncytine-2 – une protéine qui oriente l'internalisation des Vésicules extracellulaires placentaires dans les cellules	224
5.6.1	L'adressage de la Syncytine-2 dans les vésicules extracellulaires.....	225
5.6.2	Les implications de la présence des Syncytine-1 et -2 à la surface des vésicules extracellulaires placentaires	228

5.6.3 Le rôle envisagé de la Galectine-1 dans l'entrée des vésicules extracellulaires	232
5.6.4 Perspectives.....	232
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	237
ANNEXE A Séquence protéique annotée de la protéine syncytine-2	239
ANNEXE B Séquence protéique annotée de la protéine Syncytine-1	241
BIBLIOGRAPHIE	243

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Organisation d'une particule rétrovirale et de la glycoprotéine d'enveloppe.	2
Figure 1.2: Exemple de l'organisation génomique des rétrovirus simples et complexes et d'une molécule d'ARN génomique d'un rétrovirus.....	4
Figure 1.3: Représentation schématique de la structure de la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus.	7
Figure 1.4: La rétrotranscription de l'ARN génomique viral en ADN double brin.....	9
Figure 1.5: Synthèse du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus.	11
Figure 1.6 Organisation du placenta humain et de ces villosités choriales.....	18
Figure 1.7: Répartition des cytotrophoblastes villeux et extravilleux dans les villosités choriales.	19
Figure 1.8: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la Syncytine-1.	26
Figure 1.9: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la Syncytine-2.	34

Figure 1.10: Représentation schématique de l'isoforme 2 du transporteur membranaire MFSD2a.	37
Figure 1.11: Les différentes protéines Syncytines identifiées dans les placentas des vertébrés.	53
Figure 1.12: La voie de synthèse des exosomes.	58
Figure 1.13: Rôle potentiel des protéines Syncytine-1 et -2 dans l'internalisation des vésicules extracellulaires dans les cellules.	60
Figure 1.14: Les différents types de N-Glycans.	72
Figure 1.15 Organisation d'un homodimère de Galectine-1 lié avec deux molécules de lactose (tiré de (Barrientos <i>et al.</i> 2014).	84
Figure 1.16: Structure du N-Acétyllactosamine et affinité de liaison des galectine-1 et -3 pour différents types de β -galactosides.	85
Figure 2.1: Galectin-1 is necessary for the fusion of trophoblastic cells. Confocal microscopy images of primary cultures of villous cytotrophoblasts (A) or BeWo cells (B and C).	132
Figure 2.2: Galectin-1 alone does not induce cell fusion and is not modulated by BeWo cell activation.	133
Figure 2.3: Syncytin-2-pseudotyped viruses are infectious in MFSD2a-expressing cells.	134

Figure 2.4: Galectin-1 specifically increases Syncytin-2-pseudotyped viruses in a MFSD2a-dependent manner.	135
Figure 2.5: Galectin-1 but not Galectin-3 increases the infection rate of Syn-2-expressing viruses.	137
Figure 2.6: Galectin-1 differently affects Syncytin-1 and Syncytin-2-pseudotyped viruses.	137
Figure 2.7: Galectin-1 enhance the attachment of Syn-2 pseudotypes to the cells surface.	138
Figure 2.8: Gal-1 interacts with viral particles in a CRD-dependent manner.....	139
Figure 2.9: Proposed model of the association between Galectin-1, Syncytin-2 and MSFD2a during villous cytotrophoblast fusion.	140
Figure 2.10: Expression of MFSD2a in MFSD2amyc stable HEK293T cells.	141
Figure 2.11: Fusogenic activity of Syn-2-Flag construct in HEK293T cells.....	142
Figure 3.1: Galectin-1 increases the fusion of Syncytin-2- expressing HEK293T cells.	171
Figure 3.2: Infection rates of pseudotyped viruses on different cell lines.	172
Figure 3.3: Galectin-1 increases the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses on human and simian cells that express homologous MFSD2a but the effect is independent on MFSD2a N-glycosylation status.	173

Figure 3.4: Galectin-1 significantly increases the infectivity of Syn-2 pseudotyped viruses on different human cell lines.	174
Figure 3.5: The effect of Galectin-1 on the infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses depends on the cell line.....	176
Figure 3.6: Galectin-3 does not modulate the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses and exerts cell-specific modulation of the infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses.	176
Figure 3.7: Galectin-1 increases the fusion capacity of EnvP(b).....	177
Figure 3.8: Expression and localisation of MSFD2a N-glycosylation mutants.....	178
Figure 4.1: Characterization of placental extracellular vesicles.	201
Figure 4.2: Placental extracellular vesicles are internalised in HUVEC cells.	204
Figure 4.3: Characterisation of extracellular vesicles produced in HEK293T cells.	205
Figure 4.4: Syncytin-2-dependent uptake of extracellular vesicles in HUVEC cells and potential increase of internalisation mediated by Galectin-1.....	208

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

CA : Capside

CD : Classe de différenciation (*Cluster of differentiation*)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Complexe multivésiculaire

CRD : *Carbohydrate Recognition Domain*

CTBv : Cytotrophoblastes villeux

CTBev : Cytotrophoblastes extravilleux

DHA : Acide décosaénoïque

DIS : Domaine immunosuppresseur

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTM : Domaine transmembranaire

Env: Enveloppe

ERV: *Endogenous retroviruses*

ESCRT: *Endosomal sorting complex required for transport*

FSK : Forskoline

Gal : Galectine

GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFP : *Green Fluorescent Protein*

gp: Glycoprotéine

HeLa: Cellules Henrietta Lacks

HELLP : *Hemolysis, Liver and Low Platelet Syndrome*

HTLV-1: *Human T-cell leukemia Virus type 1*

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells*

LTR: *Long Terminal Repeat*

Luc : Luciférase

MA: Matrice

MEC: Matrice extracellulaire

MFSD2a : *Major Facilitator Superfamily containing Domain 2a*

MV : Microvésicules

NC : Nucléocapside

NK : cellule *Natural Killer*

PE : Pré-éclampsie

PF : Peptide fusion

PLAP : Phosphatase alcaline placentaire

PPT : *Polypurine tract*

R : Région unique répétée

RE : Réticulum endoplasmique

RT-PCR : *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SLC1A4/5 : *Solute Carrier 1A4/5*

STB : Syncytiotrophoblaste

SU: Surface

SYN : Syncytine

TM : Transmembranaire

TNF : *Tumor necrosis factor*

U3 / U5 : Séquences uniques répétées

VE : Vésicules extracellulaires

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humain de type 1

VSV-G : *Vesicular stomatitis virus G protein*

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

α : Alpha

β : Beta

$^{\circ}\text{C}$: Degrés celsius

h : Heure

kDa: Kilodalton

ml: Mililitre

μg : Microgramme

μl : Microlitre

μm : Micromètre

mM : Milimolaire

μM : Micromolaire

pb : Paire de bases

pg : Picogramme

RLU : Relative light unit

xx

% : pourcent

RÉSUMÉ

Les rétrovirus endogènes (ERV) sont des séquences d'origines rétrovirales acquises durant l'évolution et représentent environ 8% du génome humain. Bien que la majorité des ERV soient mutés, certaines séquences codent pour des protéines d'enveloppes rétrovirales fonctionnelles. C'est le cas des protéines Syncytine-1, Syncytine-2 et EnvP(b) qui sont des protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes exprimées dans le placenta humain. Dans ce tissu, les protéines Syncytine-1 et -2 sont nécessaires à la formation et au maintien du syncytiotrophoblaste, une structure cellulaire primordiale pour les échanges nutritionnels entre les circulations maternelle et fœtale. Cette structure est issue de la fusion de cellules spécialisées appelées les cytotrophoblastes villosités selon un processus complexe et encore mal compris. La syncytialisation des cytotrophoblastes implique de nombreuses protéines, dont les Syncytines et les Galectines, mais peu de connexions ont été établies entre les différents acteurs de la fusion. Le syncytiotrophoblaste libère également des vésicules extracellulaires, petites vésicules membranaires qui transportent des messages moléculaires entre les cellules et internalisées dans différents types de cellules. Les Syncytine-1 et -2 sont exprimées à la surface des vésicules extracellulaires placentaires et pourraient aider à l'internalisation des vésicules dans les cellules. Ce projet de doctorat a visé premièrement à établir un lien fonctionnel entre les protéines Syncytine-1 et -2 et certaines Galectines placentaires lors de la fusion des cytotrophoblastes. Dans un deuxième temps, ce projet s'est intéressé au rôle de la Syncytine-2 lors de l'entrée des vésicules extracellulaires dans un modèle de cellules endothéliales. Les résultats obtenus durant ce doctorat montrent l'existence d'une association entre la Galectine-1 et les Syncytine-1 et -2 dans différents modèles cellulaires, une association qui pourrait s'étendre à d'autres protéines de ERV. Il ressort également de ces résultats une différence dans la réponse des protéines Syncytine-1 et -2 à la présence de la Galectine-1. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent que l'expression de la Syncytine-2 à la surface des vésicules extracellulaires augmente l'internalisation de ces vésicules dans les cellules endothéliales, un événement auquel pourrait aussi contribuer la Galectine-1.

Mots clés : Rétrovirus endogènes, Syncytine-1, Syncytine-2, Galectine, placenta, syncytiotrophoblaste, cytotrophoblastes villosités, vésicules extracellulaires

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui forment la famille taxonomique des *Retroviridæ*. Les rétrovirus ont un génome composé de deux molécules d'ARN à polarité positive et ont la particularité d'utiliser une forme génomique intermédiaire sous la forme d'une molécule d'ADN double brin afin de répliquer leur génome. Ces virus ont été décrits pour la première fois au début du XXe siècle suite à l'identification des agents étiologiques responsables de l'apparition de sarcomes et leucémie chez le poulet (Coffin *et al.* 1997). Depuis, de nombreux rétrovirus ont été identifiés chez un grand nombre d'espèces dont l'humain, chez qui les rétrovirus sont responsables de plusieurs pathologies, dont l'épidémie du SIDA.

1.1.1 Structure générale des particules rétrovirales

Les virions ont des tailles allant de 90 à 200 nm selon les rétrovirus et sont organisés selon plusieurs couches structurales (Figure 1.1). Les rétrovirus sont des virus enveloppés, dont l'enveloppe est composée à la fois de protéines transmembranaires virales, les glycoprotéines d'enveloppe, et d'une bicouche lipidique

d'origine cellulaire. Des protéines membranaires cellulaires sont également retrouvées à la surface des rétrovirus. Les protéines d'enveloppe sont composées de deux sous-unités, une sous-unité de surface (SU) et une sous-unité transmembranaire (TM), associées en oligomères et ancrées dans la membrane d'origine cellulaire. Sous l'enveloppe se trouvent les protéines de matrice (MA) qui forment la matrice virale. Ensuite on trouve la capside (CA) virale qui adopte des formes variables selon les rétrovirus (sphérique, conique, icosaédrique, tubulaire) (Zhang *et al.* 2015). La capside renferme le génome viral composé de deux molécules d'ARN simple brin associées aux protéines de nucléocapside (NC) (Coffin *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2015).

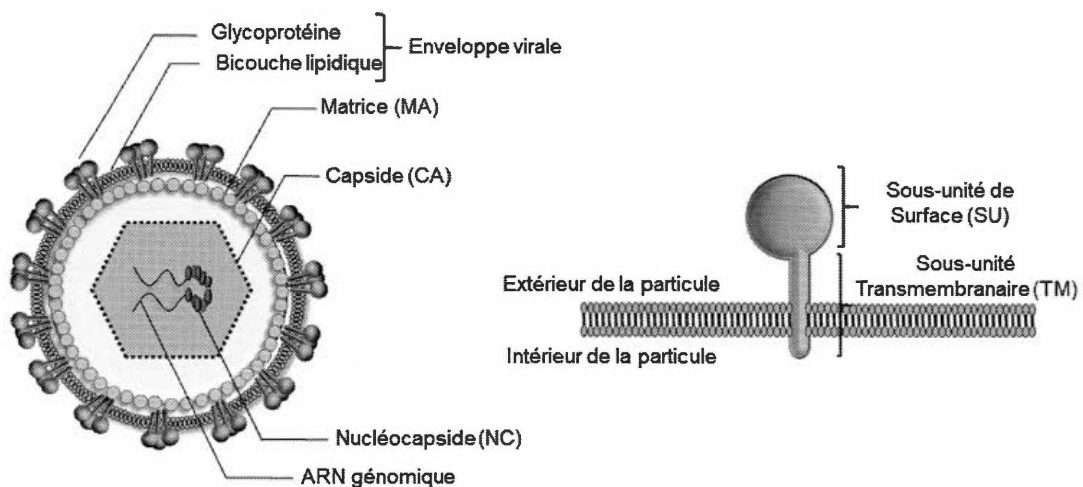


Figure 1.1 Organisation d'une particule rétrovirale et de la glycoprotéine d'enveloppe.

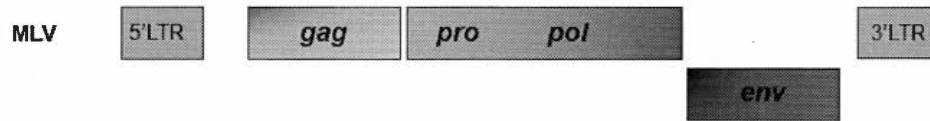
Les différentes structures d'une particule rétrovirale sont représentées sur le schéma de gauche. De l'extérieur vers l'intérieur on trouve: l'enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire et de trimères de glycoprotéine virale, la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC) et les deux brins d'ARN génomiques. L'organisation de la glycoprotéine d'enveloppe est présentée sur le schéma de droite. Une glycoprotéine d'enveloppe est formée de deux sous-unités: une sous-unité de

surface (SU) et une sous-unité transmembranaire (TM). La sous-unité transmembranaire est ancrée dans la bicouche lipidique avec une partie située à l'extérieur du virion et une partie à l'intérieur de la particule virale.

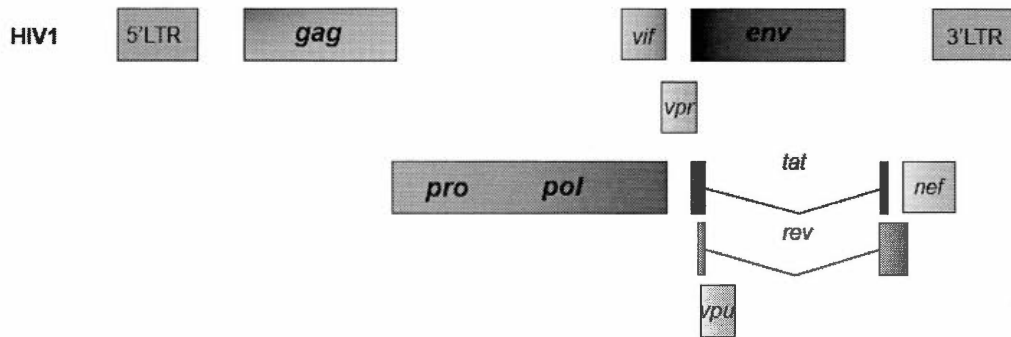
1.1.2 L'organisation du génome des rétrovirus

Considérant leur structure génomique, les rétrovirus peuvent être divisés en deux catégories : les rétrovirus simples et complexes (Figure 1.2). Les rétrovirus dits simples possèdent les gènes essentiels au cycle réplcatif du virus alors que les rétrovirus complexes ont également des gènes accessoires. Les rétrovirus possèdent un génome à ARN avec deux molécules d'ARN simple brin à orientation positive. Les gènes essentiels sont les gènes *gag* (group specific antigen), *pro* (protease), *pol* (polymerase) et *env* (envelope). Le gène *gag* code pour un précurseur protéique Gag qui est clivé en protéines de matrice (MA), capsid (CA) et nucléocapsid (NC). Le gène *pro* code pour l'enzyme protéase virale responsable de la maturation des autres protéines structurales virales. Le gène *pol* code pour l'ADN polymérase ARN-dépendante, la transcriptase inverse et pour la protéine intégrase. Le gène *env* code pour les deux sous-unités de la glycoprotéine d'enveloppe, la sous-unité de surface (SU) et la sous-unité transmembranaire (TM). En plus de ces 4 gènes, les rétrovirus complexes possèdent des gènes accessoires qui sont localisés soit entre les gènes *pol* et *env*, soit en antisens au niveau du gène *env*, soit en aval de *env* (Coffin *et al.* 1997; Barbeau et Mesnard 2015). Aux extrémités 5' et 3' des molécules d'ARN se trouvent des séquences répétées (R) et uniques (U). L'organisation des molécules d'ARN est comme suit de l'extrémité 5' vers 3' : une coiffe en 5', une région répétée (R), une séquence unique en 5' U5, les régions transcriptionnelles correspondant aux gènes essentiels et accessoires, une séquence unique en 3' U3, une séquence répétée R et une queue polyadénylée en 3' (Coffin *et al.* 1997).

A Rétrovirus simple



Rétrovirus complexe



B ARN génomique

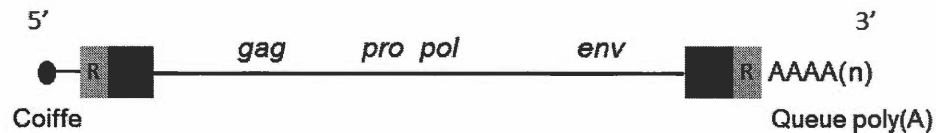


Figure 1.2: Exemple de l'organisation génomique des rétrovirus simples et complexes et d'une molécule d'ARN génomique d'un rétrovirus.

A. L'organisation génomique des rétrovirus MLV et HIV-1 sont présentés en exemple de rétrovirus simple et complexe, respectivement. Les boîtes de couleurs représentent les gènes viraux. Les gènes dans le même cadre de lecture sont représentés sur la même ligne alors que ceux dans des cadres de lectures différents sont décalés. Les gènes essentiels (*gag*, *pro*, *pol*, et *env*) sont indiqués en gras et les gènes accessoires en italique. Les lignes triangulaires entre deux boîtes indiquent un épissage des exons. Par mesure de simplicité, le gène antisens du VIH-1 n'est pas indiqué sur ce schéma. B. Représentation schématique d'une molécule d'ARN génomique viral avec une coiffe en 5', une queue polyadénylée en 3', les séquences uniques (U) et répétées (R) en 5' et 3' et les régions du transcrit correspondant aux gènes essentiels. Schéma modifié de

(Coffin *et al.* 1997), chapitre 'Retroviral virions and genomes', sous-chapitre 'Genetic organization'.

1.1.3 Taxonomie des rétrovirus

Selon le comité de taxonomie international des virus, la famille des *Retroviridae* appartient à l'ordre des Ortervirales et se divise en deux sous-familles :

- Les *Orthoretrovirinae*
- Les *Spumaretrovirinae*

La sous-famille des *Orthoretrovirinae* comprend 6 genres de rétrovirus qui infectent un large spectre d'espèces:

- Les *Alpharetrovirus*
- Les *Betaretrovirus*
- Les *Deltaretrovirus*
- Les *Epsilonretrovirus*
- Les *Gammaretrovirus*
- Les *Lentivirus*

La sous-famille des *Spumaretrovirinae* comprend 5 genres et se subdivise en plusieurs espèces de virus spumeux qui infectent les singes simiens et prosimiens, les équidés, les bovins et les félins (Khan *et al.* 2018).

1.1.4 Le cycle de réplication des rétrovirus

Le cycle infectieux des rétrovirus peut se diviser en 5 étapes. En premier, les particules virales doivent se fixer à la surface des cellules qui expriment le(s) récepteur(s) spécifique(s) du virus et entrer dans la cellule. La deuxième étape consiste en la libération de la capside virale dans le cytoplasme et la rétrotranscription de l'ARN génomique en ADN double brin. La troisième étape est l'intégration de l'ADN viral

dans le génome de la cellule hôte. La quatrième étape consiste en la transcription des ARN génomiques et subgénomiques et la synthèse des protéines de structure du virus. Enfin, les virions doivent être assemblés, libérés dans l'espace extracellulaire et subir une étape de maturation pour donner de nouvelles particules virales infectieuses.

1.1.4.1 L'attachement et l'entrée de la particule rétrovirale

Le cycle infectieux débute par l'attachement de la particule virale à la surface de la cellule hôte. Cette étape dépend de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus. Les protéines cellulaires présentes à la surface de l'enveloppe virale peuvent aussi aider, mais cet attachement est non spécifique (Coffin *et al.* 1997; Segura *et al.* 2008). L'attachement de la particule virale dépend de la sous-unité SU de la glycoprotéine d'enveloppe qui interagit spécifiquement avec une protéine membranaire cellulaire, définie comme le récepteur viral (Figure 1.3). Certains rétrovirus peuvent utiliser plusieurs récepteurs indépendants ou d'autres nécessitent la présence d'un récepteur et de corécepteurs à la surface des cellules. La spécificité d'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe et le récepteur viral définit le tropisme du virus (Coffin *et al.* 1997). Suite à l'interaction SU/récepteur, l'infection de la cellule par la particule virale a lieu. L'entrée peut se faire soit par endocytose puis fusion de l'enveloppe rétrovirale avec la vacuole d'endocytose, soit par fusion directe entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Dans les deux cas, la fusion dépend d'une séquence appelée peptide fusion (PF) présente sur la sous-unité TM (Figure 1.3). L'interaction de la SU avec le récepteur entraîne un changement conformationnel de la protéine qui permet le rapprochement de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique et qui expose le PF. Le PF permet ensuite la fusion des deux membranes et l'entrée de la capside virale dans le cytoplasme cellulaire (Coffin *et al.* 1997).

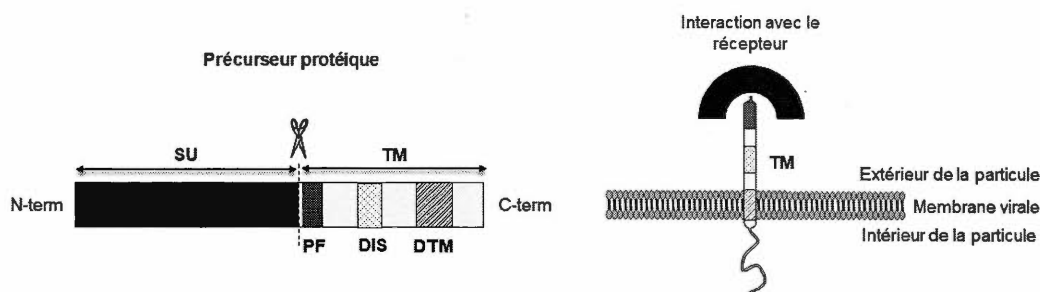


Figure 1.3: Représentation schématique de la structure de la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus.

La glycoprotéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est clivé pour donner une sous-unité de surface (SU), responsable de l'interaction spécifique avec le récepteur cellulaire, et une sous-unité transmembranaire (TM). Le site de clivage entre les sous-unités SU et TM est indiqué par un trait pointillé vertical. La TM porte trois domaines fonctionnels qui sont le peptide fusion (PF), le domaine immunosuppresseur (DIS) et le domaine transmembranaire (DTM). Le DTM permet l'ancrage de la glycoprotéine dans la bicouche lipidique et le PF permet la fusion entre les membranes virale et cellulaire.

1.1.4.2 La rétrotranscription de l'ARN viral en ADN double brin

Suite à la libération de la capside virale dans le cytoplasme, l'ARN viral simple brin est rétrotranscrit en ADN double brin. Ceci implique l'activité ADN polymérase et RNase H de l'enzyme virale qui est associée avec l'ARN génomique: la transcriptase inverse (Coffin *et al.* 1997). Lors de la formation de nouveaux virions, les enzymes virales intégrase et transcriptase inverse s'associent avec les brins d'ARN génomiques afin d'initier la rétrotranscription et l'intégration du génome viral dès les premières phases du cycle infectieux. Les ARN génomiques sont également associés avec des ARN de transfert (ARNt) cellulaires qui se lient par complémentarité de séquence avec une séquence située dans la région 5' des ARN viraux, appelée séquence PBS pour 'Primer Binding Site' (Coffin *et al.* 1997). Les étapes majeures de la

rétrotranscription sont présentées sur la Figure 1.4. La transcription du brin antisens d'ADN (ADN (-)) est initié à l'extrémité 3' de l'ARNt lié à la séquence PBS en direction de l'extrémité 5' de l'ARN viral. La RNase H dégrade l'ARN viral complémentaire à l'ADN nouvellement synthétisé. Le brin d'ADN antisens va ensuite s'hybrider à l'extrémité 3' de l'ARN viral au niveau des séquences R. La synthèse ADN reprend de l'extrémité 3' vers 5' de l'ARN viral, qui est dégradé au fur et à mesure par la RNase H. La séquence *polypurine tract* (PPT) est résistante à la dégradation RNase H et permet d'initier la synthèse du brin sens d'ADN (ADN (+)). Ce segment d'ADN contient des séquences complémentaires à l'extrémité 3' du brin antisens d'ADN. Le fragment d'ADN sens vient s'hybrider à l'extrémité 3' du brin d'ADN antisens et la synthèse du brin sens continue. Les brins sens et antisens d'ADN servent finalement chacun de matrice à la polymérase. Au final, l'ADN proviral contient à chaque extrémité des séquences dupliquées U3/R/U5 appelées LTR pour 'Long Terminal Repeat' (Figure 1.4). Les LTRs contiennent des séquences promotrices et régulatrices de la transcription afin d'optimiser la transcription des ARN viraux ainsi que les séquences d'initiation de la transcription et de polyadénylation (Coffin *et al.* 1997).

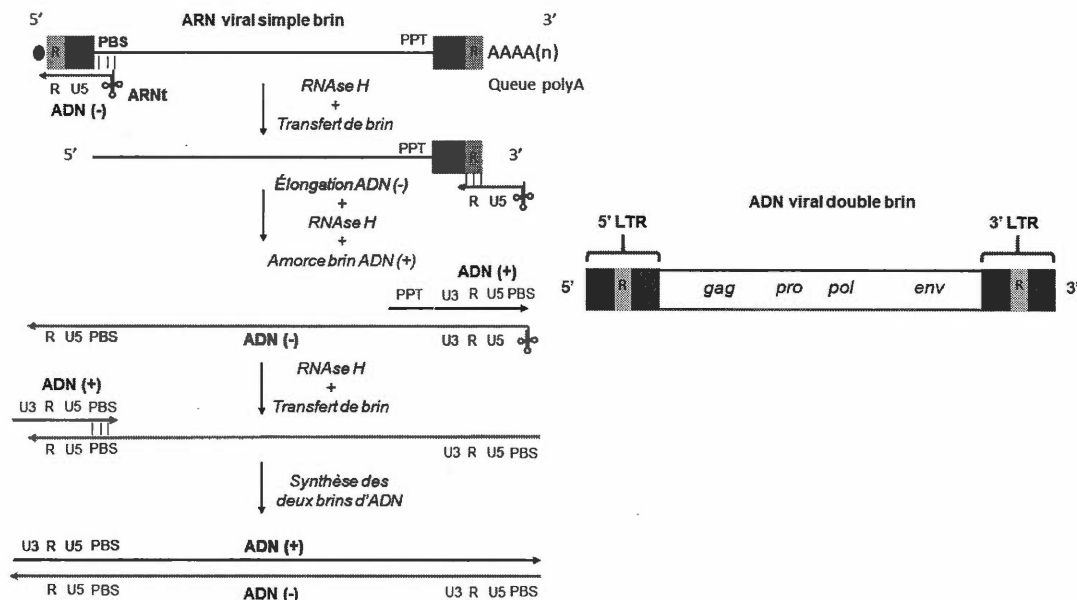


Figure 1.4: La rétrotranscription de l'ARN génomique viral en ADN double brin.

L'ARN viral est représenté par un trait plein noir, l'ADN sens (ADN (+)) par un trait plein gris foncé et l'ADN antisens (ADN (-)) par un trait plein gris clair. Le sens de la polymérisation de l'ADN est indiqué par des flèches. Les séquences répétées (R) et uniques en 5' et 3' (U5 et U3) sont représentées par des boîtes grises à chaque extrémité de l'ARN ou l'ADN. La complémentarité de séquence est indiquée par trois traits verticaux. PBS: *primer binding site*, PPT: *polypurine tract* et LTR: *long terminal repeat*. Figure réalisée d'après (Coffin *et al.* 1997), figure 2 du chapitre 'Overview of reverse transcription'.

1.1.4.3 L'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN hôte

Les rétrovirus dépendent de la cellule hôte pour répliquer et transcrire leur matériel génétique. La stratégie adoptée par cette famille de virus est d'intégrer l'ADN proviral dans l'ADN hôte. Après la rétrotranscription, l'ADN proviral double brin doit transiter jusqu'au noyau pour être intégré dans l'ADN hôte. Dans le cytoplasme, l'ADN

viral est associé à plusieurs protéines virales et cellulaires et forme le complexe de pré-intégration (CPI). L'intégrase fait partie de ce complexe. L'intégrase va cliver l'extrémité 3' de chaque brin d'ADN viral et éliminer 2 à 3 paires de base (pb) à ces extrémités, libérant des groupements hydroxyles -OH. L'intégrase va aussi cliver l'ADN hôte puis liguer ensemble les extrémités d'ADN viral et hôte en recréant des liens phosphodiester. L'ADN viral sous sa forme intégrée est désigné sous le terme de provirus. Le choix du site d'intégration dépend moins de la séquence ADN que de son organisation chromatinienne, car il semble que les nucléosomes soient des cibles préférentielles ou dépend de la reconnaissance de protéines de liaison à l'ADN (Coffin *et al.* 1997). L'intégration de l'ADN proviral dans celui de la cellule hôte conduit à la duplication de séquences (4 à 6 pb) de chaque côté du provirus.

1.1.4.4 La transcription des ARN viraux codants et génomiques

La transcription des ARN viraux dépend de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de transcription de la cellule hôte. Une fois synthétisés, les ARN viraux sont coiffés en 5', clivés et polyadénylés en 3'. Plusieurs ARN viraux sont synthétisés, ARNs génomiques non épissés et les ARN subgénomiques obtenus suite à des épissages alternatifs (Coffin *et al.* 1997). Les ARNs doivent transiter du noyau vers le cytoplasme pour être traduits ou empaquetés dans des nouvelles particules. Les ARN épissés sont traduits en protéines virales (protéines de structures et accessoires pour les rétrovirus complexes). En fonction de la complexité des rétrovirus, les ARN peuvent avoir un ou plusieurs sites d'épissages. Les rétrovirus simples auront un site d'épissage pour donner un ARNm codant les protéines Gag et Pol et un ARNm pour la protéine Env. Pour certains rétrovirus complexes comme le VIH-1, la présence de sites d'épissages alternatifs permet la synthèse de nombreux ARNm viraux différents (Coffin *et al.* 1997). La synthèse de plusieurs protéines virales différentes à partir d'un transcrit peut également se faire par la synthèse de précurseurs protéiques qui sont ensuite clivés. C'est le cas des protéines de structure CA, MA et NC qui sont

synthétisées sous la forme d'un précurseur Gag (Pr55gag). La glycoprotéine d'enveloppe est aussi synthétisée sous la forme d'un précurseur SU-TM qui est clivé par une enzyme cellulaire (Coffin *et al.* 1997). La présence d'un peptide signal au début du précurseur permet son adressage au RE où il est glycosylé. Les protéines Env sont plus ou moins glycosylées selon les rétrovirus. Les glycosylations jouent notamment un rôle dans la conformation de la protéine. La glycoprotéine d'enveloppe est ancrée à la membrane plasmique grâce à un domaine transmembranaire situé dans la TM (Figure 1.5). Les protéines d'enveloppes ont des séquences C-terminales intracytoplasmiques dont la longueur varie beaucoup d'un rétrovirus à l'autre et qui semblent réguler leur incorporation dans les nouveaux virions et leur capacité fusogénique (Rein *et al.* 1994; Piller *et al.* 2000; Celma *et al.* 2001; Bobkova *et al.* 2002). La glycoprotéine d'enveloppe forme un oligomère, généralement un trimère, dans la membrane du RE et à la membrane plasmique plus tard. Les sous-unités SU et TM interagissent par des liaisons de type ponts disulfures entre les séquences CxxC et Cx₆C localisées respectivement dans la SU et la TM (Figure 1.5). Lors du passage dans le Golgi, le précurseur SU-TM est clivé par une endoprotéase cellulaire, ce qui permet le réarrangement structural de la glycoprotéine (Coffin *et al.* 1997).

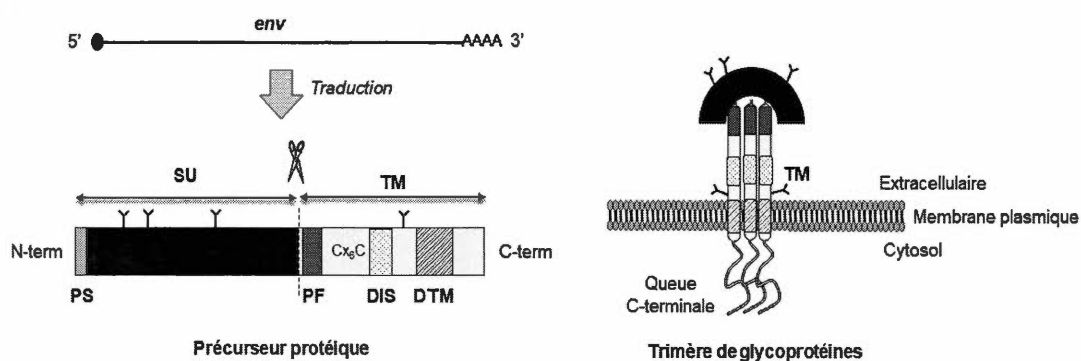


Figure 1.5: Synthèse du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus.

Le transcrit codant pour l'enveloppe est traduit en un précurseur protéique. La présence d'un peptide signal (PS) à l'extrémité N-terminale adresse la synthèse du polypeptide au réticulum endoplasmique. Le précurseur subit des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations (Y) et est clivé par une endoprotéase cellulaire dans le Golgi. Le trait vertical pointillé indique le site de coupure par l'endoprotéase. Les sous-unités SU et TM s'associent par des liaisons de type ponts disulfures entre les séquences CxxC et Cx₆C pour former des oligomères, souvent des trimères, à la membrane plasmique. Les domaines fonctionnels sur la sous-unité TM sont indiqués sous la forme de boîtes avec PF: peptide fusion, DIS: domaine immunosuppresseur et DTM: domaine transmembranaire.

1.1.4.5 Assemblage, bourgeonnement et maturation des virions

Les protéines de structure sous la forme du précurseur Pr55Gag transitent jusqu'à la membrane plasmique et se dirigent vers les domaines de la membrane où se trouvent les protéines d'enveloppe. Lors de son transit, le précurseur Gag interagit aussi avec des molécules d'ARN. En effet, Pr55Gag interagit avec les ARN génomiques viraux au niveau de la séquence d'encapsulation psi et les acheminent vers la membrane plasmique. La dimérisation de l'ARN génomique viral est également importante pour l'interaction avec Pr55Gag (Mailler *et al.* 2016). Le précurseur Gag interagit aussi avec des ARNt cellulaires de façon à les intégrer dans les nouveaux virions et d'assurer l'initiation de la rétrotranscription au prochain cycle infectieux (Eckwahl *et al.* 2016). Les nouvelles particules virales bourgeonnent à la membrane plasmique et sont libérées dans l'espace extracellulaire sous une forme immature. Le clivage des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol par la protéase virale permet le réarrangement des protéines de structure et la formation de nouveaux virions infectieux (Coffin *et al.* 1997; Mailler *et al.* 2016).

La particularité du cycle infectieux des rétrovirus est la rétrotranscription de leur génome en ADN double brin et l'intégration de cet ADN dans le génome de l'hôte. Une fois intégré dans l'ADN génomique, le provirus peut y persister, mais seules les

cellules ayant été infectées seront porteuses du provirus. En revanche, si le rétrovirus exogène infecte les cellules germinales, la persistance du provirus dans l'ADN de ces cellules peut donner naissance à un rétrovirus endogène (Levy 1986).

1.2 Les rétrovirus endogènes

1.2.1 La découverte des rétrovirus endogènes

Les rétrovirus endogènes (ERV pour endogenous retroviruses) sont des séquences génomiques d'origine rétrovirale qui résultent de l'infection des cellules germinales par des rétrovirus exogènes il y a plusieurs millions d'années. En s'intégrant au génome des cellules germinales chez les ancêtres de nombreux vertébrés, ces provirus ont été transmis de façon mendélienne aux descendants et ont été maintenus de manière plus ou moins intacte chez ces derniers au fil des générations (Dupressoir *et al.* 2012).

Les ERV ont été découverts entre la fin des années 1960 et le début des années 1970 grâce à l'avancée des techniques d'analyse génomique (Weiss 2006). En effet, des études sur la transmission verticale de pathologies cancéreuses chez la poule domestique et la souris de laboratoire ont abouti successivement à la description de trois rétrovirus endogènes : le virus leucémique aviaire ALV (*Avian Leukosis Virus*), le virus leucémique murin MLV (*Murine Leukemia Virus*) et le virus tumoral mammaire murin MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) (Weiss 2006). Il est à noter que ces trois rétrovirus possèdent aussi des formes exogènes (Golovkina *et al.* 1997; Denesvre *et al.* 2003; Kozak 2014). Des années 70s au début des années 80s, de nombreux travaux ont rapporté l'identification d'ERV chez plusieurs espèces de mammifères et notamment chez les primates (Hino *et al.* 1977; Todaro *et al.* 1978; Sherwin et Todaro 1979). Puis, au début des années 1980, plusieurs travaux ont montré l'existence de séquences rétrovirales endogènes dans le génome humain. En effet,

l'utilisation de sondes d'ADN radiomarqués, correspondant à des séquences de rétrovirus endogènes de primates, a montré des homologies de séquences entre des rétrovirus endogènes de babouin et de singe Grivet et des séquences génomiques humaines (Martin *et al.* 1981; Noda *et al.* 1982). De plus, en 1982, l'équipe de Cohen rapporte le clonage d'une séquence rétrovirale humaine qui est homologue aux séquences des gènes *pol* des ERV MoMuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) et BaEV (*Baboon Endogenous Virus*) (Bonner *et al.* 1982). Finalement, cette séquence rétrovirale sera localisée sur le chromosome 18 chez l'humain et correspond au premier locus de rétrovirus endogène humain identifié: ERV-1 (O'Brien *et al.* 1983). En 1984, ERV-3 est découvert sur le chromosome 7 (O'Connell *et al.* 1984) et la découverte de nouvelles séquences rétrovirales endogènes n'a cessé d'augmenter par la suite. Depuis la découverte des premiers ERV humains, environ 30 000 éléments proviraux ont été identifiés dans le génome humain (de Parseval et Heidmann 2005) et l'ensemble des ERV humains représente environ 8% du génome humain (Lander *et al.* 2001).

1.2.2 La classification des rétrovirus endogènes

La comparaison de séquences des ERV entres elles et avec celles de rétrovirus exogènes a abouti au regroupement des ERV en trois classes qui s'apparentent aux groupes de classification des rétrovirus exogènes. En effet la classe I, qui regroupe la grande majorité des ERV, est apparentée aux gammarétrovirus, la classe II aux bétarétrovirus et la classe III aux spumarétrovirus (de Parseval et Heidmann 2005). Au total, environ 80 sous-familles (la famille étant *Retroviridae*) de ERV ont été identifiées (de Parseval et Heidmann 2005). La nomenclature la plus couramment utilisée pour désigner les sous-familles de ERV est basée sur l'attribution d'une lettre correspondant à l'acide aminé lié à l'ARN de transfert initiateur de la transcription inverse de l'ARN viral ancestral. Par exemple, dans le cas de ERV-W, l'ARNt lié au tryptophane (W) fût l'ARNt initiateur de la transcription inverse du rétrovirus exogène dont découle le rétrovirus endogène actuel. Les différents membres d'une même sous-

famille sont ensuite désignés par un chiffre. Bien que d'origines rétrovirales, les ERV font maintenant partie intégrante du génome humain et ces séquences appartiennent aux éléments génomiques répétés de la famille des rétroéléments possédant des répétitions terminales longues (LTR). Le nombre important de ERV dans le génome s'explique non seulement par la succession d'infections par des rétrovirus exogènes au cours de l'évolution, mais surtout par la duplication des provirus après leur intégration. En effet, suite à l'intégration d'un provirus ancestral dans le génome, des événements de rétrotranspositions ont permis la multiplication et la dispersion de ces rétroéléments et ont abouti à la présence de plusieurs copies du même provirus à différents sites génomiques (de Parseval et Heidmann 2005). Aussi, la production de pseudoparticules rétrovirales par des rétrovirus endogènes qui utilisent des protéines d'enveloppes issues d'autres ERV permet la réinfection des cellules et la dispersion des ERV (Dewannieux et Heidmann 2013; Greenwood *et al.* 2018). Chez les espèces où des rétrovirus exogènes et endogènes apparentés coexistent, les ERV apportent aussi une protection contre les rétrovirus exogènes (Best *et al.* 1997). C'est le cas de certaines séquences rétrovirales endogènes apparentées au rétrovirus JSRV (enJSRV) chez les ovins. Soit ces séquences codent pour une enveloppe qui interfère dans la liaison de l'enveloppe exogène avec le récepteur, soit il s'agit de séquences qui portent une mutation dominante sur le gène *gag* qui conduit à la synthèse d'une protéine Gag mutée et inhibe les étapes tardives du cycle infectieux de JSRV chez les individus porteurs de ces ERV (Arnaud *et al.* 2007; Cumer *et al.* 2019).

Malgré leur nombre important chez l'humain, la majorité des ERV sont inactifs aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. En effet, dans la plupart des cas, des événements de recombinaisons entre LTRs ont excisé toute la région codante du provirus, ne laissant que des LTRs solitaires (Dewannieux et Heidmann 2013). Dans les cas où il n'y a pas eu de recombinaison, l'absence de pression de sélection positive a mené à l'accumulation de mutations dans les séquences des gènes *gag*, *pol* et *env*,

rendant ces gènes non codants (Dewannieux et Heidmann 2013). Bien qu'il soit possible de détecter des transcrits de ERV dans plusieurs tissus, il est rare que ceux-ci soient traduits (Mayer *et al.* 2011). Néanmoins pour certains ERV humains, la séquence du gène *env* a été maintenue (de Parseval *et al.* 2003). En effet, l'étude de de Parseval *et al.* a montré que, parmi 476 cadres ouverts de lecture de gènes *env* analysés, 16 pouvaient potentiellement coder pour des protéines d'enveloppe. Les transcrits de ces glycoprotéines sont retrouvés dans différents tissus avec des niveaux d'expression variables d'un transcrit à l'autre et trois sont fortement exprimés dans le placenta. Parmi ces trois glycoprotéines d'enveloppe se trouvent les protéines Syncytine-1 et Syncytine-2.

Afin de faciliter la compréhension de la fonction de ces deux protéines dans le fonctionnement du placenta, une brève présentation de l'organisation fonctionnelle du placenta humain va suivre.

1.3 Les rétrovirus endogènes humains dans le placenta

Le placenta humain est un organe transitoire, primordial au développement du fœtus et qui possède des fonctions de nutrition, de maintien de la grossesse et de protection du fœtus contre les infections. Un mauvais fonctionnement du placenta durant la grossesse peut avoir diverses conséquences sur le développement du fœtus, mais aussi avoir des répercussions sur la santé de la mère à plus ou moins long terme et plusieurs pathologies obstétriques sont caractérisées par un défaut de placentation, par exemple la pré-éclampsie.

1.3.1 La structure du placenta humain

Le placenta se forme dès le stade blastocyste de l'embryon, à partir du trophoctoderme qui est composé de cellules épithéliales appelées trophoblastes. Durant

l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, les trophoblastes du trophoctoderme vont former deux couches cellulaires différenciées, une couche interne de cytotrophoblastes (CTB) et une couche externe appelée le syncytiotrophoblaste (STB). Le placenta est constitué d'une face fœtale, appelée la plaque chorale, où se situe le cordon ombilical et d'une face maternelle en contact avec l'endomètre utérin appelé la plaque basale (Figure 1.6) (Benirschke *et al.* 2012). À partir de la plaque chorale vont se développer des structures vasculaires appelées les villosités chorales (Figure 1.6). Chez l'humain, les villosités chorales sont en contact direct avec le sang maternel, ce qui est caractéristique d'un placenta de type hémochorial.

Les villosités chorales sont constituées de plusieurs couches cellulaires et contiennent les vaisseaux sanguins du fœtus. Les villosités se développent selon trois stades : primaire, secondaire et tertiaire. Au stade primaire, les villosités sont formées par la prolifération et le bourgeonnement des CTB qui forment des extensions de cellules dans le STB. Au stade secondaire, on voit apparaître des cellules mésenchymateuses fœtales au sein de ces extensions et au stade tertiaire des vaisseaux sanguins se forment à partir des cellules mésenchymateuses (Benirschke *et al.* 2012). Les villosités tertiaires possèdent des cellules endothéliales, vasculaires et mésenchymateuses d'origine fœtale au centre puis une couche de CTB et sont recouvertes par le STB qui est en contact avec le sang maternel. Les villosités chorales peuvent être flottantes ou ancrées. Les villosités flottantes sont attachées au tronc de la villosité mais leurs extrémités sont libres dans l'espace intervilloux. Les villosités ancrées sont en contact avec la caduque basale (décidue) et attachent le placenta à l'endomètre utérin. La décidue est une couche cellulaire spécialisée de l'endomètre utérin qui se développe avant l'implantation de l'embryon. La décidue contient des cellules du stroma utérin, des vaisseaux sanguins (artérioles spiralées et veinules) et des cellules immunitaires (Mori *et al.* 2016) (Figure 1.6).

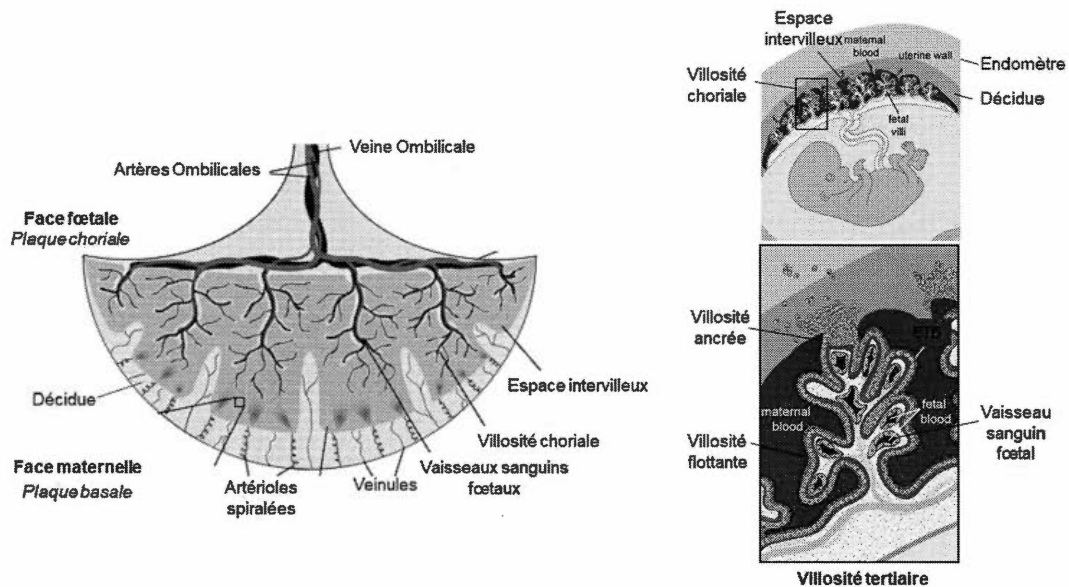


Figure 1.6 Organisation du placenta humain et de ces villosités chorales.

Le placenta présente une face fœtale et une face maternelle. Les villosités chorales sont en contact avec le sang maternel qui envahit l'espace intervilloux et sont recouvertes par le syncytiotrophoblaste (STB). Les vaisseaux sanguins fœtaux se développent à l'intérieur des villosités. Les villosités chorales sont divisées en villosités flottantes, dont les extrémités sont libres dans l'espace intervilloux, et ancrées qui attachent le placenta à l'endomètre. Adapté de (Robbins *et al.* 2010; Plitman Mayo *et al.* 2016).

1.3.2 Les cytotrophoblastes villeux et extravilleux

Dans les villosités chorales, les cytotrophoblastes peuvent se différencier selon deux phénotypes: villeux et extravilleux. Les CTB villeux (CTBv) sont des cellules mononucléées, situées directement sous le STB et qui vont permettre le maintien de cette structure (Figure 1.7). En effet, le STB est un syncytium instable qui doit être constamment renouvelé par la fusion des CTBv sous-jacents (Baines et Renaud 2017). Les CTBv prolifèrent constamment durant la grossesse et une partie des cellules

obtenues à chaque division vont progressivement arrêter leur cycle cellulaire et fusionner avec le STB pour le renouveler (Baines et Renaud 2017). Au niveau des villosités ancrées, les CTB se différencient en CTB extravilleux (CTBev) (Figure 1.7). Ceux-ci prolifèrent activement et forment des colonnes cellulaires qui partent de la villosité (partie proximale de la colonne) vers la décidue placentaire (partie distale de la colonne). Les CTBev distaux possèdent un phénotype invasif et vont migrer dans la décidue pour remodeler les artérioles spiralées maternelles et permettre l'irrigation du placenta avec du sang maternel (Baines et Renaud 2017). Parmi ces CTBev, on distingue les CTB interstitiels qui sont dans la décidue et les CTB endovasculaires qui remplacent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins maternels (Figure 1.7) (Redman et Sargent 2005; Costa 2016b).

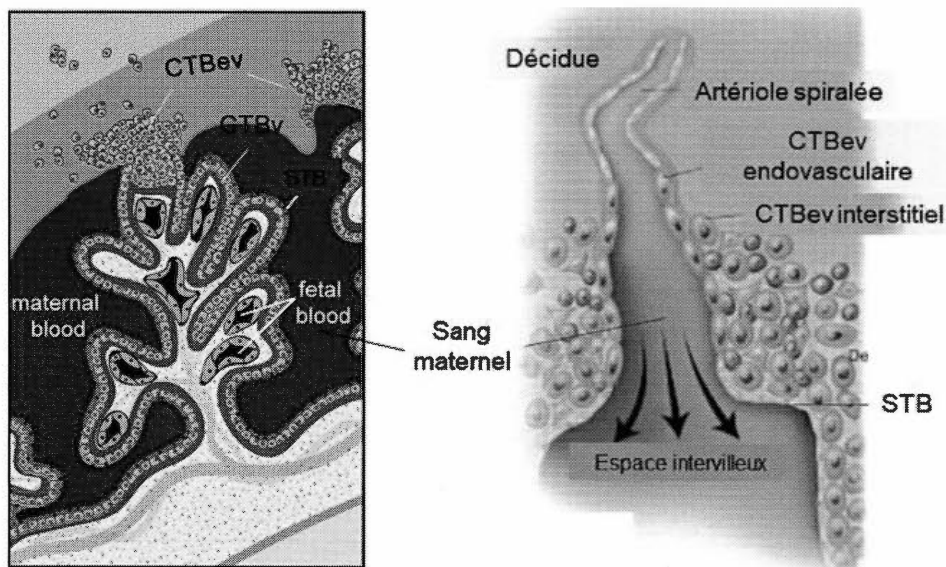


Figure 1.7: Répartition des cytotrophoblastes villex et extravilleux dans les villosités choriales.

Les cytotrophoblastes villex (CTBv) sont situés sous le syncytiotrophoblaste (STB) dans l'ensemble des villosités flottantes. Au niveau des villosités ancrées, les CTB se

différencient en CTB extravilleux (CTBev) et s'organisent en colonnes. Les CTBev distaux migrent dans la décidue (CTBev interstitiel) et envahissent l'endothélium des artérioles spiralées (CTBev endothélial) afin d'irriguer l'espace intervilloux avec du sang maternel. Schéma tiré et modifié de (Redman et Sargent 2005; Robbins *et al.* 2010).

1.3.3 Le syncytiotrophoblaste

Le syncytiotrophoblaste (STB) est un syncytium formé au moment de l'implantation du blastocyste dans l'endomètre utérin (Burton et Jones 2009; Costa 2016b). Ce syncytium est formé suite à la fusion de CTBv sous-jacents et correspond à la partie la plus externe des villosités choriales, qui est en contact avec le sang maternel de l'espace intervilloux (Figures 1.6 et 1.7). Le STB est une interface d'échanges entre les circulations fœtales et maternelles et couvre une surface de 10-12 m² à terme (Biswas et Ghosh 2008; Burton et Jones 2009). En premier lieu, les résultats d'analyses sur l'état de la chromatine et sur l'activité transcriptionnelle des noyaux du STB ont convergé vers l'hypothèse que les noyaux du STB sont transcriptionnellement inactifs et entrent progressivement en apoptose. Il est maintenant admis que le STB présente des activités transcriptionnelles et traductionnelles, car il produit des transcrits et protéines absentes des CTBv (Burton et Jones 2009; Fogarty *et al.* 2011). Le STB présente des fonctions endocrine et immunologique importantes pour le développement de la grossesse et est le lieu des échanges en gaz et nutriments entre le sang maternel et fœtal (Burton et Fowden 2015; Costa 2016b; Costa 2016a).

1.3.3.1 Les fonctions endocrines du syncytiotrophoblaste

Plusieurs hormones et facteurs de croissances nécessaires au développement et au maintien de la grossesse sont synthétisés et sécrétés au niveau du STB. En effet, les hormones stéroïdes progestérone et œstrogènes sont synthétisées au niveau des mitochondries du STB. L'hormone hCG (*human chorionic gonadotropin*) ainsi que les

hormones peptidiques hPL (*human placental lactogen*) et hPGH (*human placental growth hormone*) sont synthétisées principalement par le STB. Toutes ces hormones ont des fonctions majeures dans l'implantation embryonnaire, la mise en place de la tolérance immunitaire, l'adaptation et la régulation métabolique durant la grossesse et dans l'angiogenèse placentaire et endométriale (Costa 2016a).

1.3.3.2 Les fonctions immunologiques du syncytiotrophoblaste

Le succès d'une grossesse demande un contexte immunologique particulier afin d'éviter le rejet du fœtus dû à la présence d'alloantigènes fœtaux. Le STB étant en contact direct avec le sang maternel, c'est aussi une zone de libération de cytokines et de facteurs immunorégulateurs. En effet, plusieurs études ont localisé l'expression d'interleukines (IL-1, IL-6), de TNF α et de M-CSF au niveau du STB ainsi que la sécrétion de vésicules extracellulaires qui modulent l'activité des cellules immunitaires, localement et à distance (Kameda *et al.* 1990; Paulesu *et al.* 1991; Haynes *et al.* 1993; Saito *et al.* 1993; Benyo *et al.* 1997). La synthèse ainsi que les fonctions associées aux vésicules extracellulaires placentaires seront développées dans la section 1.4 de cette introduction. Les fonctions immunorégulatrices du STB peuvent être aussi associées à la libération de plusieurs hormones ayant une capacité immunorégulatrice, tel que les hormones hCG, œstrogène et progestérone (Dong *et al.* 2008; Costa 2016a). Enfin, des expériences d'incubation de lymphocytes T avec le surnageant de culture d'explants placentaires ou de cellules trophoblastiques ont montré la capacité immunorégulatrice des cytotrophoblastes villosités (Dong *et al.* 2008; Liu *et al.* 2011).

En plus des facteurs immunologiques libérés par le STB, les cellules immunitaires localisées dans la décidue maternelle ont des fonctions importantes pour le développement du placenta. Par exemple, les cellules dendritiques et NK (*Natural Killer*) produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, LIF) lors de l'implantation de l'embryon ce qui permet l'invasion de ce dernier dans l'endomètre

utérin (Yockey et Iwasaki 2018). Les cellules NK réguleraient aussi la migration des CTBev jusqu'au artérioles spiralées et produiraient des facteurs proangiogéniques, facilitant le remodelage des vaisseaux sanguins maternels (Liu *et al.* 2017).

1.3.3.3 Les mécanismes de la fusion membranaire

La fusion entre deux membranes est un phénomène biologique important qui permet des échanges entre les cellules ou au sein même de la cellule et nécessaire lors de la formation de syncytium, la fécondation, la réponse immunitaire et les infections virales (Martens et McMahon 2008). La fusion entre les feuilletts lipidiques de deux cellules adjacentes ou de vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique implique le rapprochement physique des deux membranes et le réarrangement des feuilletts lipidiques qui composent les membranes (Martens et McMahon 2008). Le phénomène de fusion membranaire est un processus énergétique dû au rapprochement entre deux membranes chargées négativement et aux changements conformationnels des membranes (Martens et McMahon 2008). La fusion entre deux membranes passe par une stade d'hémifusion, où seuls les deux feuilletts juxtaposés sont fusionnés, puis par la formation d'un pore de fusion (Epand 2000; Martens et McMahon 2008). La composition des membranes en lipides et protéines dirige la fusion membranaire. En effet, la présence de céramides et diacylglycérol facilite la courbure des membranes (Epand 2000). Certaines protéines membranaires permettent aussi le rapprochement physique des bicouches lipidiques et apportent l'énergie nécessaire à la fusion via des changements conformationnels (Martens et McMahon 2008). Par exemple, les protéines de la famille SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*) sont impliquées dans la fusion des vésicules intracellulaires avec différents compartiments cellulaires et dans la fusion synaptique (Martens and McMahon, 2008). Dans le cas des infections virales, les protéines d'enveloppes sont impliquées dans la fusion des particules virales avec la

membrane de la cellule cible. Ceci implique une interaction entre la protéine d'enveloppe et un récepteur cellulaire et le peptide fusion situé dans la sous-unité transmembranaire de la protéine d'enveloppe (Epanand 2000).

Plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans la fusion des CTBv et la formation du STB tels que des protéines de jonctions adherens, jonctions GAP, jonctions zonula occludens et des protéines rétrovirales endogènes (Gerbaud et Pidoux 2015).

1.3.4 Les protéines rétrovirales endogènes humaines Syncytine-1 et Syncytine-2

1.3.4.1 La Syncytine-1

La Syncytine-1 (Syn-1) est la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus endogène appartenant à la sous-famille ERV-W. Cette sous-famille découverte en 1999, appartient à la classe I des ERV et possède plusieurs membres dont les loci sont répartis sur différents chromosomes. De plus, les travaux ayant menés à la découverte de la sous-famille ERV-W ont montrés que les transcrits de ces rétrovirus endogènes sont principalement détectés dans le placenta (Blond *et al.* 1999). Un intérêt particulier a été porté au locus situé sur le chromosome 7 (ERVW-1) car c'est le seul qui présentait un cadre de lecture intact dans l'un des gènes rétroviraux. En effet, la séquence du gène d'enveloppe était très conservée contrairement aux gènes *gag* et *pol*, indiquant que ce gène pourrait potentiellement coder pour une protéine d'enveloppe (Blond *et al.* 1999). Deux études ont finalement montré l'expression de ce gène *env* au niveau transcriptionnel et traductionnel et localisé l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe, nommée « Syncytine » par l'équipe du Dr McCoy au niveau du syncytiotrophoblaste placentaire (Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000). En plus de montrer le maintien de l'expression du gène *env* du rétrovirus endogène ERVW-1, ces travaux ont mis en évidence les capacités fusogéniques de la protéine Syncytine. En effet,

l'expression de la protéine dans différents types cellulaires entraîne la fusion des cellules qui l'expriment et la formation de nombreux syncytia (Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000). Le nom « Syncytine » proposé pour cette protéine vient de son expression au niveau du STB ainsi que de sa capacité à induire la formation de syncytia. La Syncytine a ensuite été renommée « Syncytine-1 » afin de la distinguer d'une autre protéine aux propriétés très similaires, découverte trois ans plus tard, et également exprimée dans le placenta (Blaise *et al.* 2003) (voir section 1.3.4.2).

1.3.4.1.1 La structure de la Syncytine-1

La Syn-1 est une protéine de 538 acides aminés et sa structure est semblable à celle d'une glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus exogène. En effet, elle est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur de 73 kDa, gp73, qui est ensuite clivé par l'endoprotéase cellulaire furine au niveau de la séquence consensus RNKR. Ce clivage donne naissance à la sous-unité de surface (SU), gp50, et à la sous-unité transmembranaire (TM), gp24 (Cheynet *et al.* 2005). Les sous-unités SU et TM s'associent par formation de ponts disulfures entre les séquences CxxC et Cx₆CC situées respectivement sur la SU et la TM (Figure 1.8). Après ancrage à la membrane plasmique, la Syn-1 s'associe en homotrimères pour former une protéine fonctionnelle. Au cours de son acheminement vers la membrane, la Syn-1 est modifiée post-traductionnellement par l'ajout de chaînes de polysaccharides. Parmi les sites de glycosylations, la protéine possède sept sites de N-glycosylation qui sont les asparagines N169, N208, N214, N234, N242, N281, N409 (Cheynet *et al.* 2005) (Figure 1.8). Chaque sous-unité porte des domaines importants pour la fonction de la protéine. La SU porte le domaine d'interaction avec les deux récepteurs cellulaires de la Syn-1 qui sont les transporteurs d'acides aminés neutres SLC1A4 (ou ASCT1) et SLC1A5 (ou ASCT2) (Blond *et al.* 2000; Lavillette *et al.* 2002). Le domaine d'interaction entre la SU et les récepteurs a été caractérisé et comprend 124 acides aminés situés dans la région N-terminale de la SU, avec une importance particulière

accordé aux acides aminés 21 à 69 et 117 à 144 (Cheynet *et al.* 2006) (Figure 1.8). La sous-unité TM porte quant à elle plusieurs domaines fonctionnels. Situé juste après le site de coupure de la furine, on trouve une région indispensable à l'activité fusogénique des enveloppes rétrovirales en général, le peptide fusion (PF), qui permet la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire. Dans le cas de la Syn-1, ce PF permet la fusion entre les membranes de deux cellules adjacentes. L'activité fusogénique de la Syn-1 dépend également de la présence de deux structures de type *leucine-zipper* dans l'ectodomaine de la protéine, HRA (*Heptad Repeat A*) et HRB, composées de motifs répétés de sept acides aminés (Figure 1.8). Ces deux structures hélicoïdales interagissent ensemble et permettent probablement le repliement optimal de la protéine durant son activité fusogénique (Chang *et al.* 2004). La capacité fusogénique de la Syn-1 serait régulée par sa région intracytoplasmique car la délétion des acides aminés 480 à 538 augmente significativement la fusogénicité de la protéine (Chang *et al.* 2004). En position 373 à 398 de la TM se trouve un domaine immunosuppresseur (DIS) (Mi *et al.* 2000). Le DIS est un domaine conservé sur les glycoprotéines de nombreux rétrovirus exogènes et endogènes et a un rôle dans la neutralisation de la réponse immunitaire de l'hôte (Cianciolo *et al.* 1985). Bien qu'une première étude ait suggéré que la Syn-1 ne présentait pas d'activité immunosuppressive (Mangeney *et al.* 2007), il semble néanmoins que le DIS de la protéine soit toujours actif. En effet, l'incubation d'un peptide synthétique correspondant à la région DIS de la Syn-1 avec des cellules immunitaires stimulées est capable d'inhiber de manière significative la libération de plusieurs cytokines dans le milieu extracellulaire (Tolosa *et al.* 2012). Le dernier domaine fonctionnel trouvé sur la TM est le domaine d'ancrage à la membrane plasmique, situé entre les acides aminés 437 et 473 (Mi *et al.* 2000; Cheynet *et al.* 2005).

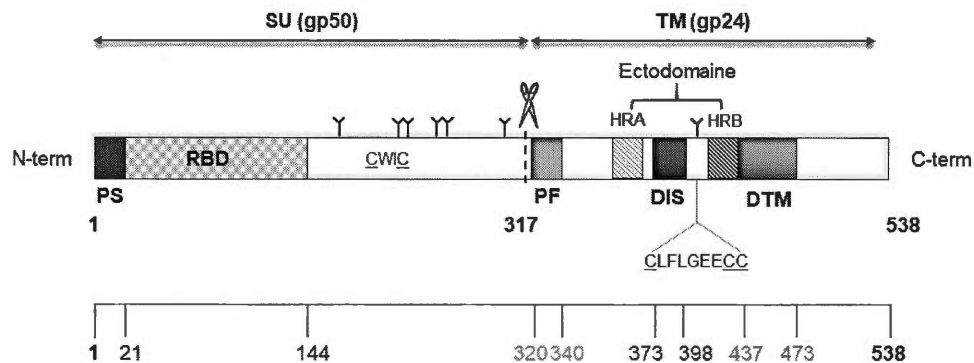


Figure 1.8: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la Syncytine-1.

La Syn-1 est une protéine synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est clivé par l'enzyme furine en deux sous-unités: une sous-unité de surface (SU) et transmembranaire (TM). Le site de coupure de la furine est indiqué par un trait vertical pointillé. La SU comporte un peptide signal (PS) à son extrémité N-terminale suivi par le site de liaison aux récepteurs (RBD). La TM comprend le peptide fusion (PF), le domaine immunosuppresseur (DIS) et le domaine transmembranaire (DTM). La TM porte aussi l'ectodomaine de la protéine avec les deux domaines HRA et HRB. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par un Y sur le schéma et les séquences CxxC et Cx₆CC permettant l'interaction de la SU et de la TM sont présentés, avec les résidus cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfure indiqués par C. L'échelle située sous le schéma indique la position des acides aminés correspondant aux différents domaines fonctionnels.

1.3.4.1.2 Les récepteurs de la Syncytine-1

Les protéines SLC1A4 et SLC1A5 sont deux protéines membranaires et des transporteurs d'acides aminés sodium dépendant, appartenant à la famille des transporteurs '*Solute Carrier 1*' (SLC1). Ces protéines sont conservées chez de nombreuses espèces. Chez l'humain, les gènes *SLC1A4* et *SLC1A5* sont respectivement localisés sur les chromosomes 2 et 19 et codent pour des protéines de 532 et 541 acides aminés, respectivement. SLC1A4 est un transporteur des acides aminés alanine, sérine, cystéine et thréonine dans de nombreux tissus incluant le cerveau, les muscles, le foie

et le placenta (Kanai *et al.* 2013; Simner *et al.* 2017). La protéine SLC1A5, qui a d'abord été associée au transport de trois acides aminés neutres et nommée ASCT2 (pour Alanine, Serine, Cystein Transporter 2), possède en réalité une fonction principale de transporteur de glutamine (Scalise *et al.* 2018). La protéine SLC1A5 a été le premier récepteur identifié pour la Syn-1 (Blond *et al.* 2000). Cette protéine est également utilisée comme récepteur par plusieurs virus, dont le rétrovirus endogène félin RD114, le rétrovirus endogène du babouin (BaEV) et des rétrovirus infectieux simiens de type D (simian retroviruses ou SRVs), pour ne citer que les rétrovirus (Rasko *et al.* 1999). Ces rétrovirus endogènes et exogènes forment un groupe d'interférence, c'est-à-dire que la liaison d'un de ces rétrovirus avec la protéine SLC1A5 à la surface d'une cellule empêche l'infection par un autre rétrovirus qui utilise le même récepteur (Blond *et al.* 2000). Il a ensuite été montré que la Syn-1, comme d'autre rétrovirus de ce groupe d'interférence, utilise aussi le transporteur SLC1A4 comme récepteur (Lavillette *et al.* 2002).

Chez l'humain et la souris, ces deux transporteurs possèdent chacun deux sites de N-glycosylations localisés dans une région extracellulaire appelée ECL2 (Marin *et al.* 2000; Marin *et al.* 2003). Il est intéressant de noter que la N-glycosylation de cette région régule l'utilisation de SLC1A4 comme récepteur dans le groupe d'interférence. En effet, la déglycosylation de la protéine Slc1a4 murine permet son utilisation comme récepteur par le rétrovirus félin RD114 et les rétrovirus SRVs qui sont normalement non infectieux chez les muridés (Marin *et al.* 2000). Aussi, la protéine homologue chez le hamster possède un troisième site de N-glycosylation dans la région extracellulaire ECL2 et la mutation de ce site permet l'utilisation de la protéine Slc1a4 comme récepteur pour l'ensemble des rétrovirus de ce groupe d'interférence (BaEV, ERV-W1, RD114 et SRVs) (Marin *et al.* 2003). La situation est différente avec la protéine SLC1A5 dont la régulation comme récepteur dans le groupe d'interférence dépend plus de la séquence de la région ECL2 que de son statut de N-glycosylation (Marin *et al.* 2003). Néanmoins, la déglycosylation de la protéine murine Slc1a5 permet son

utilisation comme récepteur pour la Syn-1 contrairement à sa forme N-glycosylée (Lavillette *et al.* 2002). Il semble donc que les N-glycosylations de la région ECL2 dans la protéine murine masquent le site de liaison de la Syn-1 à Slc1a5.

SLC1A4 et A5 sont exprimés de manière ubiquitaire avec des fonctions essentielles de transport de sérine dans le cerveau pour SLC1A4 et de glutamine dans le cerveau et le placenta pour SLC1A5 (Kanai *et al.* 2013; Scalise *et al.* 2018). Dans le placenta, SLC1A5 est détecté dans les CTBv en contact avec le STB, le STB et dans les CTBev avec une expression qui semble diminuer entre le premier et le deuxième trimestre de grossesse (Malassine *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Hayward *et al.* 2007; Aiko *et al.* 2014). La diminution d'expression de SLC1A5 est aussi observée dans la lignée cellulaire BeWo pendant leur syncytialisation (Kudo et Boyd 2002; Hayward *et al.* 2007). Il y a peu d'information quant à l'expression et la localisation du transporteur SLC1A4 dans le placenta. D'après la base de données Protein Atlas, les transcrits de *SLC1A4* sont très faiblement présents dans le placenta et la protéine SLC1A4 n'y est pas détectée alors que l'anticorps utilisé pour le marquage réagit très fortement dans d'autres tissus, par exemple dans l'épithélium vaginal. L'étude globale sur l'expression des gènes de la famille SLC dans le placenta indique que l'expression de *SLC1A4* diminue durant la grossesse (Simner *et al.* 2017). D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer si cette protéine s'exprime faiblement ou non dans le placenta.

1.3.4.1.3 Les fonctions de la Syncytine-1 dans le placenta

Plusieurs éléments ont poussé les chercheurs à étudier le rôle physiologique de la Syn-1 au niveau placentaire. Tout d'abord, le maintien du provirus ERVW-1 pendant plus de 25 millions d'années et l'absence de mutations dans le cadre de lecture du gène *env*, alors que les autres gènes rétroviraux sont inactivés, a suggéré que l'expression de la Syn-1 a été maintenue en raison de sa fonction biologique chez l'humain (Voisset *et al.* 1999; Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000; Esnault *et al.* 2013). Aussi, le locus ERVW-1 sur le chromosome 7 est conservé dans la population et le gène *env* de ce locus

possède le même taux de variations qu'un gène cellulaire, ce qui renforce l'idée que son expression a été maintenue par pression de sélection positive (Mallet *et al.* 2004). Ensuite, le fait que cette protéine rétrovirale soit exprimée au niveau du STB et possède une capacité fusogénique a amené l'hypothèse que la Syn-1 serait impliquée dans la formation de ce tissu placentaire. L'importance de la Syn-1 pour la formation du STB a finalement été démontrée par l'étude de Frendo *et al.* qui montre que l'inhibition de l'expression de la Syn-1 dans des CTBv diminue fortement leur syncytialisation (Frendo *et al.* 2003b). Ceci concorde avec la localisation cellulaire de la protéine qui est exprimée au niveau des syncytiotrophoblastes et des CTBv (Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000). Finalement, des défauts d'expression de cette protéine dans le placenta ont été associés à des pathologies obstétriques comme le syndrome HELLP et la pré-éclampsie qui seront détaillés dans la section 1.3.4.3.2 (Knerr *et al.* 2002). La Syn-1 est donc un acteur important de la fusion des CTBv avec le STB.

La Syn-1 et un de ces récepteurs sont aussi exprimés dans les trophoblastes non-fusogéniques CTBev mais sa fonction dans ce type de trophoblastes n'a pas été résolue (Malassine *et al.* 2005; Muir *et al.* 2006). Le fait que la Syn-1 et son récepteur principal SLC1A5 soient exprimés dans des cellules qui ne fusionnent pas soulève l'idée d'une régulation de l'interaction entre la protéine d'enveloppe et son récepteur.

1.3.4.1.4 La régulation de l'expression de la Syncytine-1

L'expression du gène ERVW-1 est en partie régulée par des modifications épigénétiques de sa région promotrice. En effet, le statut de méthylation des îlots CpG sur le promoteur du gène varie en fonction des tissus avec la déméthylation de certains îlots dans les cellules trophoblastiques associée avec l'expression du gène et au contraire un statut de méthylation plus élevé dans les cellules qui n'expriment pas la Syn-1 (Matouskova *et al.* 2006; Gimenez *et al.* 2009; Huang *et al.* 2014a). Durant la grossesse, une méthylation progressive du promoteur de ERVW-1 est observée dans le

placenta et associée avec une diminution d'expression de la protéine, avec 30% d'îlots CpG méthylés au troisième trimestre (Chen *et al.* 2006; Gimenez *et al.* 2009). Plusieurs changements de méthylation du promoteur sont aussi rapportés dans les cas de pathologies obstétriques associées à une diminution de l'expression de la Syn-1 dans le placenta ou inversement, à une expression anormale de la protéine dans d'autres tissus (Ruebner *et al.* 2013; Zhuang *et al.* 2014; Benesova *et al.* 2017). Une variation au niveau des marqueurs de l'activité de la chromatine a aussi été observée dans la région promotrice du gène en fonction des cellules, avec une chromatine 'active' (acétylation des lysines 9 des histones H3 (H3K9)) dans les cellules BeWo et 'inactive' (triméthylation de H3K9) dans les cellules HeLa (Trejbalova *et al.* 2011).

L'expression de la Syn-1 est également régulée par l'épissage alternatif de ses ARNm. Dans les cellules BeWo, une lignée cellulaire de choriocarcinome placentaire servant de modèle de syncytialisation des trophoblastes, les ARNm sont majoritairement épissés alors que la majorité des transcrits présents dans les cellules qui n'expriment pas la protéine sont non épissés (Trejbalova *et al.* 2011).

Enfin, la présence de facteurs de transcription et de régulateurs de la transcription cellules spécifiques explique aussi les différences d'expression de la Syn-1 dans les différents tissus. Le facteur de transcription GCM1 est le facteur de transcription associé à l'induction de l'expression du gène ERVW-1 dans le placenta mais une étude rapporte aussi le rôle de PPAR γ (Yu *et al.* 2002; Ruebner *et al.* 2012). Une région activatrice de la transcription présente dans le LTR 5' de ERVW-1 permet une augmentation de la transcription spécifique aux cellules trophoblastiques avec la liaison des facteurs de transcription SP1 et GATA2/3 dans cette région du promoteur (Cheng et Handwerger 2005).

1.3.4.2 La Syncytine-2

1.3.4.2.1 La découverte de la Syncytine-2

La protéine Syncytine-2 (Syn-2) est la protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène humain ERVFRD-1 situé sur le chromosome 6. Cette protéine a été identifiée en 2003, mais la découverte des rétrovirus endogènes humains de la sous-famille ERV-FRD est bien antérieure. C'est en analysant le contenu génomique de pseudo-particules rétrovirales libérées par des cellules de carcinome mammaire humaines que Seifarth *et al.* ont découvert de nouvelles séquences rétrovirales endogènes humaines et identifié la sous-famille -FRD (Seifarth *et al.* 1995). Le nom attribué à cette sous-famille ne suit pas la nomenclature usuelle, mais découle de l'association des lettres qui représentent les trois premiers acides aminés de la séquence traduite du transcrit isolé dans les particules rétrovirales. Il a ensuite été suggéré que l'ARNt initiateur lié à la séquence PBS du rétrovirus ancestral de la sous-famille -FRD est l'ARNt lié à l'histidine (Tristem 2000). Les rétroéléments -FRD sont multicopies avec une centaine de séquences plus ou moins conservées et dispersées sur le génome, mais ils n'ont suscité que peu d'intérêt suite à leur découverte (base de données HGNC, (Tristem 2000; Benit *et al.* 2001; de Parseval *et al.* 2003)). Cette sous-famille est ressortie de l'ombre lorsque des travaux publiés en 2003 ont identifié une séquence -FRD possédant un gène *env* intact. En cherchant l'ensemble des ERVs possédant un gène *env* conservé, l'équipe du Dr Heidmann a révélé l'existence d'un provirus de la sous-famille -FRD, localisé sur le chromosome 6 et porteur d'un gène *env* avec un cadre de lecture très conservé. Ce provirus a été identifié sous le nom ERVFRD-1. De plus, des expériences de transcription-traduction *in vitro*, de PCR en temps réel ainsi que le clonage du cadre de lecture du gène dans des vecteurs d'expressions, ont permis de montrer que le gène *env* de ce provirus code pour une protéine et s'exprime préférentiellement dans le placenta (de Parseval *et al.* 2003). Cette même équipe a ensuite montré la conservation du gène ERVFRD-1 chez les primates et daté l'insertion du provirus ancestral à 40 millions d'années, donc antérieur au provirus ERVW-1. Mais l'élément majeur de cette étude est la démonstration des capacités fusogéniques de cette nouvelle glycoprotéine d'enveloppe dans plusieurs modèles cellulaires (Blaise *et al.* 2003). En raison de ses

similarités avec la glycoprotéine d'enveloppe « Syncytine » découverte trois ans plus tôt, les chercheurs ont proposé d'appeler cette nouvelle protéine « Syncytine-2 ».

1.3.4.2.2 La structure de la Syncytine-2

La structure de la Syn-2 est semblable à celle de la Syn-1 et l'organisation fonctionnelle de la protéine est présentée sur la figure 1.9. La Syn-2 possède également 538 acides aminés et est synthétisée sous la forme d'un précurseur (Pr73) de 73 kDa. La présence d'un peptide signal à son extrémité N-terminale adresse la synthèse de la protéine au compartiment du réticulum endoplasmique. Le précurseur Pr73 est clivé en sous-unités SU (acides aminés 15 à 350, poids moléculaire d'environ 37 kDa) et TM (acides aminés 351 à 538, poids moléculaire d'environ 22 kDa) par l'enzyme furine lors de son transit dans le Golgi, par reconnaissance de la séquence RVRR. Ces deux sous-unités interagissent par liaison covalente entre les séquences CxxC dans la SU et Cx₆CC dans la TM et forment une protéine homotrimérique à la membrane plasmique (Blaise *et al.* 2003; Chen *et al.* 2008). La SU est responsable de l'interaction avec un récepteur cellulaire unique, identifié comme la protéine MFSD2a (Major Facilitator Superfamily Domain-containing 2a) (Esnault *et al.* 2008). On retrouve sur la TM les mêmes domaines fonctionnels que sur celle de la Syn-1, c'est-à-dire un peptide fusion (PF) entre les acides aminés 351 et 374, un domaine immunosuppresseur (DIS) qui s'étend des acides aminés 414 à 430 et un domaine d'ancrage à la membrane, situé entre les acides aminés 477 et 504 (Blaise *et al.* 2003) (Figure 1.9). De plus, la TM possède un motif de 54 acides aminés appelé ectodomaine qui comporte deux séquences répétées de sept acides aminés, HR1 (ou HRA) et HR2 (ou HRB) formant une structure hélicoïdale nécessaire pour l'activité fusogénique de la protéine. En effet, l'analyse structurale de ce motif par cristallographie a montré qu'il possède la même conformation que ceux des glycoprotéines rétrovirales de HTLV-1 et MoMLV. Il est donc suggéré que cette structure subisse un changement conformationnel comparable à celui opéré par les glycoprotéines d'enveloppe de HTLV-1 et MoMLV, permettant

ainsi le rapprochement et la fusion des membranes plasmiques de deux cellules voisines (Renard *et al.* 2005).

Au cours de son transit du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, la protéine subit des modifications post-traductionnelles dont des N-glycosylations. Neuf sites de glycosylation N-liés ont été identifiés sur la Syn-2 : huit sont dans la SU (N133, N146, N177, N220, N241, N312, N332) et un seul dans la TM (N443) (Cui *et al.* 2016) (Figure 1.9). Certaines de ces N-glycosylations semblent moduler l'activité fusogénique de la protéine et l'interaction avec MFSD2a. Les mutations ponctuelles des asparagines N133, N312 et N443 inhibent la capacité fusogénique de la Syn-2 alors que la mutation en position N332 augmente la fusogénicité. Étonnamment, seule la mutation du résidu N443 situé dans la TM inhibe l'interaction avec le récepteur MFSD2a dans des expériences de co-immunoprécipitations, ce qui suggère l'importance de ce site de glycosylation pour la conformation fonctionnelle de la Syn-2 (Cui *et al.* 2016). Ces quatre sites de glycosylations sont donc nécessaires à la fonction de la protéine, que ce soit pour l'interaction avec le récepteur ou les changements conformationnels de l'ectodomaine qui ont lieu après liaison au récepteur.

Aussi, l'activité fusogénique de la Syn-2 semble dépendre en partie de sa région intracytoplasmique. En effet, la délétion de sa queue C-terminale n'altère pas la synthèse de la protéine, mais inhibe la fusion cellulaire, inversement à ce qui a été montré pour la Syn-1 (Chang *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008). Ces résultats sont à confirmer, car la localisation membranaire des mutants de délétion n'a pas été démontrée.

En plus de son activité de fusion, la Syn-2 a aussi conservé une activité immunosuppressive (Mangeney *et al.* 2007; Lokossou *et al.* accepted) qui pourrait contribuer à l'établissement de la tolérance immunitaire au niveau du placenta (Lokossou *et al.* 2014).

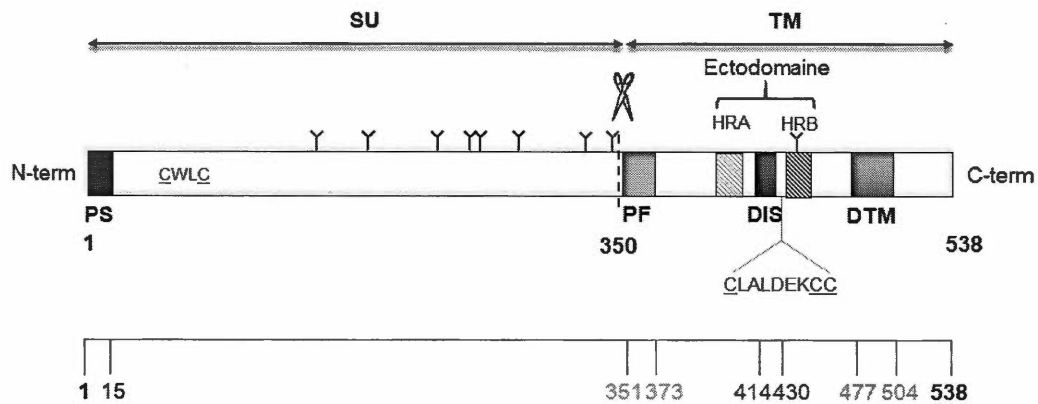


Figure 1.9: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la Syncytine-2.

La présence d'un peptide signal (PS) à l'extrémité N-terminale du précurseur adresse la synthèse de la protéine au réticulum endoplasmique. Le précurseur est clivé par la furine en sous-unités de surface (SU) et transmembranaire (TM) lors de son transit dans le Golgi. Le site de coupure est indiqué par un trait vertical pointillé. La TM contient le peptide fusion (PF), le domaine immunosuppresseur (DIS), l'ectodomaine et le domaine transmembranaire (DTM). Les séquences CxxC et Cx₆CC permettant la formation de ponts disulfures entre les sous-unités SU et TM sont indiquées sur le schéma et les résidus cystéines sont représentés par C. Les sites de N-glycosylations sont indiqués par un Y, la couleur rouge indique les sites essentiels pour l'activité fusogénique de la protéine. L'échelle située sous le schéma indique la position des acides aminés correspondants aux différents domaines fonctionnels.

1.3.4.2.3 Le récepteur de la Syncytine-2

La protéine MFSD2a est une protéine membranaire qui appartient à la superfamille des transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*) et qui possède des homologues chez de nombreuses espèces avec une conservation de séquence (Angers *et al.* 2008). Le gène *MFSD2a* se localise sur le chromosome 1 et possède plusieurs

transcrits dont deux sont codants pour des protéines de 543 (isoforme 1) et 530 (isoforme 2) acides aminés. L'analyse de la structure secondaire de MFSD2a a permis d'identifier 10 à 12 domaines transmembranaires selon les isoformes. L'expression de *MFSD2a* est presque ubiquitaire, mais son niveau d'expression varie selon les tissus. Les transcrits et protéines sont fortement exprimés dans le cerveau, le foie, les poumons, le tissu adipeux brun, le tractus gastro-intestinal, les testicules et le placenta, mais absents dans le cœur et les muscles squelettiques (base de données Protein Atlas, (Esnault *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2014; Guemez-Gamboa *et al.* 2015; Uhlen *et al.* 2015)). La protéine MFSD2a se localise à la membrane plasmique et dans le réticulum endoplasmique des cellules et est rapidement recyclée vers les lysosomes avec une demi-vie d'environ 60 min (Reiling *et al.* 2011; Berger *et al.* 2012). Il semble que la région C-terminale de la protéine soit importante pour son expression et sa localisation membranaire, car des délétions progressives de cette région diminuent l'expression de la protéine et la délétion des 40 derniers acides aminés abolit sa localisation à la membrane (Reiling *et al.* 2011). MFSD2a présente une conservation de certains acides aminés avec le symporteur bactérien MelB, notamment deux aspartates qui sont importants pour la fonction de symporteur de ce dernier (Figure 1.10). La mutation du résidu D97 de MFSD2a suggère que celui-ci soit important pour sa fonction de transporteur (Reiling *et al.* 2011). La protéine MFSD2a est glycosylée et possède deux asparagines glycosylées qui sont conservées entre les isoformes et les homologues protéiques (Reiling *et al.* 2011; Berger *et al.* 2012) (Figure 1.10). Chez la souris, différentes isoformes de *Mfsd2a* sont détectées selon les tissus, avec les formes glycosylée (70kDa) et non-glycosylée (59kDa) trouvées dans le foie et le tissu adipeux brun et une isoforme de 65 kDa détectée dans le cerveau et l'épithélium rétinien de l'oeil (Berger *et al.* 2012; Wong *et al.* 2016).

La protéine MFSD2a est un transporteur d'acide gras au niveau des barrières hématoencéphalique, hématorétinienne et placentaire (Nguyen *et al.* 2014; Guemez-Gamboa *et al.* 2015; Wong *et al.* 2016). En effet, MFSD2a transporte l'acide

décosahexaénoïque (DHA), un acide gras essentiel de type Oméga-3, sous la forme d'acide lysophosphatidylcholine (LPC). Chez la souris, *Mfsd2a* est exprimée dans les cellules endothéliales des capillaires du cerveau et de l'œil et un défaut d'expression de la protéine entraîne une baisse majeure des niveaux de DHA dans ces organes. De plus, l'expression de la protéine est importante pour la formation de la barrière hématoencéphalique et le développement cérébral, mais n'est pas essentielle à la formation de la barrière rétinienne (Ben-Zvi *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2014; Wong *et al.* 2016). Chez l'humain, des mutations du gène sont associées à des microcéphalies congénitales sévères ou létales (Guemez-Gamboa *et al.* 2015; Harel *et al.* 2018). Sa fonction de transporteur de DHA a récemment été confirmée dans le placenta. Dans le cas de diabète gestationnel, un défaut de transport du DHA entre les circulations maternelle et fœtale a été associé à une diminution d'expression placentaire de la protéine MFSD2a (Prieto-Sanchez *et al.* 2017).

En plus de ces fonctions de transporteur de DHA, cette protéine possède des fonctions dans le métabolisme des lipides, dans la régulation de la migration et la prolifération des cellules de carcinomes pulmonaires et pourrait être un suppresseur de tumeur (Angers *et al.* 2008; Spinola *et al.* 2010; Berger *et al.* 2012; Shi *et al.* 2018). MFSD2a est aussi un transporteur de la tunycamicine, un inhibiteur de la N-glycosylation utilisé pour étudier la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Reiling *et al.* 2011; Moritake *et al.* 2017).

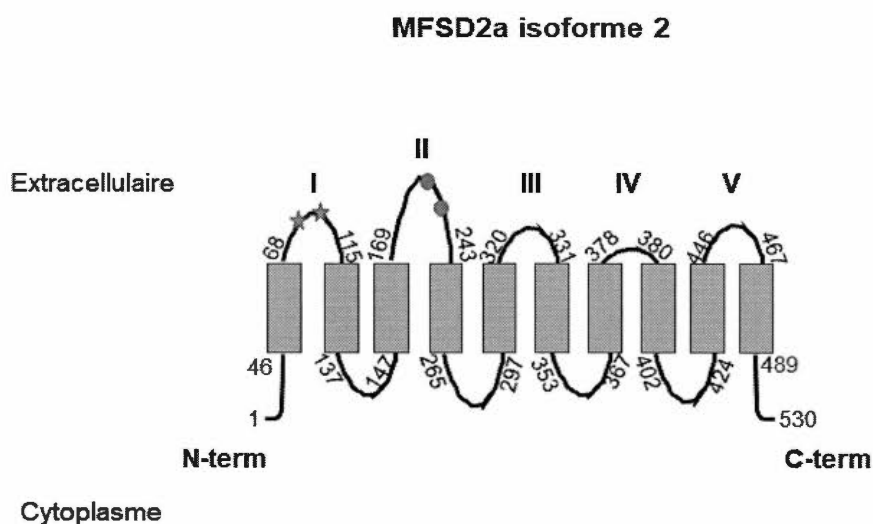


Figure 1.10: Représentation schématique de l'isoforme 2 du transporteur membranaire MFSD2a.

L'isoforme 2 possède 530 acides aminés et 10 domaines transmembranaires (boîtes grises). MFSD2a possède cinq domaines extracellulaires annotés de I à V. Le domaine I porte deux résidus aspartates conservés (asp 95 et 97) et potentiellement importants pour la fonction de symporteur (étoiles rouges) et le domaine II porte les deux asparagines glycosylées (asn 217 et 227, points bleus).

1.3.4.2.4 Localisation et fonction de la Syncytine-2 dans le placenta

Comme la Syn-1, la Syn-2 exerce sa fonction biologique dans le placenta. Dans ce tissu, l'expression de la Syn-2 est restreinte aux CTBv ayant quitté le cycle cellulaire et qui sont en contact avec le STB (Malassine *et al.* 2007; Lu *et al.* 2017). L'expression de la Syn-2 a été localisée dans le cytoplasme et à la membrane plasmique des CTBv, avec une expression qui semble plus accentuée aux points de contact avec le STB, mais aucune immunoréactivité n'a été détectée dans le STB ou dans les CTBev (Malassine

et al. 2007; Lu *et al.* 2017). Le récepteur MFSD2a quant à lui, a été localisé au niveau du STB et son expression est indispensable à la fusion des cellules trophoblastiques (Esnault *et al.* 2008; Toufaily *et al.* 2013).

Le fait que la Syn-2 et son récepteur soient restreints aux CTBv et au STB respectivement, suggère que la Syn-2 soit responsable du maintien du STB en induisant la fusion entre cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes (Esnault *et al.* 2008). Le rôle de la Syn-2 dans la fusion des cellules trophoblastiques ne fait aujourd'hui aucun doute. En effet, l'expression de la protéine est induite lors de la syncytialisation des cellules BeWo et des cultures de CTBv et l'inhibition de son expression par transfection de petits ARN interférents diminue significativement la fusion de ces cellules (Vargas *et al.* 2009). De plus, plusieurs études ont établi un lien entre le défaut d'expression de la protéine et des pathologies de placentation. Dans les placentas d'enfants atteints de trisomie 21, la Syn-2 est anormalement localisée dans le cytoplasme des CTBv, et non à la membrane des cellules, et cette localisation est associée au défaut de fusion des CTBv qui est observé dans ces placentas (Malassine *et al.* 2008). Aussi, des études ont montré que l'expression de la Syn-2 est significativement diminuée, aussi bien au niveau transcriptionnel que traductionnel, dans les placentas pré-éclamptiques par rapport aux placentas contrôles et que son niveau d'expression corrèle avec la sévérité de la pathologie (Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2011; Vargas *et al.* 2014). Bien que les protéines Syn-1 et -2 semblent toutes les deux impliquées dans la formation du STB, des données suggèrent que la Syn-2 pourrait avoir un rôle plus déterminant dans la fusion des cellules. Tout d'abord, le fait que la Syn-1 et un de ces récepteurs soient exprimés dans les CTBv, cellules non-fusogéniques, suggère que les Syn-1 et -2 ne présentent pas des fonctions redondantes dans le placenta. Ensuite, l'étude comparative de l'expression des Syn-1 et -2 aux niveaux transcriptionnel et traductionnel dans des CTBv a montré que l'expression de la Syn-1 diminue à mesure de la différenciation et de la fusion des cellules alors que celle de la Syn-2 augmente au cours du temps. De même, l'induction de la fusion de cellules BeWo par des activateurs de la voie AMPc

semble corrélérer avec une induction plus forte de l'expression de la Syn-2 par rapport à celle de la Syn-1. Enfin, l'inhibition de l'expression de la Syn-2 dans les CTBv par interférence ARN a montré une diminution significativement plus grande de la fusion des cellules par rapport à l'effet observé par l'inhibition de la Syn-1 (Vargas *et al.* 2009). Une étude réalisée dans notre laboratoire a enfin montré que la fusion des cellules trophoblastiques BeWo dépend de l'expression de MFSD2a et que la protéine est significativement moins exprimée dans les placentas de femmes atteintes de pré-éclampsie sévère comparativement aux placentas contrôles (Toufaily *et al.* 2013).

Toutes ces données concordent donc avec l'idée que la Syn-2 a un rôle majeur dans la fusion des CTBv et dans le maintien du STB.

1.3.4.2.5 Régulation de l'expression de la Syncytine-2 et de MFSD2a

L'expression de la Syn-2 est hautement régulée en dehors des cellules placentaires. Les travaux de Liang *et al.* se sont intéressés à la régulation de l'expression de la Syn-2 dans des cellules placentaires et non placentaires et ont montré que la méthylation des îlots CpG sur son promoteur permet d'inhiber son expression dans les cellules non placentaires (Liang *et al.* 2010). La restriction de l'expression du gène ERVFRD-1 par la méthylation de son promoteur a été confirmée dans les cellules HeLa (Trejbalova *et al.* 2011). Aussi, une différence de méthylation et d'acétylation des lysines 9 des histones H3 au niveau du promoteur est observée en fonction des cellules, avec une déacétylation et une triméthylation des histones chez les HeLa et une déméthylation des histones H3 chez les BeWo.

De manière intéressante, un épissage alternatif des transcrits permet aussi de réguler l'expression de la protéine avec la présence majoritaire des transcrits épissés dans les cellules trophoblastiques, mais non épissés dans les cellules non trophoblastiques (Trejbalova *et al.* 2011).

En plus des modifications épigénétiques et de l'épissage alternatif, des facteurs de transcriptions activent l'expression de ERVFRD-1. Un site de liaison fonctionnel

pour GCM1 a été identifié dans la région promotrice du gène et ce facteur de transcription régule positivement l'expression du gène dans les cellules de choriocarcinome BeWo. Ce même facteur de transcription se lie à la région promotrice de *MFSD2a* et régule son expression dans les cellules BeWo (Liang *et al.* 2010). L'expression de GCM1 dans les cellules non placentaires (MCF-7) peut également conduire à la déméthylation du promoteur et à l'expression de la Syn-2 dans ces cellules, ce qui suggère que GCM1 peut recruter des enzymes de déméthylation de la chromatine (Liang *et al.* 2010). Des travaux publiés récemment ont confirmé la régulation GCM1-dépendante de la Syn-2 et rapportent aussi un rôle synergique entre le régulateur du cycle cellulaire p21 et GCM1 dans les cellules trophoblastiques afin d'induire l'expression de la Syn-2 uniquement dans les CTBv ayant quitté le cycle cellulaire (Lu *et al.* 2017). En effet, des expériences d'immunoprécipitation, de colocalisation et d'immunoprécipitation de la chromatine dans des cultures cellulaires et des tissus placentaires ont montré une interaction entre GCM1 et p21, la colocalisation de ces deux facteurs dans le noyau des CTBv sous-jacents au STB, une expression de p21 dans des CTBv qui expriment la Syn-2 et la liaison de p21 dans la région promotrice de ERVFRD-1 et ce, dans la même région où se lie le facteur GCM1. Enfin, des analyses de l'activation du promoteur du gène ERVFRD-1 ont montré une action synergique de p21 et GCM1 sur l'activation de la transcription du gène (Lu *et al.* 2017). En plus du facteur GCM1, les facteurs de transcriptions CREB2 et JunD régulent aussi l'expression de ERVFRD-1. L'utilisation de vecteurs d'expression pour le gène rapporteur luciférase sous la dépendance de la région promotrice entière du gène ERVFRD-1 ou avec des délétions progressives a montré que les facteurs CREB2 et JunD induisent l'expression de la Syn-2 dans les cellules BeWo. Ces deux facteurs de transcriptions se lient sur un motif CRE/AP-1 situé dans la région -203-197 du promoteur de la Syn-2 lors de la syncytialisation des cellules BeWo (Toufaily *et al.* 2015).

La régulation de l'expression de la Syn-2 dans les cellules trophoblastiques est donc un processus complexe, faisant intervenir des modifications épigénétiques de la région promotrice du gène, un épissage alternatif ainsi que plusieurs facteurs de transcriptions et un régulateur du cycle cellulaire.

1.3.4.3 L'implication des protéines Syncytine-1 et 2 dans les autres événements de fusion et dans les pathologies

En plus de leur expression dans le placenta, les protéines Syn-1 et -2 sont retrouvées dans d'autres tissus qui présentent naturellement des syncytium et participent aux événements de fusion dans ces tissus. La Syn-1 pourrait aussi participer à la fusion des gamètes lors de la fécondation. Ces deux protéines sont également anormalement exprimées dans certaines pathologies et contribuent plus ou moins directement au développement de ces pathologies.

1.3.4.3.1 La fusion des myoblastes, des ostéoclastes et la fécondation

Le muscle et l'os sont deux autres tissus qui forment naturellement des syncytiums, avec la fusion de cellules spécialisées appelées myoblastes et ostéoclastes, respectivement. L'implication des protéines Syn-1 et -2 dans la formation de ces structures multinuclées a été étudiée, mais la majorité des études se sont concentrées sur la Syn-1.

Dans le muscle, une première étude a montré l'expression de la Syn-1 et de la Syn-2 dans des cultures primaires de myoblastes humains, mais seules la localisation et la fonction de la Syn-1 ont ensuite été étudiées (Bjerregard *et al.* 2014). Les résultats montrent une localisation membranaire de la Syn-1 et une induction de son expression lors de la différenciation des myoblastes en myotubes. Aussi, l'inhibition de l'expression de la Syn-1 dans les myoblastes diminue la fusion des cellules (Bjerregard *et al.* 2014). Une seconde étude a ensuite confirmé l'expression des protéines Syn-1 et -2 et de leurs récepteurs, SLC1A4 et MFSD2a, dans les fibres musculaires humaines

(Frese *et al.* 2015). La Syn-1 et son récepteur SLC1A4 ont été localisés au niveau du sarcolemme et des myofibres, respectivement alors que le récepteur SLC1A5 ne semble pas être exprimé dans les myofibres. La Syn-2 et son récepteur MFSD2a ont quant à eux été localisés dans les myofibres et le sarcolemme, respectivement (Frese *et al.* 2015). L'inhibition de la Syn-1 ou de la Syn-2 dans des cultures de myoblastes humains (anticorps bloquants ou la transfection de petits ARN interférents) a finalement permis d'établir un lien entre l'expression des protéines Syn-1 et -2 et la fusion des myoblastes (Frese *et al.* 2015; Redelsperger *et al.* 2016).

Dans l'os, la Syn-1 et de son récepteur SLC1A5 ont été localisés à la membrane plasmique des ostéoclastes durant leur différenciation, avec une expression polarisée de la Syn-1 à la membrane de certains ostéoclastes qui vont fusionner. L'inhibition de la Syn-1 dans des cultures d'ostéoclastes a ensuite démontré le fonction de cette protéine fusogénique durant la fusion des cellules, conduisant à une diminution significative du nombre de cellules multinucléées (Soe *et al.* 2011). Ces résultats ont été confirmés récemment par une étude indépendante (Verma *et al.* 2018). En continuant leurs investigations, les chercheurs Sør et Delaissé ont montré que la fusion des ostéoclastes est orientée, c'est-à-dire que la fusion entre deux cellules dépend de l'expression et de la localisation cellulaire de certains facteurs, et que l'expression polarisée de la Syn-1 à la membrane des ostéoclastes contribue à ce phénomène (Hobolt-Pedersen *et al.* 2014). Il semble finalement que le rôle de la Syn-1 dans la fusion des ostéoclastes dépende de l'état de différenciation des cellules. L'inhibition de la Syn-1 dans des cultures d'ostéoclastes précurseurs mononucléés augmente la fusion des cellules alors que l'inhibition de la protéine à des stades plus tardifs réduit significativement la fusion entre syncytia préexistants (Møller *et al.* 2017). Ces résultats indiquent que la fonction de la Syn-1 dans la fusion des ostéoclastes pourrait varier en fonction des partenaires de fusion dans une culture cellulaire.

Enfin, des résultats publiés en 2014 suggèrent un rôle potentiel de la Syn-1 dans la fusion des gamètes lors de la fécondation. Dans le but d'identifier des protéines

impliquées dans la fusion des gamètes, les auteurs rapportent en effet l'expression de la Syn-1 et son récepteur SLC1A5 dans les gamètes humains. La Syn-1 est uniquement exprimée dans les spermatozoïdes, majoritairement au niveau de l'acrosome alors que SLC1A5 est exprimé dans les spermatozoïdes et les oocytes avec une expression qui augmente au cours de la maturation des oocytes (Bjerregaard *et al.* 2014). De plus amples analyses ainsi que des expériences fonctionnelles sont nécessaires afin d'évaluer la fonction fusogénique de la Syn-1 dans la fécondation.

Toutes ces études convergent vers un rôle des Syncytines dans la fusion des myoblastes et ostéoclastes humains et des analyses approfondies sont nécessaires pour comprendre la régulation de l'expression de ces protéines dans ces tissus ainsi que leur rôle exact durant la fusion des cellules.

1.3.4.3.2 Les Syncytines dans les pathologies

1.3.4.3.2.1 La pré-éclampsie

La pré-éclampsie (PE) est un syndrome pathologique obstétrique qui touche entre 5 et 8% des femmes enceintes dans le monde et qui est responsable d'un fort taux de mortalité maternelle, pouvant atteindre 12 % dans certaines régions du globe, et d'accouchements prématurés (Duley 2009). La PE est une pathologie multifactorielle qui est diagnostiquée par l'apparition de deux symptômes autour de la 20^e semaine de grossesse: une hypertension artérielle persistante chez une femme préalablement normotensive (pression artérielle systolique/diastolique >140/90 mm de mercure qui persiste entre plusieurs mesures), une protéinurie (plus de 300 mg de protéines éliminées dans les urines en 24h), une thrombocytopénie (<100 000 cellules/ μ l) et des anomalies rénales et du foie (Duley 2009; Roberts *et al.* 2013; Berkane *et al.* 2017). Les troubles de la pression artérielle peuvent être accompagnés de symptômes plus ou moins sévères avec des maux de tête, des oedèmes, des troubles de la vision, des étourdissements et des vomissements et la protéinurie est symptomatique d'un mauvais

fonctionnement des reins. On distingue deux types de PE, la PE précoce (ou PE sévère), qui apparaît avant la 34^e semaine de grossesse, et la PE tardive après la 34^e semaine de grossesse. La PE précoce est un syndrome généralement plus sévère avec un risque de complication et de mortalité accru pour le fœtus et la mère. Il est d'ailleurs suggéré que ces deux types de PE aient une étiologie différente (von Dadelszen *et al.* 2003). Malgré les nombreuses recherches sur cette pathologie, le seul traitement curatif de la PE est l'accouchement et il n'y a pas encore d'outils permettant de diagnostiquer la PE avant l'apparition des symptômes caractéristiques bien que plusieurs marqueurs soient actuellement à l'étude (Yusuf *et al.* 2018).

L'étiologie de la PE est complexe avec des causes génétiques, environnementales et ethniques. Aussi, plusieurs facteurs de risques ont été identifiés comme l'hypertension chronique, le diabète, l'obésité, le tabagisme, les grossesses multiples et les antécédents familiaux (Redman et Sargent 2005). Deux composantes sont associées à la PE, une composante placentaire et une composante inflammatoire. La composante placentaire inclut un défaut de placentation avec moins d'invasion des trophoblastes extravilloux dans la décidue, moins de trophoblastes endothéliaux, un faible remodelage des artérioles spiralées et moins d'irrigation du placenta (Fisher 2015). Les défauts placentaires se reflètent aussi au niveau du chorion villosus avec une diminution du nombre d'embranchements, un défaut de formation du STB et la libération de nombreux débris membranaires et de facteurs anti-angiogéniques du STB dans l'espace intervilloux qui se retrouvent dans la circulation maternelle (Steegers *et al.* 2010). Parmi les facteurs solubles sécrétés par les trophoblastes, on trouve le récepteur soluble au VEGF de type 1, appelé sFlt-1, qui capte le VEGF et le facteur de croissance placentaire (PlGF pour placental growth factor) dans la circulation sanguine et inhibe leurs activités pro-angiogéniques. Un défaut d'expression de sFlt-1 et PlGF est également associé à la PE, avec une augmentation de sFlt-1 et une diminution de PlGF dans le sang chez les femmes pré-éclamptiques (Redman et Sargent 2005). Les conditions hypoxiques dans le placenta entraînent l'apoptose des cellules par un stress

oxydatif, l'apparition de tissu nécrotique et favorisent la libération des débris membranaires ainsi que la sécrétion des facteurs anti-angiogéniques par les trophoblastes. Tout ceci serait à l'origine de la composante inflammatoire de la pathologie. En effet, une réponse cytokinique pro-inflammatoire exacerbée et un stress oxydatif sont observés dans la PE qui entraînent un dysfonctionnement des cellules endothéliales (Fisher 2015). Cette inflammation systémique et le dysfonctionnement endothélial peuvent avoir des conséquences sur le long terme surtout au niveau cardiaque pour les femmes ayant souffert de PE durant leur(s) grossesse(s) bien que cette corrélation entre la PE et le risque cardiovasculaire soit remise en question par certaines études cliniques de populations ayant analysés rétrospectivement l'état de santé cardiovasculaire chez des femmes ayant développées une PE durant leur grossesse (Myatt et Roberts 2015).

Des défauts d'expression des protéines Syn-1 et -2 sont associées à la PE notamment dans le défaut de fusion des CTBv et de formation du STB. En 2001, des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie montrent une diminution d'expression significative de la Syn-1 dans onze placentas pré-éclamptiques par rapport aux tissus contrôles, ainsi qu'un défaut de localisation de la Syn-1 dans le STB des placentas pré-éclamptiques (Lee *et al.* 2001). La diminution d'expression de la Syn-1 dans les placentas PE a été confirmée ensuite par plusieurs études indépendantes (Keith *et al.* 2002; Knerr *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006; Vargas *et al.* 2011). L'expression du récepteur SLC1A5 a aussi été étudiée dans la PE et des expériences de RT-PCR et Western-blot ne montrent pas de variation significative de son expression (Chen *et al.* 2006). La diminution de l'expression de la Syn-1 est associée avec les conditions d'hypoxies trouvées dans la PE. En effet, la culture de CTBv, de BeWo et d'explants placentaires en conditions hypoxiques entraîne une diminution d'expression de la Syn-1 et du facteur de transcription GCM1, qui régule l'expression du gène ERVW-1 dans les trophoblastes (Knerr *et al.* 2003; Kudo *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006; Soleymanlou *et al.* 2007; Chiang *et al.* 2009; Wich *et al.* 2009). Plus

récemment, deux équipes ont montré que la diminution d'expression de ERVW-1 dans les placentas pré-éclamptiques serait due à une hyperméthylation de sa région promotrice, associée avec la surexpression de deux méthyltransférases (Ruebner *et al.* 2013; Zhuang *et al.* 2014). La littérature disponible sur la protéine Syn-2 est beaucoup plus réduite que sur la Syn-1 mais plusieurs travaux ont démontré l'importance de cette protéine dans la physiopathologie du placenta. En 2008, l'analyse du niveau d'expression de la Syn-2 dans des placentas pré-éclamptiques a montré une baisse significative de l'expression de la protéine (Chen *et al.* 2008). Ces résultats ont été confirmés par notre laboratoire en montrant une baisse significative de l'expression de la Syn-2 dans les placentas de femmes atteintes de PE ainsi qu'une corrélation entre le niveau d'expression des Syn-1 et -2 et la sévérité des cas de PE, plus marquée pour la Syn-2 (Vargas *et al.* 2011). Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus au laboratoire qui montraient que l'inhibition de l'expression de la Syn-2 par des petits ARN interférents diminue plus fortement la fusion des cellules BeWo et CTBv (Vargas *et al.* 2009). Finalement, la fréquence de certaines mutations ponctuelles de nucléotides (SNP) situées dans l'ORF et la région 3'UTR du gène ERVFRD-1 a été relevée dans des cohortes de patientes pré-éclamptiques en Chine mais aucune corrélation entre le risque de PE et la présence de ces SNP n'a pu être établit (Cui *et al.* 2016; Hua *et al.* 2018). La présence d'un domaine immunosuppresseur fonctionnel dans la sous-unité TM des Syncytines suggère que ces protéines puissent potentiellement avoir un rôle dans la tolérance immunitaire au niveau du placenta et qu'une diminution d'expression de ces deux protéines dans les placentas pré-éclamptiques entraîne un déséquilibre de la réponse immunitaire (Lokossou *et al.* 2014).

La baisse d'expression des Syncytines dans la PE s'observe aussi dans des vésicules membranaires qui circulent dans le sang des patientes. En effet, le placenta libère des vésicules extracellulaires tout au long de la grossesse et les protéines Syn-1 et -2 sont internalisées dans ces vésicules. La diminution d'expression de la Syn-2 dans la PE se reflète sur les vésicules extracellulaires qui expriment significativement moins

la protéine que dans les vésicules contrôles (Vargas *et al.* 2014). Les conséquences de cette baisse d'expression dans les vésicules seront développées dans la section 1.4.

1.3.4.3.2.2 Le syndrome HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzyme, Low Platelets) et le retard de croissance intrautérin (Intra Uterin Growth Restriction IUGR)

Le syndrome HELLP a été décrit pour la première fois en 1982 en recoupant les cas de 29 patientes diagnostiquées avec une PE sévère et présentant une thrombocytopénie, une hémolyse et un dysfonctionnement du foie (Weinstein 1982). Ce syndrome est souvent associé à la PE (10 % des cas) mais peut se développer indépendamment de la PE dans certains cas, rendant son diagnostic plus complexe (Jebbink *et al.* 2012). Le retard de croissance intra-utérin, ou IUGR en anglais, est diagnostiqué pour des foetus ayant un poids en dessous du 10e percentile et une circonférence abdominale inférieure au 2,5e percentile par rapport à l'âge gestationnel (Peleg *et al.* 1998). L'IUGR est très fréquemment associé aux cas de PE et HELLP. Un défaut de placentation est associé à ces deux pathologies avec une dérégulation de l'expression des Syncytines. Une première étude réalisée en 2003 a suggéré une diminution de la transcription du gène ERVW-1 dans le syndrome HELLP (Knerr *et al.* 2003). Des analyses comparatives de l'expression de la Syn-1 dans le syndrome HELLP, l'IUGR et la PE ont ensuite montré que la Syn-1 est significativement moins exprimée dans les cultures de CTBv et les placentas issus de femmes présentant une PE combinée au syndrome HELLP ou IUGR. Ces analyses ont finalement établi un lien entre la baisse de syncytialisation des CBTv, la diminution d'expression de la Syn-1 dans les placentas et une hyperméthylation du promoteur du gène ERVW-1 (Langbein *et al.* 2008; Ruebner *et al.* 2010). Bien que peu documentée, l'expression de la Syn-2 est également réduite dans les placentas HELLP et IUGR avec une diminution d'expression qui semble plus importante dans les placentas IUGR comparativement à la Syn-1 (Ruebner *et al.* 2010). Il est intéressant de noter que le récepteur MFSD2a est aussi moins exprimé dans la PE et le syndrome IUGR alors que l'expression des récepteurs SLC1A4 et 5 semble plus stable (Ruebner *et al.* 2010; Toufaily *et al.* 2013).

1.3.4.3.2.3 Autres pathologies

1.3.4.3.2.3.1 Les neuropathologies

Deux protéines rétrovirales de la famille ERV-W, la Syn-1 et une protéine d'enveloppe appelée MSRVenv (Multiple Sclerosis associated Retrovirus envelope protein), sont associées avec la sclérose en plaques, une pathologie neurodégénérative et inflammatoire. Ces deux protéines ne diffèrent que par l'insertion d'une séquence de 12 acides aminés dans la région TM de MSRVenv, et bien que le rôle de chaque enveloppe soit encore discuté, les deux protéines sont exprimées dans le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques (Mameli *et al.* 2009). Concernant le rôle de la Syn-1 dans la pathologie, les études de Antony *et al.* ont montré que 1) la protéine Syn-1 était anormalement exprimée dans le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques et 2) que le contexte pro-inflammatoire de la pathologie entraîne une surexpression de la Syn-1 dans les astrocytes, induisant un stress du réticulum endoplasmique et une production d'espèces réactives de l'oxygène qui diminuent l'expression du récepteur SLC1A4 et altèrent la production de protéines de myéline par les oligodendrocytes (Antony *et al.* 2006; Antony *et al.* 2007). Ces études ne permettent pas encore de dire si l'expression de la Syn-1 est une cause ou une conséquence de la sclérose en plaques, néanmoins l'expression anormale de cette enveloppe rétrovirale endogène dans le cerveau contribue à l'évolution de la pathologie.

1.3.4.3.2.3.2 Les cancers

Plusieurs études ont rapporté l'expression anormale de la Syn-1 dans des cellules cancéreuses comme des carcinomes de l'endomètre utérin, carcinomes mammaire et colorectal, cancer de l'ovaire, leucémies, lymphomes et séminomes du testicule (Menendez *et al.* 2004; Bjerregaard *et al.* 2006; Strick *et al.* 2007; Larsen *et al.* 2009; Trejbalova *et al.* 2011; Yu *et al.* 2014; Sun *et al.* 2016b; Benesova *et al.* 2017; Sun *et al.* 2017). Cette anomalie d'expression a été associée avec une modification de la méthylation des îlots CpG du promoteur du gène ERVW-1, levant l'inhibition

d'expression du gène dans les cellules cancéreuses (Menendez *et al.* 2004; Trejbalova *et al.* 2011; Strissel *et al.* 2012; Benesova *et al.* 2017). À l'inverse, une étude a rapporté une diminution de l'expression de la Syn-1 dû à l'hyperméthylation de son promoteur dans des adénocarcinomes du pancréas, mais l'expression de la Syn-1 dans ce tissu à l'état physiologique reste à confirmer (Lu *et al.* 2015).

De manière surprenante, l'induction de l'expression de la Syn-1 dans les cellules cancéreuses est associée à différents pronostics en fonction des cancers. Par exemple, dans le cancer du sein et du côlon, son expression est associée avec un meilleur pronostic chez les patients alors que c'est l'inverse dans le cas du cancer du rectum (Larsson *et al.* 2007; Larsen *et al.* 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par l'activité fusogénique de la Syn-1. En effet, l'expression de la Syn-1 dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires a été associée avec des événements de fusion entre les cellules cancéreuses et des cellules endothéliales (Bjerregaard *et al.* 2006). De même, la formation de syncytia est également observée dans les adénocarcinomes de l'endomètre et a été liée à l'expression de la Syn-1 dans les cellules tumorales (Strick *et al.* 2007). Sachant que la fusion des cellules tumorales avec des cellules non tumorales peut avoir un effet pro ou antitumoral dépendamment des cancers, les événements de fusion induits par l'expression de la Syn-1 pourraient donc affecter la survie des cellules cancéreuses (Platt *et al.* 2016). Bien que la plupart des études ayant montré une fusion Syn-1-dépendante dans un contexte tumoral n'ont pas étudié les conséquences de cette fusion sur l'évolution des tumeurs, une étude a néanmoins rapporté le potentiel antitumoral de la Syn-1, lorsqu'exprimée dans un modèle cellulaire de mélanomes (Mo *et al.* 2013). Enfin, une autre conséquence possible de l'expression de la Syn-1 dans les cellules tumorales pourrait être celle d'aider les tumeurs à échapper au système immunitaire grâce aux capacités immunorégulatrices de cette protéine (Grandi et Tramontano 2018).

Les études s'étant intéressées à l'expression de la Syn-2 dans les cellules cancéreuses sont moins nombreuses. Néanmoins, on retrouve la surexpression de cette

protéine dans les carcinomes de l'endomètre utérin de stade II et dans les tumeurs d'adénocarcinomes colorectaux (Strissel *et al.* 2012; Diaz-Carballo *et al.* 2015).

Bien que l'implication directe des Syncytines comme cause des cancers et neuropathologies soit discutable, il est aujourd'hui admis que leur expression anormale contribue à l'évolution des pathologies via leurs capacités fusogéniques et immunorégulatrices.

1.3.5 Les protéines Syncytines chez les autres espèces

La conservation de gènes d'enveloppes rétrovirales qui s'expriment dans le placenta n'est pas spécifique à l'humain et les travaux d'une équipe en particulier ont conduit à l'identification de plusieurs protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes acquises indépendamment durant l'évolution chez de nombreuses espèces placentaires. Les chercheurs ont associé trois caractéristiques essentielles pour définir ces protéines comme des 'Syncytines': 1) une activité fusogénique conservée, 2) une expression spécifique dans le placenta et au niveau de cellules fusogéniques et 3) une conservation de séquence au sein d'une espèce. En 2005, deux gènes *env* fonctionnels d'origine rétrovirale ont été identifiés chez les *Muridae*. Ces gènes codent pour les protéines fusogéniques Syncytine-A et -B qui s'expriment au niveau des deux couches de syncytiotrophoblastes, caractéristiques du placenta murin (Dupressoir *et al.* 2005). Des souris homozygotes KO pour les gènes *syncytin-A* et *-B* présentent des défauts de formation de la première et deuxième couche de STB respectivement, avec 100 % de mortalité foetale au jour de développement embryonnaire 14.5 pour les KO Syn-A contre 20 % de mortalité embryonnaire pour les homozygotes Syn-B *-/-*, mais avec des foetus qui présentent un retard de croissance (Dupressoir *et al.* 2009; Dupressoir *et al.* 2011; Vernochet *et al.* 2014). Ces travaux ont ainsi démontré l'importance des Syncytines murines dans le fonctionnement du placenta tout en montrant leur indépendance fonctionnelle. En plus d'une fonction dans le placenta, les Syn-A et -B

seraient nécessaire à la fusion des myoblastes. En effet, la double mutation des gènes *syn-A* et *-B* chez des souris engendre un défaut de développement musculaire et de fusion des myoblastes chez ces mutants (Redelsperger *et al.* 2016).

Depuis la découverte des Syncytines murine, huit nouvelles protéines Syncytines exprimées spécifiquement dans le placenta de plusieurs espèces de vertébrés ont été identifiées: la Syncytine-Ory1 chez les léporidés (Heidmann *et al.* 2009), la protéine non-fusogénique 'type Syncytine' Cav1 et la protéine Syncytine-Mar1 chez les rongeurs hystricomorphes et sciurormorphes respectivement (Vernochet *et al.* 2011; Redelsperger *et al.* 2014), Syncytine-Car1 chez les carnivores (Cornelis *et al.* 2012), Syncytine-Rum1 chez les ruminants (Cornelis *et al.* 2013), Syncytine-Ten1 chez les tenrecidés (Cornelis *et al.* 2014), Syncytine-Opo1 chez les marsupiaux (Cornelis *et al.* 2015) et Syncytine-Mab1 chez les reptiles du genre Mabuya (Cornelis *et al.* 2017). Toutes ces Syncytines présentent des activités fusogéniques et une expression spécifique dans le placenta, suggérant fortement leur implication dans la formation du placenta chez ces différentes espèces.

La découverte de protéines Syncytines chez toutes les espèces analysées qui possèdent un placenta a amené les chercheurs à formuler l'hypothèse d'un lien entre l'apparition de ce mode de développement embryonnaire et l'acquisition d'une protéine d'enveloppe rétrovirale ancestrale (Cornelis *et al.* 2017). Aussi, il est suggéré que plusieurs enveloppes endogènes se seraient succédé durant l'évolution dans le placenta des différentes espèces, certaines étant remplacées par les nouvelles enveloppes, d'autres étant conservées mais évoluant dans leurs fonctions. Cette théorie du « passage de relais » entre les enveloppes endogènes rétrovirales est aujourd'hui proposée comme explication de l'évolution et de la diversification du placenta ainsi que de la présence de plusieurs enveloppes fonctionnelles qui s'expriment dans le placenta d'une espèce (Imakawa *et al.* 2015).

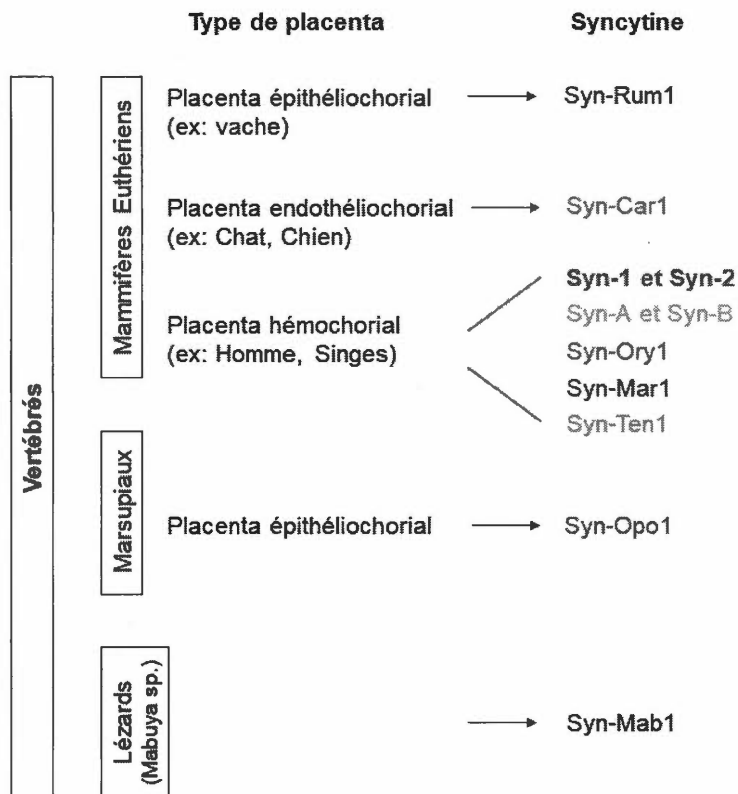


Figure 1.11: Les différentes protéines Syncytines identifiées dans les placentas des vertébrés.

Schéma représentatif des protéines de type 'Syncytine' identifiées dans différentes espèces de vertébrés et de placentas.

1.3.6 Les autres protéines rétrovirales endogènes humaines dans le placenta

En 2003, l'équipe du Dr Heidmann s'intéresse aux gènes *env* d'origine rétrovirale présents dans le génome humain et identifie 16 gènes potentiellement actifs (de Parseval *et al.* 2003). Cette étude va permettre l'identification de la Syn-2 comme il a été présenté précédemment, mais va aussi mettre en lumière d'autres gènes *env* dont les transcrits sont exprimés dans le placenta. Dans ce tissu, le rétrovirus endogène

ERV-R (ou ERV-3) présente un nombre important de transcrits, mais des travaux avaient précédemment rapporté la présence d'un polymorphisme chez 1% de la population caucasienne qui occasionne l'apparition d'un codon-stop précoce dans la protéine EnvR. Cette mutation est sans conséquence sur la gestation, semblant indiquer que cette enveloppe endogène n'est pas essentielle dans la fonction placentaire (de Parseval et Heidmann 1998). En 2004, la découverte de 42 nouvelles séquences de ERV dans le génome humain permet d'identifier deux nouveaux gènes d'enveloppes rétrovirales endogènes qui présentent des homologies de séquences avec ERV-FRD et un rétrovirus endogène du poisson-zèbre (Villesen *et al.* 2004). L'analyse des séquences PBS dans les régions 5'LTR de ces gènes a identifié les ARNt-Valine (V) et -Proline (P) comme les ARNt initiateurs des rétrovirus ancestraux et les deux gènes *env* nouvellement identifiés ont été renommés *envV* et *envP(b)*, respectivement (Blaise *et al.* 2005). EnvV est la protéine d'enveloppe du provirus ERV-V situé sur le chromosome 19 et EnvP(b) est la protéine d'enveloppe du provirus ERV-P(b) localisé sur le chromosome 14 (Villesen *et al.* 2004). Les rétrovirus endogènes ERV-V et ERV-P(b) sont tous deux exprimés dans le placenta avec une expression spécifique dans ce tissu pour ERV-V, mais seule la protéine EnvP(b) semble posséder une activité fusogénique (Blaise *et al.* 2005). Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont ensuite montré que, bien que les deux gènes soient induits lors de la syncytialisation des cellules BeWo, leur expression n'est pas essentielle à la fusion de ces dernières contrairement au gène codant la Syn-2 (Vargas *et al.* 2012). Les deux protéines EnvV et EnvP(b) s'expriment dans le placenta et les cellules trophoblastiques, il est néanmoins possible qu'elles possèdent un rôle dans l'immuno-tolérance foeto-maternel car elles possèdent des domaines immunosuppresseurs fonctionnels (Mangeney *et al.* 2007).

En conclusion, les rétrovirus endogènes contribuent à l'évolution des génomes de nombreuses espèces et certains ERVs ont conservé l'expression de leur gène *env* dans

le placenta. Chez l'humain, les glycoprotéines d'enveloppes Syn-1 et -2 participent largement à la fonction du placenta grâce à leurs propriétés fusogéniques et immunorégulatrices. Ces protéines contribuent aussi à la fonction d'autres tissus, aussi bien par une expression dans ces tissus, mais aussi par leur localisation dans des petites vésicules membranaires libérées dans le milieu extracellulaire par le placenta tout au long de la grossesse.

1.4 Les vésicules extracellulaires

Le terme vésicule extracellulaire (VE) regroupe l'ensemble des vésicules libérées par les cellules dans le milieu extracellulaire. Les VE sont classées en trois catégories en fonction de leur compartiment cellulaire d'origine et de leur taille: les corps apoptotiques, les microvésicules et les exosomes (Mathivanan *et al.* 2010; Colombo *et al.* 2014; Maas *et al.* 2017). Les VE ont largement été décrites comme ayant des fonctions majeures dans la communication intercellulaire aussi bien dans des cellules normales que tumorales. Une attention particulière a été portée aux exosomes en tant que messagers intercellulaires, mais les limitations techniques pour isoler ces vésicules des microvésicules de tailles similaires ainsi que l'absence de marqueurs spécifiques pour chaque type de vésicules rend difficile l'attribution de fonctions distinctes à un type vésiculaire. Il est maintenant conseillé d'utiliser le terme général de VE dans les études plutôt que 'exosomes' ou 'microvésicules' (Tkach *et al.* 2017; Tkach *et al.* 2018). Dans cette section seront présentés les trois types de VE avec une attention particulière pour les microvésicules et exosomes. Les fonctions biologiques associées aux vésicules seront aussi regroupées sous le terme général de VE.

1.4.1 Les corps apoptotiques

Les cellules en apoptose vont éliminer leur matériel génétique et cytoplasmique dans le milieu extracellulaire sous la forme de larges vésicules qui contiennent des

fractions de cytoplasme, des fragments d'ADN et parfois certaines organelles (Maas *et al.* 2017). Ces vésicules sont appelées corps apoptotiques et ont une taille généralement comprise entre 1 μm et 5 μm mais peuvent aussi présenter une taille inférieure à 1 μm (Akers *et al.* 2013). Les corps apoptotiques sont éliminés du milieu extracellulaire par les macrophages qui reconnaissent certaines molécules présentes à leur surface et qui permettent leur élimination par phagocytose (Akers *et al.* 2013).

1.4.2 Les microvésicules

Les microvésicules (MV) sont les vésicules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique de certaines cellules. La taille des MV est comprise entre 20-30 nm jusqu'à 500-1000 nm (Colombo *et al.* 2014; Maas *et al.* 2017). La capacité des cellules à libérer des vésicules dans le milieu extracellulaire via le bourgeonnement de leur membrane est connue depuis de nombreuses années et a été d'abord décrite dans les plaquettes et les érythrocytes (Wolf 1967; Schrier *et al.* 1971; Dalton 1975; Shukla *et al.* 1978; Allan et Thomas 1981; Trams *et al.* 1981). Les MV ont également été isolées de fluides corporels tels que le sang, le sérum et le liquide synovial (Gyorgy *et al.* 2012; Krafft *et al.* 2017; Menck *et al.* 2017). Les travaux de Daveloose *et al.* ont montré que les MV libérées par les érythrocytes peuvent être internalisées dans les plaquettes et empêcher leur agrégation, agglutination, ce qui suggère une activité biologique potentielle pour ces vésicules (Daveloose *et al.* 1981). Les MV ont aussi été isolées de nombreuse biopsie de cancers (Huber *et al.* 2005). Les mécanismes moléculaires qui permettent la formation et la libération des MV à la membrane plasmique ne sont pas encore élucidés, mais ce processus semble dépendre de certaines protéines du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport), du réarrangement lipidique de la membrane, du flu calcique et de protéines du cytosquelette (Allan et Thomas 1981; Allan *et al.* 1982; Fox *et al.* 1990; Crawford *et al.* 2010; Maas *et al.* 2017).

1.4.3 Les exosomes

Les exosomes sont des petites vésicules d'une taille généralement comprise entre 30 et 100 nm qui se distinguent des autres vésicules de par leur origine endosomale. Le terme 'exosome' apparaît dans la publication de Trams et al. en 1981 lors de la caractérisation de microvésicules issues de différents types cellulaires. Dans ces travaux, les chercheurs décrivent l'isolation de deux populations de vésicules extracellulaires en se basant sur la taille des vésicules: une population d'une taille moyenne comprise entre 500 et 1000 nm et une autre avec des vésicules d'environ 40 nm. Néanmoins, l'origine membranaire ou endosomale de ces vésicules n'est pas déterminée (Trams *et al.* 1981). La découverte des exosomes comme on les définit actuellement est attribuée aux équipes de recherche qui ont étudié la maturation des réticulocytes et l'internalisation du récepteur de la transferrine. Ces travaux ont montré que lors de la maturation des réticulocytes, le récepteur de la transferrine est éliminé vers le milieu extracellulaire via la formation d'endosomes multivésiculaires qui fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les petites vésicules intraluminales qu'ils contiennent (Harding *et al.* 1983; Pan et Johnstone 1983; Johnstone *et al.* 1987). Le terme 'exosome' a été proposé pour ces vésicules. En 1996, Raposo et al. rapportent la sécrétion d'exosomes porteurs des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) par des lymphocytes B (Raposo *et al.* 1996). Depuis, les exosomes ont fait l'objet de nombreuses études et ont été associés à tous les types cellulaires et à de nombreux fluides corporels (e.g. sang, urine, liquides synovial, séminal, amniotique et salivaire) (Colombo *et al.* 2014).

Comme mentionné plus haut, les exosomes sont originaires du compartiment endosomal. La Figure 1.12 présente la synthèse des exosomes. Certains endosomes vont présenter une invagination intraluminaire de leur membrane menant à la formation de vésicules intraluminales (VIL). Ces endosomes sont appelés des corps multivésiculaires (CMV) et certains vont aller fusionner avec la membrane plasmique,

ce qui libère les VIL dans l'espace extracellulaire. Une fois sécrétées, les VIL sont appelées exosomes. Tous les CMV ne vont pas fusionner avec la membrane plasmique et certains sont plutôt dirigés vers la voie de dégradation lysosomale. Il semblerait donc exister différentes populations de CMV dans les cellules (Mathivanan *et al.* 2010; Kowal *et al.* 2014). En revanche, les mécanismes moléculaires qui adressent les CMV vers la membrane plasmique plutôt que vers la dégradation sont encore inconnus. Plusieurs protéines sont impliquées dans la voie de synthèse et de sécrétion des exosomes. Les protéines du complexe ESCRT et les tétraspanines semblent importantes pour la formation des CMVs alors que certaines protéines Rab GTPases, des protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*) et les protéines SNARE semblent diriger la fusion des CMVs avec la membrane plasmique (Kowal *et al.* 2014).

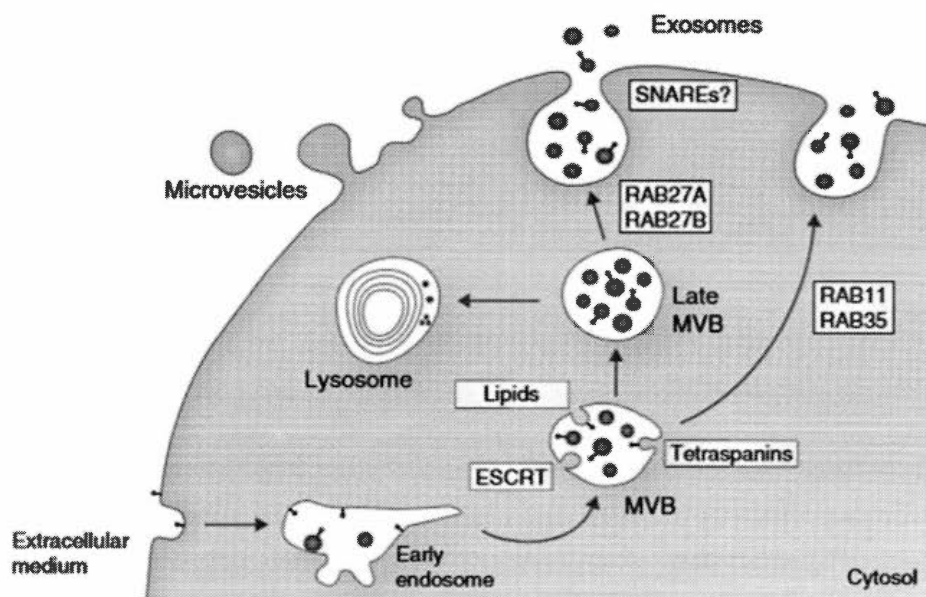


Figure 1.12: La voie de synthèse des exosomes.

Certains endosomes vont former des corps multivésiculaires (MVB pour *Multivesicular body*) par invagination de leur membrane. Les corps multivésiculaires

contenant des petites vésicules intraluminales vont soit fusionner avec les lysosomes, soit être acheminés vers la membrane plasmique où ils libèrent les vésicules, appelées exosomes. Les encadrés indiquent les différents acteurs moléculaires impliqués dans la voie de synthèse des exosomes. Issue de Kowal *et al.*, 2014.

1.4.4 La voie d'internalisation des vésicules extracellulaires dans les cellules

Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, les VE peuvent interagir localement avec les cellules ou gagner la circulation et agir de manière systémique (Colombo *et al.* 2014). Les VE expriment différentes protéines à leur surface comme des intégrines, des ligands ou récepteurs et celles-ci permettraient la liaison des VE aux membranes cellulaires. De plus, les VE portent des protéines glycosylées et les glycans qui composent les chaînes de glycosylations peuvent être différemment reconnus par des lectines cellulaires, une large famille de protéines qui se lient aux oligosaccharides. Ainsi, en fonction des protéines exprimées à la surface des VE, celles-ci vont interagir avec différentes populations de cellules et avoir un certain tropisme cellulaire (Yanez-Mo *et al.* 2015). Un bon exemple pour illustrer ceci est l'expression des protéines rétrovirales endogènes Syn-1 et -2 à la surface des VE placentaires. En effet, ces deux protéines sont internalisées dans les VE issues de cultures de CTBv et leur expression à la surface des VE permet en partie leur internalisation dans des cellules BeWo qui expriment leurs récepteurs respectifs (Vargas *et al.* 2014). L'association des Syncytines avec les VE placentaires pourrait donc faciliter l'internalisation de ces VE dans les cellules trophoblastiques ou d'autres cellules qui expriment les protéines SLC1A4, SLC1A5 et MFSD2a (Figure 1.13). Rappelons aussi que ces deux protéines sont glycosylées et que les glycans pourraient être reconnus par des lectines membranaires, facilitant l'attachement des VE à la surface des cellules. Suite à leur liaison avec la membrane cellulaire, les VE vont être majoritairement internalisées par voie d'endocytose ou de phagocytose, et la fusion entre les membranes des VE et des

vacuoles a semble-t-il lieu plus tard, dans un environnement acide (Yanez-Mo *et al.* 2015).

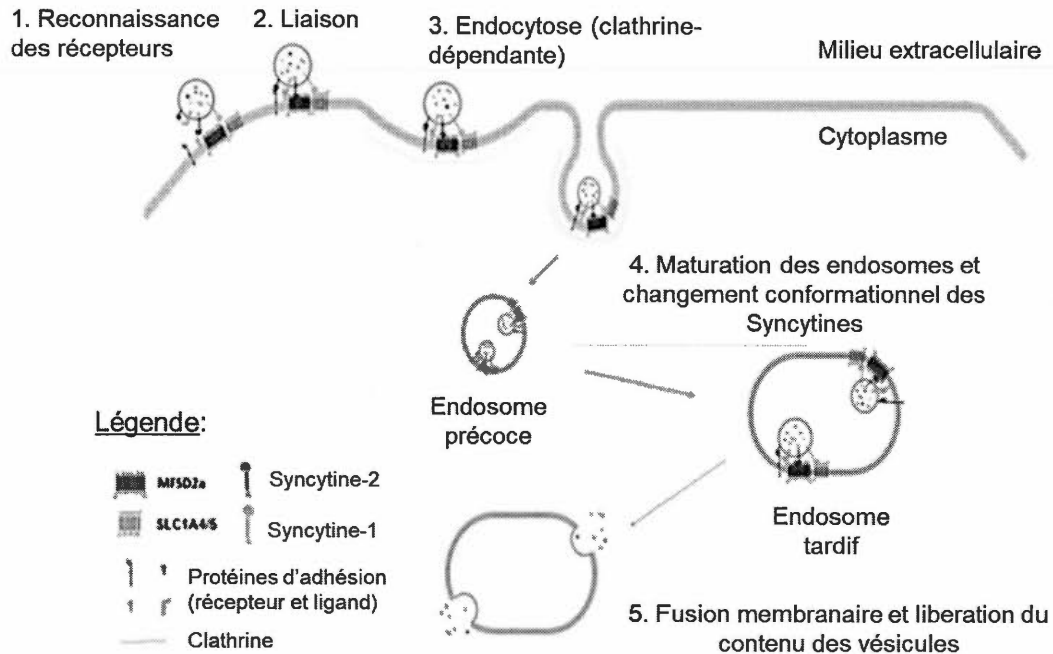


Figure 1.13: Rôle potentiel des protéines Syncytine-1 et -2 dans l'internalisation des vésicules extracellulaires dans les cellules.

Schéma descriptif de l'attachement (étapes 1 et 2) et de l'internalisation par endocytose (étapes 3 à 5) des vésicules extracellulaires médié par les Syncytines. Adapté de Lokossou *et al.*, 2014.

1.4.5 La fonction des vésicules extracellulaires

La majorité des fonctions biologiques associées aux VE a d'abord été attribuée aux exosomes, mais selon les recommandations de la société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV), il est recommandé de décrire les fonctions

biologiques initialement rapportées aux exosomes comme étant attribuées aux VE. Les VE ont d'abord été décrites comme un moyen pour les cellules d'éliminer certaines protéines au cours de leur maturation. En effet, lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes, les protéines membranaires inutiles au fonctionnement des érythrocytes sont éliminées via la sécrétion de vésicules dans le milieu extracellulaire (Johnstone *et al.* 1991). Puis la découverte de VE libérées par d'autres types cellulaires dont des cellules immunitaires a élargi le rôle de ces vésicules qui sont maintenant reconnues comme un moyen de communication cellulaire locale et systémique, indépendant du contact cellule-cellule.

1.4.5.1 La communication intercellulaire

Les VE transportent plusieurs types de protéines qui sont associées à leur membrane ou contenues dans leur lumière. La compilation des études ayant analysé le contenu protéique des VE issues de différent type cellulaire a permis de déterminer que la composition des VE en protéines dépend des cellules dont elles sont issues. Néanmoins, ces analyses ont aussi révélé la présence récurrente des certaines protéines qui seraient en fait impliquées dans la voie de synthèse des VE (Colombo *et al.* 2014). Parmi ces protéines, on trouve des tétraspanines (CD63, CD9, CD81), des petites protéines Rab GTPase (Rab5, Rab7), des protéines de choc thermique (Hsp70), des protéines du cytosquelette (actine, tubuline) et des enzymes (acétylcholine estérase) (Colombo *et al.* 2014). La communication intercellulaire via les VE repose sur deux mécanismes.

Le premier est la présence de protéines de signalisation à la membrane des vésicules qui peuvent moduler la maturation, la prolifération et l'activité des cellules qui captent ces VE et ceci a été particulièrement étudié dans le contexte du système immunitaire. Par exemple, les VE issues des certaines cellules tumorales expriment les ligands de NKG2D et le TGF β 1 à leur surface et diminuent l'expression du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques, empêchant

l'activation de ces cellules immunitaires (Clayton *et al.* 2008). Aussi, des VE issues de lymphocytes B présentent des molécules du CMH-II et se lient à la surface de cellules dendritiques, pouvant ainsi activer ces cellules (Denzler *et al.* 2000). Il a ensuite été montré que des VE issues de cellules dendritiques peuvent exposer à leur surface des molécules du CMH-II couplées avec un antigène et transférer ces complexes moléculaires à d'autres cellules dendritiques qui activent finalement des lymphocytes T (Thery *et al.* 2002).

Le deuxième mécanisme implique le transfert de protéines après l'internalisation et la libération du contenu des VE dans le cytosol. Par exemple, les VE isolées du sang transportent le récepteur nucléaire PPAR γ impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes dans les adipocytes et cellules immunitaires et peuvent potentiellement transférer ce récepteur aux cellules (Looze *et al.* 2009). Dans le cas du cancer de la prostate et des glioblastomes, l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 6$ et du récepteur mutant au facteur de croissance épidermique EGFRvIII est respectivement associée avec une capacité métastatique accrue et à la transformation des cellules. Dans les deux cas, un transfert de ces protéines dépendant des VE a été montré entre cellules cancéreuses qui les expriment vers des cellules cancéreuses qui ne les expriment pas et est associé avec une augmentation de la migration des cellules et avec l'activation de voies de signalisation oncogéniques (Al-Nedawi *et al.* 2008; Fedele *et al.* 2015). Enfin, le transfert de VE a pu être observé *in vivo* par l'utilisation de la protéine rapporteur luciférase fusionnée avec un domaine transmembranaire. Cette protéine chimère, exprimée à la surface des cellules et internalisée dans les VE, a été transférée dans différents tissus chez des souris après injection des VE chez les animaux (Lai *et al.* 2014).

En plus du transport de protéines, les VE contiennent différentes molécules d'ARN fonctionnels qui semblent spécifiquement adressées aux VE. Une première étude s'intéressant au contenu des VE en ARN a montré la présence et l'enrichissement

spécifique de plusieurs molécules d'ARNm et microARN dans les VE libérées par des cellules humaines et murines. Des expériences de traduction *in vitro* ont ensuite montré que ces ARNm vésiculaires sont fonctionnels, ce qui a été confirmé par la synthèse de protéines murines dans des cellules humaines suite à leur incubation avec des VE d'origine murine porteuses des ARNm correspondants, mais pas des protéines (Valadi *et al.* 2007). Aussi, plusieurs molécules de microARNs différents ont été identifiées dans les VE isolées du sang avec une différence notable de la composition en microARNs des VE et des cellules sanguines productrices (Hunter *et al.* 2008). Certains mécanismes permettant une internalisation spécifique des ARN dans les VE ont été identifiés et impliquent des séquences consensus sur les molécules d'ARN et des facteurs cellulaires (Yanez-Mo *et al.* 2015). Il a en effet été observé que la combinaison de trois séquences dans la région 3' ainsi que la structure secondaire des ARN était associée avec leur adressage spécifique aux VE (Batagov *et al.* 2011). Également, une protéine sumoylée qui se lie spécifiquement aux ARN permettrait une internalisation de certains microARN dans les VE (Villarroya-Beltri *et al.* 2013). Un système très ingénieux a permis de montrer le transfert d'ARNm dans un contexte *in vivo* en utilisant des souris génétiquement modifiées qui expriment l'enzyme recombinase Cre sous la dépendance d'un promoteur cellulaire spécifique des cellules hématopoïétiques et des cassettes loxP-Stop-loxP-GFP. Ainsi, les auteurs ont pu observer la communication VE-dépendante entre les cellules hématopoïétiques et neuronales par l'apparition de fluorescence dans ces cellules non-hématopoïétiques et ont montré que ces événements de recombinaisons dans les neurones faisaient suite au transfert des ARNm Cre et non de la protéine par les VE (Ridder *et al.* 2014). Depuis, de très nombreuses analyses transcriptomiques ont été réalisées sur les VE de différentes origines (lignées cellulaires, cellules primaires, fluides corporels) et les données de ces analyses ont été regroupées dans des bases de données (Tkach *et al.* 2017).

Les VE ont également une composition lipidique particulière. Leur membrane est enrichie en cholestérol, sphingolipides et céramides, des lipides retrouvés principalement au niveau des rafts lipidiques (Yanez-Mo *et al.* 2015). Certaines VE sont enrichies en lysophosphatidylcholine et prostaglandines et le transfert de lipides et lipoprotéines entre les VE et les cellules a été décrit (Subra *et al.* 2007; Subra *et al.* 2010; Yanez-Mo *et al.* 2015).

Au final, de nombreuses molécules actives ont été identifiées dans les VE issues de différents tissus et types cellulaires, dont des enzymes, des transporteurs, des protéines du cytosquelette cellulaire, des lipides et des ARN codants et non-codants (Simpson *et al.* 2012; Colombo *et al.* 2014; Maas *et al.* 2017). Toutes les données recueillies par les analyses protéomiques, transcriptomiques et lipidomiques sont maintenant regroupées dans la base de données EVpedia (Kim *et al.* 2013).

1.4.5.2 La modulation du système immunitaire

De nombreuses recherches ont attribué une fonction immunorégulatrice aux VE avec des effets très variés en fonction de l'origine de ces vésicules, des cellules qui interagissent avec / internalisent les VE et du contexte physiologique ou pathologique (cancers, infections) ayant conduit à leur libération. La majorité des cellules de l'immunité innée ou acquise sécrètent des VE, ce qui a largement été décrit pour les macrophages, les cellules NK, les mastocytes, les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes (Yanez-Mo *et al.* 2015). En effet, les VE issues de lymphocytes B sont pourvues d'une activité de présentation d'antigènes grâce à la présence de molécules du CMH-II et sont capables d'activer des lymphocytes T (Raposo *et al.* 1996). En 1998, Zitvogel *et al.* montrent la libération de VE porteuses de molécules CMH-I et -II par des cellules dendritiques capables de réduire la progression tumorale chez la souris via l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (Zitvogel *et al.* 1998). D'autres études ont démontré la capacité présentatrice d'antigènes des VE sécrétées par les cellules

dendritiques (Thery *et al.* 1999; Thery *et al.* 2002). De même, les VE produites par des mastocytes peuvent présenter des antigènes aux cellules dendritiques et induire leur maturation afin de stimuler la production d'anticorps dirigés contre les antigènes (Skokos *et al.* 2001). Enfin, l'activation des lymphocytes T conduit à la libération de VE qui expriment des molécules d'adhésions et activatrices, suggérant une activité immunorégulatrice de la part de ces vésicules (Blanchard *et al.* 2002). Dans un contexte pathologique, les VE peuvent activer ou inhiber la réponse immunitaire permettant soit de lutter contre le développement de tumeurs ou d'infection, soit d'aider les cellules tumorales ou infectées d'échapper à la réponse immunitaire. Par exemple, les VE issues de cellules infectées avec les bactéries *Mycobacterium bovis* et *tuberculosis* induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages qui activent les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et recrutent d'autres cellules immunitaires au site d'infection (Giri et Schorey 2008; Singh *et al.* 2012). Aussi, les VE issues de cellules tumorales peuvent contribuer à l'évasion immunitaire des cellules tumorales via l'expression d'enzymes ou de protéines qui vont inhiber l'activation des cellules NK et des lymphocytes T (Clayton *et al.* 2008; Clayton *et al.* 2011; Grange *et al.* 2011). En plus d'inhiber la réponse immunitaire, les VE tumorales peuvent activer l'angiogenèse dans l'environnement tumoral et diriger l'établissement de niche pré-métastatique dans d'autres tissus (Skog *et al.* 2008; Grange *et al.* 2011; Hoshino *et al.* 2015). Dans le cas d'infection virales, les VE peuvent contribuer à la dissémination de l'infection. Ceci est particulièrement étudié avec le rétrovirus VIH-1 qui peut recruter le complexe ESCRT pour favoriser la formation de virions dans les cellules infectées, exporter certaines protéines et ARN viraux dans les VE afin de moduler la réponse immunitaire ou induire l'export de son corécepteur CCR5 via les VE vers des cellules qui n'expriment normalement pas cette protéine et augmenter son tropisme cellulaire (Mack *et al.* 2000; Stuchell *et al.* 2004; Booth *et al.* 2006; Lenassi *et al.* 2010; Sampey *et al.* 2016).

1.4.5.3 Biomarqueurs de pathologies

Comme la composition moléculaire des VE varie en fonction du type cellulaire d'origine et qu'elles sont libérées dans plusieurs liquides corporels, dont le sang, de nombreux chercheurs se sont intéressés au potentiel des VE en tant qu'outil diagnostique. En effet, l'analyse des profils protéomique et transcriptomique spécifique aux VE issues de cellules cancéreuses a permis d'identifier des marqueurs potentiels de cancers comme les cancers de l'appareil urinaire, de la prostate, du sein et des ovaires et un intérêt particulier est porté aux microARN dont plusieurs sont spécifiquement sécrétés par des VE tumorales (Bard *et al.* 2004; Taylor et Gercel-Taylor 2008; Murakami *et al.* 2018). De nombreuses équipes de recherche travaillent maintenant à l'harmonisation des techniques d'isolement des VE et au développement d'outils diagnostiques pour ces cancers (Wang *et al.* 2018). Dans le cas de pathologies neurodégénératives, les VE présentent un intérêt potentiel pour détecter l'évolution des maladies (Croese et Furlan 2018). Enfin, durant la grossesse, des VE sont sécrétées par le placenta et peuvent être détectées dans la circulation sanguine. Leur composition peut également varier en cas de pathologies obstétriques, ce qui sera détaillé dans la section suivante.

1.4.6 Les vésicules extracellulaires placentaires

Le placenta est une source importante de VE durant la grossesse et comprend des corps apoptotiques, des microvésicules et des exosomes. Ces vésicules sont appelées VE placentaires et sont distinguées des autres VE par l'expression de la phosphatase alcaline placentaire (PLAP) qui est ancrée dans la membrane des VE par une liaison GPI (phosphatidyl inositol) et qui permet d'isoler spécifiquement ces VE (Sabapatha *et al.* 2006; Mincheva-Nilsson et Baranov 2014; Salomon *et al.* 2014b). Les VE placentaires sont majoritairement issues du STB et libérées au niveau de la membrane apicale du STB dans l'espace intervilloux et donc dans le sang maternel qui

irrigue cet espace (Mincheva-Nilsson et Baranov 2014). Les VE placentaires sont aussi libérées par les CTBev qui sont identifiées par l'expression de la molécule non classique du CMH-I HLA-G (Atay *et al.* 2011; Salomon *et al.* 2014a). Plusieurs études ont montré que le nombre de VE dans le sang augmente avec la grossesse, que cette augmentation est croissante à mesure que la grossesse avance et que les VE placentaires peuvent être détectées dès la 6^{ème} semaine de grossesse dans le sang périphérique (Sabapatha *et al.* 2006; Salomon *et al.* 2014b; Sarker *et al.* 2014).

Les fonctions des VE placentaires sont multiples et contribuent à l'adaptation du système immunitaire à la grossesse (immunorégulation et tolérance immunitaire), à la migration des CTBev et au remodelage des artérioles spiralées (Escudero *et al.* 2016). Les VE placentaires expriment en effet des molécules qui régulent l'activation des cellules NK et des lymphocytes T (Sabapatha *et al.* 2006; Hedlund *et al.* 2009; Stenqvist *et al.* 2013). De manière très intéressante, des études ont montré l'expression de la Syn-1 dans les VE placentaires et proposent un rôle immunorégulateur des VE grâce à la présence de la Syn-1 avec un rôle immunosuppresseur ou pro-inflammatoire (Holder *et al.* 2012b; Tolosa *et al.* 2012). Aussi, les VE issues de trophoblastes au premier trimestre de la grossesse permettraient le recrutement de monocytes et macrophages au site d'implantation pour aider à l'invasion des trophoblastes dans la décidue (Atay *et al.* 2011). Une deuxième fonction attribuée aux VE placentaires est la modification de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales et vasculaires. Des études ont montré que l'incubation de VE placentaires avec des cellules endothéliales HUVEC inhibe leur prolifération (Gupta *et al.* 2005; Hoegh *et al.* 2006; Chen *et al.* 2012). Également, les VE placentaires isolées du sang périphérique et de lignées de CTBev stimulent la migration des cellules endothéliales et des cellules vasculaires de muscle lisse respectivement, ce qui aiderait à l'adaptation des vaisseaux sanguins maternels à la grossesse et au remodelage des artérioles spiralées dans la décidue par les CTBev (Salomon *et al.* 2014c; Salomon *et al.* 2014a).

L'activité des VE placentaires est en partie associée à l'internalisation de plusieurs microARN placentaires et au transfert de ces molécules à d'autres cellules. En effet, une étude a établi le profil d'expression de microARN dans le placenta et a montré la présence de certains de ces microARN dans les VE placentaires circulantes (Luo *et al.* 2009). Plusieurs cytokines, facteurs de croissance et facteurs angiogéniques ont finalement été identifiés dans les VE placentaires, ce qui pourrait expliquer leurs effets sur les cellules immunitaires et endothéliales (Fitzgerald *et al.* 2018).

Les VE placentaires sont aussi impliquées dans l'évolution de la PE. Plusieurs études ont montré que le nombre de débris membranaires issus du STB et celui des VE placentaires dans le sang est significativement augmenté dans les cas de PE, particulièrement dans les cas de PE précoces (Knight *et al.* 1998; Goswami *et al.* 2006; Chen *et al.* 2012; Pillay *et al.* 2016; Salomon *et al.* 2017). L'augmentation du nombre de VE placentaires pourrait s'expliquer par les conditions hypoxiques dans le placenta pré-éclamptique, car ces conditions augmentent la libération de VE dans plusieurs modèles cellulaires, dont des cultures de CTB (Salomon *et al.* 2013a). Les VE placentaires libérées dans les cas de PE présentent une composition différente en protéines, lipides et microARN et ces différences pourraient expliquer la réponse inflammatoire exacerbée et les défauts d'angiogenèse associés avec la PE (Escudero *et al.* 2016; Cronqvist *et al.* 2017; Gohner *et al.* 2017). Les travaux de Holder *et al.* ont en effet montré une activité pro-inflammatoire des VE placentaires isolées chez des femmes atteintes de PE sur des cellules mononuclées du sang périphérique, mais aucun mécanisme moléculaire n'a été associé à cet effet (Holder *et al.* 2012a). Une étude globale sur la composition lipidique des VE placentaires a montré une variation significative de lipides impliqués dans l'apoptose et la régulation des cellules immunitaires dans les VE issues de placentas pré-éclamptiques comparativement aux VE placentaires contrôles, suggérant une activité différente des VE en cas de PE (Baig *et al.* 2013). Concernant l'effet des VE placentaires sur les fonctions des cellules

endothéliales, certaines études rapportent des différences d'internalisation de facteurs régulateurs de l'angiogenèse entre VE issues de grossesses normales et pré-éclamptiques. L'export du récepteur soluble au VEGF de type 1, sFlt1, dans les VE est augmenté dans les cas de PE, ce qui est associé avec les défauts d'angiogenèse observés dans la PE (Lok *et al.* 2008). Aussi, plusieurs microARN impliqués dans la régulation de gènes pro- et anti-angiogéniques sont différemment exprimés dans les VE placentaires de pré-éclampsie (Escudero *et al.* 2016).

En raison des différences moléculaires trouvées entre les VE placentaires normales et pathologiques, les VE font aussi l'objet d'études sur leur potentiel en tant qu'outil diagnostic dans les pathologies obstétriques (Guarino *et al.* 2018). De plus, les VE placentaires étant détectées très tôt dans la circulation sanguine maternelle, l'analyse de ces VE et la recherche de marqueur potentiel d'une dysfonction placentaire peuvent se faire de manière non invasive, dans les prélèvements sanguins de routine dès le premier trimestre de grossesse. Dans le cas de la PE, la quantification du facteur de croissance placentaire PlGF et des molécules angiogéniques solubles sFlt1 et sEndoglin dans le sang des femmes enceintes suscite un intérêt particulier pour le diagnostic de cette pathologie, mais de récentes études montrent que le pouvoir diagnostic de ces marqueurs varie entre les études et ne sont pas exclusivement associés à la PE (Stolz *et al.* 2018; Yusuf *et al.* 2018).

Un marqueur intéressant pour le diagnostic de la PE pourrait être la protéine Syn-2. En effet, son expression est significativement diminuée dans les placentas de femmes pré-éclamptiques et elle est exprimée à la surface des VE placentaires. De plus, une diminution significative de la Syn-2 est aussi observée dans les VE isolées du sang périphérique chez des femmes pré-éclamptiques (Vargas *et al.* 2014). Il est donc possible que, combiné avec d'autres facteurs de risques, les niveaux d'expression de la Syn-2 dans les VE placentaires circulantes permettent d'identifier le risque de développer une PE chez les femmes enceintes (Lokossou *et al.* 2014). Des travaux sont

menés au laboratoire en collaboration avec l'hôpital Sainte-Justine afin de déterminer le potentiel de la Syn-2 comme outil diagnostique.

En conclusion, le VE sont des acteurs importants de la physiologie cellulaire, avec le transport d'une multitude de biomolécules entre les cellules, et représentent une source d'information sur l'état des cellules qui les produisent. Le placenta est une source importante de VE durant la grossesse et les VE placentaires participent au développement du placenta et du fœtus en assurant la communication entre les cellules au sein du tissu placentaire, mais aussi entre le placenta et de nombreux types cellulaires de l'organisme. L'internalisation des VE dans les cellules est un processus qui semble impliquer différentes protéines à la surface des VE et des cellules cibles. Dans le cas des VE placentaires, l'expression des protéines Syn-1 et -2 à la surface des vésicules pourrait participer à l'entrée des VE dans certaines cellules grâce à l'interaction avec leurs récepteurs cellulaires. La présence de glycans sur les Syncytines pourrait également contribuer à l'internalisation des VE placentaires dans les cellules grâce à la liaison de certaines lectines cellulaires, par exemple les galectines, sur ces glycans.

1.5 Les galectines

Les galectines, anciennement connues sous le nom de lectines de type S, sont des protéines qui appartiennent à la grande famille des protéines liant des glycans. Afin de mieux comprendre le mode de fonctionnement de ces lectines, une brève présentation ciblée sur la N- et O-glycosylation des protéines amorce cette partie de l'introduction.

1.5.1 La N- et O-glycosylation des protéines chez les organismes eucaryotes

Chez les eucaryotes, la glycosylation des protéines est une modification post-traductionnelle des protéines membranaires et sécrétées. La glycosylation d'une protéine consiste en l'ajout d'oligo- ou polysaccharides sur certains acides aminés polaires qui composent la protéine. Il existe deux types de glycosylation, la N- et O-glycosylation, dépendamment de l'acide aminé qui sera porteur de la glycosylation. Les N-glycosylations sont liées au groupement amine terminal (-NH₂) de l'acide aminé Asparagine (Asn). Les O-glycosylations sont ajoutées sur les groupements hydroxyles (-OH) des acides aminés Sérine (Ser) ou Thréonine (Thr) d'une protéine (Stanley *et al.* 2009; Brockhausen et Stanley 2015).

La N-glycosylation des protéines commence dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) lorsque les protéines porteuses d'un peptide signal sont adressées à ce compartiment. Seuls les résidus Asn situés dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr seront reconnus comme site de glycosylation. La N-glycosylation consiste au transfert d'un oligosaccharide précurseur sur l'Asn. Cet oligosaccharide est assemblé dans le RE par addition successive de deux N-acétyl-glucosamine, neuf mannoses et trois glucoses (GlcNAc₂Man₉Glc₃) sur un lipide ancré dans la membrane du RE appelé Dol-P. L'oligosaccharide précurseur est finalement lié au groupement -NH₂ de l'Asn par l'enzyme oligosaccharide transférase. Cet oligosaccharide va ensuite être modifié à plusieurs reprises sous l'action de différentes enzymes au cours du transit de la protéine dans le RE, le Golgi et le réseau transgolgien. Ces modifications vont donner naissance à trois types de N-glycans (simples, complexes et hybrides) qui se distinguent en fonction de leur composition en glucides et du nombre d'embranchements. Les N-glycans peuvent ensuite être modifiés par l'ajout de fucose, d'acide sialique, de sulfate et de galactose sur différents résidus glucidiques qui composent l'oligosaccharide N-lié, ajoutant un niveau de complexité supérieur dans la

structure des glycosylations (Figure 1.14). Toutes ces modifications permettent d'avoir une large diversité de glycosylation des protéines (Stanley *et al.* 2009).

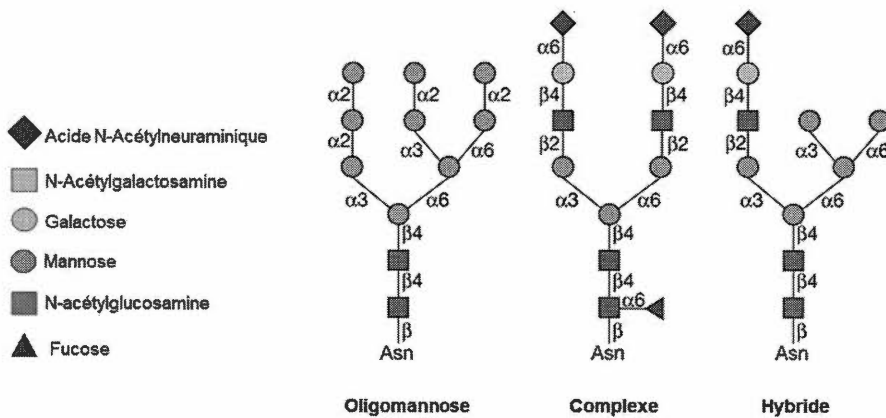


Figure 1.14: Les différents types de N-Glycans.

Il existe trois sortes de chaînes glycosylées N-liées : les chaînes oligomannose, les chaînes complexes et les chaînes hybrides. Tiré de (Cummings et Liu 2009).

La O-glycosylation a lieu dans le Golgi et commence par le transfert du monosaccharide N-acétyl-galactoside (GalNAc) sur le groupement hydroxyl d'un acide aminé Ser ou Thr d'une protéine et est catalysée par l'enzyme GalNAc-transférase. Différents glucides peuvent ensuite être ajoutés au monosaccharide GalNAc pour former quatre types de O-glycans. La structure des O-glycans peut être complexifiée par la présence d'embranchements, comme dans les N-glycans, et par l'ajout de fucose, d'acide sialique, de sulfate et de galactose à leur extrémité. Plusieurs enzymes de la classe des glycosyltransférases réparties dans le compartiment golgien permettent la synthèse des glycans O-liés. Certaines enzymes sont ubiquitaires et d'autres sont type cellulaire spécifique permettant différentes O-glycosylations en

fonction du type cellulaire (Brockhausen et Stanley 2015). Les saccharides β -galactose (β -galactosides) ajoutés aux extrémités des chaînes polysaccharidiques N- et O-liées sont reconnus et liés par les galectines.

1.5.2 La découverte des galectines

Les galectines ont été découvertes individuellement chez plusieurs organismes et sous divers noms avant d'être regroupées en une famille de protéine sur la base d'une homologie de séquences et d'une affinité de liaison pour des polysaccharides spécifiques (Barondes *et al.* 1994b). Les galectines sont définies comme des protéines solubles, dépourvues d'activité enzymatique, ayant une affinité pour les groupements β -galactosides (Gal β 1-4GlcNAc) et qui possèdent un domaine très conservé de reconnaissance pour les β -galactosides appelé CRD (Carbohydrate Recognition Domain) (Hirabayashi et Kasai 1993). Ce domaine est généralement codé par un seul exon et fait environ 130 acides aminés, dont huit sont très conservés et responsables de l'interaction avec les groupements β -galactosides (Barondes *et al.* 1994a; Cooper et Barondes 1999). Les galectines sont des protéines conservées chez les nématodes, arthropodes, plantes, champignons et les vertébrés (Hirabayashi et Kasai 1993; Barondes *et al.* 1994b). Chez ces derniers, on dénombre 15 galectines dont les gènes sont répartis sur les chromosomes 1, 14, 17, 19 et 22 (Johannes *et al.* 2018).

1.5.3 La classification des galectines

Dans un souci de clarification, une nomenclature précise a été établie en 1994 afin d'identifier toutes les protéines qui possèdent un CRD et lient spécifiquement les groupements β -galactosides. Ces protéines sont nommées 'galectine' (gal) suivi d'un numéro selon leur ordre de découverte (par exemple Gal-1, gal-2, Gal-3 etc.). La nomenclature des gènes codant ces protéines change également et on leur attribue le nom général '*LGALS*' (Lectin, Galactoside-binding, Soluble) suivi du même numéro

qu'utilisé pour désigner la protéine (Barondes *et al.* 1994b). En fonction de leur structure, les galectines sont divisées en trois catégories: 1) les galectines prototypiques, 2) les galectines chimériques et 3) les galectines avec des répétitions en tandem. Les galectines prototypiques possèdent un CRD unique et peuvent s'associer en homodimères où chaque CRD peut interagir avec des groupements β -galactosides (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15). Les galectines chimériques possèdent un CRD et une extrémité N-terminale polypeptidique et peuvent former des oligomères. La galectine-3 (Gal-3) est la seule galectine de ce type chez l'humain. Enfin, les galectines avec répétitions en tandem consistent en deux CRD reliés par une séquence peptidique de longueur variable, allant de 5 à 50 acides aminés (gal-4, -6, -8, -9, -12) (Barondes *et al.* 1994a; Cummings et Liu 2009; Boscher *et al.* 2011).

1.5.4 La synthèse des galectines

Les galectines sont des protéines que l'on retrouve dans tous les tissus mais avec une différence de distribution en fonction des protéines, certaines étant presque ubiquitaires (Gal-1, -3, -8) alors que d'autres semblent tissu-spécifiques (Gal-10, -13) (Barondes *et al.* 1994a)(base de données Protein Atlas). Au niveau cellulaire, les galectines sont localisées dans le noyau, le cytoplasme et dans l'espace extracellulaire et une même galectine peut présenter les trois localisations. La localisation d'une galectine peut aussi dépendre du type cellulaire, du cycle cellulaire et de l'état physiologique des cellules (Wang *et al.* 2004). Elles vont interagir avec différents partenaires et exercer différentes fonctions dépendamment de leur localisation. Les ARNm des galectines sont traduits par des polyribosomes libres dans le cytoplasme et les protéines sont ensuite acheminées vers les différents compartiments cellulaires. La localisation nucléo-cytoplasmique de certaines galectines semble dépendre d'un signal de localisation nucléaire et d'un signal d'export nucléaire, mais ces séquences n'ont été identifiées que pour la Galectine-3 (Gal-3) (Wang *et al.* 2004; Johannes *et al.* 2018). Il est aussi possible que les galectines transitent au noyau par interaction avec des

protéines nucléo-cytoplasmiques. La sécrétion des galectines suit une voie non conventionnelle, indépendante des compartiments RE/Golgi, et dont le mécanisme est toujours incompris (Cummings et Liu 2009; Johannes *et al.* 2018). La sécrétion des galectines pourrait se faire par translocation au travers de la membrane plasmique ainsi que par la formation de VE, comme les microvésicules et les exosomes, mais pourrait varier d'un type cellulaire à l'autre (Hughes 1999; Popa *et al.* 2018).

Une fois dans l'espace extracellulaire, les galectines vont interagir avec différentes glycoprotéines grâce à leur CRD : soit des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) pour permettre l'ancrage des cellules, soit des glycoprotéines de surface membranaire pour favoriser les interactions cellules-cellules ou la transduction de signaux, ou des glycoprotéines à la surface de pathogènes (bactéries et virus) pour les neutraliser. La liaison entre le domaine CRD et les groupements N-acétyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) se fait par liaison hydrogène entre les acides aminés hydrophiles du CRD et les groupes hydroxyles du galactose (4-OH, 6-OH) et du N-acétylglucosamine (3-OH) (Hirabayashi *et al.* 2002).

Les formes intracellulaires (cytoplasmiques et nucléaires) ont aussi des fonctions majeures de régulation du cycle cellulaire, dans l'autophagie et l'épissage des ARNs (Vasta *et al.* 2017).

1.5.5 Les fonctions biologiques des galectines

Les galectines sont impliquées dans de multiples fonctions biologiques qui varient en fonction des tissus et des cellules.

1.5.5.1 Fonctions dans le développement embryonnaire

Chez l'humain et la souris, des galectines sont exprimées dès le stade blastocyste et participent à l'implantation de l'embryon, au développement du système nerveux, du cartilage, des muscles squelettiques et du système immunitaire (Poirier *et al.* 1992; Fowles *et al.* 1995; Wada *et al.* 1997; Barrientos *et al.* 2014). Des modèles de souris mutantes homozygotes pour la délétion des gènes *Lgals1* et/ou *Lgals3* ont montré que les fonctions de ces galectines semblent être compensées par d'autres galectines ou protéines, car la délétion du ou des gènes n'est pas létale et une fois adulte, les souris sont fertiles avec une espérance de vie comparable aux souris de type sauvage (Poirier et Robertson 1993; Colnot *et al.* 1998). Des études plus récentes ont néanmoins montré que la délétion de certains gènes *LGALS* entraîne des défauts de la réponse immunitaire, des troubles du comportement ainsi que des défauts de développement des os et des muscles (Georgiadis *et al.* 2007; Sakaguchi *et al.* 2011; Alhabbab *et al.* 2018; Beccaria *et al.* 2018; Chaudoin et Bonasera 2018; Oliveira-de-Abreu *et al.* 2018; Vinik *et al.* 2018). D'autres modèles *in vivo* ont également permis d'appréhender les fonctions des galectines dans le développement (Vasta *et al.* 2017). Par exemple, chez le poisson-zèbre, la délétion du gène homologue de *LGALS1* conduit à des défauts du développement des muscles squelettiques (Ahmed *et al.* 2009).

1.5.5.2 La régulation de la réponse immunitaire

Une des fonctions les plus étudiées des galectines est celle de modulation de la réponse immunitaire. En effet, plusieurs galectines (notamment Gal-1, -3, -8 et -9) sont exprimées par des cellules immunitaires et ont la capacité de moduler la réponse immunitaire, ayant des fonctions pro- ou anti-inflammatoires selon les situations (Cummings et Liu 2009; Vasta *et al.* 2017). La relation entre les galectines et le système immunitaire a été étudiée dans des lignées cellulaires et avec des modèles de souris KO pour les gènes de certaines galectines. La Galectine-1 (Gal-1) a des propriétés pro-apoptotiques sur des lymphocytes T activés et est associée à une réponse anti-inflammatoire alors que la Galectine-3 (Gal-3) peut avoir une activité pro- ou anti-

inflammatoire (Dhirapong *et al.* 2009). De plus, la délétion du gène *Lgals1* chez des souris modifie le développement de certaines catégories de lymphocytes B qui régulent normalement la réponse des lymphocytes T activés, des résultats qui renforcent le rôle de la Gal-1 dans la modulation de la réponse immunitaire (Alhabbab *et al.* 2018). Aussi, des souris KO pour le gène *Lgals3* génèrent des lymphocytes B qui produisent des auto-anticorps et développent un syndrome auto-immun (Beccaria *et al.* 2018). La Galectine-8 est quant à elle impliquée dans la prolifération des lymphocytes T CD4+ de la rate ainsi que dans la maturation des cellules dendritiques. Cette dernière fonction a été confirmée *in vivo* chez des souris KO pour cette galectine (Tribulatti *et al.* 2009; Carabelli *et al.* 2017). Enfin, la Galectine-9 active la maturation des cellules dendritiques et induit l'apoptose des lymphocytes Th1 activés par liaison avec la protéine membranaire Tim-3 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing molecule-3*) (Dai *et al.* 2005; Dardalhon *et al.* 2010).

1.5.5.3 La signalisation cellulaire

L'interaction des galectines avec des protéines membranaires ou cytoplasmiques peut induire certaines voies de signalisation nécessaires à la survie, prolifération et migration cellulaire dans un contexte physiologique, mais aussi pathologique. Plusieurs études rapportent la liaison de galectines avec des intégrines présentes à la surface de cellules normales ou transformées et induisent différentes voies de signalisation (par exemple PI3K/Akt et Ras/MEK/ERK) qui vont modifier l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire ou réguler le cycle cellulaire (Nakahara et Raz 2006). Aussi, certaines galectines extracellulaires peuvent se lier de manière CRD-dépendante aux récepteurs de facteurs de croissance (ex: EGF et VEGF), aux récepteurs de cytokines (ex: TGF β) et aux récepteurs des lymphocytes T (TCRs) et déclencher des cascades de signalisations spécifiques ou empêcher leur internalisation pour maintenir ces récepteurs actifs (Nakahara et Raz 2006). Par exemple, les galectines Gal-1 et Gal-3 se lient aux récepteurs du VEGF et augmentent l'angiogenèse

par activation des cellules endothéliales alors que la Gal-3 est aussi capable d'inhiber l'internalisation du récepteur VEGFR2 dans un modèle de cellules endothéliales (Markowska *et al.* 2011; D'Haene *et al.* 2013). Également, la Gal-1 régule l'activation des lymphocytes T par liaison au TCR et modifie la transduction des signaux qui découlent de l'activation du récepteur (Chung *et al.* 2000). La transduction de signaux est aussi modulée par les formes cytoplasmiques de certaines galectines de façon généralement indépendante de leur domaine CRD. Il a été montré que les Gal-1 et Gal-3 interagissent avec les formes actives des petites protéines GTPase H-Ras et K-Ras, respectivement, et activent la voie Ras/ERK dans le cas de la liaison Gal-1/H-Ras ou Ras/PI3K dans le cas de l'interaction Gal-3/K-Ras (Paz *et al.* 2001; Elad-Sfadia *et al.* 2004).

1.5.6 Le rôle des galectines dans le développement tumoral et les infections

Considérant les multiples fonctions des galectines dans la transduction de signaux et la régulation du système immunitaire, il n'est pas étonnant que ces protéines soient aussi impliquées dans le développement de pathologies et les infections.

1.5.6.1 Les galectines dans les cancers

La transformation des cellules et le développement des tumeurs ont souvent été associés à une dérégulation de l'expression des galectines dans les cellules et dans le microenvironnement tumoral. Cette dérégulation peut avoir un impact direct sur la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, mais peut aussi modifier le fonctionnement d'autres types cellulaires pour favoriser l'irrigation des tumeurs et l'échappement au système immunitaire (Vasta *et al.* 2017). Une expression anormale des galectines a été rapportée dans les cancers du sein, de la prostate, de l'utérus, des ovaires, de l'estomac, du pancréas, des poumons, colorectaux, des tumeurs cérébrales ainsi que dans des mélanomes et leucémies (Vasta *et al.* 2017; Chou *et al.* 2018; Dube-

Delarosbil et St-Pierre 2018). La modification d'expression des galectines dans les tumeurs entraîne un changement dans la transduction de signaux au niveau des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires, favorisant la progression et la survie des tumeurs. Aussi, l'apparition de métastases et de résistances aux chimiothérapies semble être favorisée par la dérégulation de l'expression de certaines galectines. En effet, les galectines peuvent interagir directement avec les protéines de la MEC ou avec certaines intégrines et peuvent donc, dans le cas des cancers, moduler l'attachement des cellules tumorales entre elles, avec la MEC ou avec les cellules endothéliales (Liu et Rabinovich 2005). L'apparition de résistance aux chimiothérapies est un enjeu majeur dans le traitement des cancers. Les Gal-1 et -3 sont liés à l'apparition de résistance aux traitements (Chou *et al.* 2018). Enfin, la modification de l'expression des galectines est associée au pronostic des patients dans certains cancers et la classification des tumeurs en fonction de l'expression des galectines pourrait servir d'outil diagnostique (Liu et Rabinovich 2005; Long *et al.* 2018; Schulz *et al.* 2018).

1.5.6.2 L'interaction des galectines avec les pathogènes

De par leur interaction avec les cellules immunitaires, les galectines vont être importantes également dans la résolution des infections par différents agents pathogènes: bactéries, virus, champignons et parasites. Leurs fonctions peuvent aussi être détournées ou altérées par les agents infectieux (Sato *et al.* 2009; Vasta 2009).

Les galectines peuvent interférer dans la capacité infectieuse de certains pathogènes en se liant directement sur des glycans situés à la surface de ces derniers et activer le système immunitaire inné pour lutter contre les infections. Plusieurs études ont montré la liaison de galectines à la surface de bactéries gram positives et négatives (voir revues (Sato *et al.* 2009; Vasta 2009). Dans le cas de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*, la présence de la Gal-3 dans le tissu pulmonaire permet de ralentir l'infection grâce au recrutement et à l'activation des neutrophiles nécessaires à la

phagocytose des bactéries et à la diminution de la croissance bactérienne par la liaison de cette galectine à la surface de la bactérie (Farnworth *et al.* 2008). La Gal-3 joue également un rôle important durant l'infection des cellules épithéliales gastriques par *Helicobacter pylori*. La Gal-3 interagit avec des groupements O-glycosylés à la surface de la bactérie et cette liaison retiendrait *H. pylori* à la surface de l'épithélium gastrique en plus d'avoir un effet bactéricide. Aussi, l'infection des cellules par *H. pylori* augmente l'expression cellulaire de Gal-3, une réponse qui permet le recrutement de neutrophiles et de macrophages sur le site d'infection (Fowler *et al.* 2006; Park *et al.* 2016). Dans le cas d'infections virales, une action antivirale de la Gal-1 a été rapportée lors de l'infection de souris et de lignées cellulaires par le virus de la Dengue. En effet, la liaison de la Gal-1 aux particules virales par reconnaissance de groupements glycosylés inhibe l'attachement et l'internalisation des particules virales dans différentes lignées cellulaires. Il semble aussi que la fonction immunorégulatrice de la Gal-1 soit importante durant l'infection par ce virus, car des souris déficientes pour le gène *Lgals1* présentent une réponse inflammatoire plus importante que des souris sauvages dans le contexte d'infection par le virus de la Dengue (Toledo *et al.* 2014). Le même effet de la Gal-1 est observable dans le cas d'une infection avec le virus Influenza de type A. Le traitement de souris infectées par le virus Influenza avec de la Gal-1 exogène augmente en effet la survie des souris et diminue l'inflammation dans les poumons (Yang *et al.* 2011b). Cette étude a aussi montré que la Gal-1 se lie à la surface des particules virales et inhibe l'infection des cellules par le virus (Yang *et al.* 2011b). Plus récemment, une étude s'intéressant aux facteurs génétiques qui influencent la susceptibilité des individus au virus Influenza A H7N9 dans une population chinoise a associé la susceptibilité à l'infection virale avec des variants alléliques du gène *LGALS1* (Chen *et al.* 2015). Ces résultats sont à confirmer dans une plus grande cohorte, mais suggèrent le rôle important de la Gal-1 durant l'infection par les virus Influenza chez l'humain. La Gal-3 pourrait aussi jouer un rôle durant l'infection par les virus Influenza. En effet, une hausse d'expression de Gal-3 est

observable dans les poumons de souris et dans une lignée cellulaire durant l'infection par les virus Influenza A H5N1 et H7N9, respectivement. La résultante de cette augmentation d'expression de Gal-3 n'est en revanche pas claire, car dans un cas, elle augmenterait la pathogénicité du virus en causant une réponse inflammatoire exacerbée dans les poumons et dans l'autre, cette augmentation est associée avec une diminution de la réplication virale (Li *et al.* 2014b; Chen *et al.* 2018). Durant l'infection de macrophages par le rétrovirus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), la Gal-3 pourrait avoir une action antivirale en favorisant l'apoptose des macrophages infectés, mais ces résultats sont à confirmer dans des modèles *in vivo* (Xue *et al.* 2017).

D'un autre côté, certains pathogènes ont détourné l'affinité de liaison des galectines à certains glycans à leur avantage. Ceci est notamment rapporté dans la littérature pour certains virus. Dans les cas d'infection par les rétrovirus VIH-1 et HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Retrovirus type 1*), la présence de Gal-1 dans le milieu extracellulaire permet aux virus d'optimiser leur attachement aux cellules. En effet, l'ajout de Gal-1 recombinante lors de l'infection de différentes lignées cellulaires, de macrophages et d'un tissu lymphoïde par le VIH-1 augmente significativement l'infectivité du virus en optimisant l'attachement des particules virales à la surface des cellules cibles, un effet qui dépend de la disponibilité du domaine CRD de la Gal-1. Il est intéressant de noter que l'ajout de Gal-3 n'a aucun effet sur l'infectivité du VIH-1 dans tous les modèles *in vitro* ou *ex vivo* testés (Ouellet *et al.* 2005; Mercier *et al.* 2008). Il a ensuite été montré que la Gal-1 se lie spécifiquement à certains groupements de N-glycans complexes sur la protéine d'enveloppe gp120 et sur son récepteur CD4 et optimise ainsi la liaison de la protéine d'enveloppe du VIH-1 à son récepteur cellulaire (St-Pierre *et al.* 2011). Il ressort de cette étude une information très intéressante concernant la différence d'affinité des Gal-1 et -3 pour la gp120. En effet, ce n'est pas la composition, mais l'arrangement stérique des chaînes de glycosylation qui permet ou non la liaison de ces galectines à la protéine d'enveloppe (St-Pierre *et al.* 2011).

Bien que la Gal-3 n'agisse pas sur la phase précoce de l'infection par le VIH-1, une étude plus récente suggère qu'elle pourrait avoir un rôle dans le bourgeonnement des particules virales. Dans des cellules infectées, les niveaux d'expression de Gal-3 modulent la libération des virions et cette galectine se retrouve dans un complexe protéique qui inclut la protéine virale Gag et la protéine cellulaire Alix du complexe ESCRT (Wang *et al.* 2014). Aussi, l'inhibition de la Gal-3 dans les cellules réduit l'interaction entre les protéines Gag et Alix et diminue le bourgeonnement des virions (Wang *et al.* 2014). Dans le cas du rétrovirus HTLV-1, l'infection des lymphocytes T par ce virus active l'expression du gène *LGALS1* via l'action de la protéine accessoire transactivatrice Tax. De plus, l'ajout de Gal-1 exogène augmente l'infection par le virus et favorise la fusion de cellules infectées avec des cellules non infectées (Gauthier *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent donc que HTLV-1 pourrait profiter de l'activité de Gal-1 à différentes étapes de son cycle infectieux. La protéine Tax induit aussi l'expression de la Gal-3 dans des lignées de lymphocytes T infectés mais les conséquences sur l'infection virale ne sont pas connues (Hsu *et al.* 1996). Les virus peuvent également détourner l'activité immunorégulatrice des galectines. Le virus HSV-1 (*Herpes Simplex Virus 1*) pourrait profiter de l'activité pro-apoptotique de la Gal-1 envers les lymphocytes T activés afin d'échapper au système immunitaire. En effet, l'infection des cellules épithéliales par HSV-1 augmente l'expression et la sécrétion de Gal-1 dans les cellules et cette dernière induit l'apoptose de lymphocytes T activés (Gonzalez *et al.* 2005). En revanche, l'infection de HSV-1 ne semble pas moduler l'expression de la Gal-3, mais ce virus pourrait bénéficier de sa présence dans le milieu extracellulaire pour infecter les cellules épithéliales de l'oeil (Gonzalez *et al.* 2005; Woodward *et al.* 2013).

Finalement, il semble qu'une même galectine puisse avoir la double fonction de facteur pro et antiviral pour un pathogène donné. C'est le cas de la Gal-1 avec le virus Nipah, qui optimise ou inhibe l'infection dépendamment du moment du cycle infectieux. En effet, la forme dimérisée de la Gal-1 inhibe le cycle infectieux du virus

Nipah par liaison avec les deux protéines d'enveloppes (NiV-G et NiV-F) exprimées à la surface des cellules endothéliales, ce qui forme des oligomères entre les protéines et inhibe leur fonction fusogénique, phénomène normalement associé à la pathogénicité du virus. La Gal-1 empêche également la maturation, la mobilité membranaire et le changement conformationnel de la protéine d'enveloppe fusogénique NiV-F. Cette inhibition dépend en fait de la liaison de la Gal-1 avec un groupe de N-glycans, appelé F3, situé proche du site de clivage du précurseur NiV-F0 en deux sous-unités fonctionnelles (Levroney *et al.* 2005; Garner *et al.* 2010). En revanche, la présence de Gal-1 dans le milieu extracellulaire durant la phase précoce de l'infection de cellules endothéliales par le virus Nipah présente un avantage pour le virus en augmentant la liaison des particules virales à la surface des cellules. Cet effet dépend également de l'interaction de la Gal-1 avec la chaîne de glycosylation F3 sur la protéine NiV-F (Garner *et al.* 2015). En compilant les données de leurs trois études, les auteurs suggèrent que l'agencement des protéines d'enveloppes NiV-F à la surface des particules virales ou de la membrane plasmique après infection est différent, ce qui change la façon dont la Gal-1 s'y lie. Dans le premier cas, la forme dimérisée de la Gal-1 favoriserait l'interaction entre l'enveloppe NiV-F et certaines protéines membranaires glycosylées situées à la surface des cellules cibles alors que dans le deuxième cas, les deux domaines CRD d'un dimère de Gal-1 pourraient plus facilement lier les N-glycans F3 de deux protéines NiV-F adjacentes exprimées à la membrane des cellules (Levroney *et al.* 2005; Garner *et al.* 2010; Garner *et al.* 2015). Le cas du virus Nipah montre donc que l'interaction avec une même galectine peut présenter un avantage durant un stade du cycle infectieux, mais que la protéine peut aussi avoir un effet inhibiteur dans les stades plus tardifs de l'infection.

1.5.7 La fonction des galectines dans le développement du placenta humain

1.5.7.1 La Galectine-1

1.5.7.1.1 L'expression de la Galectine-1 dans le placenta

La Galectine-1 (Gal-1) est la première protéine de la famille des galectines à avoir été identifiée. Cette protéine d'environ 14 kDa et 135 acides aminés a d'abord été isolée chez l'anguille puis chez le poulet et le bovin sous des noms différents avant d'être renommée Gal-1 (Cummings et Liu 2009; Barrientos *et al.* 2014). Chez l'humain, le gène *LGALS1* qui code pour cette protéine est situé sur le chromosome 22. La Gal-1 est une galectine prototypique qui possède un CRD de forme globulaire. La structure secondaire d'un monomère de Gal-1 se présente sous la forme de deux feuillets β avec cinq et six brins antiparallèles, respectivement (Cummings et Liu 2009). Deux monomères de Gal-1 peuvent s'associer de manière non covalente en homodimère avec les CRD de chaque monomère situé à l'opposé l'un de l'autre (Figure 1.15) (Cummings et Liu 2009; Barrientos *et al.* 2014).

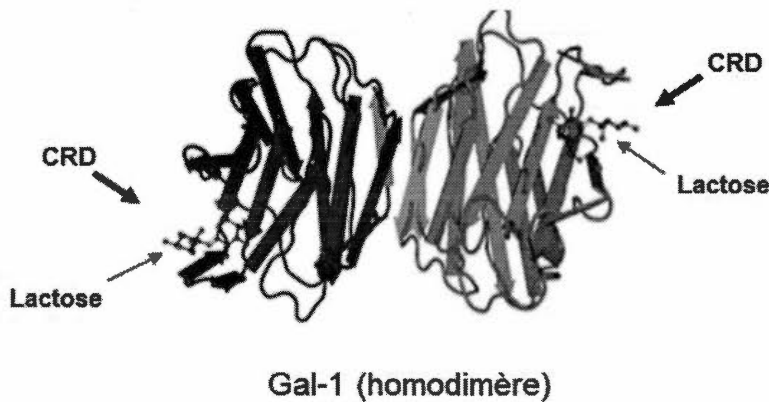


Figure 1.15 Organisation d'un homodimère de Galectine-1 lié avec deux molécules de lactose (tiré de (Barrientos *et al.* 2014)).

Chaque monomère s'organise en feuillets bêta et possède un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) qui permet l'interaction avec les groupements glycosylés des protéines. Sur ce schéma, les deux CRD sont liés avec une molécule de lactose.

La dimérisation de la Gal-1 dépend de la concentration et survient lorsque celle-ci est supérieure ou égale à 7 μM . La dimérisation est réversible lorsque la concentration de la protéine est inférieure à 7 μM pendant plusieurs heures (Cho et Cummings 1996). Les formes monomérique et dimérique de Gal-1 sont toutes deux capables de liaison avec les résidus β -galactosides (Cho et Cummings 1996). La Gal-1 présente une affinité de liaison croissante envers les glycanes complexes possédant deux et trois embranchements N-acétyllactosamine, mais perd toute affinité lorsque les résidus galactose sont modifiés par ajout d'acide sialique (sialylation α 2-6) (Hirabayashi *et al.* 2002). L'affinité de liaison de la Gal-1 pour les β -galactosides est présentée sur la Figure 1.16 et est comparée avec celle de la Gal-3.

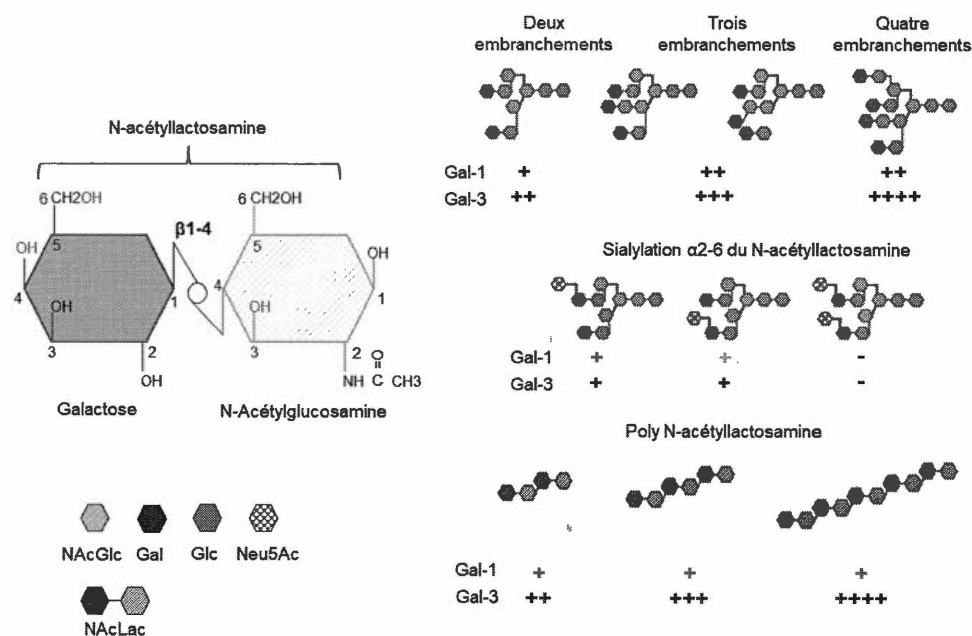


Figure 1.16: Structure du N-Acétyllactosamine et affinité de liaison des galectine-1 et -3 pour différents types de β -galactosides.

Le N-Acétyllactosamine (NAcLac) est un disaccharide composé d'une molécule de N-Acétylglucosamine (NAcGlc) et d'une molécule de galactose (Gal) avec une liaison β 1-4 entre le Gal et le NAcGlc. Les groupes hydroxyles importants pour la formation de ponts hydrogènes avec les acides aminés du CRD des galectines sont indiqués en rouge (positions 3, 4 et 6 du N-acétylglucosamine et du galactose respectivement). Les chaînes poly-NAcLac sont composées de plusieurs disaccharides NAcLac associés les uns aux autres. Les affinités de liaison des Gal-1 et -3 sont représentées par des signes "+" et "-", un symbole "+" noir indique une affinité moyenne, un symbole "+" gris indique une faible affinité et un symbole "-" une absence de liaison.

La Gal-1 humaine s'exprime dans de nombreux tissus, dont le placenta (Hirabayashi et Kasai 1988). En fait, cette galectine semble être exprimée très tôt durant l'embryogenèse et est détectée dans le trophoctoderme de l'embryon préimplantatoire, la structure qui donne naissance aux trophoblastes (Tirado-Gonzalez *et al.* 2013). Dans le placenta, la Gal-1 est localisée dans la décidue maternelle et les cellules trophoblastiques, mais l'expression de la protéine dans les différents types de trophoblastes varie selon les études. Des premiers résultats rapportent une faible expression de la Gal-1 dans les CTBev dans les placentas au premier trimestre et son absence dans les CTBv et le STB (Maquoi *et al.* 1997). À l'inverse, les résultats d'autres études montrent une expression progressive de la Gal-1 dans les CTBv entre le premier et troisième trimestre de grossesse ainsi que l'expression de la Gal-1 à la membrane apicale du STB au premier et troisième trimestre (Vicovac *et al.* 1998; Jeschke *et al.* 2007; Than *et al.* 2008a). Une étude réalisée en 2013 a rapporté une expression plus importante des transcrits de *LGALS1* dans les CTBev que dans les CTBv et aucune différence d'expression des transcrits dans les CTBv entre le premier et troisième trimestre de grossesse (Tirado-Gonzalez *et al.* 2013). Cette protéine est également détectée dans les CTBev des colonnes médianes et distales, dans les cellules macrophages de Hofbauer et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du chorion vilieux (Vicovac *et al.* 1998; Than *et al.* 2008a). Dans les cultures de cellules trophoblastiques, la Gal-1 se localise au niveau des points d'ancrage cellulaire et aux

points de contact cellule-cellule et colocalise avec la laminine, une protéine de la MEC qui interagit avec la Gal-1 (Ozeki *et al.* 1995; Vicovac *et al.* 1998). Des CTBv en culture expriment la Gal-1, mais perdent son expression lors de leur syncytialisation et le même patron d'expression est observé avec des cultures de cellules BeWo (Vicovac *et al.* 1998). La Gal-1 est également détectée dans le sang périphérique durant la grossesse et une étude a montré que son expression augmente au premier trimestre avec un pic d'expression au deuxième trimestre jusqu'à la fin du troisième trimestre (Tirado-Gonzalez *et al.* 2013).

1.5.7.1.2 Les fonctions de la Galectine-1 dans le développement du placenta

Le succès d'une grossesse dépend majoritairement sur le bon fonctionnement du placenta. Ceci implique l'invasion des trophoblastes dans l'endomètre utérin, la mise en place d'une tolérance immunitaire au niveau du site d'implantation du placenta, l'irrigation du tissu placentaire suite au remodelage des vaisseaux sanguins maternel et la formation et l'entretien continu du STB pour permettre les échanges entre les circulations maternelle et fœtale. La Gal-1 semble impliquée dans tous ces processus cellulaires.

Premièrement, la Gal-1 pourrait aider la migration des CTBev dans l'endomètre utérin. En effet, la Gal-1 est fortement exprimée dans les colonnes médianes et distales de CTBev (Vicovac *et al.* 1998). Aussi, des expériences réalisées sur des CTBev (lignées cellulaires et cultures primaires isolées à partir de placenta) ont montré que la Gal-1 est exprimée à leur surface et qu'elle contribue à la migration et à l'invasion des cellules (Kolundzic *et al.* 2011). Il est suggéré que la liaison de la Gal-1 avec les intégrines $\beta 1$ exprimées à la surface des CTBev facilite leur migration dans la décidue grâce à l'interaction de la Gal-1 avec les protéines fibronectine et laminine de la MEC (Ozeki *et al.* 1995; Bojic-Trbojevic *et al.* 2018).

Deuxièmement, la Gal-1 pourrait contribuer à la mise en place de la tolérance immunitaire au niveau de la barrière foeto-maternelle. Cette galectine est en effet

exprimée par les cellules NK déciduales et les CTBev distaux, cellules en contacts avec les cellules immunitaires, et exerce une activité immunorégulatrice en induisant l'apoptose des lymphocytes T activés (Perillo *et al.* 1995; Kopcow *et al.* 2008). L'utilisation d'un modèle murin d'avortements précoces dans lequel le gène *Lgals1* a été supprimé suggère une fonction de la Gal-1 dans la régulation immunitaire au site d'implantation des embryons. En effet, dans ce modèle, les embryons sont rapidement éliminés après implantation dans la paroi utérine, un effet associé à une réponse inflammatoire accrue à l'interface foeto-maternel (Blois *et al.* 2007). Il s'avère que la Gal-1 favorise la différenciation des cellules dendritiques utérines vers un phénotype tolérogénique qui activent ensuite des lymphocytes T régulateurs compatibles avec le maintien de la grossesse et la délétion du gène altère ce processus (Blois *et al.* 2007). Les preuves directes de la fonction de la Gal-1 dans l'immunotolérance foeto-maternelle chez l'humain sont très difficiles à obtenir, car aucune mutation abolissant l'expression du gène *LGALS1* n'existe et les fonctions de la Gal-1 semblent compensées par d'autres protéines. Néanmoins la dérégulation de l'expression de la Gal-1 dans le syndrome obstétrique PE suggère que cette galectine joue un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire maternelle durant la grossesse. En effet, l'augmentation de l'expression de la Gal-1 normalement observée dans le cytoplasme des lymphocytes T et des cellules NK du sang périphérique de femmes enceintes n'est pas retrouvé dans ces cellules chez des femmes atteintes de PE (Molvarec *et al.* 2011). Les auteurs de cette étude suggèrent que l'expression de Gal-1 dans les lymphocytes T orienterait leur différenciation vers un phénotype Th2 ou régulateur et que l'absence de Gal-1 permettrait une différenciation vers un phénotype Th1.

Troisièmement, la Gal-1 pourrait aussi avoir un rôle dans l'angiogenèse placentaire. En effet, le fait que cette galectine active la prolifération et la migration des cellules endothéliales a poussé certains chercheurs à analyser le rôle potentiel de la Gal-1 dans l'angiogenèse placentaire (Hsieh *et al.* 2008; Freitag *et al.* 2013). Pour cela,

un modèle de souris qui présentent des défauts de vascularisation et de décidualisation pendant la gestation a été utilisé. Chez ces souris, une ablation des cellules dendritiques peut être induite et conduit entre autres à un défaut d'implantation des embryons. L'injection de Gal-1 recombinante corrige ce défaut d'implantation et permet le maintien des gestations, le développement normal des foetus et augmente l'expression de plusieurs facteurs proangiogéniques. Aussi, le traitement des souris avec un inhibiteur de l'angiogenèse Gal-1-dépendante induit l'apparition d'un syndrome similaire à la PE chez les animaux, avec une augmentation de la pression artérielle, une protéinurie, un retard de croissance des foetus et une augmentation du facteur antiangiogénique sEng dans la circulation. Enfin, le traitement d'une lignée cellulaire de type CTBev avec cet inhibiteur diminue leur capacité d'adhésion aux cellules endothéliales, suggérant que la Gal-1 joue un rôle lors du remodelage des artérioles spiralées par les CTBev (Freitag *et al.* 2013).

Quatrièmement, plusieurs travaux suggèrent que la Gal-1 pourrait participer à la formation du STB en facilitant la fusion des CTBv. La Gal-1 peut lier le disaccharide Thomsen-Friedenreich (TF) exprimé à la surface des cellules trophoblastiques (CTBv et BeWo) et sa liaison avec ce disaccharide est associée avec un arrêt de prolifération et à la syncytialisation des cellules BeWo (Jeschke *et al.* 2006; Fischer *et al.* 2010). Dans d'autres études, ces mêmes auteurs suggèrent que la forme extracellulaire de la Gal-1 induit la fusion des cellules BeWo, ceci en modifiant la signalisation de certaines MAP Kinases (Fischer *et al.* 2010; Fischer *et al.* 2011). Ces changements de signalisation conduisent à la diminution d'expression de la β -caténine et de E-cadhérine ainsi qu'à l'augmentation d'expression de la Syn-1, trois patrons d'expression associés avec la fusion des cellules BeWo (Fischer *et al.* 2011). Finalement, des cellules BeWo stablement inhibées pour l'expression de la Gal-1 semblent moins fusionner que les BeWo souches, mais il est important de noter que dans ces expériences, les auteurs n'ont regardé que la fusion spontanée des cellules BeWo qui est faible comparativement aux cellules traitées avec la forskoline (Hutter *et al.* 2016).

Finalement, les données obtenues dans les cas de PE sont très informatives quant à l'implication de la Gal-1 dans le développement normal de la grossesse. Des études rapportent en effet une différence d'expression de la Gal-1 dans cette pathologie au niveau placentaire, mais aussi dans le sang. Les travaux de Than et al. rapportent une augmentation globale significative de l'expression de la Gal-1 au niveau transcriptionnel et protéique dans le placenta de femmes atteintes de PE comparativement aux femmes enceintes contrôles (Than *et al.* 2008a). Ces résultats sont en accord avec ceux de Jeschke et al. qui avaient montré une augmentation de Gal-1 au niveau protéique dans les CTBev et la décidue de placentas pré-éclamptiques (Jeschke *et al.* 2007). En 2013, une équipe a publié des résultats très intéressants montrant une différence d'expression de Gal-1 entre des cas de PE précoces et tardives. En effet, les auteurs ont observé une diminution significative de la Gal-1 aux niveaux transcriptionnel et traductionnel dans les placentas de femmes ayant développé une PE précoce (avant 34 semaines de grossesse). En revanche, dans les placentas de femmes diagnostiquées avec une PE tardive (après 34 semaines), ils observent une augmentation de l'expression de la Gal-1 dans le tissu villositaire. La mesure du taux d'expression de la Gal-1 dans le sang montre que l'expression de la protéine est significativement plus élevée chez les femmes ayant une PE tardive par rapport aux femmes contrôles et PE précoces. De ces observations, les auteurs émettent l'hypothèse que les cas de PE précoces sont dus à un défaut d'expression de Gal-1 très tôt dans la grossesse, ce qui affecte le développement normal du placenta, alors que dans les cas de PE tardives, l'augmentation de Gal-1 serait une réponse adaptative aux défauts de placentation (Freitag *et al.* 2013). De plus, cette étude suggère que la Gal-1 pourrait être un marqueur potentiel de PE car les auteurs ont observé un niveau d'expression inférieure de Gal-1 dans le sang au deuxième trimestre de grossesse chez les femmes ayant développé une PE comparativement aux femmes ayant eu une grossesse normale. Très récemment, une étude a montré que, dans le sang au deuxième trimestre de

grossesse, un niveau de Gal-1 inférieur à un certain seuil (8.1 ng/ml dans cette cohorte de patientes) est associé à un risque de PE plus élevé (Hirashima *et al.* 2018).

Tous ces travaux de recherche convergent donc vers l'idée générale que la Gal-1 participe au bon fonctionnement du placenta bien que son expression ne semble pas indispensable au développement gestationnel dans certains modèles murins. Ceci s'expliquerait par une certaine redondance dans la fonction de la Gal-1 avec d'autres galectine, protéines ou d'autres voies moléculaires (Colnot *et al.* 1998).

1.5.7.2 La Galectine-3

La Galectine-3 (Gal-3) a été successivement découverte et identifiée sous plusieurs noms et dans différentes espèces. Elle fût d'abord identifiée comme un antigène de 32 kDa exprimé à la surface de macrophages activés de souris, nommé antigène Macrophage-2 (Mac-2), puis sous le nom de 'Carbohydrate-Binding Protein 35' (CBP35) dans des fibroblastes murins (Ho et Springer 1982; Roff et Wang 1983). Chez l'humain, elle fût aussi connue sous plusieurs noms (Mac-2, CBP35, IgEBP, HL29) jusqu'au changement de nomenclature, où elle fût renommée Gal-3 (Barondes *et al.* 1994b). Le gène *LGALS3* est situé sur le chromosome 14 chez l'humain et code pour une protéine de 250 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 31 kDa (Sciacchitano *et al.* 2018). La Gal-3 est la seule galectine de type chimérique, constituée d'un domaine polypeptidique composé de plusieurs répétitions de neuf acides aminés en N-terminal et d'un CRD de 135 acides aminés en C-terminal. Cette galectine peut s'associer en multimères par interaction de ses extrémités N-terminales (Cummings et Liu 2009). La Gal-3 est localisée dans le noyau, le cytoplasme, associée à la membrane et sécrétée dans le milieu extracellulaire par une voie non-conventionnelle. Cette galectine pourrait être sécrétée par l'intermédiaire de VE et a en effet été isolée dans des exosomes, mais cette route ne semble pas être majoritairement utilisée (Stewart *et al.* 2017; Banfer *et al.* 2018). Une séquence du domaine N-terminal

de la Gal-3 semble impliquée dans la sécrétion de la protéine, mais n'est pas suffisante à elle seule pour diriger la protéine vers le milieu extracellulaire (Sciacchitano *et al.* 2018). Parmi les galectine, la Gal-3 présente la plus forte affinité de liaison pour le disaccharide N-acétyllactosamine et son affinité augmente avec le nombre d'embranchements présents sur les glycans complexes. Cette galectine présente aussi une forte affinité pour les chaînes poly-N-acétyllactosamine, affinité qui augmente avec le nombre d'unités N-acétyllactosamine (Figure 1.16). De manière intéressante, il semble que la liaison des glycans par la Gal-3 n'implique pas uniquement son CRD, mais également son domaine N-terminal (Hirabayashi *et al.* 2002). Ce domaine présente notamment un site de phosphorylation (Ser-6) qui peut moduler l'affinité de liaison de la Gal-3 avec certains ligands (Mazurek *et al.* 2000).

La Gal-3 est exprimée dans le placenta humain et a été localisée dans les CTBv, les CTBev des colonnes médianes et distales, le STB et la décidue, présentant des variations quant à l'immunoréactivité des CTBev et du STB selon les études (Maquoi *et al.* 1997; Vicovac *et al.* 1998; Bozic *et al.* 2004; Jeschke *et al.* 2007). Son expression semble varier durant la grossesse avec une diminution au premier trimestre, entre la 7e et 12e semaine de grossesse, suivie d'une augmentation de son expression à la 13e semaine (van den Brule *et al.* 1994).

Aussi, plusieurs preuves indirectes suggèrent un rôle de la Gal-3 dans l'implantation embryonnaire. Chez la souris, la Gal-3 a été détectée dans le trophoctoderme du blastocyste et son expression augmente dans l'épithélium utérin en cas de grossesse et autour du site d'implantation du blastocyste. De plus, l'inhibition de son expression dans l'endomètre utérin des souris réduit significativement le nombre d'implantations embryonnaire (Poirier et Robertson 1993; von Wolff *et al.* 2005; Yang *et al.* 2011a). En revanche, la délétion du gène *Lgals3* chez les souris n'a aucun effet sur l'implantation ou le développement des embryons, une situation qui pourrait s'expliquer par la présence d'autres protéines et galectines ayant des fonctions

similaires (Poirier et Robertson 1993; Colnot *et al.* 1998; Than *et al.* 2009). Chez l'humain, il est possible qu'elle joue aussi un rôle dans l'implantation, car son expression augmente dans l'endomètre durant le cycle menstruel, possiblement pour préparer la nidation (von Wolff *et al.* 2005; Blois et Barrientos 2014).

Son expression dans les colonnes de CTB et les CTBev ainsi que son affinité de liaison pour les intégrines et certaines protéines de la MEC suggère également que la Gal-3 pourrait jouer un rôle dans la migration des CTBev (Maquoi *et al.* 1997; Blidner et Rabinovich 2013; Blois et Barrientos 2014). Aussi, la Gal-3 pourrait avoir une fonction éventuelle dans la fusion des cellules BeWo impliquant une interaction avec la protéine CD98 (Dalton *et al.* 2007).

Enfin, l'expression de la Gal-3 est modifiée dans les cas de PE et de syndrome HELLP. En effet, son expression augmente dans les CTBev par rapport aux placentas contrôles alors qu'elle ne change pas dans le STB ou la décidue. Les auteurs de cette étude proposent que l'augmentation de Gal-3 dans les CTBev puisse être une réponse adaptative à la faible implantation du placenta dans ces pathologies (Jeschke *et al.* 2007). Aussi, la Gal-3 est significativement induite dans les BeWo soumises à des conditions hypoxiques, conditions retrouvées dans les placentas pré-éclampsiques qui inhibent la fusion des cellules trophoblastiques (Hu *et al.* 2007).

1.5.7.3 Les autres galectines placentaires

1.5.7.3.1 La Galectine-7

La Gal-7 est une galectine prototypique, ayant un poids moléculaire de 15 kDa. Cette galectine est exprimée dans les cellules épithéliales de l'endomètre utérin et dans le placenta. Au premier trimestre, la Gal-7 est exprimée dans le STB et les CTBev et favorise l'attachement des trophoblastes aux cellules épithéliales de l'endomètre (Menkhorst *et al.* 2014b). Au troisième trimestre, la Gal-7 est aussi localisée dans le STB et les cellules endothéliales du chorion vilieux (Menkhorst *et al.* 2014a). Les

niveaux d'expression de la Gal-7 dans l'endomètre utérin seraient importants lors de l'implantation embryonnaire puisqu'une surexpression de la protéine dans l'endomètre a été associée à des cas de fausses-couches multiples et à une mauvaise implantation du blastocyste (Menkhorst *et al.* 2014b). Dans le cas de la PE, les niveaux sériques de Gal-7 durant le premier et deuxième trimestre de grossesse sont plus élevés chez les femmes déclarant une PE durant leur grossesse que les femmes à grossesses non pathologiques. Il est donc suggéré que la Gal-7 puisse servir de marqueur de risque de PE en mesurant son taux d'expression dans le sang au premier trimestre de grossesse (Menkhorst *et al.* 2014a).

1.5.7.3.2 Les protéines Galectine-8 et -9

Les protéines Gal-8 et -9 sont deux galectines de type répétitions en tandem exprimées dans le placenta humain au premier trimestre et à terme (Than *et al.* 2009; Unverdorben *et al.* 2016b). La Gal-9 a la particularité d'exister sous plusieurs isoformes en raison de l'épissage alternatif de ses transcrits. Dans le tissu placentaire au premier trimestre, les galectines sont localisées dans les CTBv, le STB et dans les CTBev et la Gal-9 est aussi trouvée dans la décidue et l'endomètre utérin (Kolundzic *et al.* 2011; Li *et al.* 2014a; Unverdorben *et al.* 2016b). Les fonctions potentielles de la Gal-8 dans le placenta sont inconnues, mais la Gal-9 pourrait être associée à la régulation du système immunitaire via une interaction avec Tim-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 3), une protéine immunorégulatrice exprimée par plusieurs cellules immunitaires (Blidner et Rabinovich 2013). En effet, des cellules de type CTBev qui expriment la Gal-9 sont résistantes à la cytotoxicité des cellules NK déciduales et cette résistance est diminuée par inhibition spécifique de la Gal-9. L'interaction Gal-9/Tim-3 inhibe en fait la dégranulation des cellules NK de la décidue et permettrait de protéger les CTBev contre ces cellules (Sun *et al.* 2016a). Aussi, des études ont associé une variation d'expression de Tim-3 et du gène *LGALS9*, et ses variants transcriptionnels, avec un syndrome d'avortement spontané répété (Heusschen

et al. 2013; Li *et al.* 2014a; Sun *et al.* 2016a; He *et al.* 2018). Enfin, une étude rapporte une dérégulation de l'expression de la Gal-9 et de Tim-3 dans différentes populations de cellules immunitaires du sang périphérique chez des femmes diagnostiquées avec une PE précoce. Ces défauts d'expression pourraient être associés avec une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T et au dérèglement de la réponse inflammatoire observée dans cette pathologie (Miko *et al.* 2013).

1.5.7.3.3 La Galectine-13 et le cluster de galectines du chromosome 19

La Galectine-13 (Gal-13), aussi connue sous le nom 'Placental Protein 13' (PP13), est une galectine prototypique de 16 kDa qui s'exprime presque exclusivement dans le placenta (Than *et al.* 1999). Le gène *LGALS13* est situé sur le chromosome 19. Cinq autres gènes codant des galectines sont localisés dans la même région chromosomique et forment un *cluster* de galectines et trois sont exprimés dans le placenta (*LGALS13*, *LGALS14* et *LGALS16*) (Than *et al.* 2009). La Gal-13 est assez unique parmi les galectines prototypiques, car sa dimérisation implique la formation de ponts disulfures au lieu d'une liaison non covalente (Than *et al.* 2004). Dans le placenta, cette galectine est majoritairement localisée à la membrane apicale du STB, où est aussi exprimé son ligand l'annexine II, et colocalise avec la phosphatase alcaline placentaire (PLAP) et l'actine (Than *et al.* 2008b; Balogh *et al.* 2011). Elle est aussi localisée en périphérie des noyaux du STB et détectée dans les bourgeonnements membranaires qui se détachent du STB (Than *et al.* 2004 et 2008). La protéine a également été localisée dans certains CTBev en contact avec les vaisseaux sanguin maternels et les cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux (Balogh *et al.* 2011; Kliman *et al.* 2012). La Gal-13 est très largement étudiée dans le contexte de la PE. En effet, plusieurs études ont découvert un lien entre une baisse du niveau d'expression de Gal-13 dans le sang périphérique durant le premier et deuxième trimestre de grossesse et le risque de développer une PE précoce (Burger *et al.* 2004; Chafetz *et al.* 2007; Spencer *et al.* 2007;

Gonen *et al.* 2008; Romero *et al.* 2008; Khalil *et al.* 2009). Aussi, l'expression de *LGALS13* dans le placenta pré-éclamptique semble diminuer et la protéine est majoritairement adressée à la membrane du STB et associée avec les larges débris membranaires libérés du STB (Than *et al.* 2008b; Sekizawa *et al.* 2009; Balogh *et al.* 2011). Une étude révèle que les niveaux de Gal-13 dans le sang pourraient varier différemment selon les trimestres dans les cas de PE, IUGR et d'accouchement prématuré. En effet, les niveaux de Gal-13 semblent inférieurs aux contrôles au 1^{er} trimestre et supérieurs aux contrôles aux 2^e et 3^e trimestres dans ces trois pathologies (Burger *et al.* 2004). Enfin, la Gal-13 a récemment été associée aux VE placentaires avec une expression diminuée dans les VE issues de placentas pré-éclamptiques comparativement aux placentas contrôles, indiquant que la baisse d'expression de la Gal-13 observée dans le placenta se reflète sur les VE placentaires.

En conclusion, les galectines représentent une famille de protéines exprimées dans tous les tissus et aux fonctions variées dans les processus biologiques et pathologiques. Plusieurs galectines sont exprimées dans le placenta et contribuent à l'implantation embryonnaire, à la régulation du système immunitaire et à la différenciation, migration et fusion des trophoblastes. Certaines galectines semblent avoir des fonctions redondantes afin d'assurer le développement normal de certains tissus comme le placenta, mais leurs partenaires d'interactions semblent être spécifiques. Plusieurs galectines sont impliquées dans la lutte contre les infections, mais leurs fonctions peuvent aussi être détournées à l'avantage de l'agent infectieux. Aussi, on trouve une dérégulation de l'expression des galectines dans plusieurs pathologies, dont la pathologie obstétrique PE et cette expression anormale peut être associée avec un risque accru de développer certaines pathologies.

PROBLÉMATIQUE

Le syncytiotrophoblaste placentaire est une structure cellulaire primordiale au fonctionnement du placenta puisqu'elle permet des échanges nutritionnels et gazeux entre les circulations maternelles et fœtales et libère des hormones et des vésicules extracellulaires qui permettent le maintien de la grossesse et l'adaptation des cellules endothéliales et immunitaires, respectivement (Salomon *et al.* 2014b; Costa 2016a). Aussi, des défauts de formation du syncytiotrophoblaste sont associés avec plusieurs syndromes pathologiques obstétricaux, tel que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Identifier les événements moléculaires qui régissent la formation du syncytiotrophoblaste est alors une des clés pour comprendre l'étiologie de ces pathologies.

La formation et le renouvellement continu du syncytiotrophoblaste placentaire durant la grossesse est un processus complexe et hautement régulé qui nécessite la fusion de cellules spécialisées, les cytotrophoblastes villosités (CTBv). Plusieurs dizaines d'années de recherche sur la syncytialisation des CTBv ont mené à l'identification de nombreux acteurs moléculaires agissant à différents moments de la fusion cellulaire, mais les voies moléculaires qui régulent la fusion des cellules trophoblastiques sont encore peu connues (Gerbaud et Pidoux 2015; Costa 2016b).

La fusion des CTBv dépend notamment de l'expression des protéines rétrovirales endogènes humaines Syncytine-1 et -2, deux protéines fusogéniques exprimées à la membrane des CTBv (Blond *et al.* 2000; Knerr *et al.* 2002; Vargas *et al.* 2009). En plus d'une expression cellulaire, ces protéines sont également détectées à la surface des vésicules extracellulaires libérées par le syncytiotrophoblaste (Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014; Ouyang *et al.* 2016). Malgré de nombreuses avancées

dans la compréhension de l'activité fusogénique des protéines Syncytine-1 et -2 dans le placenta, plusieurs questions restent en suspend, notamment sur la complémentarité des fonctions exercées par les protéines Syncytine-1 et -2 dans la fusion des CTBv, la régulation de leurs activités fusogéniques et le(s) rôle(s) de ces protéines lorsqu'elles sont associées aux vésicules extracellulaires. Les fonctions exactes des protéines EnvV et EnvP(b), deux autres protéines rétrovirales endogènes exprimées et maintenues dans le placenta, sont aussi à identifier (Aagaard *et al.* 2005; Blaise *et al.* 2005; Vargas *et al.* 2012).

La fusion des CTBv semble aussi impliquer la liaison des lectines Galectine-1 et -3 avec différents ligands à la surface des cellules trophoblastiques (Dalton *et al.* 2007; Jeschke *et al.* 2007; Fischer *et al.* 2010). En plus de leur fonctions dans le placenta, ces deux lectines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Vasta *et al.* 2017). Elles exercent notamment des fonctions pro ou antivirale en interagissant avec les protéines d'enveloppes de certains rétrovirus (Gauthier *et al.* 2008; St-Pierre *et al.* 2011). La conservation structurelle entre les protéines d'enveloppes rétrovirales exogènes et endogènes ainsi que l'expression des Galectine-1 et -3 et des enveloppes de ERV dans le placenta amènent à envisager une interaction entre ces protéines.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Ce projet de recherche est bâti sur deux hypothèses parallèles. La première suppose l'existence d'un lien fonctionnel entre les formes extracellulaires des lectines Galectine-1 et -3 et les protéines Syncytine-1 et -2 dans le placenta humain. Pour répondre à cette hypothèse, le projet avait pour objectif d'étudier l'association entre les Syncytines et les Galectines dans des modèles *in vitro*, en utilisant des virus pseudotypés par les protéines Syncytines et des Galectines recombinantes.

La deuxième hypothèse du projet propose que l'expression des Syncytines à la surface des vésicules extracellulaires placentaires aide à l'internalisation de ces vésicules dans les cellules. Considérant les résultats précédemment obtenus au laboratoire qui ont montré une diminution plus marquée de la Syncytine-2 dans les vésicules extracellulaires isolées de patientes pré-éclamptiques, une attention particulière a été portée à la Syncytine-2 dans cette partie du projet. L'objectif principal associé à cette hypothèse était d'étudier la fonction de la Syncytine-2 lors de l'internalisation de vésicules extracellulaires placentaires dans un modèle de cellules endothéliales : les cellules HUVECs. Un objectif secondaire était d'étudier le rôle de la Galectine-1 lors de l'internalisation des vésicules extracellulaires qui expriment la Syncytine-2

CHAPITRE II

LA GALECTINE-1 INTERAGIT AVEC LA PROTÉINE D'ENVELOPPE
RÉTROVIRALE ENDOGÈNE HUMAINE SYNCYTINE-2 ET OPTIMISE LA
FUSION DES CELLULES TROPHOBLASTIQUES

AVANT PROPOS

Ce chapitre présente la première partie de résultats de mon travail de recherche sur la protéine rétrovirale endogène Syncytine-2, réalisé sous la direction de Dr Benoit Barbeau et sous la codirection de Dre Julie Lafond. Ce travail a abouti à la rédaction d'un article qui a été accepté pour publication dans le journal « FASEB ».

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec Dre Sachiko Sato (PhD) de l'université de Laval à Québec qui est spécialiste des Galectine-1 et -3. Son assistant de recherche Guillaume St-Pierre a produit les Galectine-1 et -3 recombinantes utilisées dans cette étude. Le Dr Norbert Bannert (PhD) du Robert Koch Institut de Berlin a fait synthétiser le vecteur d'expression de la Syncytine-1. Les analyses de fusion des cytotrophoblastes villeux en présence de lactose et les transfections des BeWo avec les ARN interférents dirigés contre la Galectine-1 ont été réalisés par Amandine Vargas (Ph.D) durant son doctorat sous la direction du Dr Benoit Barbeau (PhD), résultats qui ont été inclus dans ce manuscrit. Tous les autres résultats ont été produits par moi-même avec assistance du Dr Yong Xiao (PhD). L'analyse et la discussion des résultats a été faite par moi-même ainsi que la rédaction du manuscrit, avec l'aide et les corrections de mon directeur Dr Benoit Barbeau, de ma codirectrice Dre Julie Lafond, du Dr Éric Rassart et de Dre Sachiko Sato.

La mise en forme du manuscrit a été modifiée pour répondre aux normes exigées par l'université.

2 Galectin-1 interacts with the human endogenous retroviral envelope protein syncytin-2 and potentiates trophoblast cell fusion

Caroline Toudic¹, Amandine Vargas¹, Yong Xiao¹, Guillaume St-Pierre², Norbert Bannert³, Julie Lafond¹, Éric Rassart¹, Sachiko Sato² and Benoit Barbeau^{1*}

¹ Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques, and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada, H3C3P8;

² Glycobiology and Bioimaging Laboratory, Research Centre for Infectious Diseases and Laval University, Quebec City, Canada; ³ Robert- Koch Institute, Berlin, Germany

*To whom correspondence should be addressed: Benoit Barbeau, Department of biological sciences, Université du Québec à Montréal, 141 Avenue du Président-Kennedy, H2X 1Y4, Montréal, Québec, Canada, Tel.: (514) 987-3000 ext. 4576; Fax: (514) 987-4647; E-MAIL: barbeau.benoit@uqam.ca

2.1 Abstract

Syncytin-2 is an important fusogenic protein which contributes to the formation of the placental syncytiotrophoblast. Galectin-1, a soluble lectin, is also involved in trophoblast cell fusion and modulates the interaction of certain retroviral envelopes with their cellular receptor. This study aimed to investigate the association between Syncytin-2 and Galectin-1 during human trophoblast cell fusion. This association was evaluated *in vitro* on primary villous cytotrophoblasts and cell lines using recombinant Galectin-1 and Syncytin-2-pseudotyped viruses. Using lactose, a galectin antagonist, and Galectin-1-specific siRNA transfections, we confirmed the implication of Galectin-1 in villous cytotrophoblasts and BeWo cell fusion but RT-PCR and ELISA analyses suggest that Galectin-1 alone does not induce syncytialisation. Infection assays showed a specific and significant effect of Galectin-1 on the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses which depended on the expression of MFSD2a. Moreover, Galectin-3, another placental galectin, did not modulate the infectivity of Syncytin-2-positive viruses, strengthening the specific association between Galectin-1 and Syncytin-2. Interestingly, Galectin-1 significantly reduced the infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses, suggesting opposite effects of Galectin-1 on Syncytin-1 and -2. Finally, coimmunoprecipitation experiments showed a glycan-dependent interaction between Syncytin-2-bearing virions and Galectin-1. We conclude that Galectin-1 specifically interacts with Syncytin-2 and possibly regulates Syncytin-2/MFSD2a interaction during syncytialisation of trophoblastic cells.

Key words: HERV-FRD, β -galactoside-binding lectin, villous cytotrophoblasts, syncytialisation

2.2 Introduction

The syncytiotrophoblast (STB) layer of the human placenta is a syncytial structure with endocrine, immunological and nutritive functions, ensuring a successful pregnancy through nutrient and gas exchanges between maternal and fetal blood circulation (Huppertz et Gauster 2011; Costa 2016b). The STB originates from the differentiation of trophoblast cells into villous cytotrophoblast (vCTB), which fuse to form a syncytium (Gerbaud et Pidoux 2015). The process of vCTB fusion is constant during pregnancy and is required to maintain the STB through a dynamic equilibrium between vCTB fusion and continuous shedding of the villous multinucleated layer. Trophoblast syncytialisation is a complex and highly regulated process, requiring cell-cycle exit, bridging of adjacent cells membranes and final fusion of cell membranes (Gerbaud et Pidoux 2015). Many cellular proteins are involved along this process such as transcription and growth factors, cytokines, hormones, tight- and gap-junction proteins, cytoskeleton-remodeling proteins, galectins and human endogenous retroviral (ERV) envelope proteins (Gauster *et al.* 2009; Barrientos *et al.* 2014; Lokossou *et al.* 2014).

Two ERV envelope proteins, called Syncytin-1 (Syn-1) and Syncytin-2 (Syn-2) have been established to be determinant for vCTB fusion (Mi *et al.* 2000; Blaise *et al.* 2003; Frendo *et al.* 2003b; Malassine *et al.* 2007; Vargas *et al.* 2009). These ancient retroviral envelope genes were acquired around 40 and 60 million years ago respectively after the infection of germ cells by two formerly active retroviruses, leading to the stable presence of ERVW-1 and ERVFRD-1 proviral DNA in the human genome (Mi *et al.* 2000; Blaise *et al.* 2003; Esnault *et al.* 2013). These ancient retroviral envelope glycoproteins have in fact conserved the typical features of retroviral envelopes, being expressed as unprocessed precursors (gp73 and gp75 respectively) and then cleaved into surface (SU) and transmembrane (TM) subunits to lastly be

exposed at the plasma membrane (Cheynet *et al.* 2005; Chen *et al.* 2008). The fusogenic properties of Syn-1 and -2 depends on their interaction with specific cellular receptors, namely SLC1A4 (ASCT1) and SLC1A5 (ASCT2) for Syn-1 (Lavillette *et al.* 2002) and MFSD2a for Syn-2 (Esnault *et al.* 2008). Despite the fact that both Syncytins are involved in vCTB fusion, some data suggest that the two proteins could have non-redundant functions. First, the localisation of Syn-1 and -2 differs in the placenta. Unlike Syn-2 which expression seems restricted to vCTB (Malassine *et al.* 2007; Lu *et al.* 2017), Syn-1 was detected in vCTB, STB and in non-fusogenic extravillous trophoblast (EVT) cells, a trophoblastic cell type with different functions (Mi *et al.* 2000; Malassine *et al.* 2005; Muir *et al.* 2006). In addition, Syn-1 and -2 expression has been reported to depend on the cell-cycle, with Syn-1 being expressed in proliferative cells and promoting the G1/S transition, and Syn-2 expression being restricted to resting (G0) vCTB (Huang *et al.* 2013; Lu *et al.* 2017). Interestingly, Syn-1 has also been associated with regulation of apoptosis (Knerr *et al.* 2007; Knerr *et al.* 2008; Huang *et al.* 2014b).

Our previous results suggest that Syn-2 could be the major fusogenic protein in syncytium formation. Indeed, inhibition of Syn-2 expression in trophoblastic-like BeWo cells and primary vCTB had a higher impact on syncytialisation than inhibition of Syn-1 expression (Vargas *et al.* 2009). Furthermore, in pre-eclampsia (PE), a hypertensive obstetrical pathology with abnormal placentation (Fisher 2015), we and others found that Syn-2 expression was significantly decreased in pre-eclamptic placentas (Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2011), and that reduced expression of Syn-2 correlated with the severity of PE (Vargas *et al.* 2011). In addition to their fusogenic function in the placenta, Syn-1 and -2 carry functional immunosuppressive domains in their TM subunit (Tolosa *et al.* 2012) Lokossou *et al.*, in press). Moreover, Syn-1 and -2 are incorporated in circulating placental extracellular vesicles (EV) and their

internalization in EV was associated with increased internalisation of these EV into BeWo cells (Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014).

Apart from ERV envelope proteins, other factors are known to be implicated in placental development and trophoblast syncytialisation, such as members of the galectin family. This family of proteins contains 19 members sharing a conserved 130 amino acid carbohydrate-recognition domain (CRD), that confers a binding-affinity for β -galactoside residues to these proteins (Vasta *et al.* 2017). Galectins play important functions in development, immune regulation, cell proliferation, migration, adhesion to extracellular matrix and are also key players in pathologies such as cancer and obstetrical disorders (Jeschke *et al.* 2007; Barrientos *et al.* 2014; Vasta *et al.* 2017). Various studies have in fact reported the importance of two members, Galectin (Gal) - 1 and -3 in several aspects of embryo implantation and placental function (Maquoi *et al.* 1997; Vicovac *et al.* 1998; Jeschke *et al.* 2007; Fischer *et al.* 2010; Jeschke *et al.* 2013; Barrientos *et al.* 2014; Hutter *et al.* 2016). Gal-1 and -3 are prototypic and chimeric galectins respectively, both secreted using a peptide signal-independent pathway and form functional homodimers containing two CRDs each capable of binding β -galactoside residues and cross-linking glycoproteins expressed on the same cell membrane or on two neighbouring cells (Hirabayashi et Kasai 1993; Sato et Hughes 1994; Cooper et Barondes 1999; Hirabayashi *et al.* 2002). In the first-trimester placenta, Gal-1 and -3 are expressed in vCTB, EVT and in the decidua (Vicovac *et al.* 1998; Tirado-Gonzalez *et al.* 2013; Unverdorben *et al.* 2016a; Unverdorben *et al.* 2016b) and the binding of Gal-1 to the STB and to BeWo cells' membrane was described (Vicovac *et al.* 1998; Jeschke *et al.* 2004). Several studies have demonstrated the implication of Gal-1 in the differentiation and fusion of trophoblastic cells (Jeschke *et al.* 2004; Jeschke *et al.* 2006; Fischer *et al.* 2009; Fischer *et al.* 2010; Fischer *et al.* 2011; Hutter *et al.* 2016). In addition, Gal-1 expression is often dysregulated in placenta

from women suffering from obstetrical disorders or spontaneous abortion (Jeschke *et al.* 2007; Than *et al.* 2008a; Tirado-Gonzalez *et al.* 2013; Unverdorben *et al.* 2016a).

Gal-1 has also been shown to play a role in cell-pathogen interactions (Vasta *et al.* 2017) and to enhance the infectivity of HIV-1 and HTLV-1 retroviruses (Ouellet *et al.* 2005; Gauthier *et al.* 2008). Interestingly, Gal-1 specifically increased the interaction of HIV-1 gp120 to its cellular receptor CD4, which led to increased HIV-1 infectivity and replication, whereas Gal-3 did not (St-Pierre *et al.* 2011). Because both Gal-1 and Syn-2 are implicated in trophoblast cell fusion and Gal-1 enhances the interaction of retroviral envelopes with their cellular receptor, we herein investigated the role of Gal-1 in the interaction of the endogenous retroviral protein Syn-2 with its cellular receptor MFSD2a. Using pseudotyped viruses, our results demonstrate that, unlike Gal-3, Gal-1 increases Syn-2-dependent infection at an early step and that this increase correlates with binding affinity of Gal-1 toward Syn-2.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Ethical approval

Placental tissues used in this study were obtained after informed consent was signed by recruited pregnant women and were collected after delivery, in accordance to the guidelines of the ethical committee of St Luc Hospital of Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) (Montréal, Qc, Canada).

2.3.2 Primary cells and cell lines

Primary villous cytotrophoblasts were isolated from normal term placentas according to a previously published protocol (Kliman *et al.* 1986; Le Bellego *et al.* 2009; Vargas *et al.* 2011). The purity of each cytotrophoblast preparation was assessed by flow

cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibody against Cytokeratin-7 (Millipore, Mississauga, Canada) and only cultures of 96 % purity were used in this study. Human embryonic kidney 293T, HeLa and BeWo cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). HEK293T and HeLa cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 2mM Glutamine and BeWo cells were maintained in Ham's F12 medium (WISENT Inc., St-Bruno, Canada). All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (WISENT Inc., St-Bruno, Canada), and cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere without antibiotics and antimycotics.

2.3.3 Recombinant Galectin-1 and -3 production

Three liters of LB containing ampicillin were inoculated with BL21(DE3)-hGal-1 or hGal-3 overnight at 37°C. Recombinant protein expression was induced by addition of 1mM Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) in the medium for 3 h. Bacteria were pelleted at 6000 x g for 20 min at 4°C. All subsequent steps were performed at 4°C. Bacteria pellets were resuspended in ice cold buffer (10ml per 1L bacterial pellet) (22mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 1mM DTT and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St-Louis MO)) and sonicated for 30 s at 120W 8 times, with 1 min interval between each sonication steps. Lysates were cleared by ultracentrifugation at 35 000 rpm (112,500 g) for 30 min at 4°C (T70.1 rotor) in a L8-80M centrifuge (Beckman Coulter Inc., Brea CA). Supernatants were then passed on α -Lactose agarose column (Sigma-Aldrich, St-Louis MO) pre-equilibrated with the column buffer (50mM Tris-HCl pH 7.2, 105 mM NaCl) Columns were washed with 50 ml column buffer and Gal-1 and Gal-3 were eluted with 7 ml of 150mM α -Lactose buffer in 1x PBS (Sigma-Aldrich, St-Louis MO) and collected in 1 ml fractions. Lactose was eliminated from fractions and recombinant galectins were purified as described previously (Mercier *et al.* 2008; Bhaumik *et al.* 2013). Protein concentration was determined by Bradford assay for each fraction. Finally, endotoxin activity was assessed by LAL assay (QCL-

1000TM Assay, Lonza, Mississauga, Canada) and hemagglutination assay was used to evaluate Gal-1 and -3 activities before use. For biotinylation of recombinant galectin-1, the EZ-linkTM Maleimide-PEG2-Biotin (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) was used, following the manufacturer's instructions.

For infections or cell treatment with recombinant Gal-1 or Gal-3, 4 μ M of Galectin proteins were used unless otherwise indicated (200 μ l final volume). The galectin inhibitor β -lactose (Sigma-Aldrich, St-Louis MO) was added at a final concentration of 50 mM.

2.3.4 Galectin-1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

BeWo cells (10^5 cells in triplicate wells) were cultivated in regular media for 24 and 48 hours before conditioned media was collected and cleared from cell debris by centrifugation (300 x g) and filtration through a 0.22 μ m filter. The secretion of endogenous Gal-1 was assessed by a in house ELISA as previously published (Gauthier et al. 2008). Briefly, 100 μ l of an anti-Gal-1 dilution (rabbit polyclonal 0.5 μ g/ml) was used to coat an ELISA plate overnight at 4 $^{\circ}$ C. 50 μ l of standards, controls (Ham's F12 complete medium without cells) and samples were loaded on the plate, incubated 2h at room temperature and 100 μ l of biotinylated Gal-1 antibody dilution (rabbit polyclonal 0.25 μ g/ml) was added for 1h at room temperature after washing of the wells with PBS-0.05% tween (PBST). Finally, after washing steps, 100 μ l of Streptavidin-HRP antibody dilution (1/4000) was added to each well and incubated for 45 min at room temperature before addition of the revealing solution. The 450 nm absorbance of standards and samples was measured and Gal-1 concentration was determined using the Gal-1 standard curve.

2.3.5 Plasmids

The HIV-1 NL4.3 envelope-deficient luciferase expressing pNL4.3env-Luc vector was obtained from the NIH AIDS Reagent Program (Germantown, MD) and the equivalent GFP-expressing pNL4.3env-eGFP construct was a kind gift from Dr. Eric Cohen (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Canada). The expression vector for the vesicular stomatitis virus G protein pLP/VSV-G was obtained from the ViraPower™ Lentiviral packaging Mix kit (K497500, Invitrogen, ThermoFischer Scientific Waltham, MA). The phCMV1-Syncytin-2 expression vector has been previously described (Vargas et al. 2009). The phCMV-Syncytin-2-Flag construct was obtained by substituting the Syncytin-2 cDNA sequence corresponding to amino acid 75-82 with the Flag-tag (DYKDDDDK) by inverse PCR (forward 5'-GACTACAAAGACGATGACGACAAGTCCTATCGATAGG-3' and reverse 5'-CAGATTAGGGTCCCATCGATAGG-3'). phCMV1-eGFP was obtained by insertion of the eGFP cDNA amplified from the pEGFP-C1-Rab7a expression vector (a kind gift from Dr. Robert Lodge, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Canada) with forward (5'-CTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3') and reverse primers (5'-GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3') using the XhoI and BamHI sites of the phCMV1 vector (Gentlantis, San Diego CA). The Syncytin-1 expression vector was obtained by cloning the codon-optimized Syncytin-1 cDNA sequence (GenScript, Hong Kong) in the pTH vector (Hohn et al. 2009) through HindIII and NotI sites. The pLVX-MFSD2a-myc construct was generated by cloning the MFSD2a cDNA from the BamHI/NotI-digested pEF6-MFSD2a vector (Spinola *et al.* 2010) (a kind gift from Dr. Tommaso Dragani and Dr. Francesca Colombo, Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy) into the pLVX-Puro plasmid (Takara Bio Inc., Mountain view CA), in which a NotI site was added next to the BamHI site. The Myc tag was then inserted at the C-terminal end of MFSD2a by inverse PCR using forward 5'-

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGTAGCGGCCGAGATCCCGCG
ACTC-3' and reverse 5'-GAGGATGCTAGCCAGC-3' primers.

2.3.6 Generation of stable MFSD2a-overexpressing HEK293T cell clones

Human Embryonic Kidney 293T cells were co-transfected with pLP1, pLP2 and pVSV-G (ViraPower™ Lentiviral packaging Mix kit K497500, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) in the presence of polyethylenimine (PEI, 1µg/µl) (Polysciences Inc., Warrington PA) (1µg DNA: 7µl PEI ratio). HEK293T cells (1.5×10^5 cells) were next infected with VSV-G pseudotyped LVX-expressing MFSD2a-myc virions. At 48h post-infection, complete medium containing 1µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) was added to the cells for selection. Colonies were then individually trypsinised and separately plated in 6-well plates. MFSD2a expression was analysed for each clone by western blot and positive clones were further expanded.

2.3.7 Production of pseudotyped NL4.3 viruses and titration

Envelope-defective HIV-1 proviral NL4.3 expressing either GFP or luciferase were used to produce Syn-2, CMVeGFP or VSV-G pseudotyped virions. 2×10^6 293T cells were co-transfected using PEI (1µg DNA : 7µl PEI) with 5 µg of pNL4.3env-Luc or pNL4.3env-eGFP and 1.5 µg of either pCMV1-Syncytin-2, pCMV1-eGFP or pLP/VSV-G. Cells were then replenished with fresh medium, which was next harvested between 36 to 40 h after transfection. Supernatants were centrifuged at 300 x g 5 min, passed through a 0.22 µm-pore-size sterile syringe filter, aliquoted and stored at -80°C before use. Virus-containing supernatants (10 µl) were next quantified by the addition of 40 µl of a reaction mix (60 mM Tris-HCL pH7.9, 6 mM MgCl₂, 0.2 M KCl, 0.6 mM EGTA, 0.06% Triton X-100, 2.5% ethylene glycol, 6 mM DTT, 0.4 mM GSH, 0.025U poly(rA) oligo dT, 2.5µCi ³H-dTTP) and incubation for 2 h at 37°C. The

reaction was stopped with 150 μ l of cold 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 min. Samples were then loaded on a Millipore Multiscreen Glass fiber FC plate (Millipore-Sigma, Etobicoke, Canada) and aspirated with a Millipore Multiscreen Manifold (Millipore-Sigma). The plate was washed once with 200 μ l of 10% cold TCA and twice with 200 μ l of cold 95% ethanol. Filters were transferred in scintillation vial containing 4 ml of scintillation solution. RT activity was determined with the Tri-Carb 2800TR liquid scintillation analyzer and the Quanta Smart software.

2.3.8 Infection assay with pseudotyped virions

Cells (5×10^4) were plated in 24-well plates and left for 16 h at 37°C. When HeLa cells were used, cells were transfected with 0.5 μ g of the pLVX-MFSD2amyc expression vector using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) 24h before infection. A volume of 200 μ l of Syncytin-2-pseudotyped NL4.3-based viruses was used for infection while added volume of Syn-1, control Env- and VSV-G pseudotyped virions were adjusted according to measured reverse transcriptase activities of virus stocks. Cells were infected in a final volume of 200 μ l, in FBS-free DMEM medium in the presence of 8 μ g/ml of polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). For infection experiments in presence of galectins, unless otherwise stated, 4 μ M of recombinant Gal-1 or Gal-3 was added to viral preparations before infection. As controls, an equal volume of 1x PBS was added to viral preparations (virus only), whereas 50 mM β -Lactose was combined with 4 μ M of recombinant galectins for other control samples (Gal + lactose). Cell-virus mixtures were finally spinoculated at 1000 x g for 2 h at 25°C or 4°C. Cells were then washed with 1x PBS and fresh complete medium was added to the cells, which were incubated for 24 h at 37°C. Infected cells were either detected by fluorescent microscopy for pseudotyped NL4.3env-GFP viruses or by luciferase assay for NL4.3env-Luc pseudotyped viruses. For detection of the GFP fluorescence, infected cells were washed with warm 1x PBS and then fixed in a 2% paraformaldehyde (PFA) solution for 15 min

at room temperature. After three washes, fluorescent cells were observed under an Eclipse Ti microscope (Nikon, Mississauga, Canada) with an ELWD 20x objective. Three to five representative fields were captured for each condition and representative images of two independent experiments were selected. For luciferase assays, infected cells were washed once with warm 1x PBS before lysis in 150 μ l of cold 1x luciferase lysis buffer (25 mM Tris pH7.8, 2 mM DTT, 1% Triton X-100, 10% Glycerol). Cells were lysed for 20 min at 4°C and the lysate was cleared by centrifugation at 16 000 x g, 10 min, 4°C. Each sample (25 μ l) was added to a 96-well luminometer plate in triplicates and the luciferase activity was measured using a luciferase buffer (20 mM Tricine, 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 220 μ M CoA, 4.7 μ M D-luciferin potassium salt, 530 μ M ATP, and 33.3 mM DTT) with the Dynex MLX microplate luminometer (Lemieux et al. 2004). Luciferase activities were calculated as the mean Relative Light Unit (RLU) value $\pm$ SEM of triplicate samples and normalized for the protein concentration of each sample.

2.3.9 Cell fusion assay

Villous cytotrophoblasts (1.5×10^6) and BeWo (8×10^4) cells were cultured in 24-well plates, on poly-D- or poly-L-lysine-coated glass coverslips (micro cover glass 12mm circle, VWR International, Mississauga, Canada) respectively. Villous cytotrophoblast were cultured for 4 days in regular medium containing 1x PBS or with medium containing 50 mM β -Lactose (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). At day 3 and 4 of differentiation, cells were fixed with cold methanol for 30 min at -20°C. BeWo cells were cultured in presence of 0,5% dimethylsulfoxide (DMSO) or 50 μ M forskolin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 24 h before changing the medium with medium containing either 1x PBS or 50 mM β -Lactose. Cells were treated for another 24 h before fixation for 30 min in cold methanol at -20°C. For experiments with siRNA transfections, 15 nM of Flexitube siRNA (SI00035924 5'CGCCAACACCATCGTGTGCAA3' and SI02628269

5'CGCCAGCAACCTGAATCTCAA3') or control siRNA were transfected into BeWo cells using the Hiperfect reagent (Qiagen, Mississauga, Canada) following manufacturer's instructions. BeWo cells were treated with 50 μ M forskolin or 0.5% DMSO 16 h after transfection and fixed after 48 h. Both cell types were washed 3 times with 1x PBS and then blocked with a solution of 1x PBS containing 2% FBS, 2% BSA and 2% human serum for 1 h at room temperature (RT). For both villous cytotrophoblasts and BeWo cells, the plasma membrane was stained with a mouse monoclonal anti-desmoplakin antibody (1/300 dilution, ab16434 anti-desmoplakin I+II, Abcam, Cambridge, MA) for 1 h at RT followed by 3 washes in PBS. Cells were then incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody (Invitrogen 1/1000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) for 1 h at room temperature. For nuclear staining, villous cytotrophoblasts were incubated for 30 min with 50 μ g/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich) at room temperature, while BeWo cells were treated with the Dapi NucBlue™ Cell Stain ReadyProbes™ reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) for 45 min at room temperature. Cells were washed three times with PBS before coverslips were mounted on a drop of ProLong® Gold antifade reagent (Life technologies, Eugene, OR). Cells were visualized with an A1R Nikon confocal unit attached to the inverted Eclipse Ti microscope suited for a Plan Fluor 20x / 0.8 N.A oil objective (Nikon Canada, Mississauga, Canada). A syncytium was defined as an agglomeration of 3 nuclei or more in the same cytoplasm. After analysis microscopic fields 5-10 per condition), a cellular fusion index was calculated by counting the number of nuclei in syncytia over the total number of nuclei per field and multiplying the results by 100 to obtain a percentage. An average percentage was calculated for each condition and the experiment was repeated three times. For each experiment, around 1000 nuclei were counted per condition. A final cellular fusion index (mean $\pm$ SEM) is presented and represent the final average of three values obtained from one well in three independent experiments.

2.3.10 Co-immunoprecipitation

Viral supernatants were collected, cleared from dead cells by centrifugation at 300 x g and filtered through a 0.22 μ m syringe filter. Viral supernatants were then concentrated using Amicon® Ultra 4 ml, 10kDa cutoff centrifugal filter units (Merck Millipore, Cork Ireland) following manufacturer's instructions. Protein G sepharose TM Xtra magnetic beads (GE Healthcare, USA) were washed three times with cold PBS-0.1% Tween-20 (PBST) and incubated with a 2 μ g / ml dilution of Flag antibody (F1804, mouse monoclonal Flag M2, Sigma-Aldrich) vs. a 2 μ g / ml dilution of isotypic control (GFP (B2) HRP, sc-9996, Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, TX) for 2 h at room temperature on a rotation wheel. Beads were washed twice with cold PBST and 200 μ l of concentrated viral supernatant were incubated with 5 μ l of Flag- or isotypic control-coupled magnetic beads overnight at 4°C on a rotation wheel. Following the incubation, beads were washed twice with cold PBST and then incubated with a 4 μ M dilution of rGal-1 supplemented with 1x PBS or 50 mM β -lactose for 1½ h. Beads were washed three times with cold PBST and virus/Gal-1 complexes were eluted in 25 μ l of elution buffer (1x NuPAGE sample reducing agent (Novex, life technologies), 1x Laemmli buffer in PBS) at 85°C for 10 min. Resulting samples were next analysed by western blot using rabbit polyclonal anti-galectin-1 (Abcam) or rabbit polyclonal anti-Myc (isotypic control) (sc-789 , Santa-Cruz, Tx) antibodies (1/100). For reverse co-immunoprecipitation, streptavidin sepharose magnetic beads (DynabeadsTM M-280 Streptavidin, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) were washed three times in cold PBST before use. Streptavidin beads (25 μ l / sample) were incubated with 4 μ M recombinant biotinylated Gal-1 for 1 h at room temperature. Following three washes in cold PBST, Gal-1-coupled beads were incubated with 200 μ l of Syn2-Flag or 20 μ l of control env- viral supernatants overnight at 4°C. After incubation, beads were washed three times with cold PBST. Protein complexes were eluted using 25 μ l

of elution buffer (1x NuPage, 1x Laemmli buffer in PBS) and boiled at 85°C for 10 min before western blot analysis.

2.3.11 Western-blot analysis

Cell extracts (30 µg) were loaded on 12% acrylamide-bis acrylamide gels. For co-immunoprecipitation experiments, 25 µl of immunoprecipitated samples and input were loaded on 14% acrylamide-bis acrylamide gels. Migrated proteins were then transferred on 0.45 µm Amersham™ Hybond™ (GE Healthcare Life sciences, Germany) membranes or 0.2 µm Immun-Blot® (BIO-RAD, USA) PVDF membranes (for co-IP experiments). Membranes were blocked in PBS-0.05% Tween-20 (PBST) containing 5% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) or 5% non-fat dry milk for 1½ h at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: mouse monoclonal anti-HIV-1 p24 antibody (1/200 dilution in PBST, from hybridoma 183-H12-5C, NIH AIDS reagent program), mouse monoclonal anti-Myc antibody (1/2000 from hybridoma MYC 9E10, purchased from ATCC), rabbit polyclonal anti-galectin-1 antibody (1/3000, ab25138, Abcam, Eugene, OR) or mouse monoclonal anti-GAPDH (1/2000, sc32233 Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, TX). Membranes were washed three times 10 min in PBST before incubation with secondary antibodies: ECL horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse or donkey anti-rabbit IgG antibodies (1/5000; GE Healthcare, UK). Proteins were detected following three 10 min-washes in PBST in 10 ml of -revealing solution (Sol. A (5 ml): 0.1M Tris-HCl pH 10.5, 18% hydrogen peroxide H₂O₂ mixed in Sol B (5 ml): 0.1M Tris-HCl pH 10.5, 450 µM p-Coumaric acid diluted in DMSO, 7.5 mM Luminol in DMSO) using the Fusion Fx 7 apparatus (MBI Lab equipment, Montreal Biotech Inc., Dorval, Canada).

2.3.12 Reverse transcription analysis

BeWo cells (10^6 cells) were treated with either 0.5% DMSO or 50 μ M forskolin for 6 hours to 24 hours and total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, CA) following manufacturer's instructions. cDNA synthesis was done with 3 μ g of RNA and the High Reverse Transcriptase (RNase H-) kit (Biobasic Inc, Mississauga, ON). Gal-1 and Actin cDNA were specifically PCR amplified using the following sets of forward and reverse primers: Gal-1 Fwd 5'GACTCAATCATGGCTTGTGTCTG3', Gal-1 Rev 5'GCTGATTTTCAGTCAAAGGCCACAC3', Actin Fwd 5'CGTGACATTAAGGAGAAGCTGT 3', Actin Rev 5'CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT 3'. PCR products were resolved on 1.5% TAE-agarose gels.

2.3.13 Statistical analysis

Graphpad Prism 5 was used for all statistical analyses. For comparison of two means, the Student t test was used. When multiple means were analysed, 1-way and 2-way ANOVA followed by a multiple comparison test (Bonferroni's) was chosen.

2.4 Results

2.4.1 Galectin-1 is involved in the syncytialisation of trophoblastic cells but acts in combination with other fusogenic factors

A previous study had demonstrated that soluble Galectin-1 (Gal-1) was capable of stimulating cytotrophoblast fusion (Fischer *et al.* 2010), although the mechanism behind this induction has not been clearly explained. We first sought to confirm the

fusion-inducing capacity of Gal-1 in both primary villous cytotrophoblast (vCTB) and BeWo cells.

Freshly isolated vCTBs were initially cultured in the presence or absence of β -lactose for 4 days, during which they differentiate and fuse to form large syncytia. Cell fusion was observed by confocal microscopy after staining of cell membranes and nuclei using an anti-desmoplakin antibody and propidium iodide, respectively. We observed that in presence of lactose, the size and number of syncytia was reduced compared to the control condition without lactose (Figure 2.1A). We repeated this experiment with the choriocarcinoma BeWo cell line, which can fuse when treated with forskolin, in a Syncytin-1 and Syncytin-2-dependent manner (Vargas *et al.* 2009; Toufaily *et al.* 2015). BeWo cells were treated with either DMSO or 50 μ M forskolin in the presence of β -lactose or not and cell fusion was analyzed by evaluating a cell fusion index following confocal microscopy. Lactose treatment had no significant effect on background levels of BeWo cell fusion, as shown by confocal images and by calculation of the cell fusion index (6,2% $\pm$ 0,65 for the PBS treatment vs 7,3% $\pm$ 2,0 for the lactose treatment), while significantly reduced fusion of forskolin-treated cells (21,3% $\pm$ 2,4 with PBS vs 11,7% $\pm$ 1,2 with lactose, $p < 0.05$) (Figure 2.1B). As lactose is a non-specific inhibitor of several galectins, we used commercially available siRNA directed against human Gal-1 to assess its role during trophoblastic cell fusion. BeWo cells were thus transfected with Gal-1-specific siRNA versus control siRNA (scramble siRNAs). Confocal microscopy analysis of syncytium formation of stained cells showed that scrambled siRNAs did not alter the levels of syncytialisation upon forskolin treatment whereas transfection of Gal-1 siRNA decreased syncytium formation in forskolin-induced BeWo cells (middle panel vs. lower panel, Figure 2.1C). Our results thus confirmed the involvement of Gal-1 in syncytialisation of trophoblastic cells.

2.4.2 Galectin-1 does not induce BeWo cell fusion and is not modulated by forskolin

Previous studies showed that the treatment of BeWo cells with extracellular Gal-1 was sufficient to induce syncytialisation (Fischer *et al.* 2010; Fischer *et al.* 2011). We wished to confirm these results in BeWo cells using a purification protocol of recombinant Gal-1, which has been demonstrated to lead to purified protein of high quality retaining its functional properties (Mercier *et al.* 2008; St-Pierre *et al.* 2011). BeWo cells were thus directly treated with Gal-1 or 1xPBS and assessed for cell fusion, as depicted in Figure 2.2A. Gal-1-treated BeWo cells had a slight increase in syncytia compared to PBS control cells but the difference was not significant (7.89% $\pm$ 1.24 for PBS-treated cells and 13.5% $\pm$ 3.56 for the Gal-1-treated cells, p value = 0.2114). These results were also confirmed by simple visual analysis of images taken from confocal microscopy showing no marked induction of cell fusion upon addition of Gal-1. Furthermore, when BeWo cells were treated with Gal-1, the expression and promoter activity of Syn-2, a crucial factor in BeWo cell fusion, was not altered, unlike cells incubated in the presence of forskolin (data not shown).

Since a determinant role of Gal-1 in cell fusion would suggest an induction of its expression during induced cell fusion, we also tested if Gal-1 levels changed during forskolin-induced cellular fusion by analysing its expression level through RT-PCR (Figure 2.2B). Interestingly, levels of transcripts did not vary between the DMSO- and forskolin-treated cells. Similarly, when levels of secreted Gal-1 was measured by ELISA in the medium of BeWo cells at 24 and 48 h after forskolin treatment, no significant increase was observed when compared to control cells (treated with DMSO). The mean concentration of Gal-1 $\pm$ SEM was 113 pg/ml $\pm$ 29 in DMSO- and 124.5 $\pm$ 54.5 in forskolin-treated BeWo cells at 24 h and 277 pg/ml $\pm$ 101 vs. 453 $\pm$ 106 at 48 h (Figure 2.2C). Our data hence suggest that Gal-1 acts in combination to other

factors during syncytialisation of trophoblastic cells, but cannot induce fusion on its own.

2.4.3 Analysis of the infection of Syncytin-2-pseudotyped viruses

As previous studies had demonstrated that Gal1 increases infection of retroviruses, such as HIV-1 and HTLV-1 and that this was mediated by its binding to the viral envelope protein (Gauthier *et al.* 2008; St-Pierre *et al.* 2011), we speculated that extracellular Gal-1 could equally act on the interaction of Syn-2 with MSFD2a to increase cell fusion. To assess this, we generated Syn-2-pseudotyped viruses, expressing either GFP or luciferase. The infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses was compared to two controls, one pseudotyped with the envelope G protein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G), and the other lacking a viral envelope protein (env-). We also generated MFSD2a-overexpressing HEK293T cells by stably transfecting an MFSD2amyc expression vector. MFSD2amyc expression was tested in each clone generated and tested for infection with env- and Syn-2-pseudotyped viruses (Figure S2.10). We first used the GFP-expressing pseudotyped viruses to infect parental HEK293T cells or MFSD2a-overexpressing HEK293T cells by spinoculation of viral preparations. As presented in figure 3A and as expected, env- viral particles were non-infectious, while Syn-2-pseudotyped viruses are significantly less infectious than the VSV-G control (upper panel, Syn-2 vs VSV-G). Importantly, Syn-2 expressing viruses were notably more infectious in MFSD2a-overexpressing HEK293T cells while no such difference was noted for VSV-G-pseudotyped viruses (Figure 2.3A). These results were confirmed when luciferase-expressing pseudotyped viruses were tested. Results showed that the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses correlated with MFSD2a expression levels, with a significant increase of infection in the MFSD2a stably-overexpressing cells compared to parental 293T cells (Figure 2.3B 66,37 +/- 19,23 for parental 293T cells versus 537,7 +/- 61,88 for the 293T MFSD2a cells) and no infection of HeLa cells, known to be deficient for MFSD2a expression (Esnault *et*

al. 2008). As expected, VSV-G pseudotyped-viruses presented no difference in the extent of infection between the different cells tested.

2.4.4 Galectin-1 but not Galectin-3 increases the binding of Syncytin-2 to MFSD2a

We next addressed the role of Gal-1 on the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses. Parental and MFSD2a stably-expressing HEK293T cells were infected in presence or absence of increasing concentrations of Gal-1 (Figure 2.4A and B). We found a significant dose-dependent increase in the infectivity of Syn-2-expressing viruses with Gal-1 compared to the virus only condition on both parental and MFSD2a cells, with optimal response being at a concentration of 4 μ M Gal-1 (Figure 2.4A). Interestingly, Gal-1 did not affect the infectivity of VSV-G viruses (Figure 2.4B). The specificity of Gal-1-induced increase of the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses was further revealed by its inhibition when lactose was added. As concentration above 4 μ M Gal-1 resulted in lower induction (Figure 2.4A), the 4 μ M concentration was chosen for the subsequent experiments.

As many glycosylated proteins are present in retroviral envelopes (Segura *et al.* 2008), we next sought to determine if Gal-1 could enhance the binding of viral particles to cell membranes in an env-independent manner. HeLa cells were thus transfected with MFSD2a expression vector and infected with Syn-2-pseudotyped viruses with or without Gal-1. The data presented in figure 2.4C indeed confirmed that the effect of Gal-1 on Syn-2 viruses depended on the expression of MFSD2a, as Gal-1 did not increase the infection of mock-transfected HeLa cells (Figure 2.4C), but significantly increased the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses on MFSD2a-transfected cells. Moreover, env- viruses remained non-infectious in the presence of Gal-1 (Figure 2.4D), showing that the observed effect of Gal-1 on Syn-2-pseudotyped viruses depended on the interaction between an envelope protein and its receptor. We also compared the

level of infection of Syn-2-pseudotyped viruses between addition of Gal-1 at the time of start of infection vs. pre-treatment of cells prior to infection and found no differences in the Gal-1-mediated enhanced infectivity of Syn-2 viruses between the two conditions (data not shown).

Because Gal-3 has important functions in the placenta (Jeschke *et al.* 2013), we wished to see if this galectin could also modulate the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses. For this purpose, we infected HEK293T cells with luciferase-expressing pseudotyped viruses in presence of either Gal-1 and Gal-3 (Figure 2.5A). As expected, the addition of Gal-1 during infection significantly increased the infectivity of Syn-2 pseudotyped viruses, which was blocked by the addition of lactose (Figure 2.5A). In contrast, Gal-3 did not significantly change the infectivity of Syn-2 expressing viruses. Gal-1 and Gal-3 showed no effect on the infectivity of VSV-G-pseudotyped viruses (Figure 2.5B). These results hence demonstrated that, unlike Gal-3, Gal-1 had a specific enhancing effect over the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses.

2.4.5 Syncytin-1 and -2 respond differently to the presence of Galectin-1

The fusogenic function of Syn-1 and -2 in the placenta is well established and redundant functions have been suggested for both endogenous retroviral proteins, despite the fact that previous results from our group has led to the determination that Syn-2 might be more important (Vargas *et al.* 2011). The demonstration that Gal-1 could potentiate the interaction of Syn-2 with its cellular receptor prompted us to investigate the response of Syn-1 to the addition of Gal-1. Infection of HEK293T cells with Syn-1 pseudotyped-viruses in presence of increasing concentrations of Gal-1 surprisingly showed a dose-dependent decrease in infectivity which was restored by the addition of lactose (Figure 2.6A). Next, comparison between Syn-1 and Syn-2 pseudotyped-viruses added to HEK293T cells in the presence of 4 μ M Gal-1 confirmed the increase of infection of Syn-2 expressing-viruses whereas, a significant decrease in

the infectivity of Syn-1 pseudotyped-viruses was again measured (Figure 2.6B). For each virus, the addition of the lactose inhibitor counteracted the Gal-1 modulation on their infectivity. In these experiments, cell viability was tested for all conditions and revealed no significant variation in between samples (data not shown).

2.4.6 Galectin-1 potentiate the attachment of Syncytin-2 pseudotyped viruses to the cell surface

The infection cycle of enveloped viruses starts with the attachment of the viral envelope to its specific receptor and / or coreceptor expressed on the surface of the targeted cell. Following the receptor binding, the viral particle can fuse directly with the cell plasma membrane or is first endocytosed and then fuse with the endosomal membrane after internalisation. Our results showed that Gal-1 increased the infectivity of Syn-2 pseudotyped viruses in a MFSD2a-dependent manner. We then wanted to determine if Gal-1 acted on the binding of Syn-2 with MFSD2a or on the fusion activity of Syn-2 after its interaction with MFSD2a. Thus, infection experiments with Syn-2 pseudotyped viruses were first performed at 4°C to block endocytosis followed by a shift to 37°C. Gal-1 was either added during the early phase of viral attachment or post-attachment, i.e. before or after spinoculation, respectively (Figure 2.7A). Results presented in Figure 2.7B showed that Gal-1 increased the infection of HEK293T cells by Syn-2-expressing viruses only when present during the attachment phase. Indeed, Gal-1 had a significant impact on viral infectivity during the binding of pseudotyped viruses but not after its binding at the fusion step. Syn-2 pseudotyped viruses showed similar infectivity than the virus only condition when lactose was combined to Gal-1 during infection. These results hence provided evidence for the mode of action of Gal-1 to be occurring at the binding step of infection of the Syn-2-pseudotyped viruses.

2.4.7 Higher association between Galectin-1 and viral particles in the presence of Syncytin-2

We were next interested in testing if Gal-1 showed higher affinity toward Syncytin-2-positive pseudotyped viruses. In order to address this, co-immunoprecipitation experiments using viral particles and recombinant Gal-1 were conducted. We first constructed a Flag-tagged Syn-2 expression vector and produced viral particles pseudotyped with this tagged version of Syncytin-2 (Figure 2.8). Importantly, the addition of a tag at position 75-82 did not alter the fusogenic capacity of Syn-2 (Figure S2.11). The expression of the protein could be further detected by western-blot analysis of lysed viral particles despite the weakness of the signal (Figure 2.8A). In addition, the Syn-2-Flag-pseudotyped viruses were comparatively as infectious as the wt Syn-2 in parental HEK293T and MFSD2a-overexpressing HEK293T cells and responded similarly to the addition of Gal-1 during infection (Figure 2.8B). Flag-tagged viral particles incubated with Gal-1 were then immunoprecipitated with Flag or isotypic control antibodies-coupled beads and analysed by western blot. As shown in Figure 2.8C, Gal-1 was co-immunoprecipitated with Syn-2-Flag-pseudotyped viruses (detected by the presence of the p24 capsid protein) and the addition of lactose to the combination of Gal-1 and pseudotyped viruses competed out the binding of Gal-1. A reverse co-immunoprecipitation approach was next carried out with Syn-2-Flag and Env- control pseudotyped viruses. A biotinylated version of recombinant Gal-1 was bound to streptavidin beads and used to co-immunoprecipitate pseudotyped viruses (Figure 2.8D). Upon western blot analyses of extracts before and after co-immunoprecipitation, the selective presence of p24 (and other non-cleaved versions) was seen only on viruses incubated with Gal-1. The association of the viruses to Gal-1 was lost upon addition of lactose prior to immunoprecipitation (Figure 2.8D). Of significant interest, the p24 signal was markedly more prominent for Syn-2-pseudotyped viruses in comparison to control env- viruses, while no such differences

were observed in terms of immunoprecipitated Gal-1 or viral-associated p24 prior to immunoprecipitation.

These results hence strongly suggest that Gal-1 interacts more importantly with Syn-2 pseudotyped viruses and that consequently Gal-1 binds to Syn-2.

2.5 Discussion

The formation of the syncytiotrophoblast layer in the human placenta is a highly regulated process that involves many actors including transcription factors (GCM1, CREB) (Yu *et al.* 2002; Schubert *et al.* 2008; Toufaily *et al.* 2015), hormones (hCG, estradiol) (Costa 2016a), fusogenic proteins (Syncytin-1 and -2) (Mi *et al.* 2000; Frendo *et al.* 2003b; Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2009), gap junction, tight junction and adhesion proteins (Connexin 43, ZO-1, Cadherin-11) (Frendo *et al.* 2003a; Getsios et MacCalman 2003; Pidoux *et al.* 2010) and galectins (Galectin-1) (Fischer *et al.* 2010). Over the years, molecular mechanisms leading to cytotrophoblast cell fusion have been unravelled (Gerbaud et Pidoux 2015). However, many questions remain regarding the connection between all these syncytialisation factors.

In this study, using pseudotyped viruses, we show for the first time a functional association between two proteins involved in vCTB fusion, namely the endogenous retroviral protein Syncytin-2 and the β -galactoside-binding lectin Galectin-1. We found that Gal-1 specifically and significantly increased infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses in MFSD2a-expressing cells and inversely, reduced the infectivity of Syn-1 pseudotyped viruses. We present evidence that Gal-1 acts on the binding of Syn-2 to the cell surface, by cross-linking Syn-2-expressing viral particles and MFSD2a-expressing cells.

The role of endogenous retroviral proteins in STB formation has been well established (Mi *et al.* 2000; Vargas *et al.* 2011), while the role of galectins in this specific placental process has been less extensively studied, except for the first identified member of this family, Gal-1 (Fischer *et al.* 2010; Hutter *et al.* 2016). In this study, we first confirmed the role of Gal-1 in the fusion of villous cytotrophoblast cells and BeWo cells by the use of the lactose inhibitor and Gal-1-specific siRNA. Although the involvement of Gal-1 in trophoblast cell fusion is already known, the mechanism behind its mode of action remains ill-defined (Fischer *et al.* 2010; Fischer *et al.* 2011; Hutter *et al.* 2016). Our initial results demonstrated that Gal-1 did not induce cell fusion and that its expression was not modulated upon induced cell fusion (Figure 2.2). Our results also confirmed the involvement of extracellular Gal-1 during the syncytialisation of BeWo cells and primary villous cytotrophoblasts (Figure 2.1). Therefore, levels of Gal-1 in unstimulated BeWo cells are sufficient for the protein to exert its function during syncytialisation but further requires additional factors involved in fusion. This is in contrast to previous studies by Fischer *et al.* (2010), which showed that Gal-1 on its own could induce trophoblast cell fusion. Differences in the purification protocol of the tested Gal-1 could be responsible for discrepancy in these results. It should also be noted that no lactose treatment was performed in this former study and it is thus difficult to assess the specificity of the observed induced cell fusion and Syncytin-1 expression (Fischer *et al.* 2010).

Based on previous studies showing an association between Gal-1 and retroviral infection, we thereby tested if Syn-2 might be directly mediating the effect of Gal-1 through the use of Syn-2-pseudotyped viruses and HEK293T cells, which has been previously shown to be strongly infected by such pseudotyped viruses (Blaise *et al.* 2004; Esnault *et al.* 2008). Indeed, addition of Gal-1 during infection significantly increased the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses but had no effect on VSV-G pseudotyped or env- viruses (Figures 2.4A and B). A significant dose-dependent effect

was noted for Gal-1-enhanced viral infection. Interestingly, high concentration resulted in reduced infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses and could suggest that Gal-1 binds to other sites on the protein at higher doses and sterically inhibits the binding of Syn-2 with MFSD2a at high concentrations. Co-immunoprecipitation experiments between purified Gal-1 and pseudotyped viruses further suggested that Syn-2 could interact with Gal-1 in a CRD-dependent manner (sensitive to the addition of lactose) (Figure 2.8). The specific effect of Gal-1 on Syn-2-pseudotyped viruses was confirmed to depend on the interaction with MFSD2a, as HeLa cells which do not express this protein were not infected by Syn-2-expressing viruses, even in the presence of Gal-1 (Figure 2.4 C). Altogether, these results showed that, even though Gal-1 can bind to viral particles when no envelope protein was present (Figure 2.8D), its activity still depends on the expression of Syn-2 and MFSD2a.

The step of viral infection during which Gal-1 acts was also determined to be at the attachment step (before fusion) (Figure 2.7). The same results have been observed for the Ebola virus, where Gal-1 increased the binding of viral particles to endothelial cells (Garner *et al.* 2015). For this virus, the envelope N-glycan responsible for the binding of Gal-1 was shown to localise in close proximity to the fusion peptide. Interestingly, previous work by Cui *et al.* has identified eight glycosylated Asn residues on the SU subunit of Syn-2 and one in the TM (Cui *et al.* 2016). It would be interesting to investigate if these Asn residues are important for the binding of Gal-1 with Syn-2. Mutation of MFSD2a N-glycosylation sites could also help understand the binding mechanism between Syn-2, Gal-1 and MFSD2a but more data on O-glycosylation sites as on the nature of the carbohydrates are needed.

The effect of Gal-3, another important placental galectin (Dalton *et al.* 2007; Jeschke *et al.* 2007) was also tested. No difference in infection by Syn-2-pseudotyped viruses was measured (Figure 2.5). A similar selective impact of Gal-1 vs. -3 on the

viral infectivity of HIV-1 has in fact been previously reported (Ouellet *et al.* 2005). A subsequent study argued that selective binding of Gal-1 to native gp120 was likely dependent on peripheral N-acetylglucosamine sugars, while Gal-3 binding required internal N-acetylglucosamine groups that are inaccessible due to the envelope folding (St-Pierre *et al.* 2011). It is possible that the tridimensional conformation of Syn-2 similarly allows selective binding of Gal-1.

Very interestingly, when the infectivity of Syn-1-pseudotyped viruses was tested in the presence of Gal-1 and compared to Syn-2-pseudotyped retroviruses, we observed an inverse effect. Indeed, addition of increasing doses of Gal-1 during infection resulted in a lactose-sensitive decrease in infection by pseudotyped-viruses (Figure 2.6). Syn-1 and -2 possess seven and nine N-glycosylation sites respectively (Cheynet *et al.* 2005; Cui *et al.* 2016) and several potential O-glycosylation sites. However, the arrangement and composition of the carbohydrates are unknown. Their receptors, SLC1A4, SLC1A5 and MFSD2a all have two N-glycosylation sites and numerous O-glycosylation sites (Marin *et al.* 2003; Reiling *et al.* 2011). Thus, the difference in the number, composition and arrangement of carbohydrates of Syn-1, Syn-2 and their receptors likely determines the differential effect of Gal-1 towards Syn-1 and -2. Because glycosylation varies between cells, we cannot be ascertained that glycan composition of Syncytin proteins or their receptors in HEK293T reflects the *in vivo* glycosylation state of these proteins in the placenta and further investigation is needed to extend these results to trophoblast cells. This is particularly relevant, as Syn-1 and -2 are differentially expressed in the placenta, with Syn-1 and the SLC1A4 receptor being expressed in fusogenic vCTB and non fusogenic EVT (Malassine *et al.* 2005; Muir *et al.* 2006) and Syn-2 restricted to vCTB (Malassine *et al.* 2007; Lu *et al.* 2017). Interestingly, the analysis of the N-glycan composition of STB, vCTB and EVT cells showed differences in the structural organization of carbohydrates, with vCTB and STB bearing mainly biantennary N-glycans and EVT multiantennary N-glycans (Chen

et al. 2016). Importantly, binding affinity of galectin proteins toward bi- and multiantennary N-glycans differs (Hirabayashi *et al.* 2002) and could consequently impact the susceptibility of glycosylated Syn-1 and Syn-2 and/or their receptors toward a modulatory effect by Gal-1 on their fusogenic properties. Further analysis of the composition of Syn-1 and -2 glycans as well as biomolecular analysis are needed to identify the glycosylation residues responsible for the binding of Gal-1 and understand potential different binding affinities of Gal-1 towards Syncytin proteins.

Altogether, our results show a specific and functional association between the endogenous retroviral protein Syn-2 and the β -galactoside-binding protein Gal-1 as well as presenting opposite response of Syn-1 and -2 to Gal-1. We propose that Gal-1 could favor or stabilize the interaction between Syn-2 and its cellular receptor MFSD2a during syncytialisation of trophoblast cells. This could be achieved by bridge formation of Gal-1 between Syn-2 and MFSD2a (Figure 2.9). Furthermore, as we and others have shown that Syn-1 and -2 are present at the surface of placental extracellular vesicles (Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014), our results further argue that Gal-1 could also play a role in the cellular internalization and / or fusion of these vesicles to target cells expressing their receptor. Furthermore, the functional association between Gal-1 and Syn-2 is of specific interest in the context of pre-eclampsia, where both proteins are dysregulated (Jeschke *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2011; Freitag *et al.* 2013; Hirashima *et al.* 2018). More studies are needed to further address this new regulatory mechanism in the context of this placental disorder.

2.6 Acknowledgments and funding

The authors thank Denis Flipo, Xavier Elisseeff and Antoine Beaulieu for their precious technical assistance. The authors are very grateful for researchers who supplied expression vectors.

This study was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (#298527-2013) and by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP130561).

2.7 Figures

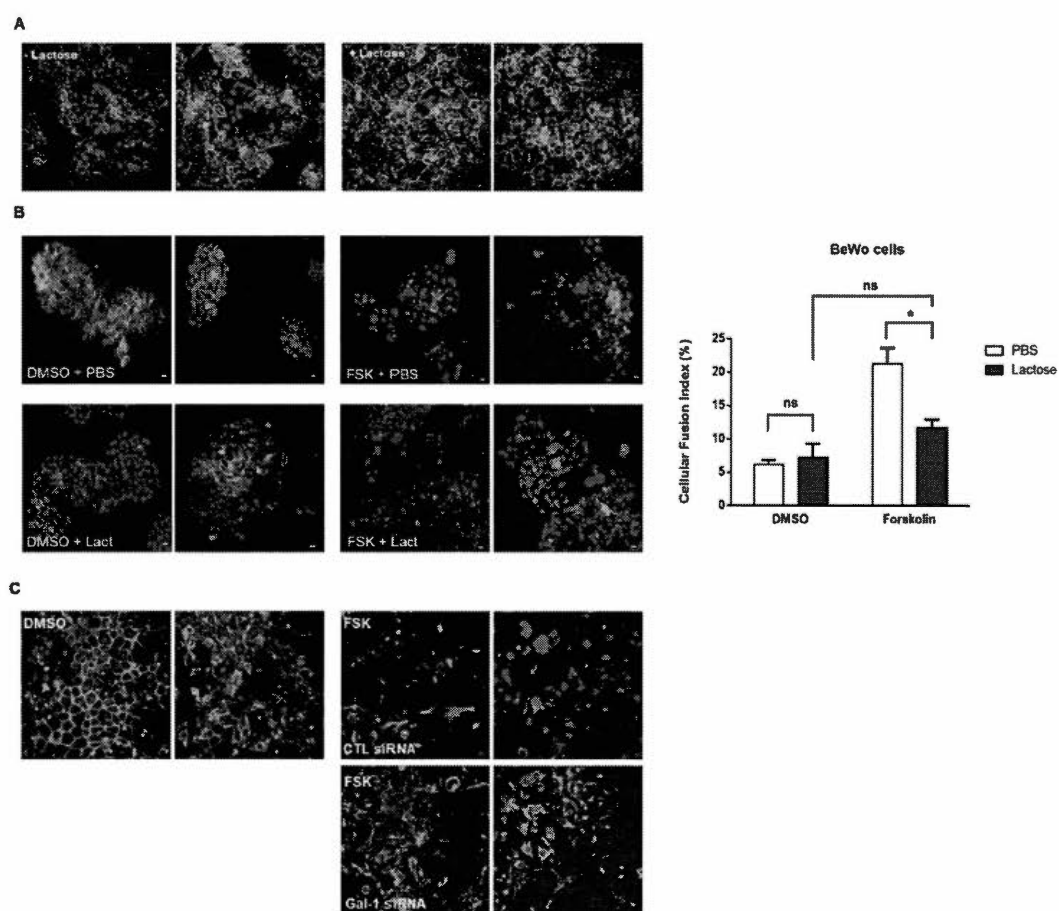


Figure 2.1: Galectin-1 is necessary for the fusion of trophoblastic cells.

Confocal microscopy images of primary cultures of villous cytotrophoblasts (A) or BeWo cells (B and C).

A. Villous cytotrophoblasts were cultivated for 4 days in absence (left panel) or presence (right panel) of lactose. After 4 days, cells were fixed and the plasma membrane (green) and nuclei (red) were stained in order to assess cellular fusion. Two representative fields are presented. **B.** BeWo cells were treated with DMSO or forskolin (50 μ M) for 24h before PBS or lactose were introduced in the culture media. Cells were fixed and the plasma membrane (green) and nuclei (blue) were stained. Two representative fields per condition are presented. A cellular fusion index, expressed as percentage of fusion, was calculated for each condition using the following formula: $(NS/NT) * 100$ with NS: number of nuclei in syncytia, NT: total number of nuclei. * $p < 0.05$. **C.** BeWo cells were transfected with scrambled- or Gal-1-siRNA and were then treated with either DMSO or forskolin (50 μ M). Cells were fixed and plasma membrane (green) and nuclei (red) stained 24h after treatment to visualize cell fusion events.

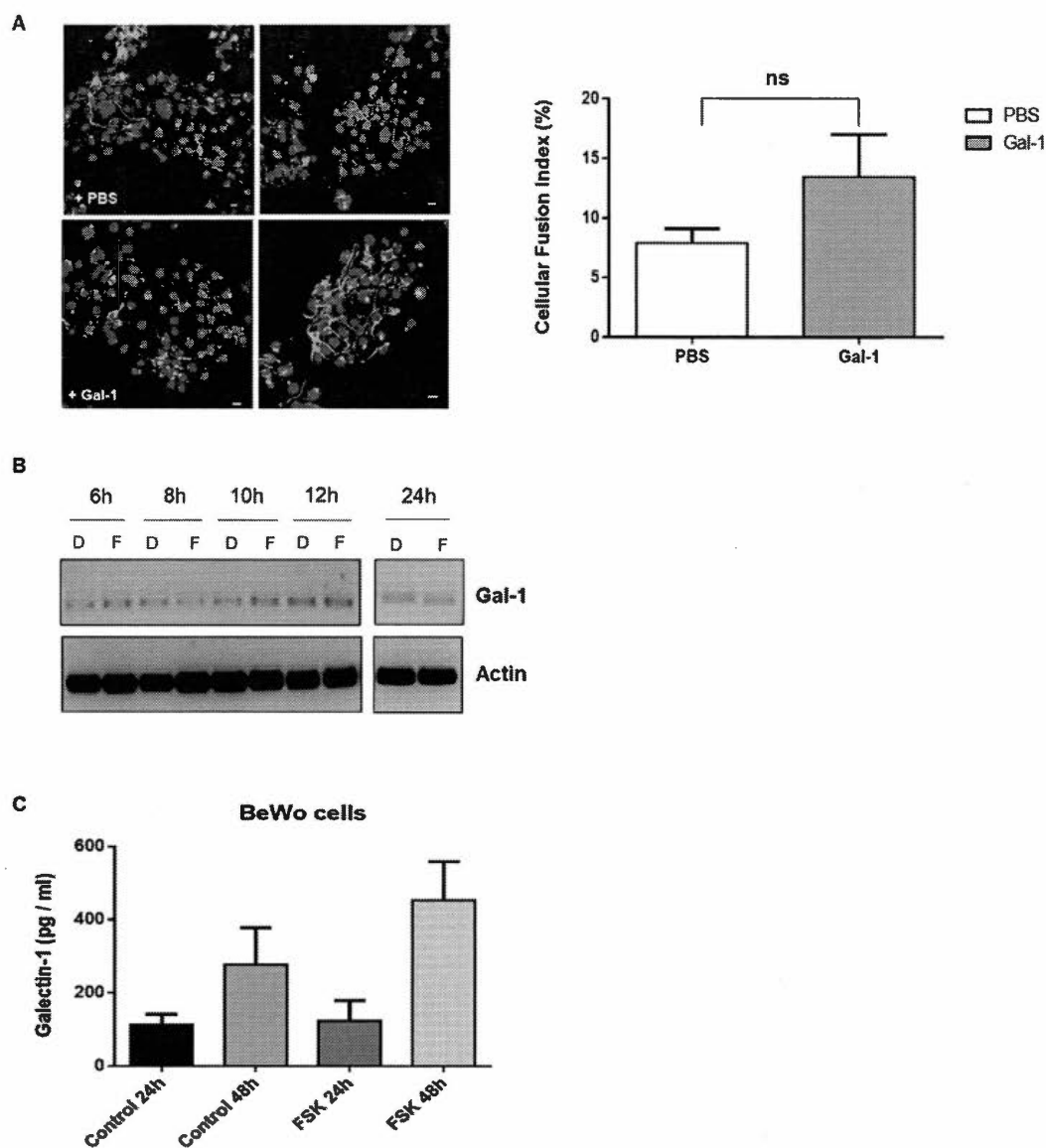


Figure 2.2: Galectin-1 alone does not induce cell fusion and is not modulated by BeWo cell activation.

A. Confocal microscopy images of BeWo cells after treatment with PBS (upper panel) or 4 μ M recombinant Gal-1 (lower panel). BeWo cells were fixed 24 h after treatment

and membranes (green) and nuclei (blue) were stained. A cellular fusion index was calculated from three independent experiments with the following formula: $(NS/NT) * 100$ with NS: number of nuclei in syncytia, NT: total number of nuclei. Scale bar 10 μ m. **B.** Time course expression of Gal-1 mRNA in DMSO- (D) or forskolin (F)-treated BeWo cells. RT-PCR analysis of Gal-1 and Actin expression was conducted after RNA isolation from BeWo cells at different time points. Following specific Gal-1 and Actin cDNA amplification, PCR products were resolved on a 1.5 % TAE-agarose gel. **C.** Secretion of Gal-1 from BeWo cells at 24 and 48 h was assessed by ELISA. BeWo cells were either treated with 0.5% DMSO (Control) or 50 μ M forskolin (FSK) for 24h and 48h then the conditioned media were collected and protein levels of secreted Gal-1 was measured.

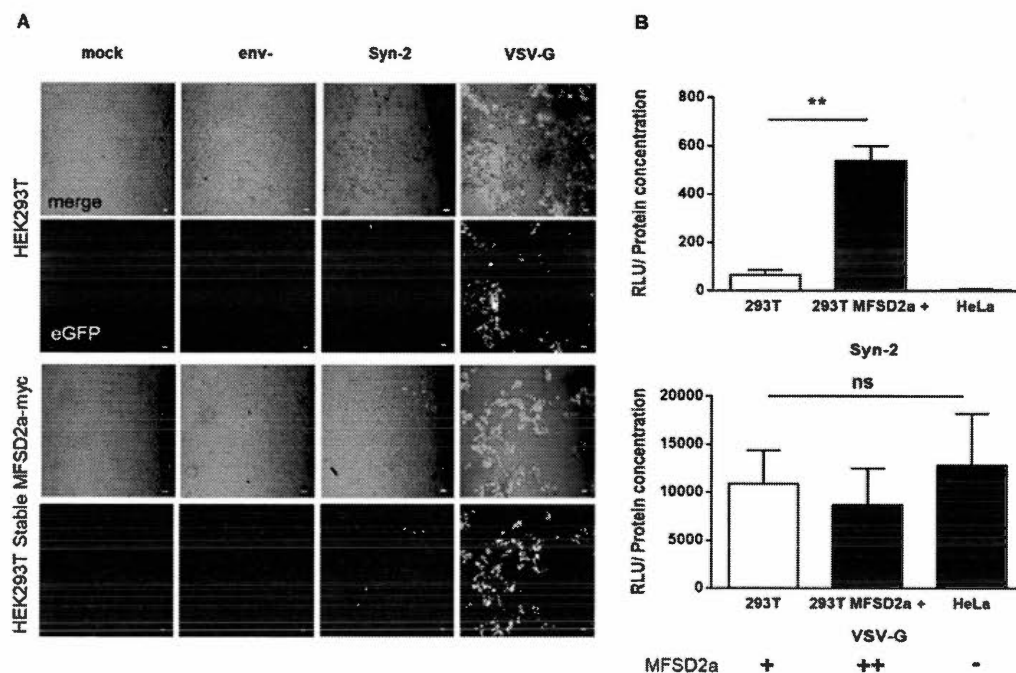


Figure 2.3: Syncytin-2-pseudotyped viruses are infectious in MFSD2a-expressing cells.

A. Confocal microscopy images of parental and MFSD2a stably-expressing HEK293T cells infected with GFP-expressing pseudotyped viruses. HEK293T cells were mock-infected or infected with env-, Syn-2 and VSV-G pseudotyped viruses and GFP expression was detected by confocal microscopy analysis. Scale bar 10 μ m. B. Luciferase assay results from infected parental HEK293T, MFSD2a stably-expressing HEK293T and HeLa cells. Cells were infected in triplicate samples with luciferase-expressing pseudotyped viruses (Syn-2 and VSV-G) and lysed 24h p.i. in luciferase buffer. The luciferase activity of each sample (expressed as relative light unit (RLU)) was normalized over the total protein concentration. One experiment representative of three is presented for Syn-2-pseudotyped viruses (upper graph) and VSV-G-pseudotyped viruses (lower graph). + and - signs under the graphs indicate MFSD2a cellular expression level. ** $p < 0.01$ Student t test.

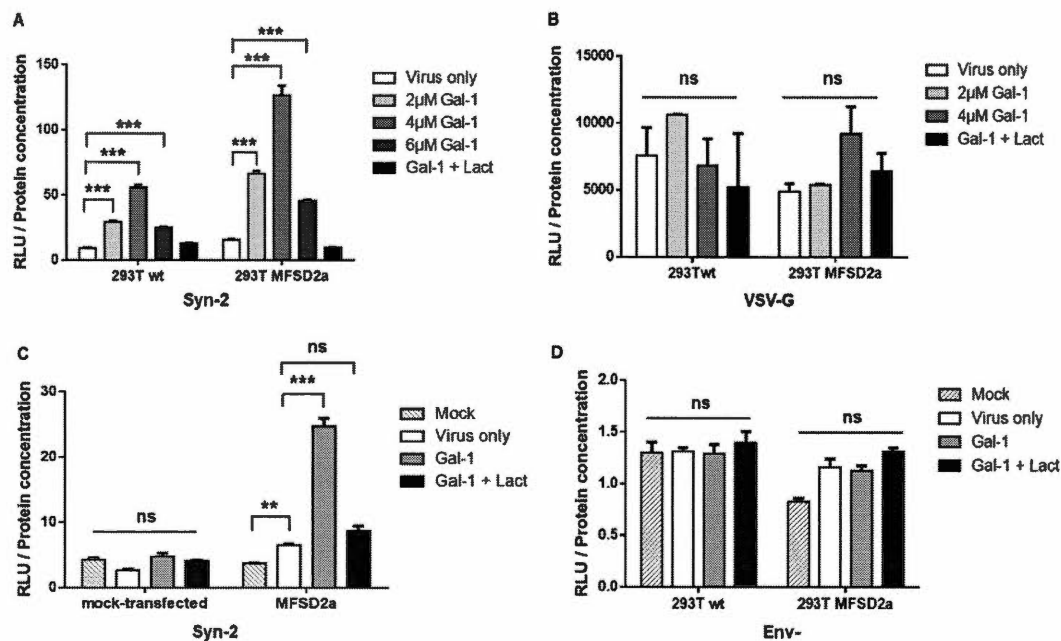


Figure 2.4: Galectin-1 specifically increases Syncytin-2-pseudotyped viruses in a MFSD2a-dependent manner.

Parental and MFSD2a stably-expressing HEK293T cells were infected (triplicate wells) with luciferase-expressing Syn-2- (A) or VSV-G- (B) pseudotyped viruses in presence of PBS (virus only, white bars), increasing doses of Gal-1 (grey bars) or 4 μ M of Gal-1 and lactose (dark grey bars). Luciferase expression was measured 24h p.i and relative light unit (RLU) values were normalized over the total protein concentration of each sample. The mean luciferase activity $\pm$ SEM of triplicate samples are presented C. HeLa cells were mock-transfected or transfected with a MFSD2a expression vector and infected with mock (striped bars) or Syn-2-pseudotyped viruses combined with PBS (white bars), 4 μ M Gal-1 (light grey bars) or 4 μ M Gal-1 and lactose (dark grey bars). 24h p.i. cells were lysed and luciferase activity was measured for each sample, normalized over the protein concentration and expressed as the mean $\pm$ SEM of triplicate samples. D. Parental and MFSD2a stably-expressing HEK293T cells were mock-infected (striped bars) or infected with Env- control viruses in presence of PBS (white bars), 4 μ M Gal-1 (light grey bars) or Gal-1 + lactose (dark grey bars) and luciferase activities were measured 24h p.i. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM relative light unit over the protein concentration of triplicates. The graphs present the results of one experiment representative of two (C) or three (A, B and D). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

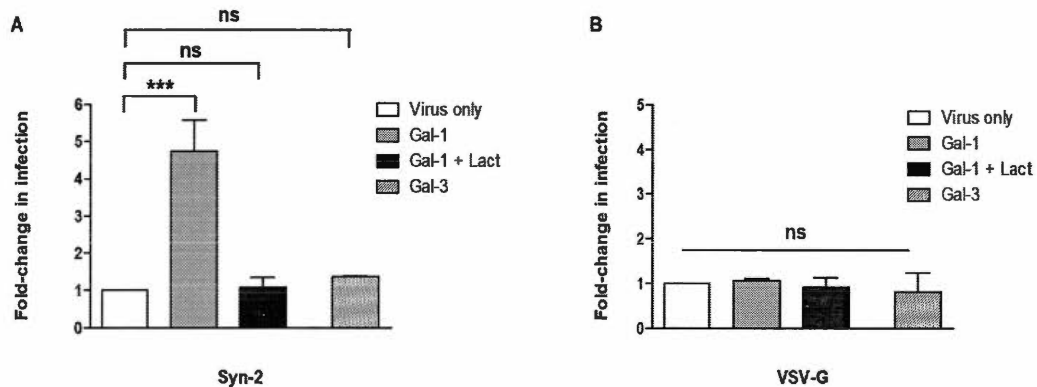


Figure 2.5: Galectin-1 but not Galectin-3 increases the infection rate of Syn-2-expressing viruses.

HEK293T cells were infected (triplicate samples) with luciferase-expressing Syn-2- (A) or VSV-G- (B) pseudotyped viruses in presence of PBS (virus only, white bars), 4 μ M Gal-1 (light grey bars), 4 μ M Gal-1 and lactose (dark grey bars) or 4 μ M Gal-3 (crossed bars). Luciferase activity was measured and normalized over the protein concentration of samples. The mean normalized luciferase activity $\pm$ SEM was calculated for triplicates and the results of three independent experiments expressed as fold-change in infection over the virus only condition. *** $p < 0.001$.

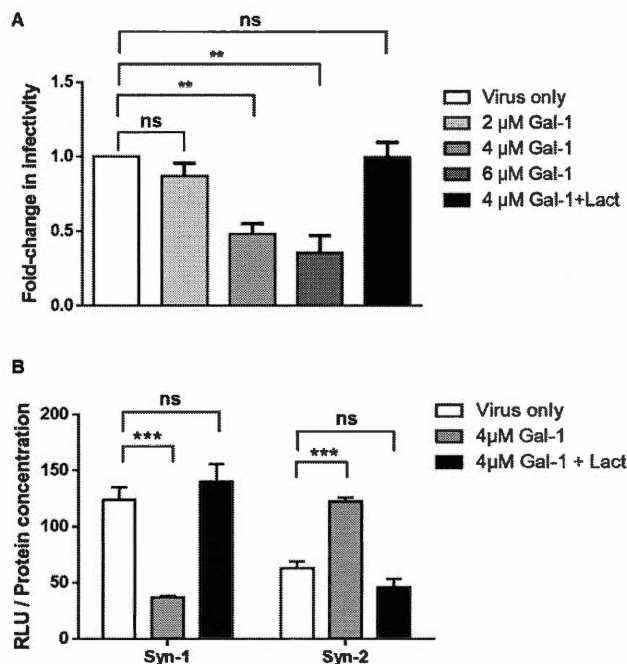


Figure 2.6: Galectin-1 differently affects Syncytin-1 and Syncytin-2-pseudotyped viruses.

A. Luciferase-expressing Syn-1-pseudotyped viruses were produced and used to infect HEK293T cells in presence of PBS (virus only, white bars), increasing doses of recombinant Gal-1 (grey bars) or Gal-1 + lactose (dark grey bars). The mean luciferase activity $\pm$ SEM normalized over the protein concentration of triplicate samples was calculated and the results of three independent experiments were expressed as fold-change in infectivity. **B.** HEK293T cells were infected either with Syn-1- or Syn-2-pseudotyped viruses in presence of PBS (white bars), Gal-1 (grey bars) or Gal-1 + lactose (dark grey bars). Cells were lysed 24 h p.i. and the mean luciferase activity of triplicate samples normalized over the protein concentration of each sample $\pm$ SEM was calculated. The graph presents the results of one out of three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

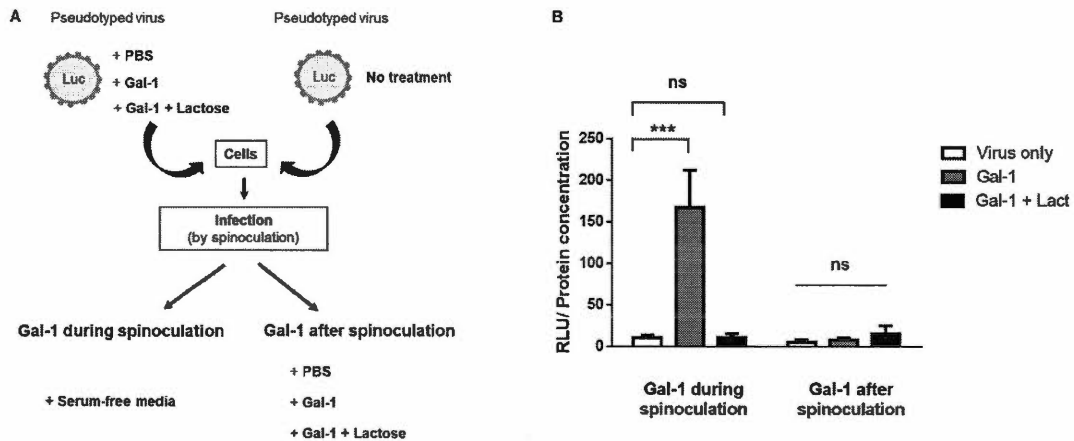


Figure 2.7: Galectin-1 enhance the attachment of Syn-2 pseudotypes to the cells surface.

A. Schematic representation of the experiment. **B.** Syn-2 pseudotyped viruses were used to infect HEK293T cells at 4OC in presence (left part of the graph) or absence (right part of the graph) of PBS (virus only), 4 μ M Gal-1 (light grey bars) or 4 μ M Gal-1 + lactose (dark grey bars). After spinoculation, the cells infected without Gal-1 (right

part of the graph) were incubated for 1h at 37°C with either PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + lactose. 24 h p.i., cells were lysed and the mean luciferase activity of triplicate samples was calculated. The graph represents the mean luciferase activity normalized over the protein concentration $\pm$ SEM of three independent experiments. *** $p < 0.001$.

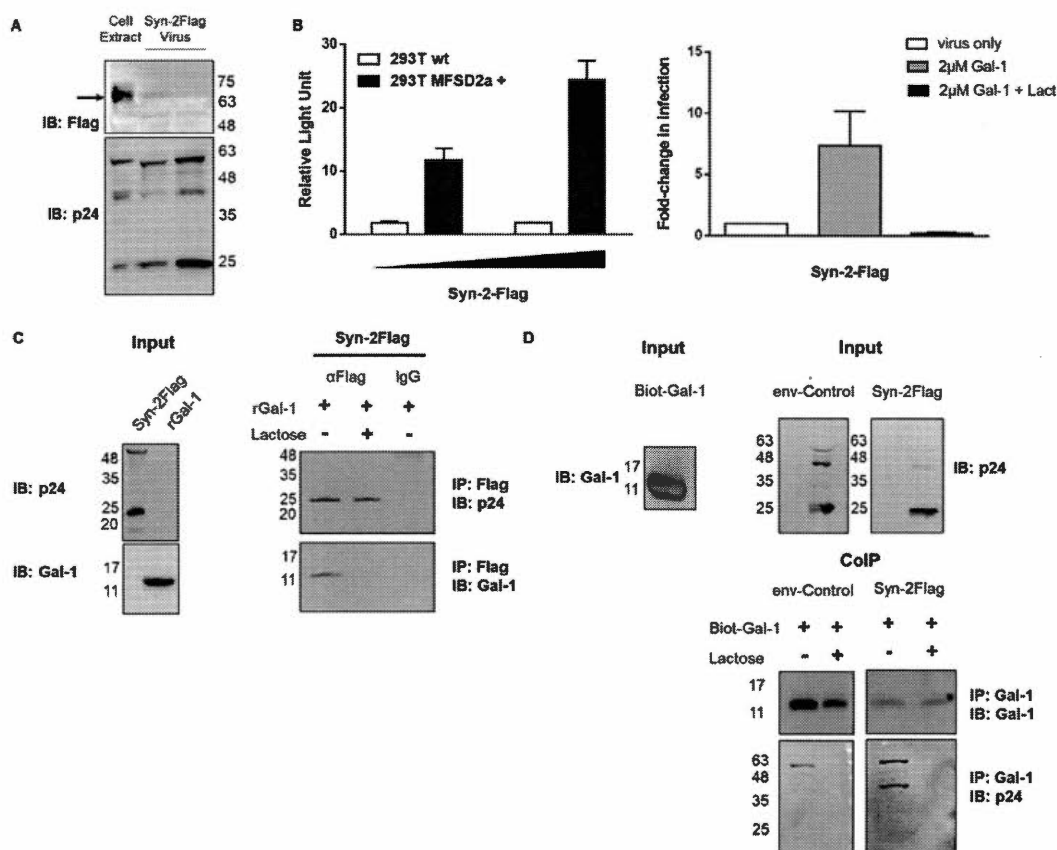


Figure 2.8: Gal-1 interacts with viral particles in a CRD-dependent manner.

A. Western-blot detection of Syn-2-Flag in lysates from virus-producing cells and two different isolates of Syn-2-Flag pseudotyped viruses. Cell lysate and concentrated viral supernatants were loaded on a 12% acrylamide /bis-acrylamide gel. **B.** Parental or MFSD2a-stably expressing HEK293T cells were infected with increasing dose of Syn-

2 Flag pseudotyped viruses (left graph) or with pseudotyped viruses combined with PBS (white bar), 2 μ M Gal-1 (light grey bar) or 2 μ M Gal-1 + latose (dark grey bar) (right graph). The graph on the left represent the mean luciferase activity of triplicates $\pm$ SEM, expressed as relative light unit. The data presented on the right graph is the mean luciferase activity normalized over the protein concentration of two independent experiments with triplicate samples $\pm$ SEM and expressed as fold-change in infection compared to the virus only condition. **C.** and **D.** Western-blot analysis of co-immunoprecipitated recombinant galectin-1 with Syn-2-Flag-pseudotyped virions (**C**) and co-immunoprecipitated pseudotyped virions with recombinant biotinylated galectin-1 (**D**).

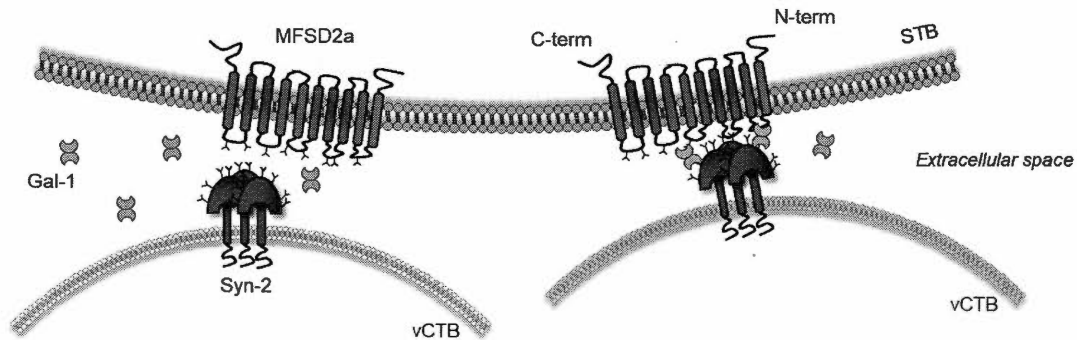


Figure 2.9: Proposed model of the association between Galectin-1, Syncytin-2 and MSFD2a during villous cytotrophoblast fusion.

Gal-1 present in the extracellular space could bind to certain N- and O-glycans (Y) on Syn-2 and MSFD2a and help or stabilize the interaction between Syn-2 and MSFD2a during the fusion of vCTB with the placental STB. The numbers and positions of glycosylation sites on MSFD2a are arbitrary except for the two N-glycosylation sites positioned on the second extracellular loop.

2.8 Supplementary materials

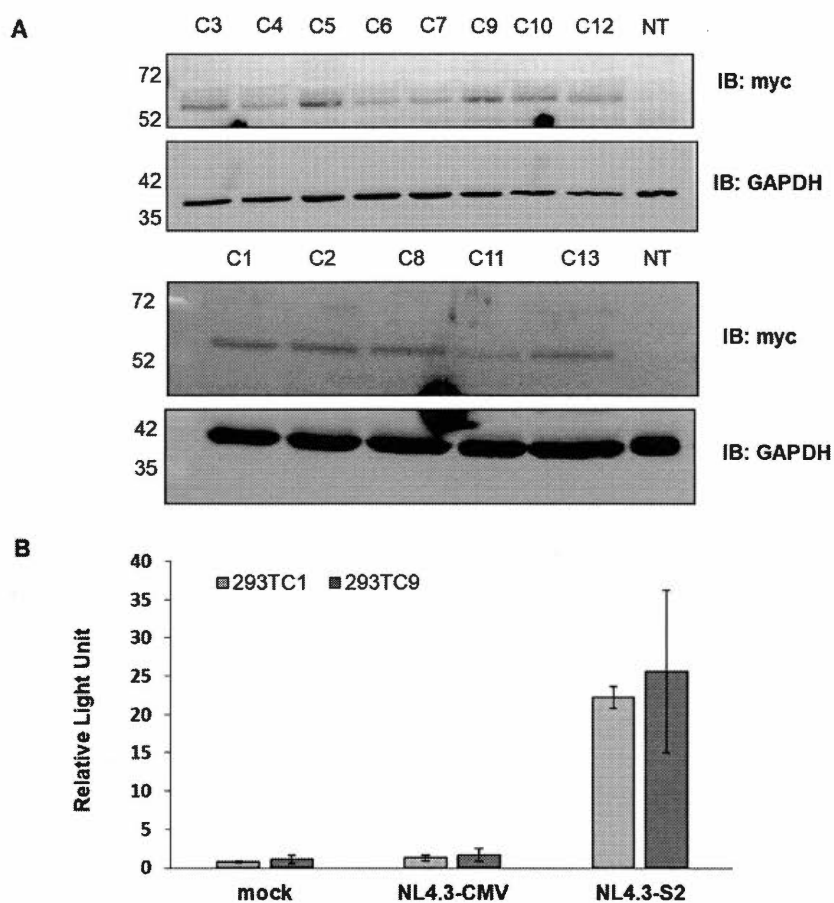


Figure 2.10: Expression of MFSD2a in MFSD2amyc stable HEK293T cells.

A. Western-blot analysis of MFSD2a-myc expression in the different clones obtained (C1 to C13). NT: Non-transfected HEK293T control cells. **B.** Comparative infection of two clones (C1 and C9) with env- (NL4.3-CMV) and Syn-2 (NL4.3-S2) pseudotyped viruses in triplicate samples. Luciferase activity was measured 24h after infection and expressed as the mean Relative Light Unit $\pm$ SD.

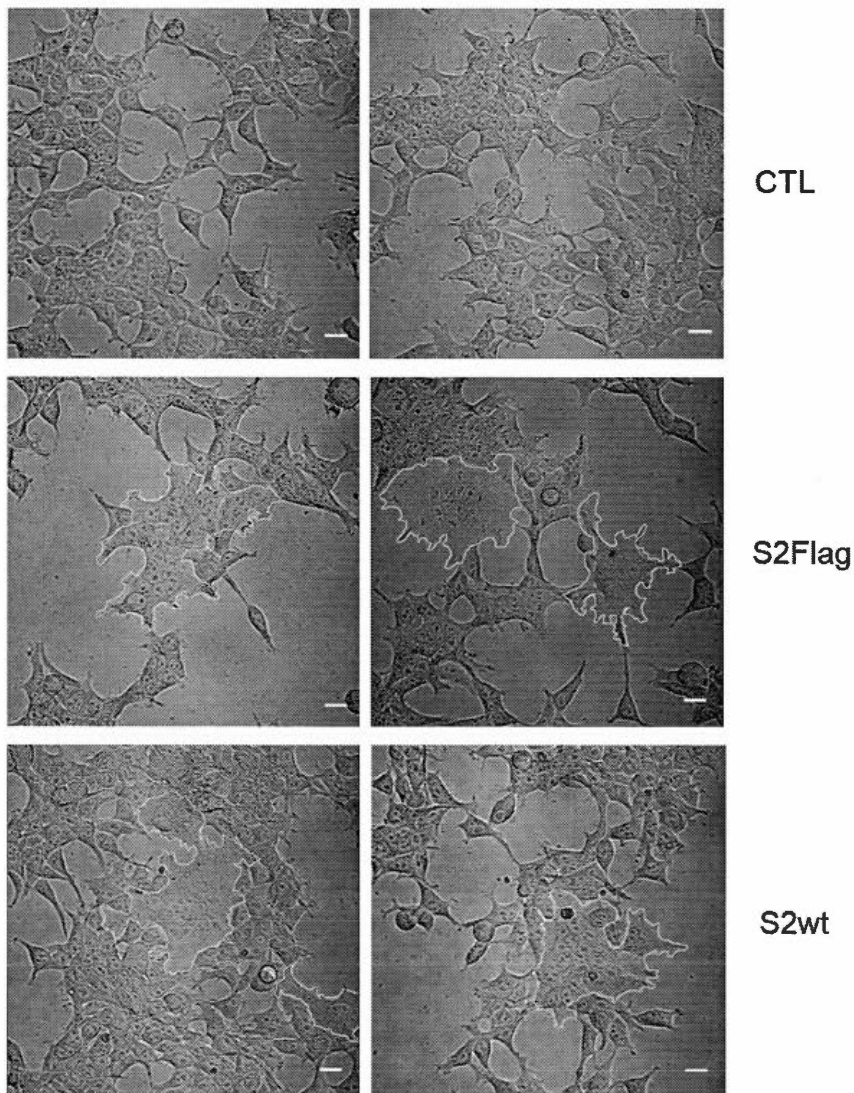


Figure 2.11: Fusogenic activity of Syn-2-Flag construct in HEK293T cells.

Cells (5×10^4) were seeded in a 24-well plate 16h before transfection. Cells were transfected with 0.25 μg of phCMV- (CTL), phCMV-Syn-2-Flag (S2Flag) or phCMV-Syn-2 (S2wt) and cell fusion was detected by live confocal microscopy (Nikon ELWD 40x objective). Two focal fields are presented per condition and syncytia were outlined in white (Fiji Image J software). Scale bar 20 μm .

CHAPITRE III

ASSOCIATION DE LA GALECTINE-1 AVEC TROIS PROTÉINES D'ENVELOPPES RÉTROVIRALES ENDOGÈNES HUMAINES PLACENTAIRES

AVANT-PROPOS

Dans ce chapitre est présenté un deuxième ensemble de résultats qui ont été obtenus au cours de mon travail de recherche sous la direction de Dr Benoit Barbeau et sous la codirection de Dre Julie Lafond.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a été réalisé par moi-même avec assistance du Dr Yong Xiao. L'analyse et la discussion des résultats ont été réalisées par moi-même. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec Dre Sachiko Sato de l'Université de Laval à Québec et avec Dr Norbert Bannert du Robert Koch Institut de Berlin. Les Galectine-1 et -3 recombinantes utilisées dans les expériences ont été produites par Guillaume St-Pierre à Québec. Le manuscrit a été rédigé par moi-même sous les conseils de rédaction de Dr Benoit Barbeau.

Ces résultats ont été compilés sous la forme d'un article qui sera soumis au journal « Retrovirology ». La mise en forme du manuscrit a été modifiée afin de répondre aux exigences de l'université.

3 Galectin-1 modulates the fusogenic activity of three placental endogenous retroviral envelopes

Caroline Toudic¹, Guillaume St-Pierre², Yong Xiao¹, Maike Mauer³, Norbert Bannert³, Julie Lafond¹, Éric Rassart¹, Sachiko Sato² and Benoit Barbeau^{1*}

¹ Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques, and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada, H3C3P8;

² Glycobiology and Bioimaging Laboratory, Research Centre for Infectious Diseases and Laval University, Quebec City, Canada; ³ Robert- Koch Institute, Berlin, Germany

*To whom correspondence should be addressed: Benoit Barbeau, Department of biological sciences, Université du Québec à Montréal, 141 Avenue du Président-Kennedy, H2X 1Y4, Montréal, Québec, Canada, Tel.: (514) 987-3000 ext. 4576; Fax: (514) 987-4647; E-MAIL: barbeau.benoit@uqam.ca

3.1 Abstract

Human endogenous retroviruses (ERV) represent around 8 % of the human genome. Although none of these retroviral sequences are capable of producing infectious viral particles, some ERV encode functional proteins, as exemplified by the well characterized envelope genes expressed in the human placenta. Syncytin-1 and -2, two fusogenic ERV envelope glycoprotein, are indeed necessary for the formation of the placental syncytiotrophoblast layer. Previous studies have suggested that these HERV proteins, in addition to the poorly characterized EnvP(b) envelope protein, are involved in other fusion events, such as myoblast and osteoclast fusion (essential for skeletal muscle and bone formation, respectively) as well as intercellular communication via their presence in extracellular vesicles. Galectin-1 and -3 are two β -galactoside binding proteins also known to be linked to trophoblast fusion during placental development. Interestingly, our previous results have shown that Galectin-1 could act on Syncytin-2-mediated cell fusion. As results suggested that Galectin-1-dependent modulation of the fusogenic potential of Syncytin-2 was different from Syncytin-1, we were interested in determining how the impact of Galectin-1 compared between Syncytin-1, Syncytin-2 and EnvP(b) in different cell context. We first demonstrated that Syncytin-1 and -2 vs. VSV-g-pseudotyped viruses (control) showed different levels of infectivity toward the simian COS-7 cell line and various human cell lines (HeLa, HEK293T, HUVEC, U87-MG and Jurkat). In the presence of Galectin-1, infection of Syncytin-2-pseudotyped viruses was augmented for all tested cell lines, an increase which was blocked by lactose (Galectin-1 inhibitor). In contrast, Galectin-1 reduced infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses toward HEK293T, had no significant impact on the infection of U87-MG, but surprisingly increased infection of other cells lines. HEK293T, HeLa and U87-MG cells were generally unresponsive toward the addition of Galectin-3 in infection experiments with pseudotyped viruses. Finally, using a syncytium assay, we found that Galectin-1 increased fusion of EnvP(b)-expressing

HEK293T cells, similarly to Syncytin-2. In this study, we report functional associations between three placental ERV and Galectin-1 and -3. These findings could bring new information with respect to the modulation of the fusogenic activity of HERV envelope proteins in the placenta as well as in other biological and pathological processes.

Key words: human Endogenous Retroviruses, Syncytin-1, Syncytin-2, EnvP(b), Galectin-1, cell fusion

3.2 Introduction

Endogenous retroviruses (ERV) repeatedly and independently integrated the human genome during evolution and today contribute around 8 % of our DNA (Lander *et al.* 2001; Dupressoir *et al.* 2012). With time, most ERV sequences were silenced by mutations or deletions but a handful of ERV *env* genes were selectively conserved and are still transcriptionally active in different tissues (de Parseval *et al.* 2003). Among the latter, ERVW-1 and ERVFRD-1 have been the focus of many researches in the field of endogenous retroviruses as they respectively code for Syncytin (Syn)-1 and -2, two envelope glycoproteins that present important function in the placenta (Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000; Blaise *et al.* 2003; Mallet *et al.* 2004; Cheng et Handwerger 2005; Malassine *et al.* 2005; Malassine *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2009; Lu *et al.* 2017). Acquired around 25-40 and 45-60 million years ago respectively (Esnault *et al.* 2013), both proteins conserved a specific expression in the placenta as well as specific features common to retroviral envelope proteins, e.g. surface (SU) and transmembrane (TM) subunits, a fusion peptide, an immunosuppressive domain and plasma membrane localization signal (Lavialle *et al.* 2013). Syn-1 and -2 are necessary for the formation and renewal of the placental syncytiotrophoblast (STB) layer (Blond *et al.* 2000; Mi *et al.* 2000; Frendo *et al.* 2003b; Vargas *et al.* 2009; Lu *et al.* 2017), a syncytial structure formed by the fusion of underlying mononucleated cells called

villous cytotrophoblasts (vCTB) and allowing nutrient and gas exchanges between maternal and fetal circulations, as well as producing pregnancy hormones and cytokines (Burton *et al.* 2015; Costa 2016b; Costa 2016a). The fusion of vCTB involves the fusogenic activity of Syn-1 and -2, which depends on their interaction with specific receptors, identified as SLC1A4 and SLC1A5 for Syn-1 and MFSD2a for Syn-2 (Blond *et al.* 2000; Lavillette *et al.* 2002; Esnault *et al.* 2008; Toufaily *et al.* 2013). Most importantly, decreased expression of Syn-1 and Syn-2 in the placenta was associated with preeclampsia (PE), a pregnancy syndrome characterized by placentation defaults, endothelial cell dysfunction and inflammation (Lee *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2011).

Two other endogenous envelope proteins discovered in the placenta, namely EnvV and EnvP(b), were also investigated for a function in STB formation (Blaise *et al.* 2005; Vargas *et al.* 2012). However, both Env proteins were found to be dispensable during trophoblast syncytialisation, with no fusogenic activity detected for the human EnvV and no essential contribution from EnvP(b) to the fusion of choriocarcinoma BeWo cells, although the protein presented fusogenic capacities (Blaise *et al.* 2005; Vargas *et al.* 2012). EnvP(b) also possesses immunosuppressive properties and could nonetheless participate in the tolerogenic immune response that prevails at the maternal-fetal interface during pregnancy, along with Syn-1 and Syn-2 (Aagaard *et al.* 2005; Mangeney *et al.* 2007; Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2012; Lokossou *et al.* accepted).

Although ERV envelope proteins have been mostly investigated in the context of the placenta, more recent studies have shed light on their potential implication in other physiological processes, such as myoblast and osteoclast fusion (Soe *et al.* 2011; Bjerregaard *et al.* 2014; Bjerregard *et al.* 2014; Frese *et al.* 2015; Redelsperger *et al.* 2016). Furthermore, numerous reports have accumulated demonstrating that abnormal expression of Syn-1 and -2 proteins occurs in various pathologies, such as cancers and neurodegenerative diseases (Diaz-Carballo *et al.* 2015; Benesova *et al.* 2017; Wang *et*

al. 2018). Indeed, several studies have prominently associated expression of Syn-1 and another ERV-W member in the physiopathology of multiple sclerosis (MS) (Antony *et al.* 2004; Garson *et al.* 2005; Antony *et al.* 2006; Laufer *et al.* 2009). Syn-1 expression was significantly upregulated in glial cells of MS patients and linked with the induction of an ER stress response in astrocytes, affecting the function of both astrocytes and oligodendrocytes (Dolei *et al.* 2002; Antony *et al.* 2007). Moreover, abnormal expression of Syn-1 was reported in several cancers and associated with prognosis and cancer progression, by mediating the fusion of cancer cell with endothelial cells (Bjerregaard *et al.* 2006; Strick *et al.* 2007; Larsen *et al.* 2009; Aagaard *et al.* 2012; Yan *et al.* 2017). EnvP(b) was also shown to contribute to placental cancer progression, mediating fusion between choriocarcinoma BeWo and endothelial cells (Aagaard *et al.* 2012).

The β -galactoside-binding protein Galectin-1 (Gal-1) is a small soluble protein, secreted from cells following a non-conventional secretion pathway and plays diverse functions in immunoregulation, angiogenesis, cell migration, embryo implantation and placentation (Poirier *et al.* 1992; Perillo *et al.* 1995; Moiseeva *et al.* 1999; Blois *et al.* 2007; Rabinovich et Toscano 2009; D'Haene *et al.* 2013; Tirado-Gonzalez *et al.* 2013). Gal-1 was the first identified member of the galectin protein family which regroups 15 proteins that share a 130 amino acid region called the carbohydrate-recognition domain (CRD) (Barondes *et al.* 1994a; Vasta *et al.* 2017). Gal-1 belongs to the prototypic galectins and is synthesized as a monomer, containing a single globular CRD, and non-covalently associates into homodimers with two oppositely-oriented CRDs that can functionally cross-link glycoproteins expressed on the same cellular membrane or on two adjacent cells (Elola *et al.* 2015). In the placenta, Gal-1 was localized in extravillous cytotrophoblasts, vCTB and the STB and involved in extravillous cytotrophoblast migration, maternal-fetal immunotolerance and fusion of vCTB cells (Vicovac *et al.* 1998; Blois *et al.* 2007; Fischer *et al.* 2010; Kolundzic *et al.* 2011; Barrientos *et al.* 2014). Gal-1 is also an important factor in tumor progression, with

proangiogenic and immune evasion functions, and during viral infections (Rabinovich et al. 2009; Vasta 2009). Noteworthy, Gal-1 increased the infectivity of two human exogenous retroviruses, namely Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) and Human T-cell Leukemia Virus type-1 (HTLV-1) (Ouellet *et al.* 2005; Gauthier *et al.* 2008; Mercier *et al.* 2008).

Because of the expression of Gal-1 in vCTB and STB and its previously reported impact on infection by Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) and Human T-cell Leukemia Virus type-1 (HTLV-1), we previously investigated on the modulation of HERV Env-mediated trophoblast fusion. Using Syn-2-pseudotyped viruses, we demonstrated that Gal-1 increased the infectivity of these viruses. Interestingly, we also found that Gal-1 decreased the infectivity of Syn-1-pseudotyped viruses (Toudic *et al.* submitted). Based on these observations, the aim of the present study was to further investigate the association of Gal-1 with Syn-1, Syn-2 and EnvP(b) in various cell lines. Our results showed that Gal-1 increased the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses in all tested cell lines whereas its association with Syn-1-expressing viruses resulted in cell-specific outcomes. Interestingly, Gal-3, another placental galectin, had limited effect on both Syn-1- and Syn-2-pseudotyped viruses. Finally, our results showed that Gal-1 increased the fusion activity of EnvP(b), suggesting an association between Gal-1 and this endogenous retroviral envelope.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Cell lines

Human Embryonic Kidney (HEK) 293T, HeLa, Cos-7, Jurkat and U87-MG were purchased from ATCC, while HUVEC were kindly given by Dr Borhane Annabi (University of Quebec in Montreal, Montreal, Canada). HEK293T, HeLa and Cos-7 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal

bovine serum (FBS) (Wisent inc., St-Bruno, Canada). U87-MG cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10 % FBS (Wisent inc., St-Bruno, QC). HUVEC cells were grown in EGMTM-2 BulletKitTM medium (Lonza, Walkersville, MD) containing 5 % FBS. Jurkat cells were sustained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium containing 10 % FBS (Wisent inc., St-Bruno, QC). All cells were cultivated without antibiotics and maintained at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere.

3.3.2 Plasmids

pNL4.3env-luc was obtained from NIH AIDS Reagent Program (Germantown, MD). The vesicular stomatitis virus G protein expression vector, pLP/VSV-G, was purchased with the ViraPowerTM Lentiviral packaging Mix kit (K497500, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). Codon optimized cDNAs for Syn-1 and EnvP(b) were synthesized (GenScript, Hong Kong) and cloned between the HindIII and NotI sites of the pTH vector for Syn-1 or in frame with a V5-tag between the HindIII and BamHI sites of the pTH vector for EnvP(b). The pLVX-MSFD2aV5/His expression vector was constructed by PCR amplification of the MSFD2aV5/His cDNA from the pEF6-MSFD2aV5/His expression vector (Spinola et al., 2010) (a kind gift from Dr. Tommaso Dragani and Dr. Francesca Colombo, Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy) with the BamHI restriction site-containing forward 5'-CATCAGGAATTCGGATCCATGGCCAAAGGAGAAGGCGCCGAGAGC-3' and PspOMI restriction site-containing reverse 5'-CCGAGCGGGCCCTCAATGGTGATGGTGATGATGACCG-3' primers. The amplified MSFD2aV5/His was then subcloned into the pLVX-Puro plasmid (Takara Bio Inc., Mountain view, CA) between the BamHI and NotI restriction sites. Single N-glycosylation MFSD2a mutants were generated by site-directed mutagenesis of the cDNA to convert asparagine 217 and 227 into glutamine-encoding codons using the Phusion® high fidelity DNA polymerase enzyme (New England Biolabs Ltd., Whitby,

ON) following the manufacturer's protocol and the forward and reverse primers: forward N217Q 5'-GTTTCCAGGACCTCCAGAGCTCTACAGTAG-3', reverse N217Q 5'-AAGGCGTGTCTGCTTGGCCCACGATTTGTC-3', forward N227Q 5'-CTTCACAAAGTGCCCAGCATAACATGGCAC-3' and reverse N227Q 5'-CTACTGTAGAGCTATTGAGGTCCTGGAAAC-3'. The phCMV1-eGFP, phCMV1-Syncytin-2 and phCMV1-Syncytin-2-Flag expression vectors were previously described (Vargas et al. 2009, Toudic et al. submitted). All new constructs were verified by sequencing.

3.3.3 Recombinant Galectin-1 and -3 production

Recombinant galectins were purified as previously described (Toudic et al. submitted). Briefly, recombinant Gal-1 and -3 production was initiated by inoculation of Terrific Broth with BL21(DE3)-hGal-1 or hGal-3 and overnight culture at 37°C. Recombinant protein expression was induced by addition of 1mM Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). Bacteria pellets were lysed by sonication (30 s at 120W (8 times, 1 min interval)) in 10ml ice cold buffer (22mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 1mM DTT and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)). Lysates were cleared by ultracentrifugation at 112,500 g for 30 min at 4°C (T70.1 rotor) in a L8-80M centrifuge (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). Recombinant Gal-1 and Gal-3 were trapped on α -Lactose agarose column (Sigma-Aldrich), washed with PBS and eluted in 1 ml fractions with 10 ml of 150 mM lactose (Sigma-Aldrich) in PBS. For Gal-1, fractions that contained the galectin were pooled and incubated overnight at 4°C with 100 mM iodoacetamide to prevent oxidation of Gal-1. Free iodoacetamide and lactose were then removed by a series of dialysis against PBS. Fractions that contained Gal-3 were pooled and lactose was removed using a HiPrep 26/10 desalting column (GE HealthCare, Chicago, IL). Proteins were further passed on Acticlean Etox columns (Sterogene, Carlsbad, CA) to remove endotoxins and then filter-sterilized using syringe filters (0.22 μ m pore size) (Millipore, Cork, Ireland). Protein concentration was determined

by the Bradford assay. Finally, endotoxin activity was assessed by the LAL assay (QCL-1000TM Assay, Lonza, Mississauga, ON). Red blood cell hemagglutination assay was used to evaluate Gal-1 and -3 activities before use.

3.3.4 Production of pseudotyped NL4.3 viruses and titration

Envelope-defective HIV-1 proviral NL4.3 expressing luciferase were used to produce CMVeGFP (env-control), Syn-2-, or VSV-G-pseudotyped virions. HEK293T (2×10^6) cells were co-transfected using polyethylenimine (PEI) (Polysciences Inc., Warrington, PA) (1 μ g DNA: 7 μ l PEI (1 μ g/ μ l PEI stock solution) with 5 μ g of pNL4.3env-Luc and 1.5 μ g of either phCMV-Syncytin-2Flag, phCMV-eGFP or pLP/VSV-G. Cells were then replenished with fresh medium, which was next harvested between 36 to 40 h after transfection. Supernatants were centrifuged at 300 x g for 5 min, passed through a 0.22 μ m-pore-size sterile syringe filter (Cat. 28145-501, VWR International North America), aliquoted and stored at -80°C before use. Virus-containing supernatants (10 μ l) were next quantified by the addition of 40 μ l of a reaction mix (60 mM Tris-HCL pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 0.2 M KCl, 0.6 mM EGTA, 0.06 % Triton X-100, 2.5 % ethylene glycol, 6 mM DTT, 0.4 mM GSH, 0.025 U poly(rA) oligo-dT, 2.5 μ Ci ³H-dTTP) and incubation for 2 h at 37°C. The reaction was stopped with 150 μ l of cold 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 min. Samples were then loaded on a Millipore Multiscreen Glass fiber FC plate (Millipore-Sigma, Etobicoke, Canada) and aspirated with a Millipore Multiscreen Manifold (Millipore-Sigma). The plate was washed once with 200 μ l of 10% cold TCA and twice with 200 μ l of cold 95% ethanol. Filters were transferred in scintillation vial containing 4 ml of scintillation solution. Reverse transcriptase activity was determined with the Tri-Carb 2800TR liquid scintillation analyzer and the Quanta Smart software (PerkinElmer, Woodbridge, ON).

3.3.5 Infections with pseudotyped viruses

HEK293T, HeLa, Cos-7 and U87-MG (5×10^4) and HUVEC (5×10^3) cells were plated in 24-well plates 16 h before infection. Jurkat cells (10^6) were seeded in 24-well plates in RPMI-1640 without FBS and incubated for 1 h at 37°C before infection to allow adhesion of cells to the wells. Incubation of Jurkat cells in serum-free media was previously shown to allow transient adhesion of cells without altering their viability and to increase their transfection efficiency (Audiffred *et al.* 2010). For experiments with wtMFSD2a or N217Q and N227Q N-glycosylation mutants, HeLa cells were transfected with 0.5 µg of pLVX-MFSD2aV5, pLVX-N217QV5 or pLVX-N227QV5 expression vectors and 3 µl of the lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were infected with either 200 µl of Syn-2, 50 µl of Syn-1, 150 µl of env-control or 20 µl of VSV-G viral supernatants in a final volume of 200 µl. Cells were spinoculated at 1000 x g for 2 h at 25°C. After infection, cells were rinsed once in PBS and replenished with complete media containing penicillin and streptomycin (Wisent inc., St-Bruno, QC). Infections were detected 24 h post-infection through luciferase assays as described previously (Toudic *et al.* submitted). Luciferase activities were calculated as the mean Relative Light Unit (RLU) value +/- standard error of the mean (SEM) of triplicate samples and normalized against the protein concentration of each sample.

3.3.6 Computational analysis of MFSD2a transcript expression in human cell lines

The expression of *MFSD2a* transcripts in HeLa, HEK293, HUVEC and U87-MG was collected from the Human Protein Atlas database (Uhlen *et al.* 2010), in the Cell Atlas (www.proteinatlas.org/ENSG00000168389-MFSD2A/cell). The RNA-sequencing data for MFSD2a, expressed as transcripts per kilobase million (TPM), were plotted against mean relative light unit (RLU) values obtained from three independent

infection experiments of HeLa, HEK293T, HUVEC and U87-MG cells with Syn-2-pseudotyped viruses.

3.3.7 Viability MTT Assay

Cells were seeded in 24-well plates before incubation with either PBS, 4 μ M recombinant Gal-1 or 50 mM lactose (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) for 2 h while centrifugated at 1000 x g to mimic infection conditions. After the spin, cells were washed once with PBS and complete media were added to cells, which were incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Twenty-four h later, medium was removed from cells and 150 μ l of a thiazolyl blue tetrazolium bromide solution (5mg/ml in PBS) (M5655 Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) was added to 150 μ l of serum-free media and incubated for 3 h on cells at 37°C, 5 % CO₂. After incubation, 300 μ l of MTT solvent solution (4mM HCL, 0.1% NP40 in isopropanol) was added and plates were incubated for 30 min on a shaker at room temperature (RT). Supernatants (100 μ l) were transferred in a 96-well plate in triplicate and the OD_{570 nm} absorbance was measured with a microplate spectrophotometer (Eon spectrophotometer, BioTek instruments, Winooski, VT).

3.3.8 Cell fusion assay

HEK293T cells (5×10^4) were seeded on glass coverslips 16 h prior to transfection with control, EnvP(b)- or Syn-2-expression vectors using PEI as a transfection reagent (1 μ g DNA: 7 μ l PEI ratio). For the cell fusion experiments with Syn-2, cells were transfected with 0.35 μ g of plasmids (phCMV1- or phCMV1-Syncytin-2). For the experiments with EnvP(b), 0.5 μ g of the pTH- or pTH-EnvP(b) plasmids were used. Six hours after transfection, cells were incubated with either PBS, 4 μ M recombinant Gal-1 or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose for 24 h at 37°C. Plasma membranes and nuclei were then stained using CellMask™ Orange (1 μ g/ml) (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) and Hoechst (2 μ g/ml) (Thermo Fischer Scientific,

Waltham, MA) solutions respectively, following the manufacturer's instructions. Cells were fixed for 15 min in 2% PFA in PBS at RT and mounted on a drop of ProLong™ Gold antifade reagent (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Eugene, OR). Cells were visualized by laser-scanning confocal microscopy with a Nikon Eclipse Ti microscope coupled with a Nikon A1R confocal unit and Plan Fluor 20x /0.75 Mlmm oil or CFI Plan Apochromat λ 60x / 1.4 N.A. objectives (Nikon Canada, Mississauga, ON). A syncytium was defined as a cluster of at least three nuclei in the same cytoplasm (Vargas et al. 2011) and eight microscopic fields were analysed per condition. For each condition, a cellular fusion index was calculated by dividing the number of nuclei per syncytia by the total number of nuclei in one field and multiplying the result by 100 to obtain a percentage. Over 1500 nuclei were counted per condition. An average percentage was then calculated per condition and the experiment repeated three times for both Syn-2- or EnvP(b)-transfected cells. A final cellular fusion index (mean $\pm$ SEM) was calculated and represents the final average of three values obtained from three independent experiments.

3.3.9 Immunolocalization of MFSD2a proteins

Cos-7 cells (4×10^4) were plated on glass coverslips in 24-well plates. Cells were transfected with 0.5 μ g of empty vector, and MFSD2a wt or N-glycosylation mutants expression vectors using PEI (1 μ g DNA: 7 μ l PEI ratio). Forty-eight hours after transfection, cells were fixed with 2 % PFA in PBS for 15 min at RT then washed three times in PBS. Cells were permeabilized for 15 min in PBS 0.01 % Triton X-100 at RT and washed three times in PBS. Blocking solution (5 % FBS, 5 % BSA in PBS) was added for 45 min at RT then cells were incubated overnight with mouse monoclonal anti-V5 antibodies (1/500, R960-25, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) at 4°C with shaking. Following three washes in PBS, cells were incubated in the dark with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 568 antibodies (1/1000, A11004, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) for 1½h at RT. Cells were then

washed three times in PBS and incubated with Dapi NucBlue™ Cell Stain ReadyProbes™ reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for 45 min at RT and finally mounted on a drop of ProLong™ Gold antifade reagent (Invitrogen) after three washes in PBS. Protein localisations were analyzed by confocal microscopy using the Eclipse Ti microscope coupled with an A1R confocal unit and the CFI Plan Apochromat λ 60x/1.4 objective (Nikon Canada, Mississauga, ON).

3.3.10 Western-blot analysis

Cellular protein extracts (25 μ g) were resolved on 10 % acrylamide/bis-acrylamide SDS gels. Proteins were transferred on 0.45 μ m methanol-activated Amersham™ Hybond™ PVDF membranes (GE Healthcare Life Science, Germany). Membranes were incubated with the blocking solution (5% skimmed-milk 0.05% PBS-tween20 (PBST)) for 1 h at RT. Mouse monoclonal anti-V5 antibodies (1/3000, R960-25, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Eugene OR) or mouse monoclonal anti-GAPDH antibodies (1/2000, sc32233, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, TX) were then incubated overnight at 4°C. Following three washes in PBST, membranes were incubated with ECL horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG secondary antibodies (1/5000, GE Healthcare, UK). After three washes in PBST, proteins were detected in 10 ml of revealing solution (Sol. A: 0.1 M Tris-HCl pH 10.5, 18% H₂O₂ mixed in Sol B: 0.1M Tris-HCl pH 10.5, 450 μ M p-Coumaric acid diluted in DMSO, 7.5 mM Luminol in DMSO) using the Fusion Fx7 apparatus (MBI Lab equipment, Montreal Biotech Inc., Dorval, Canada).

3.3.11 Statistical Analysis

Otherwise notified in the figures' legend, results were obtained from three independent experiments. Graphpad Prism 6 was used for all statistical analyses. Comparison of

multiple means was done with 1-way or 2-way ANOVA tests, followed by Bonferroni's multiple comparison test.

3.4 Results

3.4.1 Galectin-1 increases the fusion capacity of the endogenous retroviral envelope Syncytin-2

We previously established a link between Syn-2 and Gal-1 using Syn-2-pseudotyped viruses and showed that the addition of recombinant Gal-1 during infection of HEK293T cells significantly increases the infectivity of Syn-2-expressing viruses (Toudic *et al.*, submitted). The combination of lactose with Gal-1, an antagonist of several galectin proteins (Hirabayashi *et al.* 2002), precluded the effect of Gal-1, showing a CRD-dependent effect of Gal-1 during infection. We wished here to confirm this interaction in a cell fusion model and used HEK293T cells, which form large syncytia once Syn-2 is expressed in the cells (Blaise *et al.* 2003; Vargas *et al.* 2012). After transfection, HEK293T cells were incubated with PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose and the fusion of Syn-2-transfected cells was assessed by confocal microscopy after staining of the plasma membrane and nuclei. In this set of experiments, cells were transfected with low amount of Syn-2 in order to better appreciate the potential effect of Gal-1 during the fusion of the cells. The results presented in Figure 3.1A showed that Gal-1 treatment increased the number of syncytia compared to the control. Also, the addition of lactose reduced the number of syncytia to the level of the PBS control, showing a CRD-dependent effect. A cellular fusion index was then calculated as mentioned in the material and method section (Figure 3.1B). Without Gal-1, the fusion index reached 8.56% $\pm$ 0.6 and significantly increased to 17.5% $\pm$ 2.1 when 4 μ M Gal-1 was added to Syn-2-transfected cells ($p=0.016$). When 50 mM lactose was combined with Gal-1, the fusion index reached 5.76% $\pm$ 0.22 with no significant

difference with the control. Thus, extracellular Gal-1 potentiates fusion abilities of Syn-2 and this effect depends on the availability of the CRD.

3.4.2 Env-control, Syncytin-1, Syncytin-2 and VSV-G-pseudotyped viruses differentially infect human and simian cell lines

We wanted next to analyse the impact of Gal-1 on Syn-1 and -2 in broader perspective and in different cell lines representing cell types known to have association with function of Syncytin proteins. Cells lines included HEK293T and Cos-7, which both express human and simian MFSD2a, respectively and non-MFSD2a expressing HeLa cells (Blaise *et al.* 2003; Esnault *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2009). We also tested HUVEC and Jurkat cell lines as models of endothelial and CD4+ T lymphocytes, cells that have been associated with Syncytin-mediated fusion and immunosuppression respectively (Tolosa *et al.*, 2012, Lokossou *et al.*, accepted). We also added U87-MG glioblastoma cells, as Syncytin has been associated with various neurodegenerative diseases in which various CNS-residing cells (including glial cells) have been potentially implicated (Wang *et al.* 2018).

We first tested the infectivity of our pseudotyped viruses on these cells. As expected, env-control viruses were non-infectious on all tested cell lines, with values similar to mock-infected cells (Figure 3.2A). Great variations in infection rates were observed between the three pseudotyped viruses, with VSV-G pseudotypes being highly infectious compared to Syncytin-expressing viruses (Figure 3.2B, C and D). Results also showed that U87-MG cells were particularly sensitive to infection with all three viruses. Using the Human Protein Atlas Cell Atlas database (www.proteinatlas.org/ENSG00000168389-MFSD2A/cell), available data on MFSD2a mRNA expression levels were collected and compared with the infection values obtained with Syn-2-expressing viruses on selected cell lines (Figure 3.2E). Data on the expression of MFSD2a were not available for Jurkat cells but we observed

a direct relation between the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses and the number of MFSD2a transcripts for HeLa, HUVEC, HEK293T and U87-MG cell lines, indicating that our model of pseudotyped viruses is representative of the interaction between Syn-2 and MFSD2a.

3.4.3 Galectin-1-dependent increase of the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses relies on MFSD2a expression but not on one specific N-glycan on the receptor

In order to confirm the association between Gal-1, Syn-2 and MFSD2a, we compared the effect of Gal-1 during infection of cells that either express homologous MFSD2a proteins, HEK293T and Cos-7, or that do not express MFSD2a, HeLa cells (Blaise *et al.* 2003; Esnault *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2009). We first looked at the effect of Gal-1 or lactose treatment on cell viability and found that neither conditions significantly altered the survival of HEK293T and Cos-7 cells (Figure 3.3A, $p=0.99$). Regarding HeLa cells, Gal-1 and lactose treatment seemed to slightly increase cell survival compared to the PBS control but the difference was not statistically significant (Figure 3.3A, $p=0.89$). We then compared the infectivity rates of Syn-2-pseudotyped viruses on HEK293T and Cos-7 cell lines in presence of PBS (virus only), 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose (Figure 3.3B). A significant increase of infectivity was observed when Gal-1 was added, compared to the virus only condition, on both HEK293T (mean fold $\pm$ SEM 5.51-fold $\pm$ 0.76, $p=0.001$) and Cos-7 cells (6.93-fold $\pm$ 1.54, $p=0.0074$). Lactose abolished the effect of Gal-1 showing a dependency on the availability of the CRD. These results show that the association between Syn-2, Gal-1 and MFSD2a is not restricted to human HEK293T cells and is reproduced with a conserved simian MSFD2a protein.

As Gal-1 was found to bind N-glycans on HIV-1 gp120 and the CD4 receptor (St-Pierre *et al.* 2011), we looked if the N-glycosylation status of MFSD2a was important

for the effect of Gal-1 during infection. MFSD2a possesses two N-glycosylation sites, asparagines 217 and 227 (Reiling *et al.* 2011; Berger *et al.* 2012), which were both individually mutated to generate two MFSD2a asparagine-to-glutamine mutants (N217Q and N227Q). A double mutant was also generated however, the weak expression and plasma membrane localisation of this double asparagine-to-glutamine mutant prevented us from using it in our experiments. After confirming expression and plasma membrane localisation of these mutants (Figure 3.8), wtMFSD2a, N217Q or N227Q expression vectors were transfected in HeLa cells, which were then infected with Syn-2-expressing viruses in presence or absence of Gal-1. Our results confirmed the necessity for MFSD2a expression, as Gal-1 had no effect on mock-transfected cells but induced a significant 9.3-fold increase in infectivity on MFSD2a-expressing cells (Figure 3.3C mean fold $\pm$ SEM, 1.3-fold $\pm$ 0.31 for mock-transfected vs. 9.3 $\pm$ 1.52 for MFSD2a-expressing cells). Interestingly, when N217Q- or N227Q-expressing HeLa cells were infected, a 10-fold increase in infectivity was observed compared to control conditions (Figure 3.3C, N217Q 10.8-fold $\pm$ 3.96 and N227Q 10.2-fold $\pm$ 4.75). Thus, depletion of either N-glycans does not alter the binding of Gal-1. In each experiment, the addition of lactose counteracted the effect of Gal-1 on the infectivity of the viruses (Figure 3.3C, Gal-1 + lactose 0.7-fold $\pm$ 0.32 wtMFSD2a, 1.1-fold $\pm$ 0.37 N217Q and 1.49-fold $\pm$ 0.91 N227Q). Altogether, these results show that the effect of Gal-1 on the infectivity of Syn-2-pseudotyped-viruses is not cell-type specific and depends on the expression of MFSD2a but apparently not one particular N-glycan.

3.4.4 Galectin-1-dependent increase of the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses is reproduced on different human cell lines

We wished next to investigate the association between Gal-1 and Syn-2 on other human cells that are relevant in the physiopathology of Syn-2. We used HUVEC and Jurkat cell lines as models of endothelial and lymphoid cells. We also chose U87-MG glioblastoma cells because they were reported to express relatively high levels of

MFSD2a transcripts in the Protein Atlas data base and were highly permissive to the infection with Syn-2-pseudotyped viruses (Figure 3.2C). Gal-1 was previously shown to induce apoptosis in Jurkat and HUVEC cells (Lange *et al.* 2009; Jouve *et al.* 2013). The viability of HUVEC, Jurkat and U87-MG cells was thus first tested following incubation with PBS, 4 μ M Gal-1 or 50 mM lactose (Figure 3.4A). Our results show that a 2h incubation with 4 μ M Gal-1 does not significantly alter the viability of the cells. For Jurkat cells, Gal-1 seems to slightly increase the number of cells but the effect was not statistically significant (Figure 3.4A). We then studied the effect of Gal-1 addition during infection of HUVEC, Jurkat and U87-MG cells and found a significant increase of the infectivity of Syn-2-expressing viruses when Gal-1 was added during infection (Figure 3.4B, C and D) (mean fold increase $\pm$ SEM HUVEC 33.4 $\pm$ 0.05, Jurkat: 14.1 $\pm$ 1.75, U87-MG 6.76 $\pm$ 1.29). Once again, the simultaneous addition of lactose with Gal-1 inhibited the increase of infectivity, confirming the necessity of protein-glycan interaction during infection (Figure 3.4B, C and D). These results show that the effect of Gal-1 on the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses is reproduced in several human cell lines and confirm that the presence of Gal-1 in the extracellular space potentiates the interaction between Syn-2 and MFSD2a.

3.4.5 Galectin-1 differently affects Syncytin-1 according to cell type

Our previous study showed that Gal-1 reduced Syn-1 infectivity on HEK293T cells in a dose dependent manner (Toudic *et al.*, submitted). In order to confirm these results, we thought of testing Gal-1/Syn-1 interaction on different cell lines (Figure 3.5). When the infectivity of Syn-1-expressing viruses on HEK293T, HeLa and Cos-7 cells were compared, a significant decrease in infectivity on HEK293T was observed in presence of 4 μ M Gal-1 (Figure 3.5A, mean fold change $\pm$ SEM of 0.42 $\pm$ 0.04, $p=0.0002$) (as we had previously observed), while a significant increase of infectivity on HeLa and Cos-7 cells was found (Figure 3.5B and C, 14.6-fold $\pm$ 2.49 and 8.77-fold $\pm$ 1.29).

1.45, respectively). For each experiment, the addition of lactose during infection inhibited the effect of Gal-1.

We next infected Jurkat, HUVEC and U87-MG cells with Syn-1-pseudotyped viruses in presence of PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose and obtain different results (Figure 3.5D, E and F). On Jurkat and HUVEC cells, the infectivity was significantly increased in presence of Gal-1 compared to the PBS control (mean fold change $\pm$ SEM of 8.1 $\pm$ 0.19, p value =0.0001 and 24.8 $\pm$ 5.5, p value =0.0038). However, the addition of Gal-1 during infection of U87-MG did not significantly change the infectivity compared to the virus only condition (Figure 3.5F, 1.59-fold $\pm$ 0.36, p value =0.27). Altogether, these results demonstrate that Syn-1-pseudotyped viruses are differently affected by Gal-1 depending on the infected cell type.

3.4.6 Galectin-3 does not increase the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses but affects Syncytin-1-pseudotyped viruses in certain cell lines.

In addition to Gal-1, other members of the galectin family are expressed in the placenta (Blois et Barrientos 2014). Among placental galectins, Gal-3 was extensively studied and localized in villous and extravillous trophoblasts as well as in the choriocarcinoma BeWo cell line (Lee *et al.* 1998; Vicovac *et al.* 1998; Dalton *et al.* 2007). We wished to address its putative association with Syn-1 and -2 using our model of pseudotyped viruses. We infected HEK293T, HeLa and U87-MG cells either with Syn-1- or Syn-2-pseudotyped viruses in presence of PBS, 4 μ M Gal-3 or 4 μ M Gal-3 and 50 mM lactose (Figure 3.6). Prior to the infection of HeLa cells with Syn-2-pseudotyped viruses, cells were either transfected with an empty vector (mock-transfected) or with the pLVX-MFSD2aV5/His expression vector (Figure 3.6B). Our results showed that Gal-3 had no effect on the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses on any tested cells, which confirm our previous observations (Figure 3.6A-C) (Toudic *et al.*, submitted). When Syn-1-pseudotyped viruses were tested, Gal-3 significantly

increased the infectivity of these viruses on HeLa cells but neither on HEK293T nor on U87-MG, despite a trend toward increased infectivity in the latter (Figure 3.6D-F). These results confirm the inactivity of Gal-3 towards Syn-2 and show that, as Gal-1, the association with Syn-1 and its impact seems to be cell dependent.

3.4.7 Galectin-1 affects the fusion activity of the endogenous retroviral envelope EnvP(b)

The finding of specific interactions between Gal-1 and the two human Syncytin proteins prompted us to test if Gal-1 could also interact with EnvP(b), another conserved fusogenic ERV envelope protein (Aagaard *et al.* 2005; Blaise *et al.* 2005; Vargas *et al.* 2012). Because we were not able to produce infectious pseudotyped viruses using EnvP(b), a cell fusion assay was used in order to investigate the potential association between Gal-1 and this envelope protein. HEK293T cells were selected for this assay as we previously observed mild syncytialisation of these cells following EnvP(b) expression (Vargas *et al.* 2012). The results presented in Figure 7A show that the addition of recombinant Gal-1 on EnvP(b)-transfected HEK293T cells induced their fusion compared to PBS-treated cells, an induction that depended on the expression of EnvP(b), as treatment of mock-transfected cells with Gal-1 did not lead to syncytia formation. When the cellular fusion index was calculated, a significant increase in the number of fused cells was further confirmed in presence of Gal-1 compared to the PBS treatment (Figure 3.7A, 18.2 % with Gal-1 vs. 4.29 % with the PBS control, $p=0.014$). The addition of lactose antagonised the effect of Gal-1, with a cellular fusion index lowered to 3% (Figure 3.7B). These results thus demonstrate that Gal-1 can also modulate the fusogenic activity of EnvP(b), an effect that depends on the glycan-binding capacity of this galectin.

3.5 Discussion

In a previous report, we found a specific association between Syn-2 and Gal-1 using Syn-2-pseudotyped viruses and showed an interaction between Gal-1 and Syn-2-expressing viral particles, resulting in increased infectivity. Our results also suggested that the interaction of Gal-1 with Syn-2-pseudotyped viruses maximize the interaction between Syn-2 and MFSD2a, as the effect was only observable during the early-phase of infection (Toudic *et al.* submitted). With the present study, we now confirm this association in different cell lines and provide evidence that Gal-1 repeatedly increased the binding of Syn-2 with MFSD2a using cell fusion and infection assays. In each experiment, the presence of lactose, an antagonist to Gal-1 that compete for the binding of the CRD, inhibited the activity of Gal-1. This indicates that the association between Gal-1, Syn-2 and MFSD2a entails a protein-glycan interaction, which was reported to involve N-glycans in several other studies showing an interaction between Gal-1 and viral envelopes (Garner *et al.* 2010; St-Pierre *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011b; Toledo *et al.* 2014).

The presence of two and nine N-glycosylation sites has been previously confirmed for MFSD2a and Syn-2, respectively (Reiling *et al.* 2011; Cui *et al.* 2016). Nevertheless, our results indicate that Gal-1 does probably not bind specifically to one of MFSD2a N-glycans. Indeed, the expression of MFSD2a N-glycosylation mutants in HeLa cells did not change the effect of Gal-1 on the infectivity rate of Syn-2-pseudotyped viruses. Unfortunately, the double N-glycosylation mutant, in which both asparagines are mutated, was poorly expressed and mostly retained in the endoplasmic reticulum compared to the wt and single N-glycosylation mutant proteins and could not be used in our infection experiments (data not shown). Thus, either one N-linked oligosaccharide is sufficient in order to allow the binding of Gal-1 to MFSD2a (regardless of which asparagine is glycosylated) or Gal-1 recognizes O-glycans on this glycosylated protein. Another possibility is that Gal-1 does not directly interact with

MFSD2a but rather favors the clustering of Syn-2 homotrimers or stabilize homotrimers, thus optimizing Syn-2/MFSD2a interaction or the TM-mediated fusion of adjacent membranes, events that require oligomerization of retroviral envelopes (Earl *et al.* 1992).

Our results also suggested that Syn-2 specifically associates with Gal-1 as Gal-3 did not increase infectivity of Syn-2-expressing viruses on any tested cell lines, even those that express high levels of MFSD2a. These results are similar to previous reports on HIV-1 (Mercier *et al.* 2008; St-Pierre *et al.* 2011). For this retrovirus, Gal-1 but not Gal-3 was shown to increase its infectivity through the binding of clustered N-glycans on the gp120 and CD4 receptor. It was proposed that the conformation of gp120 prevents the binding of Gal-3, as this galectin can bind to free forms of gp120 glycans (St-Pierre *et al.* 2011). It is thus possible that the conformation of Syn-2 is a hindrance to the binding of Gal-3. Because galectins present different binding affinities for saccharides, another possibility would be that Gal-3 does not bind to Syn-2 glycans. However, this is unlikely as Gal-1 and -3 can recognize the same oligosaccharides and Gal-3 presents a higher binding affinity compared to Gal-1 (Hirabayashi *et al.* 2002). Several analyses are now needed to molecularly characterize the interaction between Gal-1 and Syn-2, such as determining the nature and composition of Syn-2 glycans and identify which oligosaccharides are necessary for the binding of Gal-1. More direct evidences of the interaction are also needed in trophoblastic cells in order to confirm the relevance of our findings in placental function.

Our previous work showed that Syn-1 and -2 were differently affected by Gal-1, with a significant reduction of the infectivity of Syn-1-pseudotyped viruses on HEK293T cells compared to a significant increase for Syn-2-expressing viruses (Toudic *et al.* submitted). The present results now demonstrate a cell type-specific effect of Gal-1 on the infectivity of Syn-1-expressing viruses. The observed variation is unlikely accountable for viral production as the same preparation of Syn-1-pseudotyped viruses was used in different infection experiments. However, Syn-1 can

use two cellular receptors, SLC1A4 and SLC1A5 (Lavillette *et al.* 2002), which could imply complex interactions between Gal-1, Syn-1 and its receptors. Possible explanations for such differences could come from the differential expression of SLC1A4 and SLC1A5 between cells or variations in the composition or structure of the N- or O-linked oligosaccharides from one cell line to another (Croset *et al.* 2012; Holst *et al.* 2017; Gioia *et al.* 2018). The latter hypothesis suggests different post-translational glycosylations of SLC1A4 and SLC1A5 which possess two conserved N-glycosylation sites (Lavillette *et al.* 2002). Also, even though Syn-1 can use both receptors, to our knowledge the binding affinity for either one of these proteins was never investigated. Thus, it is possible that the interaction of Syn-1 with one receptor is more optimal and variations in the expression of this receptor between cells could explain discrepancies in the effect of Gal-1.

Interestingly, when Gal-3 was tested along with pseudotyped viruses, cell-type specific effect was again specifically noted for Syn-1-pseudotyped viruses. We observed a similar increase of the infectivity between Gal-1 and Gal-3 on HeLa cells but the addition of the latter during infection did not change the infectivity on HEK293T cells. On U87-MG, Gal-1 increased the infectivity of Syn-1-pseudotyped viruses, although non-significantly, whereas Gal-3 did not modulate the infectivity. Our results thus suggest that the effect of both Gal-1 and Gal-3 with Syn-1 depends on the target cell. Interestingly, different effects of Gal-1 was reported over the infectivity of Nipah virus, in which case the presence of the galectin in the extracellular milieu favored the primary infection of endothelial cells but inhibited later stages of the viral infectious cycle, including envelope-induced syncytia formation (Levroney *et al.* 2005; Garner *et al.* 2015). However, cell type-specific effect of Gal-1 or Gal-3 on the same virus has not been reported, to our knowledge, and we cannot rule out that the observed variations are inherent to the nature of the transformed cells used in these experiments. Nevertheless, as Syn-1 and -2 are expressed on circulating placental extracellular vesicles (Holder *et al.* 2012b; Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014), the observed

associations between galectins and Syn-1 and -2 could have implications during the interaction of these vesicles with cells, especially regarding endothelial and immune cells (Holder *et al.* 2012a; Mincheva-Nilsson et Baranov 2014; Cronqvist *et al.* 2017). Moreover, abnormal expression of Syn-1 was reported in several tumor cells and linked to the fusion between cancer and endothelial cells (Bjerregaard *et al.* 2006; Strick *et al.* 2007; Aagaard *et al.* 2012; Yan *et al.* 2017), a process that could also involve Gal-1 as the expression and secretion of this galectin is induced in endothelial cells that surround tumors to stimulate tumoral angiogenesis (Thijssen *et al.* 2006; Thijssen *et al.* 2010)

Finally, using a cellular fusion assay, we found that Gal-1 potentiates the fusion activity of EnvP(b). The ectopic expression of EnvP(b) in HEK293T cells led to a significant increase in syncytia number when recombinant Gal-1 was added into culture media compared to control conditions, an effect that depended on the β -galactoside-binding activity of Gal-1. Previous reports identified EnvP(b) as a fusogenic ERV, transcriptionally expressed in several tissues, including the placenta, and that is involved in fusion of trophoblastic cells although, not essential to syncytialisation (Blaise *et al.* 2005; Aagaard *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2012). Interestingly, Aagaard *et al.* (2012) found that EnvP(b) mediated heterotypic cell fusion between BeWo and endothelial cells and thus could participate in tumor development (Aagaard *et al.* 2012). Finding an association between Gal-1 and EnvP(b) is of particular interest as many tumor cells secrete higher levels of Gal-1, which was found to stimulate tumoral angiogenesis and favor tumoral immune evasion (Daroqui *et al.* 2007; Thijssen *et al.* 2010; Thijssen *et al.* 2015). Because EnvP(b) transcripts have been detected in many tissues e.g. breast, ovaries, testis, skin and colon, higher secretion of Gal-1 by tumor cells could also favor EnvP(b)-mediated heterotypic tumor cell fusion and contribute to tumor heterogeneity (Bastida-Ruiz *et al.* 2016; Platt *et al.* 2016). As EnvP(b) possesses a functional ISD, we can also speculate that it could be involved in tumoral immune evasion. However, EnvP(b) protein expression should be confirmed in other tissues than the placenta and expression levels compared with neoplastic tissues as a

starting point. It will also be important to assess the outcome of the association between Gal-1 and EnvP(b) with other cellular models.

3.6 Conclusion

In this study, we report the modulation of the fusogenic property of three placental endogenous retroviral envelope proteins, namely Syn-1, Syn-2 and EnvP(b), by the β -galactoside-binding protein Gal-1. More specifically, we confirmed the specific impact of Gal-1 on Syn-2 which potentiates the fusogenic capacity of Syn-2 in a CRD-dependent manner in several experimental models. We also observed functional associations between Syn-1 and two placental galectins, Gal-1 and Gal-3 with the outcome of these interactions being cell type-dependent. Finally, our results suggest that EnvP(b) could also benefit from the presence of extracellular Gal-1. The fact that Gal-3 present an effect with Syn-1 - but not Syn-2 suggests that the conformation and / or the glycan composition of both proteins is different and that their fusogenic activities could be differently regulated by extracellular Gal-1 and Gal-3. Confirming an association between placental galectins and Syn-1 and -2 brings new insights on the regulation of trophoblast cells fusion. Indeed, Gal-1 could potentiate the fusogenic activity of Syn-2 in vCTB whereas Gal-1 and -3 could regulate the fusogenic activity of Syn-1 which is expressed in fusogenic and non-fusogenic trophoblast cells. These results are also relevant regarding the biological function of placental extracellular vesicles. Because Syn-1 and -2 are expressed in placental extracellular vesicles (Holder *et al.* 2012b; Tolosa *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014), extracellular Gal-1 could increase the interaction of placental extracellular vesicles with endothelial and immune cells. Finally, our results suggest that the association of Gal-1 with Syn-1 and EnvP(b) could be relevant in cancer, as abnormal expression of fusogenic proteins and Gal-1 could participate in tumor development and immune evasion.

This study brings new insights on the molecular events occurring during syncytialisation of trophoblast cells and suggest different regulation mechanisms of the fusogenic activity of Syncytin proteins in the human placenta.

3.7 Acknowledgements

This study was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (#298527-2013) and by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP130561). We would like to thank Denis Flipo for his excellent technical assistance with confocal microscopy. We thank Maike Mauer for her experimental assistance. We thank Drs Reiling, Dragani and Colombo for providing MFSD2a expression vectors.

3.8 Figures

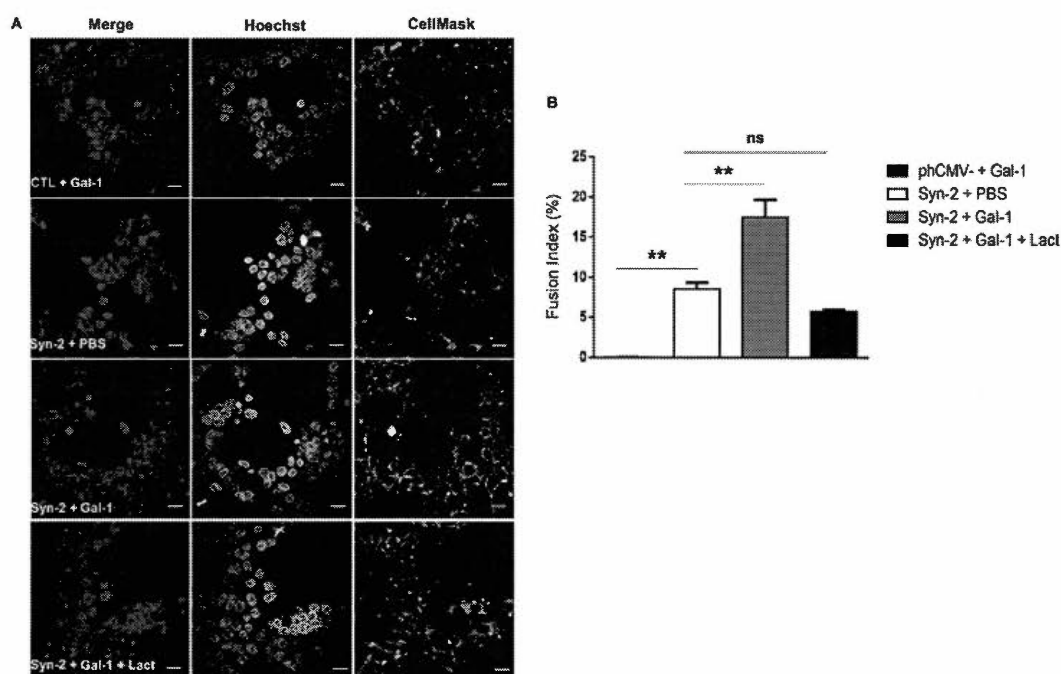


Figure 3.1: Galectin-1 increases the fusion of Syncytin-2- expressing HEK293T cells.

A. Confocal microscopy imaging of HEK293T cells transfected with either the phCMV empty vector (CTL) or phCMV-Syn-2 expression vector and treated with PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose for 24 h. Plasma membranes and nuclei were stained with CellMask and Hoechst solutions, respectively. Cell fusion was assessed by confocal microscopy and representative images of five different fields are shown. Scale bar: 20 μ m. **B.** Cellular fusion index of HEK293T cells transfected and treated as in A. For each condition, the fusion index was calculated on eight confocal microscopy fields as follow: $(Ns/Nt) \times 100$ with Ns: number of nuclei in syncytia, Nt: total nucleus number. The graph represents the mean fusion index $\pm$ standard error of

the mean (SEM) of three independent experiment, expressed as a percentage. ** $p < 0.01$, ns: non-significant.

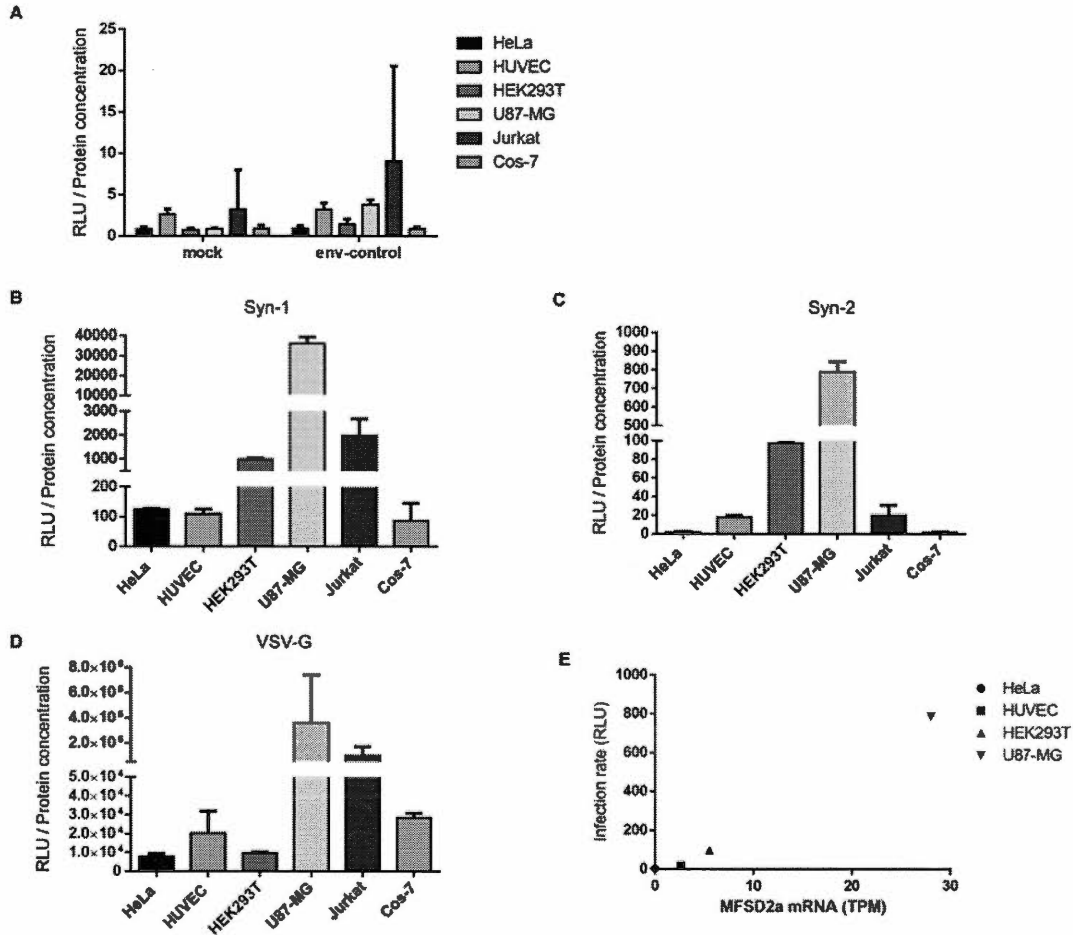


Figure 3.2: Infection rates of pseudotyped viruses on different cell lines.

A-D. Env-control (A), Syn-1- (B), Syn-2- (C) and VSV-G- (D) pseudotypes viruses were used to infect five human and one simian cell lines in triplicate. Cells were lysed 24 h post infection (p.i) and luciferase activity was measured. The results are expressed as the mean relative light unit (RLU) +/- standard deviation (SD) normalized against

the protein concentration of samples of three independent experiments. **E.** Infection rate of Syncytin-2-expressing viruses plotted against MFSD2a transcript levels in four human cell lines. MFSD2a expression levels are expressed as transcripts per kilobase million (TPM) and were collected from the Human Protein Atlas Cell Atlas database. Infection rates are expressed as RLU and were obtained from three independent infection experiments with Syn-2-pseudotyped viruses on each cell line.

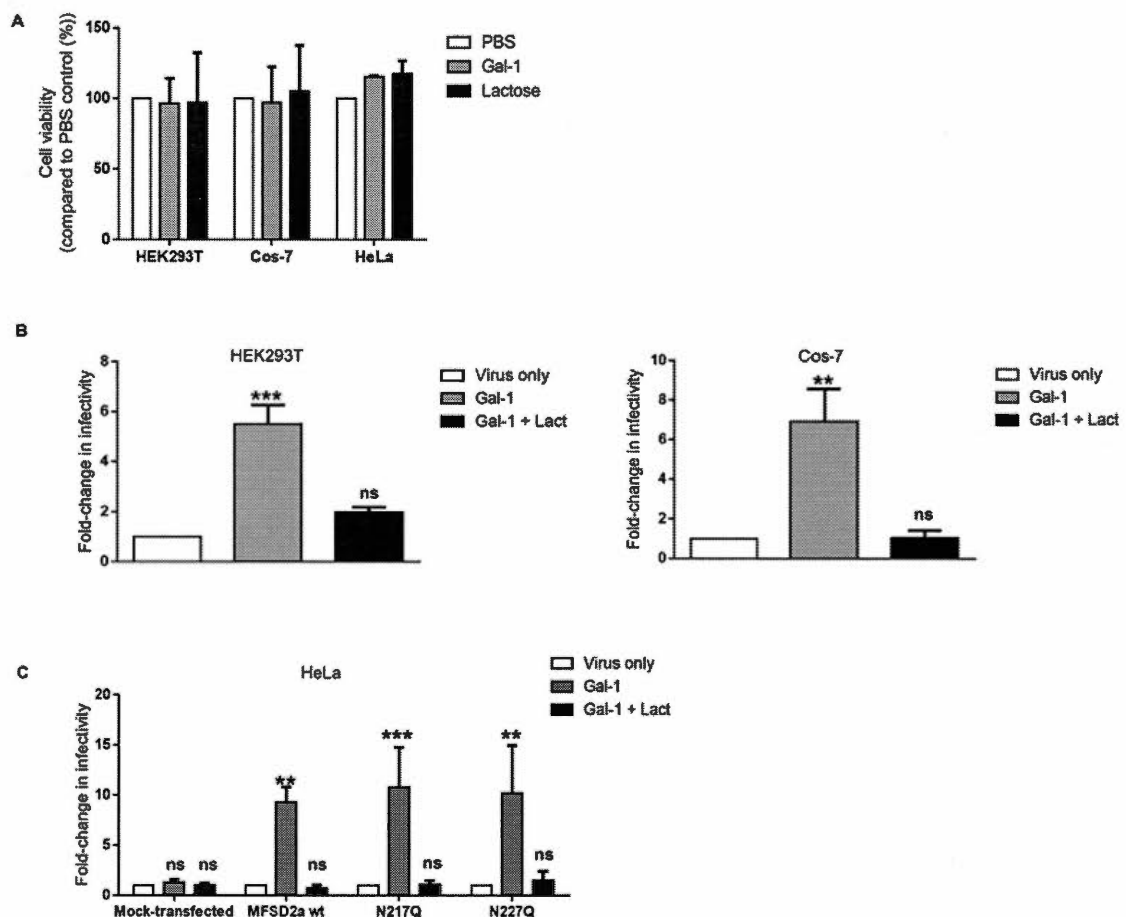


Figure 3.3: Galectin-1 increases the infectivity of Syn-2-pseudotyped viruses on human and simian cells that express homologous MFSD2a but the effect is independent on MFSD2a N-glycosylation status.

A. MTT survival assay of HEK293T, Cos-7 and HeLa cells incubated with PBS, 4 μ M Gal-1 or 50 mM lactose. Results from two independent experiments were pooled and expressed as the mean percentage of viable cells compared to the control $\pm$ SD. **B-C.** Infection of HEK293T, Cos-7 (**B**) or HeLa (**C**) cells with Syncytin-2-pseudotyped viruses in presence of PBS (virus only), 4 μ M Gal-1 (Gal-1) or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose (Gal-1 + Lact). HeLa cells were transfected with either an empty vector (mock) or with wtMFSD2a, N217QMFSD2a or N227QMFSD2a expression vectors. Luciferase activities were measured 24 h p.i. and normalized against the protein concentration. Results are the mean $\pm$ SEM of three independent infections, expressed as fold-change in infectivity compared to the virus only condition. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$.

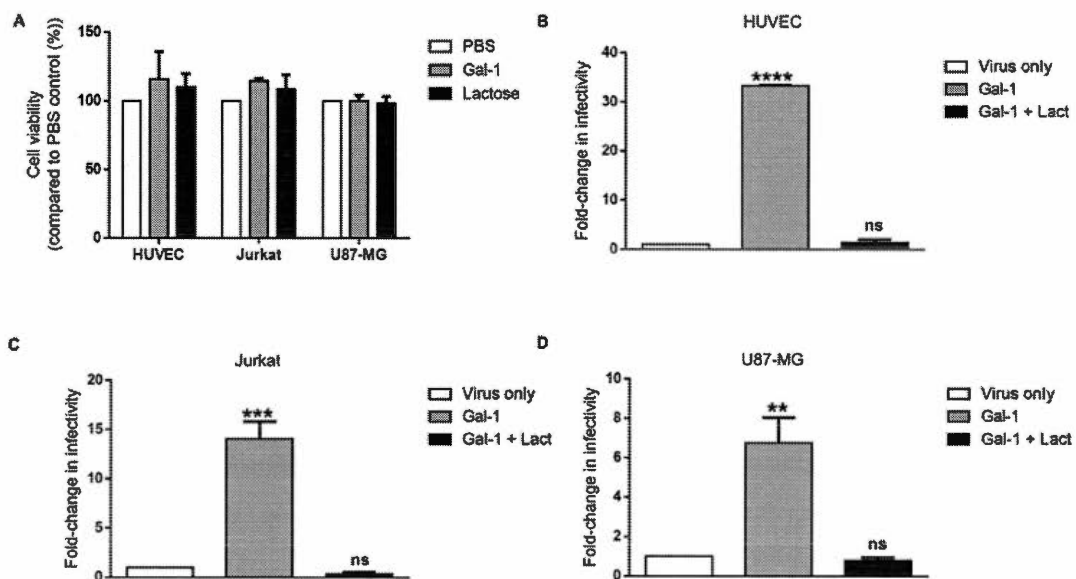


Figure 3.4: Galectin-1 significantly increases the infectivity of Syn-2 pseudotyped viruses on different human cell lines.

A. MTT survival assay of HUVEC, Jurkat and U87-MG cells incubated with PBS, 4 μ M Gal-1 or 50 mM lactose. The results of two independent experiments are presented and are expressed as the mean percentage $\pm$ SD of viable cells compared to the PBS control. **B, C and D.** Infection of HUVEC (**B**), Jurkat (**C**) and U87-MG (**D**) cells with Syn-2-pseudotyped viruses combined with PBS (virus only), 4 μ M Gal-1 (Gal-1) or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose (Gal-1 + Lact). Following infection, cells were lysed and luciferase activities measured. Luciferase activities were normalised against the protein concentration. Graphs represent the mean fold-change in infectivity $\pm$ SEM over the virus only control of three independent infection experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

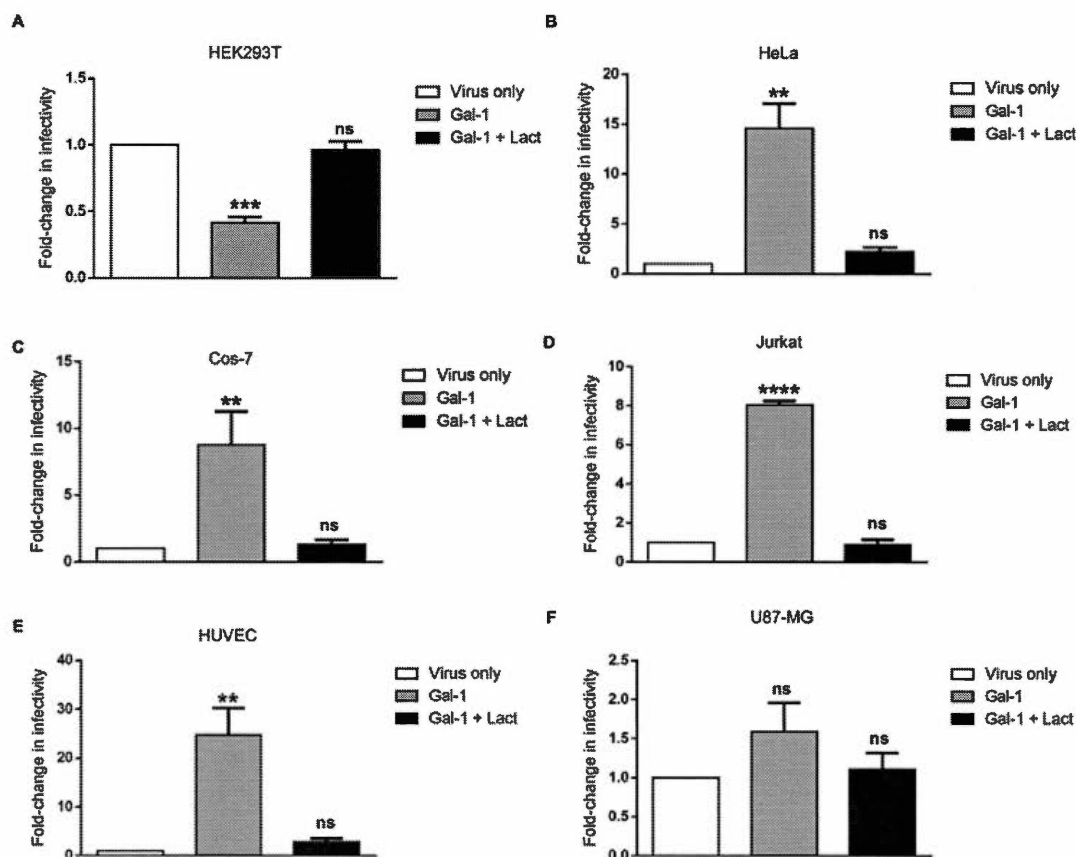


Figure 3.5: The effect of Galectin-1 on the infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses depends on the cell line.

HEK293T (A), HeLa (B), Cos-7 (C), Jurkat (D), HUVEC (E) and U87-MG (F) cells were infected with Syn-1-pseudotyped viruses in presence of PBS (virus only), 4 μ M Gal-1 (Gal-1) or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose (Gal-1 + Lact). Cells were lysed 24h p.i. and luciferase activity measured in triplicate. For each sample, the luciferase values were normalized against the protein concentration and the results expressed as fold-change in infectivity compared to the PBS control. Graphs represent the average fold-change $\pm$ SEM of three independent infection experiments for each cell lines. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

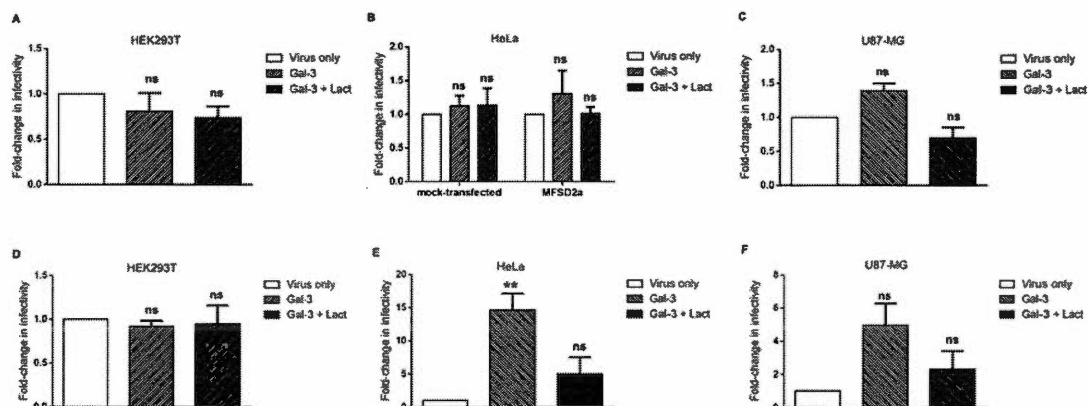


Figure 3.6: Galectin-3 does not modulate the infectivity of Syncytin-2-pseudotyped viruses and exerts cell-specific modulation of the infectivity of Syncytin-1-pseudotyped viruses.

Syn-2-pseudotyped (A-C) or Syn-1-pseudotyped (D-F) viruses were used to infect HEK293T (A and D), HeLa (B and E) or U87-MG (C and F) cells in the presence of PBS (virus only), 4 μ M Gal-3 (Gal-3) or 4 μ M Gal-3 + 50 mM lactose (Gal-3 + Lact). In B, HeLa cells were transfected with an empty vector (mock-transfected) or with a

MFSD2a expression vector prior to infection. Cells were lysed 24h p.i. and luciferase activities measured. For each sample, the luciferase values were normalized against the protein concentration and the results expressed as fold-change in infectivity compared to the PBS control. Graphs represent the average fold-change in infectivity $\pm$ SEM of three independent infection experiments for each cell line. ** $p < 0.01$.

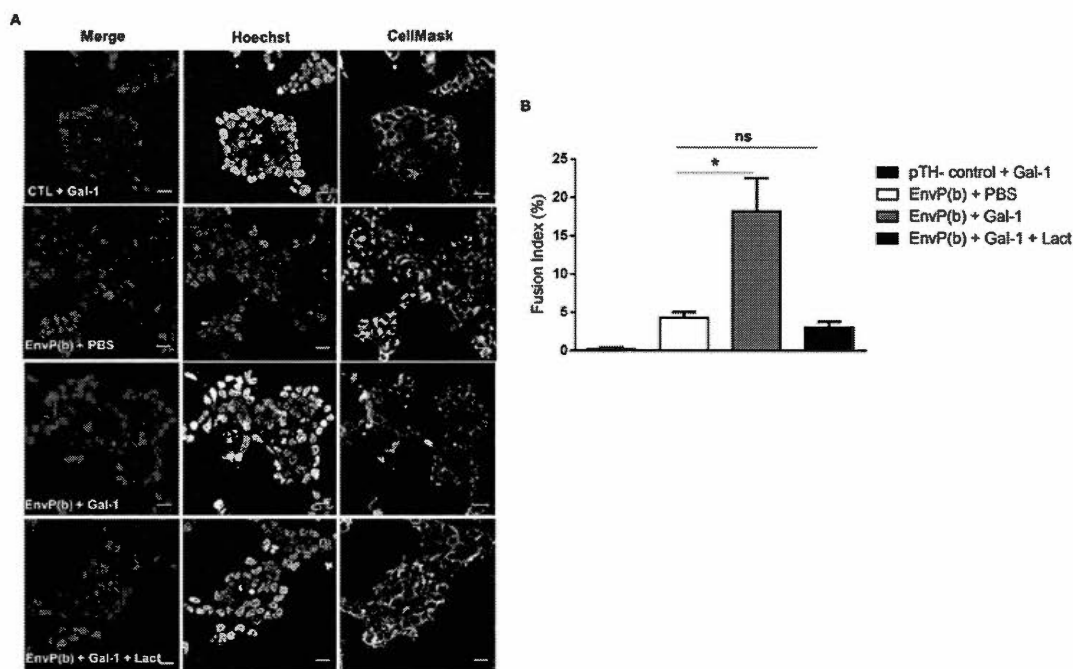


Figure 3.7: Galectin-1 increases the fusion capacity of EnvP(b).

A. Representative confocal microscopy images of HEK293T cells transfected with the pTH empty vector (CTL) or pTH-EnvP(b) expression vector and treated with either PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose. Twenty-four h after treatment, plasma membranes and nuclei were stained with CellMask and Hoechst solutions, respectively. Cells were visualized with a Nikon Eclipse Ti microscope coupled to a Nikon A1 confocal unit using an oil 60x objective. Representative images from 5 confocal fields are shown. Scale bar: 20 μ m. **B.** Cellular fusion index was calculated

from EnvP(b)-transfected HEK293T cells. For each condition, syncytial nuclei and total number of nuclei from 8 confocal microscopy fields were counted and a cell fusion index was calculated as follow: $(Ns/Nt) * 100$ with Ns: number of syncytial nuclei, Nt: total number of nuclei. The graph represents the average percentage of fused cells from three independent experiments. * $p < 0.05$.

3.9 Supplementary material

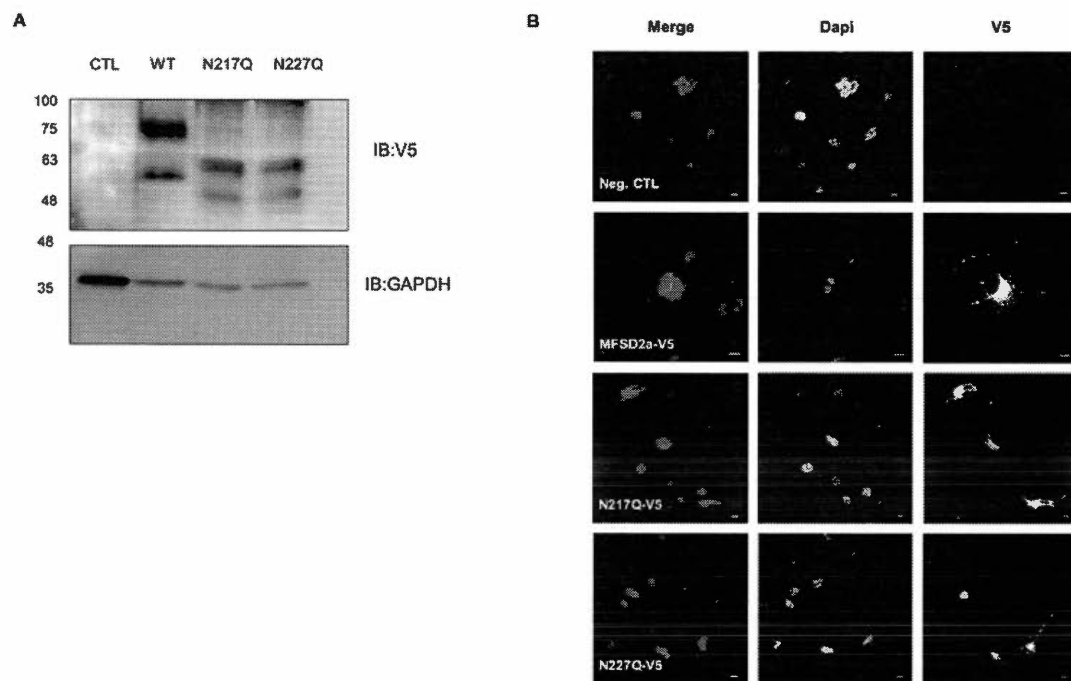


Figure 3.8: Expression and localisation of MSFD2a N-glycosylation mutants.

A. Western-blot analysis of the expression of wtMFSD2a, N217Q and N227Q MFSD2a mutants. HEK293T cells were transfected with pLVX-YFP (CTL), pLVX-MFSD2a-V5 (WT), pLVX-N217Q-V5 or pLVX-N227Q-V5. Cells were lysed 48 h after transfection and protein extracts analysed by western-blotting. MFSD2a

expression was detected using an anti-V5 antibody (upper panel, IB: immunoblot). An immunoblot against GAPDH served as a loading control (lower panel). **B.** Immunolocalization of wtMFSD2a, N217Q and N227Q observed by confocal microscopy. Cos-7 cells were transfected with pLVX- (neg. CTL), pLVX-MFSD2aV5, pLVX-N217QV5 or pLVX-N227QV5. Cells were fixed 48 h after transfection, fixed with 2% PFA and permeabilized with a solution of 0.01% Triton X-100 in PBS. MFSD2a proteins were immunolocalized using anti-V5 and Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG antibodies (red) and nuclei were stained with Dapi (blue). Stained cells were analysed by confocal microscopy using a Nikon Eclipse Ti microscope coupled with a Nikon A1R confocal unit and the CFI Plan Apochromat λ 60x/1.4 oil objective. Representative images of three independent transfections are shown. Scale bar: 10 μ m.

CHAPITRE IV

LE RÔLE DE LA SYNCYTINE-2 ET DE LA GALECTINE-1 DANS L'INTERNALISATION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES PLACENTAIRES PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES HUMAINES DE LA VEINE OMBILICALE (HUVEC)

AVANT PROPOS

Le quatrième chapitre fait état de résultats obtenus tout au long de mon doctorat et qui sont orientés sur la deuxième hypothèse de recherche : l'expression des Syncytines à la surface des vésicules extracellulaires placentaires pourrait aider à l'internalisation de ces vésicules dans les cellules. Ce projet s'est particulièrement intéressé à l'internalisation des vésicules extracellulaires placentaires dans les cellules endothéliales et au rôle potentiel de la Syncytine-2 dans leur internalisation.

Ce projet de recherche est le fruit d'une collaboration avec Dr Line Leduc (MD, PhD) de l'hôpital Ste-Justine et avec l'hôpital St-Luc pour l'obtention de placentas normaux à terme. L'isolement des cytotrophoblastes villosités à partir des placentas a été réalisé dans le laboratoire de Dre Julie Lafond avec l'aide précieuse de Xavier Elisseeff (M.sc) et de Gatien Lokossou (PhD). Le reste des analyses ont été faites dans le laboratoire du Dr Benoit Barbeau. L'ensemble des manipulations et de l'analyse des résultats ont été réalisés par moi-même avec l'aide de Diane Gingras et de Denis Flipo pour les analyses de microscopie électronique et d'imagerie en temps réel.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont préliminaires et demanderont à être complétés par des répétitions d'expériences et d'autres analyses avant de pouvoir être soumis pour publication.

4 The role of the endogenous retroviral protein syncytin-2 and of galectin-1 in the uptake of placental extracellular vesicles in endothelial cells

Caroline Toudic¹, Xavier Elisseeff², Gatien Adjimon Lokossou³, Julie Lafond¹, Line Leduc⁴ and Benoit Barbeau^{1*}

¹ Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques, and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada, H3C3P8;

² McGill University, Bioengineering Department, Montreal, Canada; ³ École polytechnique d'Abomey Calavi, Université d'Abomey, Calavi, Benin ⁴ CHU Ste-Justine and Research centre of CHU Ste-Justine, Montreal, Canada, H3T1C5

*To whom correspondence should be addressed: Benoit Barbeau, Department of biological sciences, Université du Québec à Montréal, 141 Avenue du Président-Kennedy, H2X 1Y4, Montréal, Québec, Canada, Tel.: (514) 987-3000 ext. 4576; Fax: (514) 987-4647; E-MAIL: barbeau.benoit@uqam.ca

4.1 Abstract

Preeclampsia (PE) is a pregnancy syndrome that affects 5 % of pregnancy worldwide and causes life-threatening risks for the mother and child. PE is associated with abnormal placentation, with defects in invasion and syncytiotrophoblast (STB) formation, and endothelial cell dysfunction which lead to reduced placental functions and fetal development. Extracellular vesicles (EVs) also contribute to PE by affecting the function of endothelial and immune cells. The STB is formed by the fusion of villous cytotrophoblasts, a process that involves many factors including the fusogenic endogenous retroviral protein Syncytin-2 (Syn-2) and the β -galactoside-binding lectin, Galectin-1 (Gal-1). Decreased expression of Syn-2 is found in PE placentas and was linked to the defect in STB formation. Interestingly, the decrease in Syn-2 expression in the placenta reflects on placental EVs released from the STB. However, the function of Syn-2 when present at the surface of placental EVs is unknown. The aim of this study was to follow the entry of placental EVs into endothelial cells and to address the roles of Syn-2 and Gal-1 during the internalization process. Using HUVEC cells as a model for endothelial cells and primary cultures of villous cytotrophoblasts to produce placental EVs, we found that Syn-2 contributes to the internalisation of placental EVs in endothelial cells and that Gal-1 could be a factor involved during the binding of EVs to the surface of cells. Overall, these preliminary results suggest that Syn-2 could direct placental EVs to endothelial cells, a process that could be affected by the decreased expression of Syn-2 on placental EVs during PE.

4.2 Introduction

Pre-eclampsia (PE) is a life-threatening hypertensive pregnancy syndrome, responsible for maternal and fetal mortality and morbidity and a major cause of pre-term birth (Duley 2009). PE affects around 5% of pregnancies worldwide and is

diagnosed when the characteristic symptoms of recurrent hypertension and proteinuria appear in a previously normotensive women, around the 20th week of gestation (Myatt et Roberts 2015). The only curative treatment option for PE is delivery. The physiopathology of PE is complex with abnormal placentation, dysfunction of endothelial cells, increased inflammation as well as multifactorial causes (Steeegers *et al.* 2010). Placentation defaults include less placenta invasion, reduced maternal arteries remodelling and abnormal syncytiotrophoblast (STB) formation (Fisher 2015; Roland *et al.* 2016).

The STB is a syncytial structure that covers the chorionic villi and comes into direct contact with the maternal blood that floods the intervillous space. The STB displays major function during pregnancy allowing nutrient and gas exchanges between maternal and fetal blood as well as producing pregnancy hormones and immunomodulatory molecules (Kameda *et al.* 1990; Costa 2016a). The STB is formed by the fusion of underlying cells called villous cytotrophoblasts (vCTBs) that will periodically exit the cell cycle and fuse with the STB in order to maintain this structure throughout pregnancy (Gerbaud et Pidoux 2015). The fusion of vCTBs is a complex process, involving many transcriptional factors and proteins. Syncytialisation requires the molecular differentiation of cells with modified expression and localization of adherens, tight and gap junction proteins and expression of two endogenous retroviral fusogenic proteins, Syncytin (Syn)-1 and -2 (Gerbaud et Pidoux 2015). Syn-1 and -2 are two conserved endogenous retroviral envelope proteins, specifically expressed in the human placenta. They mediate vCTB fusion through the interaction with their specific cellular receptors, SLC1A4 and SLC1A5 for Syn-1 and MFSD2a for Syn-2 (Mi *et al.* 2000; Lavillette *et al.* 2002; Blaise *et al.* 2003; Frendo *et al.* 2003b; Vargas *et al.* 2009; Toufaily *et al.* 2013). Furthermore, the expression of both Syn-1 and -2 is dysregulated in PE, with a significant decrease in their expression levels in PE placentas that was correlated with the severity of PE (Lee *et al.* 2001; Chen *et al.* 2008;

Vargas *et al.* 2009; Vargas *et al.* 2011). Interestingly, Syn-1 and -2 are also associated with placental extracellular vesicles (EVs) that are shed from the STB.

Placental EVs include plasma membrane-budding vesicles, called microvesicles, and exosomes that originate from the endosomal compartment and are externalized after the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane (Colombo *et al.* 2014). Placental EVs are secreted locally and dispersed toward other organs after entering the peripheral circulation. These vesicles can be isolated from other EVs based on the expression of the placental alkaline phosphatase (PLAP), a placenta-specific protein, along with other EV markers, e.g tetraspanin CD9 and CD63 (Sabapatha *et al.* 2006; Salomon *et al.* 2014b; Kowal *et al.* 2016). During pregnancy, placental EVs were ascribed angiogenic and immunomodulatory functions with the delivery of functional miRNAs and proteins to endothelial and immune cells that modify their activities (Mincheva-Nilsson et Baranov 2014; Cronqvist *et al.* 2017). EVs also contribute to the physiopathology of PE, especially with the increased expression of antiangiogenic proteins and the induction of pro-inflammatory cytokines release from immune cells, responsible for dysfunction of endothelial cells and inflammation (Lok *et al.* 2008; Messerli *et al.* 2010; Lee *et al.* 2012; Tong *et al.* 2017).

The active uptake of EVs by cells involves multiple ligand-receptor interaction; however, the actors and mechanisms behind this process remain largely unknown (Mulcahy *et al.* 2014). The expression of Syn-1 and -2 on placental EVs could direct the internalisation of these vesicles in cells (Vargas *et al.* 2014). Indeed, we have previously shown that the uptake of Syn-1- and Syn-2-expressing EVs by trophoblastic-like BeWo cells was higher when cells were induced for the expression of Syn-1 and -2 specific receptors and that the production of Syn-1- or Syn-2-depleted EVs reduced their cellular uptake compared to control EVs (Vargas *et al.* 2014). These results are of particular interest in the context of PE, where a significant decrease in

Syn-2 expression was noted on placental EVs isolated from PE patients and which could affect placental EVs uptake (Vargas *et al.* 2014).

Another protein associated with STB formation is Galectin-1 (Gal-1), a β -galactoside-binding soluble and extracellular protein. Gal-1 is a prototypic galectin containing a single carbohydrate recognition domain (CRD) that binds preferentially to multibranched complex glycans and exists as monomeric or dimeric forms (Hirabayashi *et al.* 2002). In the placenta, Gal-1 was localized in vCTBs, STB and extravillous CTBs and implicated in embryo implantation, immunoregulation, angiogenesis and vCTB fusion (Jeschke *et al.* 2004; Fischer *et al.* 2010; Barrientos *et al.* 2014; Hutter *et al.* 2016). Moreover, Gal-1 expression is dysregulated in PE placentas compared to control tissues and a lower level of circulating Gal-1 during the second trimester of pregnancy was associated with a risk to develop PE (Freitag *et al.* 2013; Hirashima *et al.* 2018). Interestingly, Gal-1 is also involved in cell-pathogen interaction and increases the binding of different viruses to the surface of target cells by interaction with viral and cell surface glycans (St-Pierre *et al.* 2011; Garner *et al.* 2015). However, despite structural similarities between viral particles and EVs (Meckes et Raab-Traub 2011), to our knowledge the role of Gal-1 in the cellular internalisation of EVs was never investigated.

The aim of the present study was to characterize the uptake of placental EVs in endothelial cells, a cell type greatly affected in PE, and to address the role of Syn-2 and Gal-1 during the internalisation of EVs in this cell type. Using HUVEC cells as a model for endothelial cells, the main findings in this work are that Syn-2 contributes to the internalisation of placental EVs in endothelial cells and that Gal-1 could be a factor involved during the binding of EVs to the surface of cells.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Ethical Statement

This study was approved by ethical committees of Université du Québec à Montréal, of St-Luc hospital (Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM), Montréal, Canada) and of Ste-Justine hospital (Centre Hospitalier Universitaire Ste-Justine, Montréal, Canada). Following delivery, normal term placentas were obtained after written informed consent was signed by participants, following the guidelines of ethical committees.

4.3.2 Primary cells and cell lines

Primary villous cytotrophoblasts were isolated from normal term placentas according to previously published protocols (Le Bellego *et al.* 2009; Vargas *et al.* 2011). Villous cytotrophoblasts were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 2mM L-glutamine (Wisent, St-Bruno Qc, Canada) and supplemented with 25 mM HEPES (1M HEPES Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), 1X penicillin-streptomycin-neomycin (100x Gibco™ penicillin-streptomycin-neomycin solution, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) and 10% EV-free fetal bovine serum (FBS) (ultracentrifugated overnight 100 000 g at 4°C) (Wisent, St-Bruno Qc, Canada) (Vargas *et al.* 2014). Villous cytotrophoblast were maintained in culture for 4 d during which they differentiate and fuse (Kliman *et al.* 1989). BeWo and HEK293T cells were obtained from ATCC and grown in Ham's F12 or DMEM respectively, containing 2mM Glutamine and 10% FBS (Wisent, St-Bruno Qc, Canada). HUVEC cells were a gift from Dr. Borhane Annabi (Department of chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada) and cultured in EGM™-2 BulletKit™ medium (Lonza, Walkersville, MD) containing 5% FBS. Cells were cultured without antibiotics except in experiments with extracellular vesicles,

where penicillin and streptomycin (100x penicillin and streptomycin solution, Wisent, St-Bruno Qc, Canada) was added to media. All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

4.3.3 Plasmids and recombinant Galectin-1

phCMV1 and phCMV1-Syncytin-2 expression vectors were previously described (Vargas *et al.*, 2009). Recombinant Galectin-1 was produced in bacteria as previously described (Mercier *et al.* 2008; St-Pierre *et al.* 2011).

4.3.4 Production and isolation of extracellular vesicles

Placental extracellular vesicles were isolated from the culture supernatants of villous cytotrophoblasts. During the 4 d of culture, culture media were collected at d 2 and 4. For control and Syncytin-2-expressing extracellular vesicles, 5 x 10⁶ HEK293T cells were plated and transfected with 5 µg of the phCMV1 control vector or phCMV1-Syncytin-2 expression vector using polyethylenimine (PEI) (1 µg/ml stock solution, MW 25,000, Polysciences Inc., Warrington, PA). Six hours after transfection, cells were rinsed once in warm PBS and replenished with EV-free media. Culture supernatants were collected 48 h after transfection. Isolation of extracellular vesicles was previously described (Vargas *et al.* 2014). Briefly, conditioned media collected from HEK293T and villous cytotrophoblast cells were cleared from cells and debris by two centrifugation steps at 300 g and 2000 g at 4°C and filtration using a 0.45µm Steriflip™ vacuum filter (EMD Millipore, Cork, Ireland). Supernatants were then cleared from large vesicles by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C using a SW32Ti rotor and an Optima™ L90-K centrifuge (Beckman-Coulter Inc., Montréal, QC, Canada). Supernatants were collected and small vesicles were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g for 70 min at 4°C using a SW32.1Ti rotor. Vesicle pellets were resuspended in 10 ml of sterile PBS and pelleted again by

ultracentrifugation at 100,000 g for 70 min at 4°C. After the last ultracentrifugation step, pellets were resuspended in 100-300 µl sterile PBS or 100 µl lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% sodium azide, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL)). Protein concentration of each sample was then measured using the Qubit™ fluorometric protein assay kit following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Eugene, OR).

4.3.5 Electron Microscopy analyses

After isolation, extracellular vesicles were fixed in 50 µl of 1% glutaraldehyde and loaded on Formvar-carbon coated grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Grids were washed 8x with distilled water then contrasted with 50 µl of aqueous uranyl-oxalate pH 7 for 5 min. Samples were further contrasted and embedded with 50 µl of a solution of 0.4 % uranyl-acetate and 1.8 % methyl cellulose pH 4 for 10 min on ice. Excess liquids were removed using a Whatman paper (Sigma-Aldrich) and grids were air-dried for 5 min. Samples were visualized with a CM100 electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

4.3.6 Extracellular vesicles labelling

Vesicles were labelled with the hydrophobic fluorescent dye PKH67 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), as previously described with modifications (Vargas *et al.*, 2014). Briefly, 0.5 µM PKH67 (dissolved Diluent C) was mixed with vesicles (resuspended in Diluent C) at 1:1 ratio and incubated for 5 min at 37°C. Staining was stopped by addition of 500 µl ice-cold PBS containing 0.5% EV-free FBS and incubation of 1 min. a maximum of 10 ml cold PBS was added to the solution and stained vesicles were then pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g for 70 min at 4°C. Pellets were resuspended in 4 ml EGM™-2 medium without FBS and resulting samples were

concentrated twice with Amicon® Ultra 4ml 100 kDa cut-off filter units (Millipore, Cork, Ireland). Filtrates were used as free-dye controls.

4.3.7 Live cell imaging and confocal microscopy

HUVEC (2.5×10^3) and BeWo (5×10^3) cells were seeded on poly-L-lysine-treated (Sigma-Aldrich) Lab-tek® coverglass 8-well plates (Thermo Fischer Scientific) 24 h prior to incubation with 2 µg PKH67-labelled EVs. Imaging of live cells by differential interference contrast was started after addition of EVs using the A1R Nikon confocal unit attached to the inverted Eclipse Ti microscope with the Plan Apo λ 60x/1.4 N.A oil objective coupled with a 60x Nomarski prism (Nikon Canada, Mississauga ON, Canada). Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in a stage top incubator (OKO Lab, Ottaviano, Italy) during the time of the experiment. Cells were visualized for 10 h and pictures were obtained every 3 min (2 h), 5 min (2 h), 10 min (3 h) and 15 min (3 h). The resulting images were analysed with NIS element (Nikon Canada). For EV internalisation experiments in presence of recombinant Gal-1, 4 µg of PKH67-labelled EVs were incubated on HUVEC cells (5×10^3), plated in 24-well plates, with either PBS, 4 µM Gal-1 or 4µM Gal-1 + 50 mM lactose (Sigma-Aldrich). Cells were centrifuged at 1000 g for 2 h at 10°C, washed with PBS and incubated for 24 h in complete EV-free media at 37°C, 5% CO₂ before visualization of EV uptake by confocal microscopy with the Nikon A1R confocal unit.

4.3.8 Flow cytometry

Aldehyde sulfate 4 µm latex beads (Invitrogen, Burlington, Canada) were washed 3x in PBS before incubation with extracellular vesicles (30 µg) or bovine serum albumin (BSA) in PBS for 2 h at 4°C. Unbound sites were blocked by addition of 100 mM glycine for 30 min at room temperature (RT). Beads were washed 3x in PBS, then blocked for 30 min with 2% FBS, 2% BSA in PBS at RT. After two washing steps in

PBS, beads were incubated with mouse monoclonal anti-CD63 antibodies (1/500, ab8219, Abcam), our rabbit polyclonal anti-Syn-2 antibodies or pre-immune sera for 1 h at RT. Beads were again washed 3x in PBS and incubated with Alexa Fluor 488 anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies (1/1000, A11001 or A11008, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Eugene, OR) for 1 h at RT. Following three washes in PBS, beads were analysed on the C6 flow cytometer (BD Bioscience, Mississauga ON, Canada). For EV uptake experiments, HUVEC (5×10^3) cells were seeded in 24-well plates before incubation with 2 or 4 μ g PKH67-labeled EVs at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. For the experiments with recombinant Gal-1, PKH67-labeled EVs were incubated on cells with either PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose and spun at 1000xg for 2 h at 10°C. Cells were then washed with PBS and incubated in fresh EV-free media for 24 h. Cells were finally trypsinised and analysed by flow cytometry on the C6 flow cytometer (BD Bioscience). Data were processed with the FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR).

4.3.9 Western blot

Protein samples (15 μ g) from extracellular vesicles and cell lysates were resolved on 12 % acrylamide-bis acrylamide gels under reducing or non-reducing conditions (CD9 and CD63 analysis). Proteins were transferred on 0.45 μ m PVDF membranes (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare Life sciences, Germany). Membranes were blocked in PBS-0.05% Tween-20 (PBST) containing 5% BSA (Sigma-Aldrich, St-Louis MO) for 1 h at room temperature (RT). Membranes were incubated with the following antibodies overnight at 4°C: mouse monoclonal anti-human CD9 (1/700, CBL162, EMD Millipore, Temecula, CA), mouse monoclonal anti-CD63 (1/700, CBL553, EMD Millipore, Temecula, CA), mouse monoclonal anti-PLAP (1/1000, ab133602, Abcam, Cambridge, MA). After three washes in PBST, membranes were incubated with sheep anti-mouse ECL horseradish peroxidase-conjugated antibodies (1/5000 GE Healthcare, UK) for 1½ h at RT. Following three washes in PBST, signals

were detected with a home-made revealing solution (Sol. A: 0.1M Tris-HCl pH 10.5, 18% H₂O₂ mixed with Sol B: 0.1 M Tris-HCl pH 10.5, 450 μ M p-Coumaric acid diluted in DMSO, 7.5 mM Luminol in DMSO) using the Fusion Fx7 apparatus (Montreal Biotech Inc., Dorval, QC).

4.3.10 Statistical analysis

The two-way ANOVA test coupled with Bonferroni's post test was used for multiple mean comparison, using Graphpad Prism 6.

4.4 Results

4.4.1 Characterization of extracellular vesicles isolated from villous cytotrophoblast supernatants

Villous cytotrophoblast (vCTB) cells isolated from normal placentas were cultured for 4 d and conditioned media were collected at d 2 and 4. The isolated placental EVs were analyzed by electron microscopy and representative images of the vesicles are presented in Figure 1A. The images show cup-shaped EVs of different sizes, with an average size of 48.8 nm (Figure 4.1A and 4.1B). The vesicles were then analysed for the expression of CD9 and CD63, markers associated with EVs, and for the placental alkaline phosphatase (PLAP), a marker for EVs from placental origin. Western blot analyses showed expression of all three markers in the vCTB EV extract while only PLAP was detectable in vCTB lysates (Figure 4.1C). In order to detect the expression of Syn-2 on the surface of the isolated placental EVs, vesicles were bound to 4 μ m beads and incubated with a specific anti-Syn-2 antibody. Because Syn-2 expression was shown to increase in vCTB during their differentiation (Vargas *et al.*, 2011), we compared the expression of Syn-2 on EVs isolated from the supernatants of d2 and d4 vCTB. Flow cytometry results presented on Figure 4.1D show that Syn-2 is

expressed on the surface of placental EVs with clear positive signals for EVs isolated at day 2 and 4 compared to the BSA control (negative control, Figure 4.1D). Also, Syn-2 levels increased between EV isolated at d2 and d4. Although the percentage of positive EVs slightly increased from 95.7% to 97.8% between d2 and d4 EVs, mean FL1-A fluorescence values indicate a two-fold increase in fluorescence intensity between d2 and d4 EV (d2 mean FL1-A of 7055, d4 mean FL1-A of 16189). These results confirm the isolation of small vCTB-derived EVs that express Syn-2 on their surface and suggest an increase of Syn-2 expression between d2 and d4 isolated EVs.

4.4.2 Placental extracellular vesicles are internalised in endothelial cells

We next studied the cellular uptake of vCTB EVs in HUVEC cells as a model for endothelial cells. As Syn-2 expression increases during the differentiation of vCTB, the uptake of PKH67-labelled EVs isolated from two independent vCTB cultures at d2 or d4 was compared in HUVEC cells by flow cytometry analysis (Figure 4.2A). The results showed no differences in the internalisation rates of d2 or d4 EVs after a 24 h incubation. We then wished to characterize the kinetic of placental EV internalisation in HUVEC cells and compared the uptake of d4 vCTB EVs in BeWo and HUVEC cells by live cell imaging for 10 h (Figure 4.2B). The results suggested higher number of internalized EVs in BeWo compared to HUVEC cells with apparent higher fluorescence signals detected in BeWo cells from 2 h till 10 h of incubation. Despite different internalisation signals, the uptake of EVs increased over time in both cell lines and EVs were detected intracellularly as punctuated signals, localized in the perinuclear region in BeWo and HUVEC cells. Altogether, our results show that placental EVs can be internalised in HUVEC cells and localize in the perinuclear region.

4.4.3 Syncytin-2 is expressed on extracellular vesicles produced in HEK293T cells and enhances their uptake in endothelial cells

In order to produce EVs that express only Syn-2, HEK293T cells were transfected with a Syn-2-expression vector. In parallel, HEK293T were mock transfected (with the empty vector) to obtain control EVs. Both types of harvested EVs were positive for the expression of EV markers and Syn-2 (Figure 4.3). The expression of CD9 and CD63 was detected by Western-blot and flow cytometry analysis, respectively (Figure 4.3A and 4.3B). The expression of Syn-2 was assessed by flow cytometry on mock- and Syn-2-transfected cell-derived EVs (Figure 4.3C). Syn-2 was indeed present on the surface of HEK293T-derived EVs only when the cells were transfected with the Syn-2-expression vector. Notably, the expression of Syn-2 varied between samples (as an example, two different preparations gave 51.4% and 29.5% positive signals), probably due to transfection conditions. The detected signal was specific as EVs stained with the pre-immune serum only reached 2% positive signal and control EVs, isolated from mock-transfected cells and stained with anti-Syn-2 antibodies, showed 10% positive signal.

To assess if the expression of Syn-2 on EV could influence the uptake of these vesicles in endothelial cells, control or Syn-2-positive EVs were stained with PKH67 and increasing amount of PKH67-labelled EV were incubated with HUVEC cells for 24h. After incubation, cells were trypsinised and EV uptake was analysed by flow cytometry (Figure 4.3D). The results showed a dose-dependent increase in fluorescence signal in HUVEC cells for both EV sample compared to the cells incubated with unbound PKH67 (PKH67 CTL), indicating EV-specific fluorescent signals in cells. Interestingly, HUVEC cells incubated with Syn-2-expressing EVs seemingly showed higher mean fluorescence signals than cells incubated with control EVs. In order to confirm these results, internalisation of 4 μ g of PKH67-labelled control or Syn-2-positive EVs in HUVEC cells was repeated and analysed by flow

cytometry and the results of two independent experiments are presented in Figure 4.3E. The results revealed a significant increase in mean fluorescence signals between cells incubated with control or Syn-2-positive EVs ($p=0.0047$), suggesting that the uptake of Syn-2-expressing EV might be higher than for control EVs.

Thus, EVs produced in Syn-2-transfected HEK293T cells express Syn-2 on their surface and these EV are significantly more internalized in HUVEC cells compared to control EVs.

4.4.4 The expression of Syncytin-2 on extracellular vesicles enhances their uptake in endothelial cells, an uptake that is further increased by extracellular Galectin-1

In a previous study, we reported an association between Syn-2 and the β -galactoside-binding protein Gal-1 which favored the interaction between Syn-2 and MFSD2a (Toudic *et al.* submitted). We hypothesized that Gal-1 could also optimize the binding of Syn-2-expressing EVs to the surface of HUVEC cells, which express MFSD2a. After showing that Syn-2-positive EVs can be produced in HEK293T cells (Figure 4.3), we treated control or Syn-2-positive labeled-EVs either with PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose, an antagonist to Gal-1 that binds to the CRD, and incubated the vesicles with HUVEC cells by centrifugation at 1000 g for 2 h at 10°C. Cells were centrifugated at 10°C during the incubation period to optimize contact with EVs and allow the binding of PKH67-labeled EVs to cells with minimum endocytosis of the vesicles (Harding et Unanue 1990; Escrevente *et al.* 2011; Soleti *et al.* 2012; Tian *et al.* 2013; Banizs *et al.* 2018). After 24 h, the internalisation of EVs was analysed by confocal microscopy and flow cytometry. As shown in Figure 4.4A, HEK293T-derived EVs were internalised in HUVEC cells and localized in the perinuclear region as observed with placental EVs. Interestingly, when Syn-2-expressing EVs were incubated with Gal-1, the PKH67 signal was stronger than in cells

incubated with PBS- or Gal-1+ lactose-treated EVs (Figure 4.4A). Moreover, no such difference was notable in cells incubated with Gal-1-treated control EVs. Cells were then trypsinised and the internalisation of PKH67-labeled EVs quantified by flow cytometry analysis (Figure 4.4B). The results confirmed the previous observations, with an increase in fluorescence intensity of HUVEC cells incubated with Gal-1-treated Syn-2-expressing EVs compared to PBS-treated EVs. Strikingly, cells incubated with Gal-1 + lactose-treated EVs showed a decrease in fluorescence intensity, which was comparable to PBS-treated cells, indicating that the effect of Gal-1 during the cellular uptake of EVs involved its carbohydrate-binding capacity. The treatment of control EVs with Gal-1 resulted in a slight increase of the cellular fluorescence intensity compared to the PBS treatment, which was reverted by the combination of lactose and Gal-1 (Figure 4.4B). When the results of three independent experiments were combined, we observed that the treatment of EVs with Gal-1 increases their cellular uptake whether they express Syn-2 or not, although the increase was non-significant (Figure 4.4C). Nevertheless, the results showed that Syn-2-expressing EVs were overall significantly more internalized in HUVEC cells than control EVs (Figure 4.4C, $p=0.047$). Altogether, these preliminary results suggest that Syn-2 expression on the surface of EVs favors their internalisation in endothelial cells, a process that might be optimized by the presence of Gal-1 in the extracellular space.

4.5 Discussion

With these preliminary analyses, we confirmed the uptake of placental EVs by HUVEC cells and showed that the expression of the endogenous retroviral protein Syn-2 on the surface of EVs increases their internalisation in endothelial cells. Although non-significant, our results suggest that Gal-1 could favor the binding of EVs to the surface of cells.

In a previous report, we showed that the expression of Syn-2 in vCTBs increases between 48 and 96 h of culture, whereas Syn-1 expression decreases (Vargas *et al.*, 2009). Here, we confirmed the expression of Syn-2 on the surface of placental EVs, with a slight difference in expression between d2 and d4 placental EVs. When cellular uptake of these placental EVs was compared, we did not observe any differences regarding their internalisation rates. Although an apparent difference in Syn-2 expression was observed between d2 and d4 EVs, this variation in Syn-2 abundance might not be sufficient to modify the cellular uptake of these vesicles. Another important consideration is that EVs were incubated for 24 h with cells and this long incubation time might not be optimal to observe differences in early-binding events, when Syn-2 expression levels might play a more determinant role. Thus, it would be interesting to repeat these experiments with short incubation times.

When we compared the internalisation of placental EVs in BeWo and HUVEC cells, an apparent lower internalisation rate of EVs in HUVEC cells was noted compared to BeWo cells. This observation should be confirmed with flow cytometry analyses as a rapid uptake of EVs in endothelial cells has been previously reported (Cronqvist *et al.*, 2017; Soleti *et al.*, 2012). In our assay, the observed difference in fluorescent intensity between HUVEC and BeWo cells might be flawed by the different number of cells in each microscopic field. Interestingly, monitoring the uptake of placental EVs in HUVEC and BeWo cells highlighted a perinuclear localisation of EVs in both cell types. This localisation pattern is in agreement with our previous results for BeWo cells and with other studies reporting perinuclear localisation of EVs in endothelial cells (Soleti *et al.* 2012; Vargas *et al.* 2014; Cronqvist *et al.* 2017; Durak-Kozica *et al.* 2018). The detection of EVs as punctuated signals in the nuclear region could suggest their entry via endocytosis and their presence in endosomes and lysosomes following internalisation. This is supported by studies that reported receptor-mediated clathrin-dependent endocytosis as the main entry route for EVs in endothelial cells (Soleti *et al.* 2012; Tong *et al.* 2017; Banizs *et al.* 2018), a pathway

that was also suggested for the internalisation of placental EVs in BeWo cells (Vargas *et al.*, 2014). It would now be relevant to colocalize placental EVs with the endosomal and lysosomal compartments to follow the intracellular fate of these vesicles.

In our previous study, we found that the association of placental EVs with Syn-1 and Syn-2 favored the internalisation of EVs into trophoblastic cells through the interaction with their cellular receptors (Vargas *et al.*, 2014). Here, our results showed that the expression of Syn-2 on EVs allows higher internalisation of these vesicles in HUVEC cells, comparatively to control EVs. As receptor-mediated endocytosis is the main pathway for EVs to enter endothelial cells, we can speculate that the interaction between Syn-2 and MFSD2a in part mediates the endocytosis of placental EVs in these cells. Further analyses are now needed to test this hypothesis. The contribution of Syn-1 in the uptake of EVs in endothelial cells should also be investigated as both Syn-1 and -2 are expressed on placental EVs (Vargas *et al.*, 2014).

Finally, our results showed that the treatment of EVs with Gal-1 led to an overall increase in the cellular uptake of the vesicles in HUVEC cells. The preliminary finding that Gal-1 tends to increase the internalisation of EVs in endothelial cells is in agreement with the expression of several ligands to Gal-1 on the surface of EVs, such as integrins, LAMP1 and MUC1, and with the binding of Gal-1 on endothelial cells (Romaniuk *et al.* 2012; Bojic-Trbojevic *et al.* 2014; Obermann *et al.* 2017; Bojic-Trbojevic *et al.* 2018). Nevertheless, as endothelial cells express MFSD2a and Gal-1 (Thijssen et Griffioen 2014), the presence of Syn-2 on placental EVs could target these vesicles to endothelial cells in a receptor-dependent manner, a process that could be optimized by Gal-1.

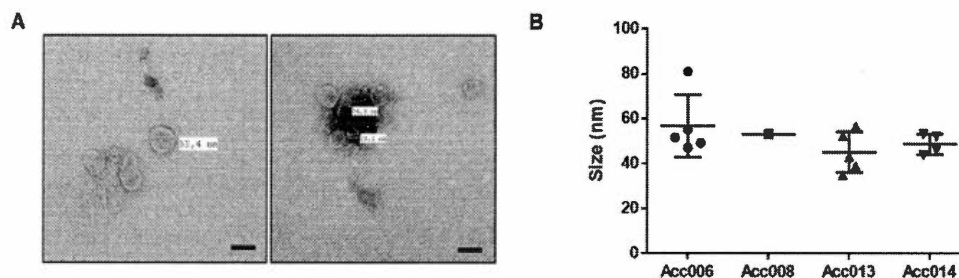
In conclusion, these findings bring new insights on the function of Syn-2 when associated with EVs and strongly suggest its implication in the uptake of placental EVs in endothelial cells. These results also suggest that Gal-1 might be a cell surface-binding factor for EVs but more experiments are needed to investigate its role. As

placental EVs are known to modify gene expression and the cellular activity of endothelial cells (Salomon *et al.* 2014c; Cronqvist *et al.* 2017), the implication of Syn-2 in the targeting of placental EVs, their internalisation and the delivery of their content needs to be thoroughly investigated, especially as Syn-2 expression is reduced on placental EVs from PE patients. Consequently, this might alter the uptake of placental EVs by endothelial cells and explain some of the endothelial dysfunction associated with PE pregnancies.

4.6 Acknowledgements

We wish to thank Diane Gingras and Denis Flipo for their excellent technical assistance with electron and confocal microscopy, respectively. We also like to thank the staff from the maternity ward of Ste-Justine and CHUM hospitals for their help and collaboration.

4.7 Figures



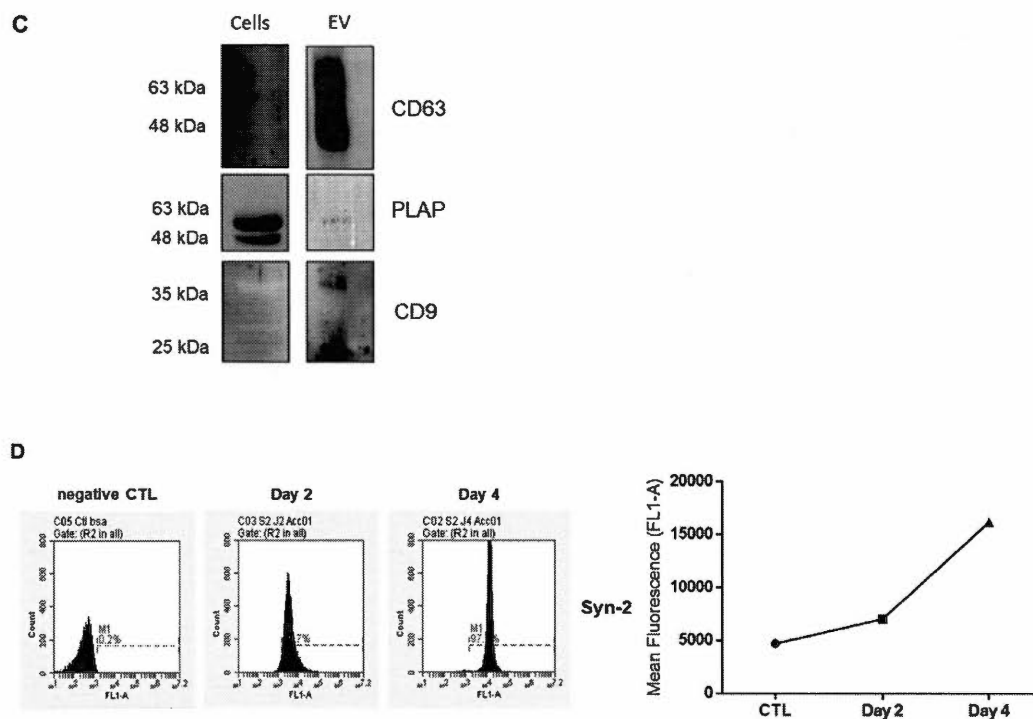


Figure 4.1: Characterization of placental extracellular vesicles.

A. Electron microscopy analyses of extracellular vesicles isolated from vCTB. **B.** Size distribution of extracellular vesicles isolated from four independent vCTB cultures (termed ACC006, Acc008, Acc013 and Acc014). The size of the vesicles was determined by electron microscopy and plotted in a graph. Dots represents the number of vesicles analysed per sample and the mean size of extracellular vesicles with a horizontal bar. **C.** Expression of extracellular vesicles and placental markers by Western-blot. Ten micrograms of vCTBs (Cells) and extracellular vesicles (EV) lysates were separated on denaturing and non-denaturing polyacrylamide gels and the expression of CD63, CD9 and PLAP was assessed with corresponding antibodies and HRP-coupled anti-mouse IgG secondary antibodies. **D.** Flow cytometry analysis of the expression of Syncytin-2 (Syn-2) on the surface of placental extracellular vesicles

isolated from d2 and d4 vCTB cultures. Extracellular vesicles or BSA (negative CTL) were bound to 4 μm aldehyde-sulfate beads before staining with rabbit polyclonal anti-Syn-2 antibodies and Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibodies. FL1-A fluorescence staining was detected with the BD C6 flow cytometer and the limit for positive fluorescent staining (M1) was set comparatively to the negative control. The mean FL1-A fluorescence of the negative control, d2 and d4 EV samples are presented on a graph.

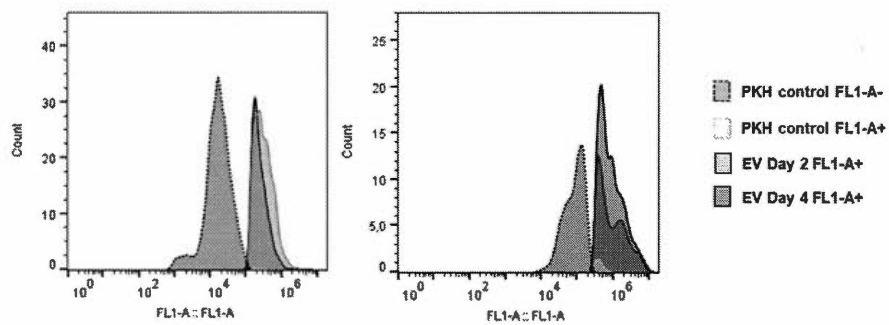
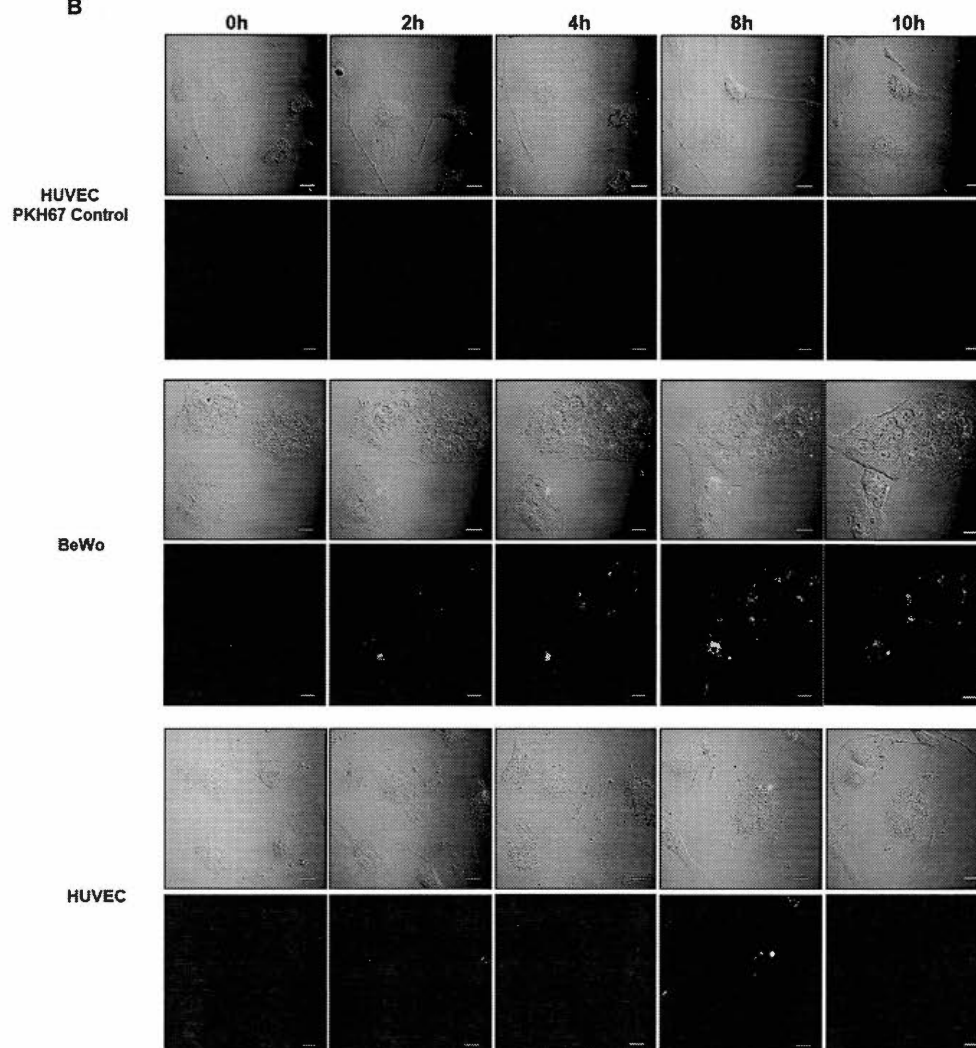
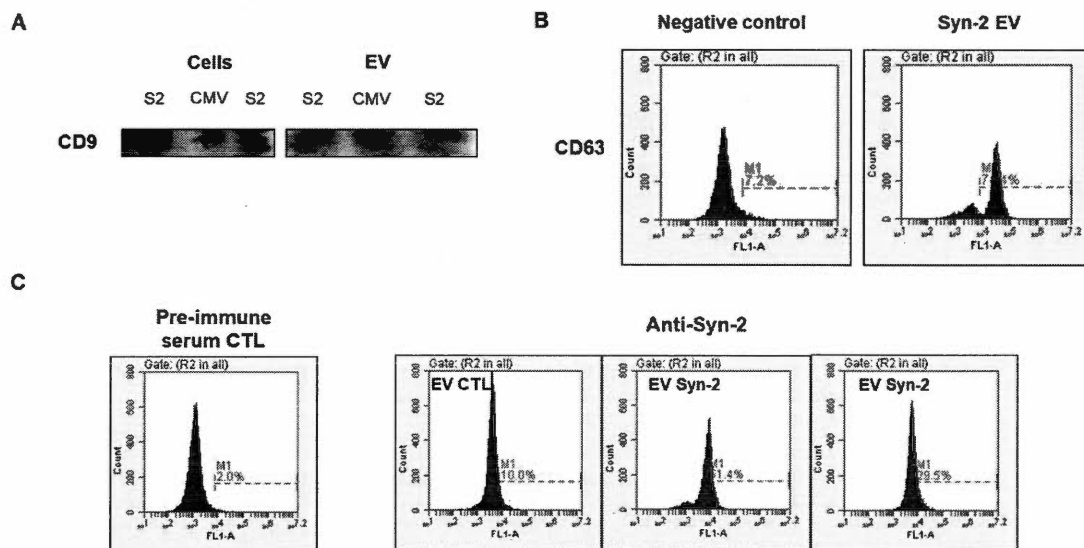
A**HUVEC****B**

Figure 4.2: Placental extracellular vesicles are internalised in HUVEC cells.

A. Comparative internalisation of PKH67-labeled extracellular vesicles isolated from vCTB cultures at d2 and d4 by flow cytometry. Labeled-extracellular vesicles (4 μ g) isolated from two independent vCTB cultures (left and right graphs) at d2 (light grey) or d4 (dark grey) were incubated with HUVEC cells for 24 h and intracellular fluorescence was then measured with the BD C6 flow cytometer. PKH67 filtrates obtained during the staining procedure of the EVs were used as free-dye controls (dotted lines). Results were processed with the FlowJo software and positive FL1-A fluorescence signals (FL1-A+) of cells incubated with extracellular vesicles were compared with free PKH67 controls. **B.** Monitoring of uptake of PKH67-labeled EVs in HUVEC and BeWo cells by live cell confocal microscopy. HUVEC and BeWo cells were incubated with 2 μ g of PKH67-labeled (green) vCTBs EVs and internalisation was then monitored for 10 h. Representative images of intracellular z plane at time 0, 2, 4, 8 and 10 h are shown (upper panels: merge of bright-field and wide-field fluorescence, lower panels: wide-field fluorescence). Scale bar: 10 μ m.



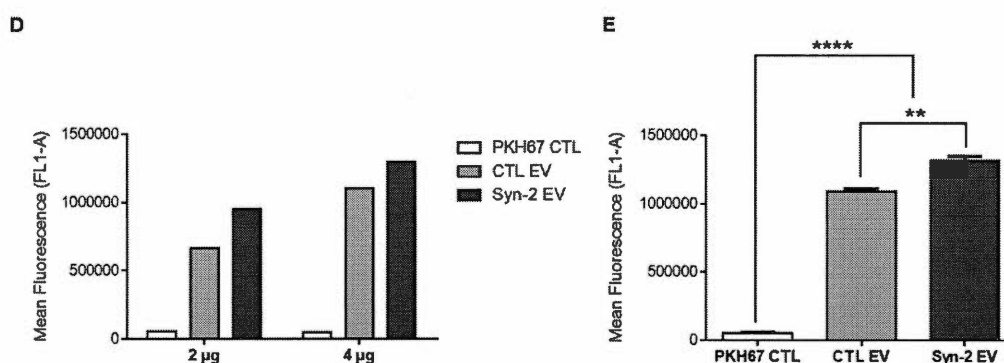


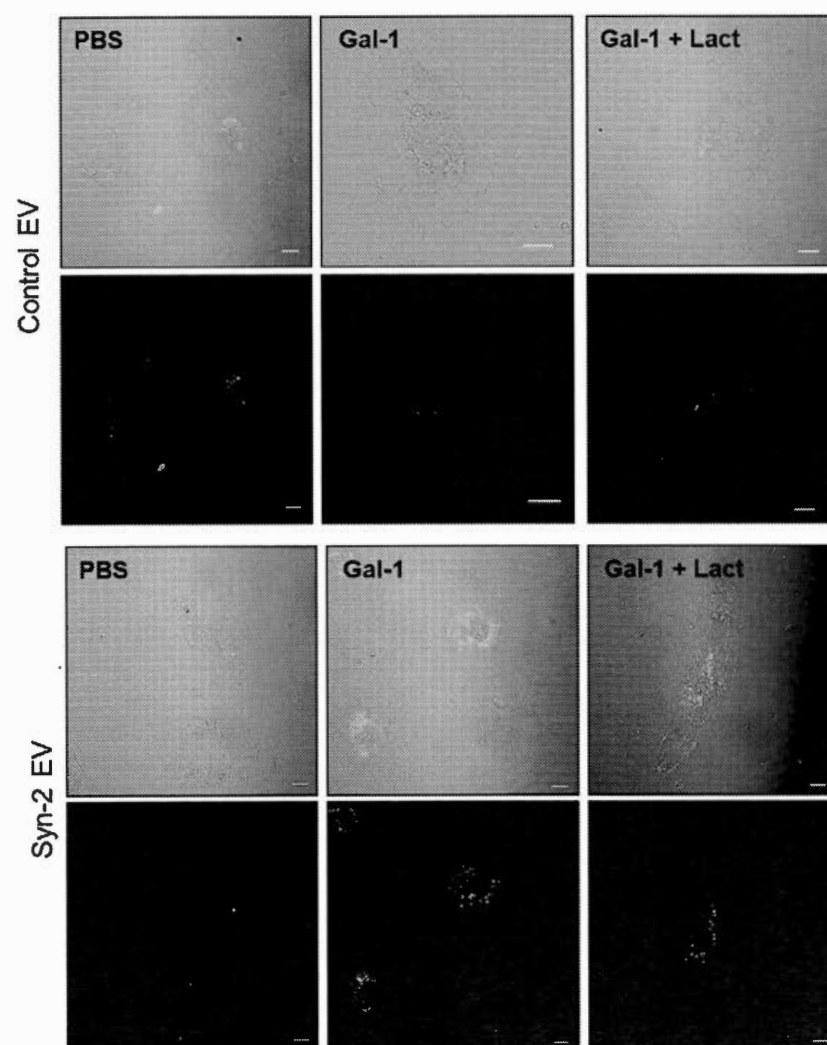
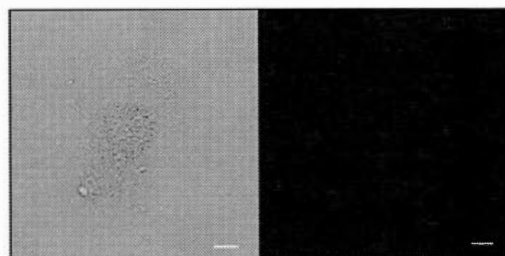
Figure 4.3: Characterisation of extracellular vesicles produced in HEK293T cells.

A. Western blot analysis of the expression of CD9 in cells and extracellular vesicles. Protein lysates from mock-transfected (CMV) or phCMV1-Syncytin-2 (S2)-transfected cells and from corresponding isolated extracellular vesicles were analysed for the expression of CD9 in non-denaturing conditions. **B.** Expression analysis of CD63 on the surface of extracellular vesicles by flow cytometry. Aldehyde sulfate beads were incubated with BSA (negative control) or with extracellular vesicles produced in Syn-2-expressing HEK293T cells (Syn-2 EV) and then stained with anti-CD63 and Alexa488-coupled anti-IgG antibodies. The percentage of positive signals are indicated in red. **C.** Detection of Syncytin-2 (Syn-2) on the surface of HEK293T-produced extracellular vesicles by flow cytometry. Extracellular vesicles isolated from mock- (CTL EV) or Syn-2-expressing (EV Syn-2) HEK293T cells were bound to aldehyde sulfate beads. Samples were stained with the pre-immune serum (upper panel) or anti-Syn-2 antibodies (lower panels) followed with Alexa488-coupled anti-IgG antibodies. Percentages of positively stained beads are indicated in red. **D.** Dose response of PKH67-labelled EV on HUVEC cells. Cells (5×10^3) were plated in 4-well plates and incubated with 2 μ g or 4 μ g of PKH67-labelled CTL EV or Syn-2 EV for 24h. Cells were then trypsinised and internalised PKH67 signal detected by flow

cytometry analysis. Results from one experiments are presented and are expressed as the mean fluorescent signal (FL1-A). **E.** Internalization of PKH67-labelled EV isolated from mock-transfected (CTL EV) or Syn-2-expressing HEK293T cells (Syn-2 EV) and incubated on HUVEC cells. HUVEC cells were incubated with 2 μ g of each labelled-EV for 24h before trypsination and detection of the fluorescence by flow cytometry. The graph represent the results from two independent experiment and are expressed as mean fluorescence from FL1-A detector.

A

PKH67 Control



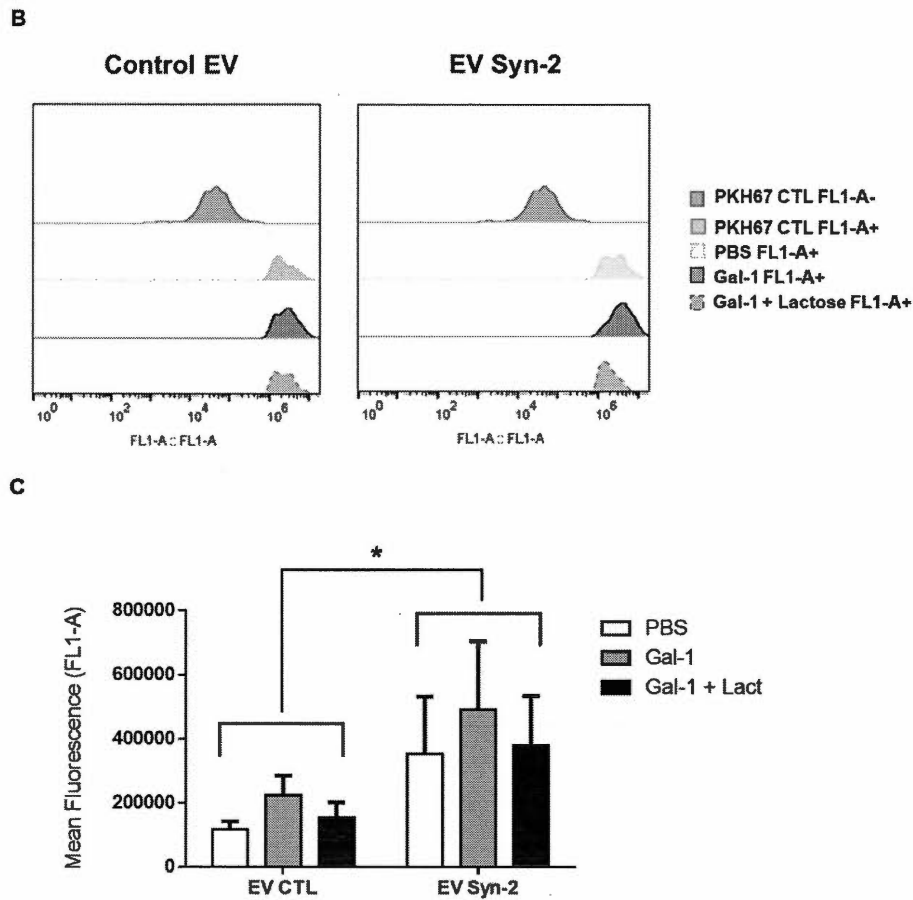


Figure 4.4: Syncytin-2-dependent uptake of extracellular vesicles in HUVEC cells and potential increase of internalisation mediated by Galectin-1.

A. Confocal microscopy analyses of the uptake of PKH67-labeled (green) extracellular vesicles by HUVEC cells after treatment with PBS, Gal-1 or Gal-1 + lactose. Cells were incubated with 4 μ g of control (upper panel) or Syn-2-expressing (lower panel) labeled-extracellular vesicles for 2 h in presence of PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 and 50 mM lactose at 10°C. Free PKH67 dye obtained during the staining procedure of EVs was incubated on cells in parallel, as a negative control (PKH67 control).

Internalisation of the vesicles was observed 24 h later by confocal microscopy (upper panels: merge of bright-field and wide-field fluorescence, lower panels: wide-field fluorescence). Scale bar: 10 μ m. **B.** Flow cytometry analysis of the internalisation of PBS-, Gal-1- or Gal-1 + lactose-treated extracellular vesicles in HUVEC cells. Cells incubated for 2 h with PKH67-labeled (green) control (left histogram) or Syn-2-positive (right histogram) extracellular vesicles in presence of PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose were quantified for internal fluorescence signals by flow cytometry. Results were processed with the FlowJo software and FL1-A positive (FL1-A +) signals combined with FL1-A signals of the PKH67 control cells. **C.** Comparative analysis of the uptake of control or Syn-2-expressing extracellular vesicles treated with PBS, 4 μ M Gal-1 or 4 μ M Gal-1 + 50 mM lactose in HUVEC cells. The graph represents the geometric means of cells incubated with PKH67-labeled control (EV CTL) or Syn-2-expressing (EV Syn-2) extracellular vesicles. Results are expressed as mean FL1-A fluorescence $\pm$ standard error of the mean (SEM) from three independent experiments. * $p < 0.05$.

CHAPITRE V

DISCUSSION

5 Discussion des résultats

En résumé des trois précédents chapitres de résultats, ce travail de recherche doctoral a montré pour la première fois une association entre la protéine Gal-1 et trois protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes humaines qui s'expriment dans le placenta, à savoir la Syn-1, la Syn-2 et EnvP(b). Les résultats montrent également une différence de réponse entre les Syn-1 et -2 à la présence de Gal-1 et Gal-3 dans le milieu extracellulaire. Ce travail a aussi apporté des résultats préliminaires qui semblent indiquer que l'expression de la Syn-2 à la surface des VE favorise leur internalisation dans les cellules endothéliales. Bien que préliminaires, ces résultats viennent renforcer les résultats publiés auparavant dans le laboratoire du Dr Benoît Barbeau sur la fonction de la Syn-2 dans l'internalisation des VE placentaires par les cellules trophoblastiques. Dans ce dernier chapitre, des éléments de discussion de l'ensemble des résultats seront apportés et les perspectives de recherches futures y seront développées.

5.1 Les Galectine-1 et -3 comme potentiels facteurs de régulation des activités fusogéniques de certaines protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes

Il est maintenant établi que les protéines Syn-1 et -2 ont des fonctions majeures dans la fusion des CTBv et dans le maintien du STB. En revanche le rôle précis de chacune ainsi que les mécanismes moléculaires qui régulent et coordonnent la fusion sont encore peu connus. Plusieurs études ont révélé une combinaison de mécanismes qui régissent l'expression spécifique des Syncytines dans les cellules trophoblastiques avec des modifications épigénétiques et la liaison de facteurs de transcriptions tissu spécifique dans la région promotrice des gènes ainsi qu'un épissage alternatif des transcrits (Gimenez *et al.* 2009; Liang *et al.* 2010; Trejbalova *et al.* 2011; Ruebner *et*

al. 2012; Ruebner *et al.* 2013; Toufaily *et al.* 2015). Néanmoins, ces mécanismes n'expliquent pas comment l'activité fusogénique des Syncytines est régulée dans les cellules trophoblastiques afin de maintenir un équilibre entre les CTBv qui prolifèrent et ceux qui fusionnent. De plus, la fonction des autres protéines ERV fusogéniques dans la formation et le maintien du STB est encore inconnue, mais il est possible que ces protéines d'enveloppes contribuent aussi dans ce processus.

5.2 La Galectine-1, un facteur extracellulaire qui optimise la capacité fusogénique de la protéine Syncytine-2

Les résultats présentés dans les chapitres II et III suggèrent l'existence d'une interaction (directe ou indirecte) entre la Gal-1 et la Syn-2 dans différents modèles cellulaires qui pourrait optimiser l'interaction de la protéine avec son récepteur MFSD2a. Il est également important de rappeler que dans nos expériences la Gal-3 n'a aucun effet sur l'activité de la Syn-2, ce qui suggère une certaine spécificité de l'interaction Gal-1/Syn-2. En revanche, ces résultats font face à plusieurs limitations puisqu'ils ont été obtenus en utilisant des virus pseudotypés, un bon modèle pour étudier l'interaction Syn-2/MFSD2a, mais qui ne reflète pas le contexte d'expression cellulaire de la Syn-2 et aussi en utilisant des lignées cellulaires et non des cellules trophoblastiques. Étant donné que les expériences de co-immunoprécipitation présentées au chapitre 2 (Figure 2.8) ont été faites avec des particules virales et non avec des protéines Syn-2 isolées, plusieurs analyses seront nécessaires afin de déterminer s'il y a une interaction physique entre ces deux protéines ou si l'effet observé est indépendant d'un contact moléculaire.

Malgré tout, ces résultats montrent que la Syn-2 bénéficie de la présence de la Gal-1 lors de son activité fusogénique, un bénéfice envisageable dans le placenta lors de la fusion des CTBv. En effet, la Gal-1 est exprimée dans le STB et, si l'on considère

une interaction entre les deux protéines, la Gal-1 pourrait interagir avec la Syn-2 lorsque celle-ci est exprimée à la surface des CTBv sous-jacents (Vicovac *et al.*, 1998; Jeschke *et al.*, 2007). La Gal-1 pourrait ainsi optimiser l'interaction de la Syn-2 avec MFSD2a, qui est localisée dans le STB (Esnault *et al.*, 2008). L'association entre la Syn-2 et la Gal-1 pourrait dater de l'époque où la Syn-2 était la protéine d'enveloppe d'un rétrovirus exogène qui, à la manière d'autres rétrovirus actuels, aurait détourné les propriétés d'adhésion de la Gal-1 à son avantage. Cette association pourrait avoir été maintenue durant l'évolution afin d'optimiser la fusion des CTBv. En effet, l'expression de la Syn-2 dans les CTBv semble assez restreinte, régulée par le cycle cellulaire et limitée à certaines cellules quiescentes au contact du STB (Lu *et al.* 2017). L'association de la Gal-1 avec la Syn-2 pourrait donc permettre une activité fusogénique optimale de la protéine au moment de son expression afin d'assurer une fusion complète des CTBv avec le STB.

Il faut maintenant démontrer l'interaction entre la Gal-1 et la Syn-2 et vérifier cette association fonctionnelle dans le placenta humain.

5.3 Les Galectine-1 et -3 comme modulateurs de l'activité fusogénique de la Syncytine-1

La régulation de l'activité fusogénique de la Syn-1 est un phénomène qui semble plus complexe, car la protéine peut utiliser deux récepteurs et son expression dans le placenta n'est pas aussi restreinte que la Syn-2. En effet, la Syn-1 semble majoritairement exprimée dans le STB, mais est aussi localisée dans les CTBv et son expression dans le STB semble étendue à tout le syncytium (Blond *et al.* 2000; Muir *et al.* 2006; Noorali *et al.* 2009; Holder *et al.* 2012b). Son récepteur SLC1A5 est exprimé dans les CTBv sous-jacents du STB (Hayward *et al.*, 2007). Malgré l'expression *a priori* continue de la Syn-1 et d'un de ces récepteurs dans ces deux compartiments

cellulaires, la réserve de CTBv est maintenue tout au long de la grossesse. De manière plus surprenante, les protéines Syn-1 et SLC1A5 sont aussi exprimées dans le compartiment des trophoblastes extravilleux, cellules pourtant non-fusogéniques, et aucune étude n'a pour le moment rapporté une régulation post-traductionnelle de la Syn-1 dans les cellules trophoblastiques (Malassiné *et al.*, 2007; Muir *et al.*, 2006). Se pose alors la question de savoir comment l'activité fusogénique de la Syn-1 est modulée si la co-expression de cette protéine avec au moins un de ses récepteurs n'entraîne pas systématiquement la fusion des cellules. Les résultats obtenus avec les Gal-1 et -3 ouvrent une nouvelle piste intéressante pour essayer de comprendre ce phénomène.

En effet, l'association des Gal-1 et -3 avec la Syn-1 semble varier en fonction du contexte cellulaire dans nos expériences *in vitro*, ce qui suggère que ces galectines pourraient moduler l'accessibilité de la Syn-1 aux sites de liaison sur ces récepteurs dépendamment du type cellulaire. Les interactions entre la Syn-1 et les Gal-1 et -3 sont à confirmer dans le placenta, mais il est envisageable que ces galectines participent à la régulation de l'activité fusogénique de la Syn-1 dans ce tissu, car elles sont localisées dans les mêmes compartiments cellulaires que la Syn-1. La variabilité observée dans l'effet d'une même galectine (Gal-1 ou -3) sur la Syn-1 pourrait ensuite s'expliquer soit par une différence d'expression entre les récepteurs, soit par une différence dans la structure et la composition des glycanes sur les protéines SLC1A4 et SLC1A5 d'un type cellulaire à l'autre.

La première hypothèse implique une expression différente des récepteurs SLC1A4 et SLC1A5 dans les cellules et un effet différent de la galectine sur l'interaction Syn-1/SLC1A4 et Syn-1/SLC1A5. D'après certaines études, l'expression de SLC1A5 serait assez stable dans les cellules trophoblastiques alors que d'autres études montrent une diminution de son expression entre le premier et deuxième

trimestre de grossesse ou lors de la fusion des cellules BeWo (Borges *et al.* 2003; Knerr *et al.* 2003; Kudo *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006; Simner *et al.* 2017). L'expression de SLC1A4 serait variable durant la grossesse, avec une décroissance progressive de son expression du premier au troisième trimestre de grossesse (Simner *et al.* 2017). Néanmoins, la localisation du transporteur SLC1A4 dans les différents compartiments de cellules trophoblastiques n'a pas été étudiée. Il est donc difficile de savoir si ces deux transporteurs sont différemment exprimés dans le STB, les CTBv et CTBev. La deuxième hypothèse implique un changement d'affinité de liaison de la galectine pour les glycans de SLC1A4 et SLC1A5 due à la variation des profils de glycosylation des récepteurs selon les types cellulaires. C'est une hypothèse envisageable, car la variation du nombre d'embranchements ou la sialylation des glycans modifie l'affinité de liaison des Gal-1 et -3 pour les glycans et les CTBev et CTBv présentent un profil de glycosylation un peu différent (Hirabayashi *et al.* 2002; Chen *et al.* 2016). Si la composition et l'arrangement des glycosylations des protéines SLC1A4 et SLC1A5 varient entre les types cellulaires alors les galectines pourraient plus ou moins se lier sur les récepteurs et différemment moduler l'accessibilité de la Syn-1 aux sites de liaison. Dans le placenta, il est donc possible que les protéines Gal-1 et -3 inhibent l'interaction avec le(s) récepteur(s) dans les CTBev, mais pas dans les CTBv et qu'une combinaison entre la présence des galectines dans le milieu extracellulaire avec d'autres facteurs cellulaires régule la fusion des CTBv avec le STB.

L'interaction des protéines Gal-1 et Gal-3 avec la Syn-1 peut aussi être envisagée lors de l'implantation embryonnaire. En effet, la Syn-1 et la Gal-1 ont toutes les deux été détectées dans les embryons humains au stade blastocyste et impliquées respectivement dans la formation précoce du STB et l'interaction des embryons avec l'endomètre (Tirado-Gonzalez *et al.* 2013; Soygur et Moore 2016). Bien que l'expression de la Gal-3 n'ait pas été étudiée dans les embryons, son expression est induite dans l'endomètre utérin juste avant l'implantation de l'embryon et est fortement

exprimée dans la décidue, ce qui suggère une fonction lors de l'implantation (Maquoi *et al.*, 1997; von Wolff *et al.*, 2005). Mis en lien avec ces études, nos résultats suggèrent une possible régulation de la fonction fusogénique de la Syn-1 par les galectines dès le stade blastocyste.

5.4 L'association de la Galectine-1 avec EnvP(b)

Nos résultats ont aussi montré une augmentation de la fusion de cellules qui expriment la protéine rétrovirale endogène EnvP(b) suite à l'ajout de Gal-1 dans le milieu extracellulaire (Chapitre III, Figure 3.7). Ces résultats sont notables, car ils étendent l'association de la Gal-1 à d'autres protéines rétrovirales endogènes. Il faut cependant rester prudent avec ces résultats pour l'instant, car il est possible que l'effet de la Gal-1 lors de la fusion des cellules qui expriment EnvP(b) soit indirect et que la Gal-1 et EnvP(b) agissent en synergie lors du processus de fusion. L'approfondissement de ses analyses est nécessaire afin de déterminer si la Gal-1 et EnvP(b) interagissent à la surface des cellules et cette interaction est spécifique.

Toutefois, ces résultats relancent l'intérêt pour cette troisième protéine d'enveloppe rétrovirale endogène. Bien qu'EnvP(b) soit considérée comme une protéine fusogénique non-essentielle, son expression a été maintenue dans le placenta et le gène qui code pour la protéine présente un taux de mutations stable dans la population humaine (Aagaard *et al.* 2005; Esnault *et al.* 2013). Le fait que la Gal-1 semble augmenter l'activité fusogénique d'EnvP(b) suggère une possible conservation des associations galectines et enveloppes rétrovirales endogènes et permet d'envisager une fonction pour EnvP(b) dans le placenta, complémentaire à celle des Syncytines. L'extrapolation des résultats au placenta est pour l'instant compliquée par le manque de données sur la localisation et l'expression de la protéine dans les trophoblastes et par le fait que son récepteur est inconnu.

5.5 Les implications des interactions Galectine-1 et -3 avec les enveloppes rétrovirales endogènes

En considérant les autres tissus où s'expriment les Syn-1 et -2, les associations galectine-Syncytine pourraient exister en dehors du placenta. De manière intéressante, on retrouve les Gal-1 et -3 dans les mêmes tissus que les Syncytines.

5.5.1 Dans les pathologies

5.5.1.1 La pré-éclampsie

Dans la PE, l'expression des Syncytines est diminuée dans le placenta et a été associée avec une baisse de fusion des CTBv et un défaut de formation du STB (Vargas *et al.*, 2011). L'expression de la Gal-1 est aussi dérégulée dans les cas de PE mais il semble y avoir une différence entre les cas de PE précoces (avant 34 semaines de grossesse), de PE tardives (après 34 semaines de grossesse) et les PE sévères (pression systolique > 160 mmHg et protéinurie > 5g en 24h) avec une diminution de Gal-1 dans le placenta dans le premier cas et à l'inverse une augmentation de son expression dans les PE tardives et sévères (Than *et al.* 2008a; Freitag *et al.* 2013). Cette différence entre PE précoces et tardives est aussi observée dans les niveaux de Gal-1 circulante avec une concentration en Gal-1 sérique significativement plus basse chez les femmes ayant une PE précoce comparativement aux femmes ayant une PE tardive (Hirashima *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, les niveaux d'expression des Syncytines et de la Gal-1 ont été analysés séparément dans la PE. Mais la démonstration d'une association fonctionnelle entre la Gal-1 et les protéines Syn-1 et -2 suggère qu'un défaut dans ces interactions pourrait éventuellement contribuer dans la physiopathologie de la PE et avoir des conséquences différentes entre les PE précoces et tardives. Déterminer le rôle joué par la Gal-1 dans la fonction des Syncytines et des autres enveloppes endogènes (fusion et

immunosuppression) permettra de proposer de nouvelles pistes pour comprendre le développement de la / des PE(s).

5.5.1.2 La sclérose en plaques

La Syn-1 et le virus apparenté MSRV ont été associés à la pathogenèse de la sclérose en plaques avec une expression anormale de la Syn-1 dans les astrocytes de patients qui induit un stress oxydatif dans ces cellules et une réponse délétère envers les oligodendrocytes (Antony *et al.* 2006). Des études rapportent aussi des changements d'expression et de localisation des protéines Gal-1 et -3 dans les lésions actives de sclérose en plaques avec une augmentation de leur expression dans les lésions, la microglie et les astrocytes et avec une sécrétion plus importante de Gal-1 dans les astrocytes de patients atteints de sclérose en plaques (Stancic *et al.* 2011; Starossom *et al.* 2012). Si les Gal-1 et -3 présentent des fonctions de régulation de l'activité de la Syn-1, les changements d'expression et de localisation de ces protéines pourraient avoir des enjeux dans l'évolution de la sclérose en plaques. Aussi, la protéine d'enveloppe du virus MSRV étant apparentée à la Syn-1, il est possible que les Gal-1 et -3 interagissent avec cette enveloppe et que ces interactions soient impliquées dans le développement de la pathologie.

5.5.1.3 Les cancers

L'induction anormale de l'expression des protéines Syn-1 et Syn-2 a été rapportée dans plusieurs types de cancers tels que des cancers du sein, de l'utérus, des testicules, colorectaux et des lymphomes (Trejbalova *et al.* 2011; Strissel *et al.* 2012; Yu *et al.* 2014; Diaz-Carballo *et al.* 2015; Sun *et al.* 2016b; Benesova *et al.* 2017). La protéine EnvP(b) quant à elle induit la fusion des cellules de choriocarcinomes avec les cellules endothéliales et pourrait donc participer au développement de certaines tumeurs. Étant donné que les Gal-1 et -3 sont aussi impliquées dans le développement

de certains cancers, tels que des mélanomes, cancers du sein, des ovaires et de la prostate (Vasta *et al.* 2017), nos résultats soulèvent des implications possibles pour les interactions entre les galectines et les protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes dans les événements de fusions entre cellules tumorales et les cellules de l'environnement tumoral.

5.5.2 Dans les processus de fusion en dehors du placenta

Les myoblastes et ostéoclastes sont les deux autres types cellulaires en dehors des trophoblastes qui forment un syncytium et l'expression de la Syn-1, la Syn-2 et d'EnvP(b) ont été rapporté dans les myoblastes et de la Syn-1 dans les ostéoclastes. Les Gal-1 et -3 sont aussi exprimées dans ces cellules et impliquées dans l'homéostasie de ces tissus.

5.5.2.1 Interaction des Galectine-1 et -3 avec les protéines Syncytine-1, -2 et EnvP(b) dans les muscles

Plusieurs études ayant utilisé des modèles de souris déficientes pour l'expression du gène *Lgals1* ou des modèles *in vitro* humain et murin ont démontré la fonction de la Gal-1 dans la fusion des myoblastes (Goldring *et al.* 2002; Chan *et al.* 2006; Georgiadis *et al.* 2007). La Gal-3 est également exprimée dans les myoblastes et serait impliquée dans la régénération des fibres musculaires (Rancourt *et al.* 2018). De plus, les résultats de Frese *et al.* (2015) rapportent l'expression des gènes ERVW-1, ERVFRD-1 et ERV-Pb dans les muscles humains avec une immunodétection des protéines Syn-1, Syn-2, SLC1A4 et MFSD2a dans les myofibres et le sarcolemme et une induction significative de l'expression de la Syn-1 et d'EnvP(b) dans les myoblastes durant leur différenciation (Frese *et al.* 2015). À la vue de ces analyses, il est envisageable que chez l'humain les Gal-1 et -3 établissent des associations avec les protéines Syn-1, -2 et EnvP(b) qui participent à la fusion des myoblastes et, tout comme

proposé dans le placenta, les différentes interactions Galectine-enveloppe rétrovirale pourraient réguler le processus de fusion dans le muscle.

De manière intéressante, une étude a montré que les Syncytines murines (Syn-A et -B) sont également impliquées dans la fusion des myoblastes (Redelsperger *et al.* 2016). Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction entre les protéines Gal-1 et -3 et les Syncytines murines durant la fusion des myoblastes murins afin de voir si le lien Galectines-Syncytines est conservé chez les primates et les murins.

5.5.2.2 Interaction entre la Galectine-3 et la Syncytine-1 durant la formation des ostéoclastes

Dans la littérature, seule la Syn-1 a été étudiée dans le processus de formation des ostéoclastes, mais il est possible que d'autres enveloppes rétrovirales endogènes soient exprimées dans les cellules précurseurs et les ostéoclastes. D'après ces études, la Syn-1 et son récepteur SLC1A5 permettraient la formation des ostéoclastes, mais interviendraient dans une phase bien précise de leur formation, en induisant la fusion entre deux cellules précurseurs multinucléées (Soe *et al.* 2011; Hobolt-Pedersen *et al.* 2014; Moller *et al.* 2017). De manière intéressante la Gal-3 est exprimée par les ostéoblastes et ostéoclastes et il a récemment été montré dans des modèles murins et de cellules humaines que cette galectine est un facteur de régulation de la formation des ostéoclastes et que l'absence de Gal-3 chez les souris diminue la formation d'ostéoclastes qui présentent plus de 10 noyaux mais n'altère pas la formation d'ostéoclastes ayant 2 à 3 noyaux (Simon *et al.* 2017; Iacobini *et al.* 2018). Ces études et nos résultats suggèrent fortement un lien fonctionnel entre la Syn-1 et la Gal-3 durant la fusion des ostéoclastes multinucléés.

5.5.2.3 Interaction de la Galectine-1 avec la Syncytine-1 durant la fécondation

Les testicules sont le deuxième tissu après le placenta où les transcrits de la Syn-1 s'expriment de manière élevée et l'expression de la protéine et son récepteur SLC1A5 a été démontrée dans les spermatozoïdes. Dans ces cellules, la Syn-1 et son récepteur sont localisés dans l'acrosome et la queue des spermatozoïdes (Mi *et al.* 2000; Bjerregaard *et al.* 2014). La Gal-1 est aussi localisée dans ces régions et serait nécessaire pour la réaction acrosomique et la motilité des spermatozoïdes (Vasen *et al.* 2015). L'association de la Gal-1 avec la Syn-1 est donc envisageable lors de la réaction acrosomique qui implique un évènement de fusion membranaire.

5.5.3 Perspectives

Deux limitations majeures des résultats présentés sur les interactions entre les galectines et les protéines Syn-1 et -2 sont le manque d'expériences dans des modèles trophoblastiques et de preuves directes d'interaction entre les protéines. Il est donc maintenant important de confirmer l'association des protéines Gal-1 et Gal-3 avec les Syncytines dans la physiologie placentaire et de montrer que des interactions protéiques existent entre les galectines et les Syncytines.

Dans un premier temps, la colocalisation de la Gal-1 ou de la Gal-3 avec les protéines Syn-1 ou -2 devra être étudiée dans les cellules BeWo induites pour la fusion afin de savoir si les protéines sont localisées aux mêmes régions membranaires pendant la fusion. Les cellules BeWo étant des cellules de choriocarcinome, ces expériences de colocalisation devront être répétées dans des cultures primaires de cytotrophoblastes afin de se rapprocher d'un modèle plus physiologique. Enfin, il serait intéressant d'étudier en parallèle la localisation de la Syn-1, de la Syn-2, de la Gal-1 et de la Gal-3 dans des tissus placentaires par immunohistochimie puis d'analyser la colocalisation des couples Syncytine/galectine par immunofluorescence dans le tissu placentaire.

D'un point de vue fonctionnel, il est difficile de faire des analyses dans un modèle physiologique (cellules trophoblastiques ou tissu placentaire) si l'on veut dissocier les Galectines d'une part et les Syncytines d'autre part. Des expériences de fusion avec différentes lignées cellulaires transfectées avec un vecteur d'expression pour la Syn-2 en présence de Gal-1 permettront dans un premier temps de confirmer la reproductibilité des résultats obtenus avec les virus pseudotypés dans des modèles de fusion cellulaire. Il serait aussi pertinent de tester les associations de la Syn-2 avec d'autres galectines placentaires afin de déterminer l'étendue et la spécificité des interactions possibles entre la Syn-2 et les galectines.

Afin de montrer que l'effet de la Gal-1 sur l'activité fusogénique de la Syn-2 n'est pas un effet synergique, mais dépend d'une liaison entre les protéines, des analyses d'interactions protéiques devront être menées. L'identification des glycanes sur la Syn-2 responsables de l'interaction avec la Gal-1 pourra ensuite être réalisée et permettra de démontrer l'interaction entre ces protéines. L'utilisation de mutants de glycosylations N-liées de la Syn-2 a déjà été utilisée dans une étude et ces mutations ne semblent pas affecter l'expression de la protéine (Cui *et al.* 2016). Cette méthodologie pourra être utilisée afin de déterminer si l'interaction de la Gal-1 avec la Syn-2 dépend des N-glycanes et d'identifier le(s) N-glycan(s) responsables de l'interaction. Des analyses d'interactions protéiques entre les galectines et les protéines Syn-1 et EnvP(b) seront aussi à envisager.

Dans le but de comprendre les effets de la Gal-1 avec la Syn-1, il serait intéressant d'étudier l'expression des protéines SCL1A4 et SLC1A5 dans les lignées utilisées et voir s'il existe une différence marquée dans l'expression de ces protéines entre les lignées. Aussi, selon l'étude de Marin et al. (2003), les HeLa semblent n'exprimer que SLC1A5 et pourraient être utilisées dans des expériences d'infections, après transfection de quantité croissante d'un vecteur d'expression pour SCL1A4

(Marin *et al.* 2003). Il serait ainsi possible de voir si l'ajout de Gal-1 durant les infections module différemment l'infection comparativement à des HeLa qui n'expriment que SLC1A5. Il serait aussi pertinent d'utiliser des cellules non permissives à l'infection avec Syn-1, comme les cellules CHO, et de transfecter ces cellules avec soit SLC1A4, soit SLC1A5, soit les deux en faisant varier les ratios, afin de voir si la variabilité observée dans l'effet de la Gal-1 avec la Syn-1 est dû à une différence dans l'expression ou la disponibilité des récepteurs.

Un approfondissement des connaissances sur les interactions Galectines et Syncytines permettra finalement de mieux comprendre la fusion des trophoblastes durant la formation du STB et possiblement les enjeux dans le développement de pathologies obstétriques comme la PE.

5.6 La Syncytine-2 – une protéine qui oriente l'internalisation des vésicules extracellulaires placentaires dans les cellules

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire Dr Benoit Barbeau ont démontré pour la première fois que les Syn-1 et -2 jouent un rôle dans l'internalisation des VE placentaires dans les cellules (Vargas *et al.*, 2014). Ce projet de thèse apporte maintenant de nouvelles données qui renforcent l'idée que l'expression des Syncytines à la surface des VE placentaires joue un rôle dans le processus d'entrée de ces vésicules. En effet, les résultats présentés au chapitre IV montrent un effet de la Syn-2 sur l'internalisation des VE dans les cellules endothéliales HUVEC. Ces résultats sont prometteurs, car ils suggèrent une internalisation active des VE placentaires ainsi qu'un possible tropisme cellulaire dépendamment des protéines exprimées à leur surface. Ces résultats soulèvent aussi de nombreuses questions concernant l'adressage de la protéine Syn-2 dans les VE et les possibles fonctions de la Syn-2 lorsqu'elle est associée aux VE.

5.6.1 L'adressage de la Syncytine-2 dans les vésicules extracellulaires

Une des grandes questions concernant l'étude des cargos associés aux VE est celle des mécanismes d'adressage de ces molécules aux vésicules. C'est une question à laquelle tentent de répondre certains, mais qui n'est pas sans difficulté vue le grand nombre de cargos différents associés aux VE (protéines membranaires, solubles, microARN, ARNm) et la variabilité de la composition des VE en fonction du type cellulaire qui les produisent. Les analyses portant sur les cargos protéiques ont identifié plusieurs voies potentielles d'adressage vers les VE : la présence de motifs d'interactions avec les protéines des complexes ESCRT, certaines modifications post-traductionnelles ou la localisation des protéines dans les rafts lipidiques. Il est intéressant de noter que certaines de ces voies sont également empruntées par les protéines virales lors de l'assemblage des virions, établissant une analogie entre la synthèse des VE et celles des particules virales.

5.6.1.1 Ubiquitination et interaction protéine-protéine

Selon les études antérieures sur le transit de la Syn-2 vers la membrane plasmique, la protéine passe par la voie de sécrétion RE-golgi. La protéine pourrait alors être internalisée dans les différents type de VE (microvésicules et exosomes) de par sa localisation dans certains domaines de la membrane plasmique ou par des interactions avec des protéines endosomales ou impliquées dans la formation des CMV soit pendant son transport vers la membrane plasmique ou pendant un processus de recyclage de la protéine. Beaucoup de protéines cellulaires et virales détectées dans les VE interagissent avec les protéines TSG101 du complexe ESCRT-I ou la protéine accessoire Alix, mais il est peu probable que la Syn-2 interagisse directement avec ces protéines, car aucun des motifs connus d'interactions avec les protéines Alix (motif LYPX(n)L) ou TSG101 (motif PT/SAP), ne sont identifiable dans sa séquence protéique (voir Annexe A). Notons que ces séquences sont présentes dans la région

intracytoplasmique de la Syn-1 et pourraient diriger son internalisation dans les VE (voir Annexe B). En revanche, la protéine HRS qui appartient au complexe ESCRT-0 reconnaît les protéines membranaires ubiquitinées dans les endosomes et plusieurs protéines ubiquitinylées ont été détectées dans les VE (Huebner *et al.* 2016; Moreno-Gonzalo *et al.* 2018). Aucune donnée n'existe sur les modifications post-traductionnelles de la Syn-2 autres que les glycosylations, mais l'ubiquitination de la protéine est une piste potentielle pour l'adressage de la Syn-2 vers les VE de type exosomes.

Une étude plus récente a identifié la petite protéine de type ubiquitine UBL3 comme un type de modification post-traductionnelle qui dirige les protéines vers les VE (Ageta *et al.* 2018). Cette protéine interagit avec les protéines via la formation de ponts disulfures entre des résidus cystéines situés à son extrémité C-terminale et des résidus cystéines sur les protéines. Les données sur cette protéine sont très récentes, mais c'est une piste intéressante dans l'exploration de l'adressage de la Syn-2 aux VE étant donné qu'elle possède plusieurs cystéines en plus des motifs cystéine impliqués dans l'interaction des sous-unités SU et TM.

5.6.1.2 Localisation de la protéine Syncytine-2 dans les rafts lipidiques

L'internalisation de la Syn-2 dans les VE pourrait s'expliquer par une localisation de la protéine dans les rafts lipidiques, des régions membranaires riches en cholestérol et sphingolipides, prônant à former des bourgeonnements membranaires et dont la composition est similaire à la membrane des VE (Kowal *et al.* 2014; Mulcahy *et al.* 2014). En effet, la présence de la protéine dans ces microdomaines membranaires pourrait diriger l'internalisation de la Syn-2 dans les microvésicules qui bourgeonnent directement à la membrane. En revanche, l'internalisation de la Syn-2 dans les exosomes implique que la protéine soit dirigée vers les endosomes ou les CMV. Si la protéine n'est pas orientée vers ces compartiments durant son trajet vers la membrane,

il est possible que la Syn-2 soit endocytée après son expression à la membrane plasmique et se localise secondairement dans les endosomes. C'est le cas des glycoprotéines d'enveloppe des lentivirus HTLV-1, VIH-1 et SIV-1 qui possèdent un domaine d'interaction avec les complexes protéiques AP-1 et AP-2 dans leurs régions C-terminales (YxxΦ) et qui sont endocytées via une endocytose clathrine-dépendante et redirigées vers les endosomes après leur expression à la membrane plasmique (Berlitz-Torrent *et al.* 1999; Kirschman *et al.* 2018). La Syn-2 ne présente pas de motif d'interaction avec les complexes AP-1 et-2 dans sa queue C-terminale mais sa présence dans les rafts lipidiques pourrait permettre une internalisation via un processus d'endocytose indépendant de la clathrine et sa localisation secondaire dans les VE (Le Roy et Wrana 2005; Tan *et al.* 2013).

L'internalisation de certaines protéines membranaires dans les rafts lipidiques semble dépendre d'un domaine de liaison aux sphingolipides situé dans le domaine transmembranaire des protéines et correspond à une séquence consensus de 9 acides aminés (V/I/T/L)xx(V/I/T/L)(V/I/T/L)xx(V/I/T/L)(F/W/Y) (Contreras *et al.* 2012; Bjorkholm *et al.* 2014). Ce domaine serait aussi spécifiquement impliqué dans la liaison avec la sphingomyéline 18, un sphingolipide notamment associé à l'export de la forme tronquée de l'endogline (sEng) dans les exosomes placentaires dans les cas de PE (Contreras *et al.* 2012; Ermini *et al.* 2017). De manière intéressante, un motif similaire est présent dans le domaine transmembranaire de la protéine Syn-2 (VSLLLLLLF, Annexe A), suggérant que la protéine puisse effectivement se localiser dans les rafts lipidiques. Une localisation de la protéine dans ces domaines membranaires devra être réalisée afin de tester cette hypothèse.

En conclusion, l'internalisation de la Syn-2 dans la membrane des VE (microvésicules et exosomes) pourrait dépendre de modifications post-traductionnelles, d'interactions protéiques et d'une localisation de la protéine dans des domaines

membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Ces pistes pourront être explorées dans de futures recherches et apporteront des données importantes pour la compréhension des mécanismes moléculaires qui dirigent la Syn-2 vers ces vésicules et pour appuyer les résultats sur sa fonction lorsqu'elle est associée aux VE.

5.6.2 Les implications de la présence des Syncytine-1 et -2 à la surface des vésicules extracellulaires placentaires

Les VE sont connues pour leur rôle dans la communication intercellulaire et dans la régulation de la réponse immunitaire avec le transport de molécules actives dans leur lumière ou à leur surface. Mais la question se pose à savoir si les VE sont internalisées aléatoirement par les cellules ou bien si leur internalisation est plus ciblée. Une partie de la réponse vient de l'étude des protéines associées à la surface des VE avec la présence de ligands et/ou de récepteurs susceptibles d'interagir avec leurs partenaires respectifs à la surface des cellules (Hoshino *et al.* 2015). Les protéines Syn-1 et -2 rentrent dans cette catégorie de molécules et leur présence à la surface des VE pourrait favoriser l'internalisation des VE dans certaines cellules qui expriment leurs récepteurs. Ces protéines pourraient aussi contribuer au rôle immunorégulateur des VE via leurs domaines immunosuppresseurs ou exercer un rôle antiviral.

5.6.2.1 Le rôle des Syncytines dans l'internalisation des vésicules extracellulaires placentaires dans les cellules endothéliales et immunitaires

Durant la grossesse, le placenta libère des VE qui peuvent agir localement ou rejoindre la circulation maternelle et aller agir à distance afin de moduler l'activité des cellules. Ceci a été particulièrement étudié avec les cellules endothéliales et immunitaires.

Plusieurs études ont montré l'action des VE placentaires sur l'activation et la migration des cellules endothéliales (Hoegh *et al.* 2006; Salomon *et al.* 2013b; Salomon *et al.* 2014c; Cronqvist *et al.* 2017). En revanche aucune étude n'a identifié de facteurs qui dirigent l'internalisation des VE placentaires dans ces cellules. Les résultats présentés au chapitre IV suggèrent que la présence de la Syn-2 à la surface de ces vésicules pourrait jouer un rôle dans ce processus. En effet, le transporteur MFSD2a est exprimé au niveau des cellules endothéliales et l'interaction spécifique de la Syn-2 avec MFSD2a pourrait diriger l'internalisation des VE placentaires dans les cellules endothéliales de différents tissus (Ben-Zvi *et al.* 2014; Ungaro *et al.* 2017). L'interaction de la Syn-1 avec ses récepteurs contribue probablement aussi à l'entrée des VE placentaires dans les cellules endothéliales et cette contribution devra être étudiée. Il semble que le récepteur SLC1A5 soit plus fortement exprimé que SLC1A4 dans les cellules endothéliales et pourrait donc principalement contribuer à l'interaction avec la Syn-1 exprimée sur les VE (Tetsuka *et al.* 2003).

Concernant les cellules immunitaires, la fonction des VE a surtout été associée à la présence de protéines à la surface des vésicules qui régulent des voies de signalisation, mais certaines études rapportent également l'internalisation de microARN placentaires dans les cellules immunitaires via les VE (Kambe *et al.* 2014; Ospina-Prieto *et al.* 2016). Les travaux de Hummel *et al.* (2015) ont montré l'expression de MFSD2a, de SLC1A4 et SLC1A5 à la membrane des lymphocytes T et des cellules dendritiques et plusieurs autres études rapportent l'expression de SLC1A5 par les lymphocytes T activés et les cellules NK (Nakaya *et al.* 2014; Hummel *et al.* 2015; Guo *et al.* 2017; Jensen *et al.* 2017). La présence des récepteurs à la surface de cellules immunitaires, connues pour interagir avec les VE, suggère donc que les Syn-1 et -2 puissent aussi être impliquées dans le transfert du contenu des VE placentaires dans les cellules immunitaires.

L'expression des Syncytines à la surface des VE placentaires pourrait de ce fait orienter l'internalisation des VE placentaires dans certains types cellulaires dont l'activité doit être modulée durant la grossesse. La présence d'autres enveloppes rétrovirales endogènes à la surface des VE placentaires (ex : EnvP(b)) est à déterminer, mais il est possible qu'elles contribuent aussi à l'entrée des VE. Enfin, déterminer le niveau d'implication de la Syn-2 dans l'internalisation des VE placentaires est particulièrement important dans le contexte de la PE où l'expression de cette protéine est significativement réduite à la surface des VE circulantes et pourrait affecter la communication intercellulaire.

5.6.2.2 Régulation de la réponse immunitaire via le domaine immunosuppresseur

Durant la grossesse, la réponse immunitaire maternelle doit être modulée afin de permettre l'implantation et la croissance d'un fœtus semi-allogénique, et ceci passe par l'activation ou l'inhibition de cellules effectrices diverses. Des travaux ont établi que les VE placentaires avaient un rôle important dans cette immunorégulation (Gohner *et al.* 2017).

La présence d'un domaine immunosuppresseur fonctionnel dans la TM de la Syn-2 suppose que l'exportation de cette protéine via les VE puisse avoir une fonction de régulation de la réponse immunitaire (Mangeney *et al.*, 2007). Des travaux réalisés au laboratoire ont confirmé l'activité immunosuppressive de la Syn-2 et suggèrent que l'expression de la Syn-2 à la surface des VE contribue en partie à l'activité immunorégulatrice associée aux VE placentaires (Lokossou *et al.*, accepted). La Syn-1 semble également contribuer à l'activité immunorégulatrice des VE placentaires même si les domaines de la protéine impliqués dans sa fonction immunosuppressive ne sont pas encore clairement identifiés (Mangeney *et al.* 2007; Tolosa *et al.* 2012; Hummel *et al.* 2015). Ainsi, si les protéines Syn-1 et -2 ont une activité

immunosuppressive différente, l'expression de l'une et / ou l'autre des Syncytines à la surface des VE placentaires pourrait différemment réguler la réponse immunitaire maternelle.

Finalement, la contribution des protéines rétrovirales endogènes EnvV et EnvP(b) ne devrait pas être négligée, car ces deux protéines présentent aussi une activité immunosuppressive (Mangeney *et al.* 2007). L'étude de l'internalisation de ces protéines dans les VE permettra de déterminer le rôle éventuel de ces deux protéines.

5.6.2.3 Protection contre les infections virales

L'étude de Ouyang *et al.* (2016) a montré un rôle antiviral des VE placentaires et particulièrement des exosomes (Ouyang *et al.* 2016). Cette fonction antivirale a été associée en partie à la présence de certains microARN, mais les auteurs rapportent aussi la présence des protéines Syn-1 et -2 dans les exosomes placentaires, ce qui confirme les présents résultats et ceux publiés au laboratoire (Vargas *et al.* 2014). La présence de la Syn-1 à la surface des VE placentaires pourrait protéger les cellules non trophoblastiques de certaines infections virales dans son groupe d'interférence. En effet, la liaison de la Syn-1 avec ses récepteurs à la surface des cellules pourrait rendre ces récepteurs inaccessibles à d'autres virus qui utilisent ces mêmes récepteurs. En ce qui concerne la Syn-2, aucun autre virus n'a été identifié à date qui utilise MFSD2a, mais il n'est pas exclu que des virus aient existé par avant et utilisait ce même récepteur.

L'internalisation des Syncytines humaines et éventuellement d'autres protéines rétrovirales endogènes dans la membrane des VE placentaires pourrait donc être un phénomène actif et ces protéines pourraient participer à différentes fonctions exercées par les VE.

5.6.3 Le rôle envisagé de la Galectine-1 dans l'entrée des vésicules extracellulaires

Les résultats obtenus lors de l'incubation des VE avec la Gal-1 montrent une tendance à l'augmentation de l'entrée des VE en présence de Gal-1 (Chapitre IV, Figure 4.4). Ceci suggère un possible effet de cette dernière sur l'internalisation des VE. Étant donné que les VE expriment plusieurs types de glycoprotéines et glycolipides à leur surface, il est très probable que la Gal-1, et d'autres membres de cette famille de lectines présentes dans le milieu extracellulaire, puissent lier la surface des VE (Gerlach *et al.* 2013; Costa *et al.* 2018). Quelques études rapportent la détection des Gal-1 et -3 dans les VE mais leur présence à la surface ou à l'intérieur des vésicules n'a pas systématiquement été analysé (traitement des VE à la protéinase K) (Kulkarni et Prasad 2017; Banfer *et al.* 2018). Aussi, il semble que la composition des glycans à la surface des VE affecte leur localisation *in vivo* (Royo *et al.* 2019). L'interaction des VE avec les différentes galectines est donc une piste intéressante.

Durant la grossesse, les niveaux de Gal-1 dans le placenta et dans le sang semblent augmenter. Si la Gal-1 se lie aux VE placentaires, il est possible qu'elle influence l'internalisation des vésicules, aussi bien localement que dans les autres tissus. De plus amples analyses seront nécessaires afin de déterminer si la Gal-1 peut lier la surface des VE placentaires, facilite l'attachement des VE à la surface des cellules et si elle peut aussi diriger l'internalisation des VE placentaires dans certaines cellules en fonction de leurs profils de glycosylation.

5.6.4 Perspectives

5.6.4.1 Analyses fonctionnelles sur les HUVEC après incubation avec des vésicules extracellulaires qui expriment la Syncytine-2

Les résultats présentés dans le chapitre IV demandent à être complétés par une meilleure caractérisation des VE (expression de marqueurs de VE par Western-blot, caractérisation par Nano Tracking Analysis), des répétitions des expériences d'incubation des VE contrôles et qui expriment la Syn-2, une localisation des VE dans les compartiments cellulaires après internalisation par les HUVEC et une étude de l'internalisation des VE en présence d'une concentration croissante de Gal-1. Aussi, des analyses fonctionnelles sur les HUVEC permettront d'identifier si la présence de la Syn-2 à la surface des VE peut modifier la réponse des cellules (migration, différenciation, invasion). L'analyse comparative de la composition des VE qui expriment ou non la Syn-2 indiquera si les cargos changent entre les deux populations de vésicules et si les éventuels effets observés sur la réponse des HUVEC sont dus à certains cargos ou à une différence d'internalisation.

5.6.4.2 L'adressage de la Syncytine-2 aux vésicules extracellulaires

Afin de déterminer comment la Syn-2 est adressée aux VE, il sera possible dans un premier temps d'étudier les modifications post-traductionnelles de la protéine (ex : ubiquitination) dans des cellules trophoblastiques ou des lignées cellulaires et voir si ces modifications dirigent l'internalisation de la protéine dans les VE. Il sera également possible d'étudier la localisation de la Syn-2 dans les rafts lipidiques. Les protéines Flotillin-1 et -2 étant des marqueurs de rafts lipidiques dans le placenta et dans de nombreux types cellulaires, une colocalisation de la Syn-2 avec ces protéines dans les cellules trophoblastiques et des lignées cellulaires pourrait indiquer la localisation de la Syn-2 dans ces microdomaines membranaires (Walton *et al.* 2013). Il est aussi possible d'isoler les rafts lipidiques à partir de lysats cellulaires, une technique qui pourra être employée pour déterminer la localisation de la Syn-2 dans ces domaines membranaires. Aussi, une mutation de la séquence putative de liaison aux sphingolipides (VSLLLLLLF, Annexe A) de la Syn-2 permettra de savoir si cette

séquence est importante pour la localisation de la protéine dans certaines régions membranaires et dans les VE.

5.6.4.3 L'expression des autres protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes placentaires dans les vésicules extracellulaires

L'absence d'anticorps commerciaux disponibles pour les protéines EnvV et EnvP(b) limite les études de ces deux protéines et aucune étude n'a examiné l'association des protéines EnvP(b) et EnvV avec les VE. Pourtant ces protéines pourraient participer à l'entrée des vésicules dans les cellules (trophoblastiques ou autres) ou aux fonctions immunorégulatrices des VE. Des premières analyses de l'internalisation de EnvV et EnvP(b) dans les VE pourraient cependant être réalisées en utilisant des protéines recombinantes fusionnées avec des étiquettes et des cellules productrices de VE. Des analyses d'internalisation dans différents modèles cellulaires ainsi que des analyses de la réponse cytokinique de cellules immunitaires incubées avec ces VE pourront ensuite indiquer si ces protéines sont potentiellement impliquées dans l'internalisation ou les fonctions immunorégulatrices des VE.

5.6.4.4 L'association des protéines Galectine-1 et 3 avec les vésicules extracellulaires

L'association des protéines Gal-1 et -3 avec les VE pourra être déterminé en isolant les VE de différentes cultures de lignées cellulaires qui expriment ces protéines et de CTBv et par une détection des protéines par Western-blot. Une analyse par cytométrie en flux pourra être réalisée afin d'analyser l'expression des Gal-1 et -3 à la surface des vésicules, avant et après traitement des vésicules par la Protéinase K. La liaison des protéines Gal-1 et Gal-3 recombinantes à la surface des VE pourra aussi être analysée en incubant ces protéines avec des VE isolées suivi par une détection des protéines par Western-blot et cytométrie en flux. La fonction de ces galectines dans

l'internalisation des VE pourra être étudié dans un premier temps en incubant des VE marquées au PKH67 avec des doses croissantes de Gal-1 ou Gal-3 recombinantes et une comparaison de l'internalisation cellulaire avec des contrôles sans galectines ou avec lactose. Dans un deuxième temps, des cellules déficientes pour l'expression des galectines pourraient être générées et utilisées pour comparer l'internalisation de VE marquées en présence ou non de galectines recombinantes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon projet de recherche doctoral avait deux buts principaux : poursuivre la caractérisation des activités fusogéniques des protéines d'enveloppes rétrovirales endogènes humaines Syncytine-1 et -2 lors de la formation du syncytiotrophoblaste et étudier la fonction de la Syncytine-2 dans l'internalisation des vésicules extracellulaires placentaires dans les cellules endothéliales. Ces travaux ont établi un lien inédit entre les enveloppes de ERV et les protéines Galectine-1 et -3 et apporté des résultats qui permettent d'envisager la Syncytine-2 comme un facteur déterminant dans l'entrée cellulaire des vésicules extracellulaires. Les résultats obtenus ouvrent sur de nombreuses perspectives intéressantes concernant les fonctions des enveloppes rétrovirales endogènes dans le placenta, mais aussi dans les autres tissus qui expriment ces protéines ou qui internalisent des vésicules extracellulaires placentaires.

La possible régulation de l'activité fusogénique des Syncytines par les Galectines est une nouvelle hypothèse à envisager dans les mécanismes qui conduisent à la formation et au maintien du syncytiotrophoblaste dans le placenta. Les Galectines étant conservés chez de nombreuses espèces qui expriment des protéines de type Syncytine, une perspective plus générale peut être envisagée : celle d'une conservation des interactions entre les Galectines et les Syncytines et d'un mécanisme global de régulation de ces protéines fusogéniques par les Galectines. La découverte d'une connexion entre les enveloppes rétrovirales endogènes et les Galectines débouchent aussi sur de nouvelles pistes de recherche dans l'étude de la pré-éclampsie, la sclérose en plaques et certains cancers, où la modification des interactions enveloppe-Galectine pourrait contribuer à l'évolution de la pathologie.

Bien que découverte il y a plus de 15 ans, la Syncytine-2 pâtit encore aujourd'hui de la popularité de la Syncytine-1 et est souvent négligée dans les recherches qui portent sur la fusion cellulaire. Néanmoins, la différence observée dans l'interaction des Syncytines avec les Galectines renforce l'idée que ces deux protéines possèdent des fonctions complémentaires dans le placenta. Il est donc important de poursuivre la caractérisation de la Syncytine-2 afin d'envisager l'envergure de ses fonctions (fusogéniques et immunorégulatrices) dans le placenta et les autres tissus.

Aussi, comprendre l'adressage des Syncytine-1 et -2 à la membrane des vésicules extracellulaires placentaires et les fonctions jouées par ces protéines lorsqu'elles sont associées à ses vésicules est un défi majeur, mais indispensable si l'on souhaite comprendre les mécanismes d'adaptation cellulaire nécessaires au développement normal de la grossesse et les défauts qui conduisent à l'apparition de grossesses pathologiques. Les recherches précédentes réalisées dans notre laboratoire avaient proposé l'utilisation de la Syncytine-2 comme un biomarqueur de la pré-éclampsie et des analyses sont toujours en cours afin d'évaluer le potentiel diagnostique de cette protéine.

ANNEXE A

SÉQUENCE PROTÉIQUE ANNOTÉE DE LA PROTÉINE SYNCYTINE-2

10	20	30	40	50
MGLLLLVLIL	TPSLAAYRHP	DFPLLEKAQQ	LLQSTGSPYS	TNC CWLCT SSS
60	70	80	90	100
TETPGTAYPA	SPREWTSIEA	ELHISYRWDP	NLKGLMRPAN	SLLSTVKQDF
110	120	130	140	150
PDIRQKPPIF	GPIFTNINLM	GIAPICVMAK	RKNGTNVGTL	PSTVCNVTFT
160	170	180	190	200
VDSNQQTYYT	YTHNQFRHQP	RFPKPPNITF	PQGTLLDKSS	RFCQGRPSSC
210	220	230	240	250
STRNFWFRPA	DYNQCLQISN	LSSTA EWVLL	DQTRNSLFWE	NKTKGANQSQ
260	270	280	290	300
TPCVQVLAM	TIATSYLGIS	AVSEFFGTSL	TPLFHFHIST	CLKTQGA FYI
310	320	330	340	350
CGQSIHQCLP	SNWTGTCTIG	YVTPDIFIAP	GNLSLPIPIY	GNSPLPRVRR
360	370	380	390	400
AIHFIPLLAG	LGILAGTGTG	IAGITKASLT	YSQLSKEIAN	NIDTMAKALT
410	420	430	440	450
TMQEQIDSLA	AVVLQ NR RGL	DMLTAAQGGI	CLALDEKCCF	WVNQSGKVQD
460	470	480	490	500
NIRQLLNQAS	SLRERATQGW	LNWEGTWKWF	SWVLPLTGPL	VSLLLLLLFG
510	520	530		
PCLLNLTITQF	VSSRLQAIKL	QTNLSAGRHP	RNIQESPF	

Annexe A: Séquence protéique annotée de la Syncytine-2 (récupérée de la base de données Uniprot (www.uniprot.org/uniprot/P60508)). Les acides aminés asparagine glycosylés sont indiqués en bleu, les deux séquences cystéines qui permettent l'interaction entre les sous-unités SU et TM sont indiquées en gras, la séquence de

clivage par la furine est soulignée par un trait simple. Le peptide fusion est souligné par un trait pointillé et le domaine transmembranaire par un trait double. La séquence en rouge correspond à la possible séquence d'interaction aux sphingolipides..

ANNEXE B

SÉQUENCE PROTÉIQUE ANNOTÉE DE LA PROTÉINE SYNCYTINE-1

10	20	30	40	50
MALPYHIFLF	TVLLPSFTLT	APPPCRCMTS	SSPYQEFLWR	MQRPGNIDAP
60	70	80	90	100
SYRSLSKGTP	TFTAHTHMPR	NCYHSATLCM	HANTHYWTGK	MINPSCPGGL
110	120	130	140	150
GVTVCWTYFT	QTGMSDGGGV	QDQAREKHVK	EVISQLTRVH	GTSSPYKGLD
160	170	180	190	200
LSKLHETLRT	HTRLVSLFNT	TLTGLHEVSA	QNPTNC WICL	PLNFRPYVSI
210	220	230	240	250
PVPEQWNNFS	TEINTTSLV	GPLVSNLEIT	HTSNLTCVKF	SNTTYTTNSQ
260	270	280	290	300
CIRWVTPPTQ	IVCLPSGIFF	VCGTSAYRCL	NGSSESMCFL	SFLVPPMTIY
310	320	330	340	350
TEQDLYSYVI	SKPRNKRVPI	LPFVIGAGVL	<u>GALGTGIGGI</u>	TTSTQFYKYL
360	370	380	390	400
SQELNGDMER	VADSLVTLQD	QLNSLAADV	QNRRLDLLT	AERGCTCLFL
410	420	430	440	450
GECCYYVNQ	SGIVTEKVKE	IRDRIQRAE	ELRNTGPWGL	<u>LSQWMPWILP</u>
460	470	480	490	500
<u>FLGPLAAIIL</u>	<u>LLLEGPCIFN</u>	LLVNFVSSRI	EAVKLQMEPK	MQSKTKI YRR
510	520	530		
PLDRPASPRS	DVNDIKGTPP	EEISAAQ PLL	RPNSAGSS	

Annexe B : Séquence protéique annotée de la Syncytine-1 (récupérée de la base de données Uniprot (www.uniprot.org/uniprot/Q9UQF0)). Les acides aminés asparagine glycosylés sont indiqués en bleu, les deux séquences cystéines qui permettent l'interaction entre les sous-unités SU et TM sont indiquées en gras, la séquence de

clivage par la furine est soulignée par un trait simple. Le peptide fusion est souligné par un trait pointillé et le domaine transmembranaire par un trait double. Les motifs d'interaction avec les protéines ESCRT Tsg101 et Alix et le motif dileucine sont indiqués en rouge et en gras.

BIBLIOGRAPHIE

Aagaard L, Villesen P, Kjeldbjerg AL et Pedersen FS. 2005. The approximately 30-million-year-old ERVPb1 envelope gene is evolutionarily conserved among hominoids and Old World monkeys. *Genomics*, 86 : 685-691.

Aagaard L, Bjerregaard B, Kjeldbjerg AL, Pedersen FS, Larsson LI et Rossi JJ. 2012. Silencing of endogenous envelope genes in human choriocarcinoma cells shows that envPb1 is involved in heterotypic cell fusions. *J Gen Virol*, 93 : 1696-1699.

Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M et Tsuchida K. 2018. UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nat Commun*, 9 : 3936.

Ahmed H, Du SJ et Vasta GR. 2009. Knockdown of a galectin-1-like protein in zebrafish (*Danio rerio*) causes defects in skeletal muscle development. *Glycoconj J*, 26 : 277-283.

Aiko Y, Askew DJ, Aramaki S, Myoga M, Tomonaga C, Hachisuga T, Suga R, Kawamoto T, Tsuji M et Shibata E. 2014. Differential levels of amino acid transporters System L and ASCT2, and the mTOR protein in placenta of preeclampsia and IUGR. *BMC Pregnancy Childbirth*, 14 : 181.

Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS et Chen CC. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, 113 : 1-11.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A et Rak J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10 : 619-624.

Alhabbab R, Blair P, Smyth LA, Ratnasothy K, Peng Q, Moreau A, Lechler R, Elgueta R et Lombardi G. 2018. Galectin-1 is required for the regulatory function of B cells. *Sci Rep*, 8 : 2725.

Allan D et Thomas P. 1981. Ca²⁺-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation. *Biochem J*, 198 : 433-440.

Allan D, Thomas P et Limbrick AR. 1982. Microvesiculation and sphingomyelinase activation in chicken erythrocytes treated with ionophore A23187 and Ca²⁺. *Biochim Biophys Acta*, 693 : 53-67.

Angers M, Uldry M, Kong D, Gimble JM et Jetten AM. 2008. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *Biochem J*, 416 : 347-355.

Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F et Power C. 2006. Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 22 : 1253-1259.

Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG et Power C. 2007. The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J Immunol*, 179 : 1210-1224.

Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K et Power C. 2004. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*, 7 : 1088-1095.

Arnaud F, Caporale M, Varela M, Biek R, Chessa B, Alberti A, Golder M, Mura M, Zhang YP, Yu L, Pereira F, Demartini JC, Leymaster K, Spencer TE et Palmarini M. 2007. A paradigm for virus-host coevolution: sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. *PLoS Pathog*, 3 : e170.

Atay S, Gercel-Taylor C, Suttles J, Mor G et Taylor DD. 2011. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *Am J Reprod Immunol*, 65 : 65-77.

Audiffred JF, De Leo SE, Brown PK, Hale-Donze H et Monroe WT. 2010. Characterization and applications of serum-free induced adhesion in Jurkat suspension cells. *Biotechnol Bioeng*, 106 : 784-793.

Baig S, Lim JY, Fernandis AZ, Wenk MR, Kale A, Su LL, Biswas A, Vasoo S, Shui G et Choolani M. 2013. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, 34 : 436-442.

Baines KJ et Renaud SJ. 2017. Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 145 : 39-88.

Balogh A, Pozsgay J, Matko J, Dong Z, Kim CJ, Varkonyi T, Sammar M, Rigo J, Jr., Meiri H, Romero R, Papp Z et Than NG. 2011. Placental protein 13 (PP13/galectin-13) undergoes lipid raft-associated subcellular redistribution in the syncytiotrophoblast in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 205 : 156 e151-114.

Banfer S, Schneider D, Dewes J, Strauss MT, Freibert SA, Heimerl T, Maier UG, Elsasser HP, Jungmann R et Jacob R. 2018. Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 : E4396-E4405.

Banizs AB, Huang T, Nakamoto RK, Shi W et He J. 2018. Endocytosis Pathways of Endothelial Cell Derived Exosomes. *Mol Pharm*.

Barbeau B et Mesnard JM. 2015. Does chronic infection in retroviruses have a sense? *Trends Microbiol*, 23 : 367-375.

Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC et Lambrecht BN. 2004. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31 : 114-121.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA et Leffler H. 1994a. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269 : 20807-20810.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K et al. 1994b. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, 76 : 597-598.

Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL et Blois SM. 2014. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update*, 20 : 175-193.

Bastida-Ruiz D, Van Hoesen K et Cohen M. 2016. The Dark Side of Cell Fusion. *Int J Mol Sci*, 17.

Batagov AO, Kuznetsov VA et Kurochkin IV. 2011. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics*, 12 Suppl 3 : S18.

Beccaria CG, Amezcua Vesely MC, Fiocca Vernengo F, Gehrau RC, Ramello MC, Tosello Boari J, Gorosito Serran M, Mucci J, Piaggio E, Campetella O, Acosta

Rodriguez EV, Montes CL et Gruppi A. 2018. Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting spontaneous germinal centers formation via IFN-gamma. *Nat Commun*, 9 : 1628.

Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H et Gu C. 2014. *Mfsd2a* is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*, 509 : 507-511.

Benesova M, Trejbalova K, Kovarova D, Vernerova Z, Hron T, Kucerova D et Hejnar J. 2017. DNA hypomethylation and aberrant expression of the human endogenous retrovirus ERVWE1/syncytin-1 in seminomas. *Retrovirology*, 14 : 20.

Benirschke K, Burton GJ et Baergen RN. 2012. Early Development of the Human Placenta. Dans : *Pathology of the Human Placenta*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 41-53.

Benit L, Dessen P et Heidmann T. 2001. Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol*, 75 : 11709-11719.

Benyo DF, Miles TM et Conrad KP. 1997. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 : 1582-1588.

Berger JH, Charron MJ et Silver DL. 2012. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One*, 7 : e50629.

Berkane N, Liere P, Oudinet JP, Hertig A, Lefevre G, Pluchino N, Schumacher M et Chabbert-Buffet N. 2017. From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens. *Endocr Rev*, 38 : 123-144.

Berlitz-Torrent C, Shacklett BL, Erdtmann L, Delamarre L, Bouchaert I, Sonigo P, Dokhelar MC et Benarous R. 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol*, 73 : 1350-1361.

Best S, Le Tissier PR et Stoye JP. 1997. Endogenous retroviruses and the evolution of resistance to retroviral infection. *Trends Microbiol*, 5 : 313-318.

Bhaumik P, St-Pierre G, Milot V, St-Pierre C et Sato S. 2013. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. *J Immunol*, 190 : 630-640.

Biswas S et Ghosh SK. 2008. Gross morphological changes of placentas associated with intrauterine growth restriction of fetuses: a case control study. *Early Hum Dev*, 84 : 357-362.

Bjerregaard B, Holck S, Christensen IJ et Larsson LI. 2006. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci*, 63 : 1906-1911.

Bjerregaard B, Lemmen JG, Petersen MR, Ostrup E, Iversen LH, Almstrup K, Larsson LI et Ziebe S. 2014. Syncytin-1 and its receptor is present in human gametes. *J Assist Reprod Genet*, 31 : 533-539.

Bjerregaard B, Ziolkiewicz I, Schulz A et Larsson LI. 2014. Syncytin-1 in differentiating human myoblasts: relationship to caveolin-3 and myogenin. *Cell Tissue Res*, 357 : 355-362.

Bjorkholm P, Ernst AM, Hacke M, Wieland F, Brugger B et von Heijne G. 2014. Identification of novel sphingolipid-binding motifs in mammalian membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1838 : 2066-2070.

Blaise S, de Parseval N et Heidmann T. 2005. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology*, 2 : 19.

Blaise S, de Parseval N, Benit L et Heidmann T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 : 13013-13018.

Blaise S, Ruggieri A, Dewannieux M, Cosset FL et Heidmann T. 2004. Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *J Virol*, 78 : 1050-1054.

Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G et Hivroz C. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*, 168 : 3235-3241.

Blidner AG et Rabinovich GA. 2013. 'Sweetening' pregnancy: galectins at the fetomaternal interface. *Am J Reprod Immunol*, 69 : 369-382.

Blois SM et Barrientos G. 2014. Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 101-102 : 127-134.

Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA et Arck PC. 2007. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med*, 13 : 1450-1457.

Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B et Mallet F. 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*, 73 : 1175-1185.

Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F et Cosset FL. 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74 : 3321-3329.

Bobkova M, Stitz J, Engelstadter M, Cichutek K et Buchholz CJ. 2002. Identification of R-peptides in envelope proteins of C-type retroviruses. *J Gen Virol*, 83 : 2241-2246.

Bojic-Trbojevic Z, Jovanovic Krivokuca M, Kolundzic N, Petronijevic M, Vrzic-Petronijevic S, Golubovic S et Vicovac L. 2014. Galectin-1 binds mucin in human trophoblast. *Histochem Cell Biol*, 142 : 541-553.

Bojic-Trbojevic Z, Jovanovic Krivokuca M, Stefanoska I, Kolundzic N, Vilotic A, Kadoya T et Vicovac L. 2018. Integrin beta1 is bound to galectin-1 in human trophoblast. *J Biochem*, 163 : 39-50.

Bonner TI, O'Connell C et Cohen M. 1982. Cloned endogenous retroviral sequences from human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 : 4709-4713.

Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE et Gould SJ. 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol*, 172 : 923-935.

Borges M, Bose P, Frank HG, Kaufmann P et Potgens AJ. 2003. A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta*, 24 : 959-964.

Boscher C, Dennis JW et Nabi IR. 2011. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 23 : 383-392.

Bozic M, Petronijevic M, Milenkovic S, Atanackovic J, Lazic J et Vicovac L. 2004. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta*, 25 : 797-802.

Brockhausen I et Stanley P. 2015. O-GalNAc Glycans. Dans : rd, *et al.* éd. *Essentials of Glycobiology*. 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California, Cold Spring Harbor NY, p. 113-123.

Burger O, Pick E, Zwickel J, Klayman M, Meiri H, Slotky R, Mandel S, Rabinovitch L, Paltieli Y, Admon A et Gonen R. 2004. Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta*, 25 : 608-622.

Burton GJ et Jones CJ. 2009. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 48 : 28-37.

Burton GJ et Fowden AL. 2015. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370 : 20140066.

Carabelli J, Quattrocchi V, D'Antuono A, Zamorano P, Tribulatti MV et Campetella O. 2017. Galectin-8 activates dendritic cells and stimulates antigen-specific immune response elicitation. *J Leukoc Biol*, 102 : 1237-1247.

Celma CC, Manrique JM, Affranchino JL, Hunter E et Gonzalez SA. 2001. Domains in the simian immunodeficiency virus gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into particles. *Virology*, 283 : 253-261.

Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, Tal Y, Gibor Y, Meiri H, Cuckle H et Wolf M. 2007. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 197 : 35 e31-37.

Chan J, O'Donoghue K, Gavina M, Torrente Y, Kennea N, Mehmet H, Stewart H, Watt DJ, Morgan JE et Fisk NM. 2006. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells*, 24 : 1879-1891.

Chang C, Chen PT, Chang GD, Huang CJ et Chen H. 2004. Functional characterization of the placental fusogenic membrane protein syncytin. *Biol Reprod*, 71 : 1956-1962.

Chaudoin TR et Bonasera SJ. 2018. Mice lacking galectin-3 (Lgals3) function have decreased home cage movement. *BMC Neurosci*, 19 : 27.

Chen CP, Wang KG, Chen CY, Yu C, Chuang HC et Chen H. 2006. Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia. *BJOG*, 113 : 152-158.

Chen CP, Chen LF, Yang SR, Chen CY, Ko CC, Chang GD et Chen H. 2008. Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biol Reprod*, 79 : 815-823.

Chen Q, Pang PC, Cohen ME, Longtine MS, Schust DJ, Haslam SM, Blois SM, Dell A et Clark GF. 2016. Evidence for Differential Glycosylation of Trophoblast Cell Types. *Mol Cell Proteomics*, 15 : 1857-1866.

Chen Y, Huang Y, Jiang R et Teng Y. 2012. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 119 : 234-238.

Chen Y, Zhou J, Cheng Z, Yang S, Chu H, Fan Y, Li C, Wong BH, Zheng S, Zhu Y, Yu F, Wang Y, Liu X, Gao H, Yu L, Tang L, Cui D, Hao K, Bosse Y, Obeidat M, Brandsma CA, Song YQ, To KK, Sham PC, Yuen KY et Li L. 2015. Functional variants regulating LGALS1 (Galectin 1) expression affect human susceptibility to influenza A(H7N9). *Sci Rep*, 5 : 8517.

Chen YJ, Wang SF, Weng IC, Hong MH, Lo TH, Jan JT, Hsu LC, Chen HY et Liu FT. 2018. Galectin-3 Enhances Avian H5N1 Influenza A Virus-Induced Pulmonary Inflammation by Promoting NLRP3 Inflammasome Activation. *Am J Pathol*, 188 : 1031-1042.

Cheng YH et Handwerger S. 2005. A placenta-specific enhancer of the human syncytin gene. *Biol Reprod*, 73 : 500-509.

Cheyne V, Oriol G et Mallet F. 2006. Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology*, 3 : 41.

Cheyne V, Ruggieri A, Oriol G, Blond JL, Boson B, Vachot L, Verrier B, Cosset FL et Mallet F. 2005. Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol*, 79 : 5585-5593.

Chiang MH, Liang FY, Chen CP, Chang CW, Cheong ML, Wang LJ, Liang CY, Lin FY, Chou CC et Chen H. 2009. Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J Biol Chem*, 284 : 17411-17419.

Cho M et Cummings RD. 1996. Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 35 : 13081-13088.

Chou FC, Chen HY, Kuo CC et Sytwu HK. 2018. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 19.

Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA et Miceli MC. 2000. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol*, 165 : 3722-3729.

Cianciolo GJ, Bogerd HP, Kipnis RJ, Copeland TD, Oroszlan S et Snyderman R. 1985. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *Trans Assoc Am Physicians*, 98 : 30-41.

Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD et Tabi Z. 2011. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol*, 187 : 676-683.

Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD et Tabi Z. 2008. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol*, 180 : 7249-7258.

Coffin JM, Hughes SH et Varmus HE. 1997. Dans : Coffin JM, *et al.* éds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor NY.

Colnot C, Fowles D, Ripoche MA, Bouchaert I et Poirier F. 1998. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn*, 211 : 306-313.

Colombo M, Raposo G et Thery C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 : 255-289.

Contreras FX, Ernst AM, Haberkant P, Bjorkholm P, Lindahl E, Gonen B, Tischer C, Elofsson A, von Heijne G, Thiele C, Pepperkok R, Wieland F et Brugger B. 2012. Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature*, 481 : 525-529.

Cooper DN et Barondes SH. 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*, 9 : 979-984.

Cornelis G, Heidmann O, Bernard-Stoecklin S, Reynaud K, Veron G, Mulot B, Dupressoir A et Heidmann T. 2012. Ancestral capture of syncytin-Car1, a fusogenic

endogenous retroviral envelope gene involved in placentation and conserved in Carnivora. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 : E432-441.

Cornelis G, Funk M, Vernochet C, Leal F, Tarazona OA, Meurice G, Heidmann O, Dupressoir A, Miralles A, Ramirez-Pinilla MP et Heidmann T. 2017. An endogenous retroviral envelope syncytin and its cognate receptor identified in the viviparous placental Mabuya lizard. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 : E10991-E11000.

Cornelis G, Heidmann O, Degrelle SA, Vernochet C, Lavialle C, Letzelter C, Bernard-Stoecklin S, Hassanin A, Mulot B, Guillomot M, Hue I, Heidmann T et Dupressoir A. 2013. Captured retroviral envelope syncytin gene associated with the unique placental structure of higher ruminants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 : E828-837.

Cornelis G, Vernochet C, Malicorne S, Souquere S, Tzika AC, Goodman SM, Catzeflis F, Robinson TJ, Milinkovitch MC, Pierron G, Heidmann O, Dupressoir A et Heidmann T. 2014. Retroviral envelope syncytin capture in an ancestrally diverged mammalian clade for placentation in the primitive Afrotherian tenrecs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 : E4332-4341.

Cornelis G, Vernochet C, Carradec Q, Souquere S, Mulot B, Catzeflis F, Nilsson MA, Menzies BR, Renfree MB, Pierron G, Zeller U, Heidmann O, Dupressoir A et Heidmann T. 2015. Retroviral envelope gene captures and syncytin exaptation for placentation in marsupials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 : E487-496.

Costa J, Gattermann M, Nimtz M, Kandzia S, Glatzel M et Conradt HS. 2018. N-Glycosylation of Extracellular Vesicles from HEK-293 and Glioma Cell Lines. *Anal Chem*, 90 : 7871-7879.

Costa MA. 2016a. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online*, 32 : 14-43.

Costa MA. 2016b. Scrutinising the regulators of syncytialization and their expression in pregnancy-related conditions. *Mol Cell Endocrinol*, 420 : 180-193.

Crawford S, Diamond D, Brustolon L et Penarreta R. 2010. Effect of increased extracellular ca on microvesicle production and tumor spheroid formation. *Cancer Microenviron*, 4 : 93-103.

Croese T et Furlan R. 2018. Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med*, 60 : 52-61.

Cronqvist T, Tannetta D, Morgelin M, Belting M, Sargent I, Familiar M et Hansson SR. 2017. Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles transfer functional placental miRNAs to primary human endothelial cells. *Sci Rep*, 7 : 4558.

Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, Begue D, Krstanovic A, Robert F, Vilbois F, Chevalet L et Antonsson B. 2012. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol*, 161 : 336-348.

Cui L, Wang H, Lu X, Wang R, Zheng R, Li Y, Yang X, Jia WT, Zhao Y, Wang Y, Wang H, Wang YL, Zhu C, Lin HY et Wang H. 2016. Effects of individually silenced N-glycosylation sites and non-synonymous single-nucleotide polymorphisms on the fusogenic function of human syncytin-2. *Cell Adh Migr*, 10 : 39-55.

Cumer T, Pompanon F et Boyer F. 2019. Old origin of a protective endogenous retrovirus (enJSRV) in the Ovis genus. *Heredity (Edinb)*, 122 : 187-194.

Cummings RD et Liu FT. 2009. Galectins. Dans : nd, *et al.* éds. *Essentials of Glycobiology*. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California., Cold Spring Harbor NY.

D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L et Salmon I. 2013. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One*, 8 : e67029.

Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, Zhang SL, Hata T, Nakamura T, Yamauchi A et Hirashima M. 2005. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 175 : 2974-2981.

Dalton AJ. 1975. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *J Natl Cancer Inst*, 54 : 1137-1148.

Dalton P, Christian HC, Redman CW, Sargent IL et Boyd CA. 2007. Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells--implication for placental cell fusion. *FEBS J*, 274 : 2715-2727.

Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, Apetoh L, Chandwaskar R, Lee DH, Cornejo M, Nishi N, Yamauchi A, Quintana FJ, Sobel RA, Hirashima M et Kuchroo VK. 2010. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol*, 185 : 1383-1392.

Daroqui CM, Ilarregui JM, Rubinstein N, Salatino M, Toscano MA, Vazquez P, Bakin A, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E et Rabinovich GA. 2007. Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor beta1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implications for tumor-immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, 56 : 491-499.

Daveloose D, Wolf C, Jeanguillaume C, Leterrier F, Fabre G et Bereziat G. 1981. Inhibitory effect of microvesicles collected from stored blood on platelet aggregation. *Thromb Res*, 22 : 195-201.

de Parseval N et Heidmann T. 1998. Physiological knockout of the envelope gene of the single-copy ERV-3 human endogenous retrovirus in a fraction of the Caucasian population. *J Virol*, 72 : 3442-3445.

de Parseval N et Heidmann T. 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res*, 110 : 318-332.

de Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L et Heidmann T. 2003. Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol*, 77 : 10414-10422.

Denesvre C, Soubieux D, Pin G, Hue D et Dambrine G. 2003. Interference between avian endogenous ev/J 4.1 and exogenous ALV-J retroviral envelopes. *J Gen Virol*, 84 : 3233-3238.

Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C et Geuze HJ. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*, 165 : 1259-1265.

Dewannieux M et Heidmann T. 2013. Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr Opin Virol*, 3 : 646-656.

Dhirapong A, Lleo A, Leung P, Gershwin ME et Liu FT. 2009. The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun Rev*, 8 : 360-363.

Diaz-Carballo D, Acikelli AH, Klein J, Jastrow H, Dammann P, Wyganowski T, Guemues C, Gustmann S, Bardenheuer W, Malak S, Tefett NS, Khosrawipour V, Giger-Pabst U, Tannapfel A et Strumberg D. 2015. Therapeutic potential of antiviral drugs targeting chemorefractory colorectal adenocarcinoma cells overexpressing endogenous retroviral elements. *J Exp Clin Cancer Res*, 34 : 81.

Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Ciotto MC, Rosati G et Sotgiu S. 2002. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology*, 58 : 471-473.

Dong M, Ding G, Zhou J, Wang H, Zhao Y et Huang H. 2008. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem*, 21 : 463-472.

Dube-Delarosbil C et St-Pierre Y. 2018. The emerging role of galectins in high-fatality cancers. *Cell Mol Life Sci*, 75 : 1215-1226.

Duley L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 : 130-137.

Dupressoir A, Lavialle C et Heidmann T. 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*, 33 : 663-671.

Dupressoir A, Marceau G, Vernochet C, Benit L, Kanellopoulos C, Sapin V et Heidmann T. 2005. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 : 725-730.

Dupressoir A, Vernochet C, Bawa O, Harper F, Pierron G, Opolon P et Heidmann T. 2009. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 : 12127-12132.

Dupressoir A, Vernochet C, Harper F, Guegan J, Dessen P, Pierron G et Heidmann T. 2011. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 : E1164-1173.

Durak-Kozica M, Baster Z, Kubat K et Stepien E. 2018. 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett*, 23 : 57.

Earl PL, Doms RW et Moss B. 1992. Multimeric CD4 binding exhibited by human and simian immunodeficiency virus envelope protein dimers. *J Virol*, 66 : 5610-5614.

Eckwahl MJ, Telesnitsky A et Wolin SL. 2016. Host RNA Packaging by Retroviruses: A Newly Synthesized Story. *MBio*, 7 : e02025-02015.

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E et Kloog Y. 2004. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem*, 279 : 34922-34930.

Elola MT, Blidner AG, Ferragut F, Bracalente C et Rabinovich GA. 2015. Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *Biochem J*, 469 : 1-16.

Epand RM. 2000. Membrane fusion. *Biosci Rep*, 20 : 435-441.

Ermini L, Ausman J, Melland-Smith M, Yeganeh B, Rolfo A, Litvack ML, Todros T, Letarte M, Post M et Caniggia I. 2017. A Single Sphingomyelin Species Promotes Exosomal Release of Endoglin into the Maternal Circulation in Preeclampsia. *Sci Rep*, 7 : 12172.

Escrevente C, Keller S, Altevogt P et Costa J. 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11 : 108.

Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F, Acurio J, Aguayo C, Roberts JM, Truong G, Duncombe G, Rice G et Salomon C. 2016. Role of Extracellular Vesicles and microRNAs on Dysfunctional Angiogenesis during Preeclamptic Pregnancies. *Front Physiol*, 7 : 98.

Esnault C, Cornelis G, Heidmann O et Heidmann T. 2013. Differential evolutionary fate of an ancestral primate endogenous retrovirus envelope gene, the EnvV syncytin, captured for a function in placentation. *PLoS Genet*, 9 : e1003400.

Esnault C, Priet S, Ribet D, Vernochet C, Bruls T, Lavialle C, Weissenbach J et Heidmann T. 2008. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 : 17532-17537.

Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C et Sethi T. 2008. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol*, 172 : 395-405.

Fedele C, Singh A, Zerlanko BJ, Iozzo RV et Languino LR. 2015. The alphavbeta6 integrin is transferred intercellularly via exosomes. *J Biol Chem*, 290 : 4545-4551.

Fischer I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H, Markert UR et Jeschke U. 2009. Inhibition of RET and JAK2 signals and upregulation of VEGFR3 phosphorylation in vitro by galectin-1 in trophoblast tumor cells BeWo. *Placenta*, 30 : 1078-1082.

Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Friese K, Walzel H et Jeschke U. 2010. Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta*, 31 : 825-832.

Fischer I, Weber M, Kuhn C, Fitzgerald JS, Schulze S, Friese K, Walzel H, Markert UR et Jeschke U. 2011. Is galectin-1 a trigger for trophoblast cell fusion?: the MAP-kinase pathway and syncytium formation in trophoblast tumour cells BeWo. *Mol Hum Reprod*, 17 : 747-757.

Fisher SJ. 2015. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*, 213 : S115-122.

Fitzgerald W, Gomez-Lopez N, Erez O, Romero R et Margolis L. 2018. Extracellular vesicles generated by placental tissues ex vivo: A transport system for immune mediators and growth factors. *Am J Reprod Immunol*, 80 : e12860.

Fogarty NM, Mayhew TM, Ferguson-Smith AC et Burton GJ. 2011. A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation. *J Anat*, 219 : 601-610.

Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS et High NJ. 2006. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cell Microbiol*, 8 : 44-54.

Fowles D, Colnot C, Ripoché MA et Poirier F. 1995. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn*, 203 : 241-251.

Fox JE, Austin CD, Boyles JK et Steffen PK. 1990. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol*, 111 : 483-493.

Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Herse F, Thijssen VL, Weedon-Fekjaer SM, Schulz H, Wallukat G, Klapp BF, Nevers T, Sharma S, Staff AC, Dechend R et Blois SM. 2013. Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 : 11451-11456.

Frendo JL, Cronier L, Bertin G, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D et Malassine A. 2003a. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci*, 116 : 3413-3421.

Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D et Mallet F. 2003b. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, 23 : 3566-3574.

Frese S, Ruebner M, Suhr F, Konou TM, Tappe KA, Toigo M, Jung HH, Henke C, Steigleder R, Strissel PL, Huebner H, Beckmann MW, van der Keylen P, Schoser B, Schiffer T, Frese L, Bloch W et Strick R. 2015. Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS One*, 10 : e0132099.

Garner OB, Yun T, Pernet O, Aguilar HC, Park A, Bowden TA, Freiberg AN, Lee B et Baum LG. 2015. Timing of galectin-1 exposure differentially modulates Nipah virus entry and syncytium formation in endothelial cells. *J Virol*, 89 : 2520-2529.

Garner OB, Aguilar HC, Fulcher JA, Levroney EL, Harrison R, Wright L, Robinson LR, Aspericueta V, Panico M, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Lee B et Baum LG. 2010. Endothelial galectin-1 binds to specific glycans on nipah virus fusion protein and inhibits maturation, mobility, and function to block syncytia formation. *PLoS Pathog*, 6 : e1000993.

Garson J, Creange A, Dolei A, Ferrante P, Jouvin-Marche E, Marche PN, Rieger F, Ruprecht K, Saresella M, Sotgiu S, Tedder R et Perron H. 2005. MSRV, Syncytin and the role of endogenous retroviral proteins in demyelination. *Mult Scler*, 11 : 249-250.

Gauster M, Siwetz M et Huppertz B. 2009. Fusion of villous trophoblast can be visualized by localizing active caspase 8. *Placenta*, 30 : 547-550.

Gauthier S, Pelletier I, Ouellet M, Vargas A, Tremblay MJ, Sato S et Barbeau B. 2008. Induction of galectin-1 expression by HTLV-I Tax and its impact on HTLV-I infectivity. *Retrovirology*, 5 : 105.

Georgiadis V, Stewart HJ, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, Deltour L, Goldring K, Poirier F et Lawrence-Watt DJ. 2007. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn*, 236 : 1014-1024.

Gerbaud P et Pidoux G. 2015. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta*, 36 Suppl 1 : S35-42.

Gerlach JQ, Kruger A, Gallogly S, Hanley SA, Hogan MC, Ward CJ, Joshi L et Griffin MD. 2013. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One*, 8 : e74801.

Getsios S et MacCalman CD. 2003. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Dev Biol*, 257 : 41-54.

Gimenez J, Montgiraud C, Oriol G, Pichon JP, Ruel K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Frendo JL, Evain-Brion D et Mallet F. 2009. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA Res*, 16 : 195-211.

Gioia L, Siddique A, Head SR, Salomon DR et Su AI. 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, 19 : 334.

Giri PK et Schorey JS. 2008. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 3 : e2461.

Gohner C, Plosch T et Faas MM. 2017. Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, 60 Suppl 1 : S41-S51.

Goldring K, Jones GE, Thiagarajah R et Watt DJ. 2002. The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J Cell Sci*, 115 : 355-366.

Golovkina TV, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, de Olano Vela M et Ross SR. 1997. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J Virol*, 71 : 3895-3903.

Gonen R, Shahar R, Grimpel YI, Chefetz I, Sammar M, Meiri H et Gibor Y. 2008. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: a prospective longitudinal study. *BJOG*, 115 : 1465-1472.

Gonzalez MI, Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Sanjuan NA et Rabinovich GA. 2005. Regulated expression of galectin-1 after in vitro productive infection with herpes simplex virus type 1: implications for T cell apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 18 : 615-623.

Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL et von Dadelszen P. 2006. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 27 : 56-61.

Grandi N et Tramontano E. 2018. HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. *Front Microbiol*, 9 : 462.

Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B et Camussi G. 2011. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 71 : 5346-5356.

Greenwood AD, Ishida Y, O'Brien SP, Roca AL et Eiden MV. 2018. Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 82.

Guarino E, Delli Poggi C, Grieco GE, Cenci V, Ceccarelli E, Crisci I, Sebastiani G et Dotta F. 2018. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus: Updates and Perspectives. *Int J Endocrinol*, 2018 : 6380463.

Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, Zaki MS, Kara M, Ben-Omran T, Akizu N, Rosti RO, Rosti B, Scott E, Schroth J, Copeland B, Vaux KK, Cazenave-Gassiot A, Quek DQ, Wong BH, Tan BC, Wenk MR, Gunel M, Gabriel S, Chi NC, Silver DL et Gleeson JG. 2015. Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet*, 47 : 809-813.

Guo S, Zhu Q, Jiang T, Wang R, Shen Y, Zhu X, Wang Y, Bai F, Ding Q, Zhou X, Chen G et He DY. 2017. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from Chinese Han patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 27 : 441-447.

Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Holzgreve W et Hahn S. 2005. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells. *Placenta*, 26 : 59-66.

Gyorgy B, Szabo TG, Turiak L, Wright M, Herczeg P, Ledeczki Z, Kittel A, Polgar A, Toth K, Derfalvi B, Zelenak G, Borocz I, Carr B, Nagy G, Vekey K, Gay S, Falus A et Buzas EI. 2012. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One*, 7 : e49726.

Harding C, Heuser J et Stahl P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, 97 : 329-339.

Harding CV et Unanue ER. 1990. Low-temperature inhibition of antigen processing and iron uptake from transferrin: deficits in endosome functions at 18 degrees C. *Eur J Immunol*, 20 : 323-329.

Harel T, Quek DQY, Wong BH, Cazenave-Gassiot A, Wenk MR, Fan H, Berger I, Shmueli D, Shaag A, Silver DL, Elpeleg O et Edvardson S. 2018. Homozygous mutation in MFSD2A, encoding a lysolipid transporter for docosahexanoic acid, is associated with microcephaly and hypomyelination. *Neurogenetics*.

Haynes MK, Jackson LG, Tuan RS, Shepley KJ et Smith JB. 1993. Cytokine production in first trimester chorionic villi: detection of mRNAs and protein products in situ. *Cell Immunol*, 151 : 300-308.

Hayward MD, Potgens AJ, Drewlo S, Kaufmann P et Rasko JE. 2007. Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta. *Pathology*, 39 : 406-412.

He M, Jiang M, Zhou Y, Li F, Yang M, Fan Y, Xie Y, Beejadhursing R, Feng L et Deng D. 2018. Impaired Gal-9 Dysregulates the PBMC-Induced Th1/Th2 Imbalance in Abortion-Prone Matings. *J Immunol Res*, 2018 : 9517842.

Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V et Mincheva-Nilsson L. 2009. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol*, 183 : 340-351.

Heidmann O, Vernochet C, Dupressoir A et Heidmann T. 2009. Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology*, 6 : 107.

Heusschen R, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Moschansky P, Munoz-Fernandez R, Leno-Duran E, Klapp BF, Thijssen VL et Blois SM. 2013. Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biol Reprod*, 88 : 22.

Hino S, Tronick SR, Heberling RL, Kalter SS, Hellman A et Aaronson SA. 1977. Endogenous New World primate retrovirus: interspecies antigenic determinants shared with the major structural protein of type-D RNA viruses of Old World monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 : 5734-5738.

Hirabayashi J et Kasai K. 1988. Complete amino acid sequence of a beta-galactoside-binding lectin from human placenta. *J Biochem*, 104 : 1-4.

Hirabayashi J et Kasai K. 1993. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3 : 297-304.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F et Kasai K. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 1572 : 232-254.

Hirashima C, Ohkuchi A, Nagayama S, Suzuki H, Takahashi K, Ogoyama M, Takahashi H, Shirasuna K et Matsubara S. 2018. Galectin-1 as a novel risk factor for both gestational hypertension and preeclampsia, specifically its expression at a low level in the second trimester and a high level after onset. *Hypertens Res*, 41 : 45-52.

Ho MK et Springer TA. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 128 : 1221-1228.

Hobolt-Pedersen AS, Delaisse JM et Soe K. 2014. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int*, 95 : 73-82.

Hoegh AM, Tannetta D, Sargent I, Borup R, Nielsen FC, Redman C, Sorensen S et Hviid TV. 2006. Effect of syncytiotrophoblast microvillous membrane treatment on gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *BJOG*, 113 : 1270-1279.

Holder BS, Tower CL, Jones CJ, Aplin JD et Abrahams VM. 2012a. Heightened pro-inflammatory effect of preeclamptic placental microvesicles on peripheral blood immune cells in humans. *Biol Reprod*, 86 : 103.

Holder BS, Tower CL, Forbes K, Mulla MJ, Aplin JD et Abrahams VM. 2012b. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*, 136 : 184-191.

Holst S, Belo AI, Giovannetti E, van Die I et Wuhrer M. 2017. Profiling of different pancreatic cancer cells used as models for metastatic behaviour shows large variation in their N-glycosylation. *Sci Rep*, 7 : 16623.

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J et Lyden D. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527 : 329-335.

Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, Jin YT, Hong TM et Chen YL. 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene*, 27 : 3746-3753.

Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC et Liu FT. 1996. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol*, 148 : 1661-1670.

Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P et Li X. 2007. Proteomic analysis of hypoxia-induced responses in the syncytialization of human placental cell line BeWo. *Placenta*, 28 : 399-407.

Hua Y, Wang J, Yuan DL, Qi Y, Tang Z, Zhu X et Jiang SW. 2018. A tag SNP in syncytin-2 3-UTR significantly correlates with the risk of severe preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 483 : 265-270.

Huang Q, Li J, Wang F, Oliver MT, Tipton T, Gao Y et Jiang SW. 2013. Syncytin-1 modulates placental trophoblast cell proliferation by promoting G1/S transition. *Cell Signal*, 25 : 1027-1035.

Huang Q, Chen H, Li J, Oliver M, Ma X, Byck D, Gao Y et Jiang SW. 2014a. Epigenetic and non-epigenetic regulation of syncytin-1 expression in human placenta and cancer tissues. *Cell Signal*, 26 : 648-656.

Huang Q, Chen H, Wang F, Brost BC, Li J, Gao Y, Li Z, Gao Y et Jiang SW. 2014b. Reduced syncytin-1 expression in choriocarcinoma BeWo cells activates the calpain1-AIF-mediated apoptosis, implication for preeclampsia. *Cell Mol Life Sci*, 71 : 3151-3164.

Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G et Rivoltini L. 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128 : 1796-1804.

Huebner AR, Cheng L, Somparn P, Knepper MA, Fenton RA et Pisitkun T. 2016. Deubiquitylation of Protein Cargo Is Not an Essential Step in Exosome Formation. *Mol Cell Proteomics*, 15 : 1556-1571.

Hughes RC. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1473 : 172-185.

Hummel J, Kammerer U, Muller N, Avota E et Schneider-Schaulies S. 2015. Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic cells to suppress T-cell activation. *Eur J Immunol*, 45 : 1748-1759.

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D et Marsh CB. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3 : e3694.

Huppertz B et Gauster M. 2011. Trophoblast fusion. *Adv Exp Med Biol*, 713 : 81-95.

Hutter S, Morales-Prieto DM, Andergassen U, Tschakert L, Kuhn C, Hofmann S, Markert UR et Jeschke U. 2016. Gal-1 silenced trophoblast tumor cells (BeWo) show decreased syncytium formation and different miRNA production compared to non-target silenced BeWo cells. *Cell Adh Migr*, 10 : 28-38.

Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Bedini R, Pecci R, Bartolazzi A, Amadio B, Pesce C, Pugliese G et Menini S. 2018. Galectin-3 is essential for proper bone cell differentiation and activity, bone remodeling and biomechanical competence in mice. *Metabolism*, 83 : 149-158.

Imakawa K, Nakagawa S et Miyazawa T. 2015. Baton pass hypothesis: successive incorporation of unconserved endogenous retroviral genes for placentation during mammalian evolution. *Genes Cells*, 20 : 771-788.

Jebbink J, Wolters A, Fernando F, Afink G, van der Post J et Ris-Stalpers C. 2012. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome - a review. *Biochim Biophys Acta*, 1822 : 1960-1969.

Jensen H, Potempa M, Gotthardt D et Lanier LL. 2017. Cutting Edge: IL-2-Induced Expression of the Amino Acid Transporters SLC1A5 and CD98 Is a Prerequisite for NKG2D-Mediated Activation of Human NK Cells. *J Immunol*, 199 : 1967-1972.

Jeschke U, Reimer T, Bergemann C, Wiest I, Schulze S, Friese K et Walzel H. 2004. Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1. *Histochem Cell Biol*, 121 : 501-508.

Jeschke U, Karsten U, Wiest I, Schulze S, Kuhn C, Friese K et Walzel H. 2006. Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody. *Histochem Cell Biol*, 126 : 437-444.

Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K et Walzel H. 2007. Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta*, 28 : 1165-1173.

Jeschke U, Hutter S, Heublein S, Vrekoussis T, Andergassen U, Unverdorben L, Papadakis G et Makrigiannakis A. 2013. Expression and function of galectins in the endometrium and at the human feto-maternal interface. *Placenta*, 34 : 863-872.

Johannes L, Jacob R et Leffler H. 2018. Galectins at a glance. *J Cell Sci*, 131.

Johnstone RM, Mathew A, Mason AB et Teng K. 1991. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol*, 147 : 27-36.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L et Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262 : 9412-9420.

Jouve N, Despoix N, Espeli M, Gauthier L, Cypowyj S, Fallague K, Schiff C, Dignat-George F, Vely F et Leroyer AS. 2013. The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. *J Biol Chem*, 288 : 2571-2579.

Kambe S, Yoshitake H, Yuge K, Ishida Y, Ali MM, Takizawa T, Kuwata T, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M, Takeshita T, Saito S et Takizawa T. 2014. Human exosomal

placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells. *Biol Reprod*, 91 : 129.

Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T et Tanizawa O. 1990. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 11 : 205-213.

Kanai Y, Clemençon B, Simonin A, Leuenberger M, Lochner M, Weisstanner M et Hediger MA. 2013. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med*, 34 : 108-120.

Keith JC, Jr., Pijnenborg R et Van Assche FA. 2002. Placental syncytin expression in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 187 : 1122-1123; author reply 1123-1124.

Khalil A, Cowans NJ, Spencer K, Goichman S, Meiri H et Harrington K. 2009. First trimester maternal serum placental protein 13 for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk. *Prenat Diagn*, 29 : 781-789.

Khan AS, Bodem J, Buseyne F, Gessain A, Johnson W, Kuhn JH, Kuzmak J, Lindemann D, Linial ML, Lochelt M, Materniak-Kornas M, Soares MA et Switzer WM. 2018. Spumaretroviruses: Updated taxonomy and nomenclature. *Virology*, 516 : 158-164.

Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC, Park KS, Choi EJ, Kim KP, Desiderio DM, Kim YK, Lotvall J, Hwang D et Ghossein YS. 2013. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2.

Kirschman J, Qi M, Ding L, Hammonds J, Dienger-Stambaugh K, Wang JJ, Lapierre LA, Goldenring JR et Spearman P. 2018. HIV-1 Envelope Glycoprotein Trafficking through the Endosomal Recycling Compartment Is Required for Particle Incorporation. *J Virol*, 92.

Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM et Strauss JF, 3rd. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118 : 1567-1582.

Kliman HJ, Sammar M, Grimpel YI, Lynch SK, Milano KM, Pick E, Bejar J, Arad A, Lee JJ, Meiri H et Gonen R. 2012. Placental protein 13 and decidual zones of necrosis: an immunologic diversion that may be linked to preeclampsia. *Reprod Sci*, 19 : 16-30.

Knerr I, Beinder E et Rascher W. 2002. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 186 : 210-213.

Knerr I, Soder S, Licha E, Aigner T et Rascher W. 2008. Response of HEK293 and CHO cells overexpressing fusigenic syncytin-1 to mitochondrion-mediated apoptosis induced by antimycin A. *J Cell Biochem*, 105 : 766-775.

Knerr I, Weigel C, Linnemann K, Dotsch J, Meissner U, Fusch C et Rascher W. 2003. Transcriptional effects of hypoxia on fusigenic syncytin and its receptor ASCT2 in human cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol*, 189 : 583-588.

Knerr I, Schnare M, Hermann K, Kausler S, Lehner M, Vogler T, Rascher W et Meissner U. 2007. Fusigenic endogenous-retroviral syncytin-1 exerts anti-apoptotic functions in staurosporine-challenged CHO cells. *Apoptosis*, 12 : 37-43.

Knight M, Redman CW, Linton EA et Sargent IL. 1998. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 105 : 632-640.

Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Kovacevic T, Stefanoska I, Kadoya T et Vicovac L. 2011. Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery--a functional study in vitro. *PLoS One*, 6 : e28514.

Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL et Strominger JL. 2008. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 : 18472-18477.

Kowal J, Tkach M et Thery C. 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 29 : 116-125.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M et Thery C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 : E968-977.

Kozak CA. 2014. Origins of the endogenous and infectious laboratory mouse gammaretroviruses. *Viruses*, 7 : 1-26.

Krafft C, Wilhelm K, Eremin A, Nestel S, von Bubnoff N, Schultze-Seemann W, Popp J et Nazarenko I. 2017. A specific spectral signature of serum and plasma-derived extracellular vesicles for cancer screening. *Nanomedicine*, 13 : 835-841.

Kudo Y et Boyd CA. 2002. Changes in expression and function of syncytin and its receptor, amino acid transport system B(0) (ASCT2), in human placental choriocarcinoma BeWo cells during syncytialization. *Placenta*, 23 : 536-541.

Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL et Redman CW. 2003. Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta*, 1638 : 63-71.

Kulkarni R et Prasad A. 2017. Exosomes Derived from HIV-1 Infected DCs Mediate Viral trans-Infection via Fibronectin and Galectin-3. *Sci Rep*, 7 : 14787.

Lai CP, Mardini O, Ericsson M, Prabhakar S, Maguire C, Chen JW, Tannous BA et Breakefield XO. 2014. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano*, 8 : 483-494.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chisoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S,

Chen YJ et Szustakowki J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 : 860-921.

Langbein M, Strick R, Strissel PL, Vogt N, Parsch H, Beckmann MW et Schild RL. 2008. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev*, 75 : 175-183.

Lange F, Brandt B, Tiedge M, Jonas L, Jeschke U, Pohland R et Walzel H. 2009. Galectin-1 induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway: evidence for a connection between death-receptor and mitochondrial pathways in human Jurkat T lymphocytes. *Histochem Cell Biol*, 132 : 211-223.

Larsen JM, Christensen IJ, Nielsen HJ, Hansen U, Bjerregaard B, Talts JF et Larsson LI. 2009. Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: potential prognostic impact. *Cancer Lett*, 280 : 44-49.

Larsson LI, Holck S et Christensen IJ. 2007. Prognostic role of syncytin expression in breast cancer. *Hum Pathol*, 38 : 726-731.

Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N et Ruprecht K. 2009. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology*, 6 : 37.

Lavialle C, Cornelis G, Dupressoir A, Esnault C, Heidmann O, Vernochet C et Heidmann T. 2013. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368 : 20120507.

Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL et Kabat D. 2002. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol*, 76 : 6442-6452.

Le Bellego F, Vaillancourt C et Lafond J. 2009. Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake. *Methods Mol Biol*, 550 : 73-87.

Le Roy C et Wrana JL. 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 : 112-126.

Lee SM, Romero R, Lee YJ, Park IS, Park CW et Yoon BH. 2012. Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 207 : 337 e331-338.

Lee VH, Lee AB, Phillips EB, Roberts JK et Weitlauf HM. 1998. Spatio-temporal pattern for expression of galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol Reprod*, 58 : 1277-1282.

Lee X, Keith JC, Jr., Stumm N, Moutsatsos I, McCoy JM, Crum CP, Genest D, Chin D, Ehrenfels C, Pijnenborg R, van Assche FA et Mi S. 2001. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*, 22 : 808-812.

Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, Krogan NJ, Plemenitas A et Peterlin BM. 2010. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. *Traffic*, 11 : 110-122.

Levroney EL, Aguilar HC, Fulcher JA, Kohatsu L, Pace KE, Pang M, Gurney KB, Baum LG et Lee B. 2005. Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 175 : 413-420.

Levy JA. 1986. The multifaceted retrovirus. *Cancer Res*, 46 : 5457-5468.

Li J, Li FF, Zuo W, Zhou Y, Hao HY, Dang J, Jiang M, He MZ et Deng DR. 2014a. Up-regulated expression of Tim-3/Gal-9 at maternal-fetal interface in pregnant woman with recurrent spontaneous abortion. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 34 : 586-590.

Li SW, Yang TC, Lai CC, Huang SH, Liao JM, Wan L, Lin YJ et Lin CW. 2014b. Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3 up-regulation. *Eur J Pharmacol*, 738 : 125-132.

Liang CY, Wang LJ, Chen CP, Chen LF, Chen YH et Chen H. 2010. GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta. *Biol Reprod*, 83 : 387-395.

Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H et Dong M. 2011. Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS*, 119 : 597-604.

Liu FT et Rabinovich GA. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5 : 29-41.

Liu S, Diao L, Huang C, Li Y, Zeng Y et Kwak-Kim JYH. 2017. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 124 : 44-53.

Lok CA, Boing AN, Sargent IL, Sooranna SR, van der Post JA, Nieuwland R et Sturk A. 2008. Circulating platelet-derived and placenta-derived microparticles expose Flt-1 in preeclampsia. *Reprod Sci*, 15 : 1002-1010.

Lokossou AG, Toudic C et Barbeau B. 2014. Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses*, 6 : 4609-4627.

Lokossou AG, Toudic C, Nguyen PT, Elisseeff X, Vargas A, Rassart E, Lafond J, Leduc L, Bourgault S, Gilbert C, Scorza T, Tolosa JM et al and Barbeau B. accepted. Endogenous retrovirus-encoded Syncytin-2 contributes to exosome-mediated immunosuppression of T cells. *Biology of reproduction*.

Long B, Yu Z, Zhou H, Ma Z, Ren Y, Zhan H, Li L, Cao H et al Jiao Z. 2018. Clinical characteristics and prognostic significance of galectins for patients with gastric cancer: A meta-analysis. *Int J Surg*, 56 : 242-249.

Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, Wu WW, Shen RF, Daniels MP et al Levine SJ. 2009. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 378 : 433-438.

Lu Q, Li J, Senkowski C, Tang Z, Wang J, Huang T, Wang X, Terry K, Brower S, Glasgow W, Chen H et al Jiang SW. 2015. Promoter Hypermethylation and Decreased Expression of Syncytin-1 in Pancreatic Adenocarcinomas. *PLoS One*, 10 : e0134412.

Lu X, Wang R, Zhu C, Wang H, Lin HY, Gu Y, Cross JC et al Wang H. 2017. Fine-Tuned and Cell-Cycle-Restricted Expression of Fusogenic Protein Syncytin-2 Maintains Functional Placental Syncytia. *Cell Rep*, 21 : 1150-1159.

Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A, Ohkuchi A, Matsubara S, Takeshita T et al Takizawa T. 2009. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod*, 81 : 717-729.

Maas SLN, Breakefield XO et al Weaver AM. 2017. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*, 27 : 172-188.

Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V et al Schlondorff D. 2000. Transfer of the chemokine receptor

CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*, 6 : 769-775.

Mailler E, Bernacchi S, Marquet R, Paillart JC, Vivet-Boudou V et Smyth RP. 2016. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. *Viruses*, 8.

Malassine A, Blaise S, Handschuh K, Lalucque H, Dupressoir A, Evain-Brion D et Heidmann T. 2007. Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta*, 28 : 185-191.

Malassine A, Handschuh K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Cheynet V, Oriol G, Mallet F et Evain-Brion D. 2005. Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta*, 26 : 556-562.

Malassine A, Frendo JL, Blaise S, Handschuh K, Gerbaud P, Tsatsaris V, Heidmann T et Evain-Brion D. 2008. Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology*, 5 : 6.

Mallet F, Bouton O, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, Lucotte G, Duret L et Mandrand B. 2004. The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 : 1731-1736.

Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S, Serra C et Dolei A. 2009. Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods*, 161 : 98-106.

Mangeney M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, Richaud A, Ducos B et Heidmann T. 2007. Placental syncytins: Genetic disjunction

between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 : 20534-20539.

Maquoi E, van den Brule FA, Castronovo V et Foidart JM. 1997. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta*, 18 : 433-439.

Marin M, Tailor CS, Nouri A et Kabat D. 2000. Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus. *J Virol*, 74 : 8085-8093.

Marin M, Lavillette D, Kelly SM et Kabat D. 2003. N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *J Virol*, 77 : 2936-2945.

Markowska AI, Jefferies KC et Panjwani N. 2011. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 286 : 29913-29921.

Martens S et McMahon HT. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 : 543-556.

Martin MA, Bryan T, Rasheed S et Khan AS. 1981. Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 : 4892-4896.

Mathivanan S, Ji H et Simpson RJ. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73 : 1907-1920.

Matouskova M, Blazkova J, Pajer P, Pavlicek A et Hejnar J. 2006. CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Exp Cell Res*, 312 : 1011-1020.

Mayer J, Blomberg J et Seal RL. 2011. A revised nomenclature for transcribed human endogenous retroviral loci. *Mob DNA*, 2 : 7.

Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A et Bresalier RS. 2000. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem*, 275 : 36311-36315.

Meckes DG, Jr. et Raab-Traub N. 2011. Microvesicles and viral infection. *J Virol*, 85 : 12844-12854.

Menck K, Bleckmann A, Schulz M, Ries L et Binder C. 2017. Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. *J Vis Exp*.

Menendez L, Benigno BB et McDonald JF. 2004. L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Mol Cancer*, 3 : 12.

Menkhorst E, Koga K, Van Sinderen M et Dimitriadis E. 2014a. Galectin-7 serum levels are altered prior to the onset of pre-eclampsia. *Placenta*, 35 : 281-285.

Menkhorst EM, Gamage T, Cuman C, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S et Dimitriadis E. 2014b. Galectin-7 acts as an adhesion molecule during implantation and increased expression is associated with miscarriage. *Placenta*, 35 : 195-201.

Mercier S, St-Pierre C, Pelletier I, Ouellet M, Tremblay MJ et Sato S. 2008. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. *Virology*, 371 : 121-129.

Messerli M, May K, Hansson SR, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S et Rusterholz C. 2010. Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta*, 31 : 106-112.

Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, Jr. et McCoy JM. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403 : 785-789.

Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, Farkas B, Tamas P, Bodis J, Szekeres-Bartho J, Illes Z et Szereday L. 2013. Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PLoS One*, 8 : e71811.

Mincheva-Nilsson L et Baranov V. 2014. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol*, 72 : 440-457.

Mo H, Ouyang D, Xu L, Gao Q et He X. 2013. Human endogenous retroviral syncytin exerts inhibitory effect on invasive phenotype of B16F10 melanoma cells. *Chin J Cancer Res*, 25 : 556-564.

Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH et de Bono DP. 1999. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res*, 36 : 47-58.

Moller AM, Delaisse JM et Soe K. 2017. Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity. *J Cell Physiol*, 232 : 1396-1403.

Molvarec A, Blois SM, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vasarhelyi B, Rigo J, Jr. et Saito S. 2011. Peripheral blood galectin-1-

expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol*, 139 : 48-56.

Moreno-Gonzalo O, Fernandez-Delgado I et Sanchez-Madrid F. 2018. Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting. *Cell Mol Life Sci*, 75 : 1-19.

Mori M, Bogdan A, Balassa T, Csabai T et Szekeres-Bartho J. 2016. The decidua—the maternal bed embracing the embryo—maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, 38 : 635-649.

Moritake H, Obara M, Saito Y, Kashimada A, Takagi M, Funakoshi-Tago M, Fukuyama T, Yoshioka M, Inoue A, Komatsu H, Nishitoh H, Kataoka H et Nuno H. 2017. A mouse model reveals that Mfsd2a is critical for unfolded protein response upon exposure to tunicamycin. *Hum Cell*, 30 : 88-97.

Muir A, Lever AM et Moffett A. 2006. Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *J Gen Virol*, 87 : 2067-2071.

Mulcahy LA, Pink RC et Carter DR. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 3.

Murakami T, Yamamoto CM, Akino T, Tanaka H, Fukuzawa N, Suzuki H, Osawa T, Tsuji T, Seki T et Harada H. 2018. Bladder cancer detection by urinary extracellular vesicle mRNA analysis. *Oncotarget*, 9 : 32810-32821.

Myatt L et Roberts JM. 2015. Preeclampsia: Syndrome or Disease? *Curr Hypertens Rep*, 17 : 83.

Nakahara S et Raz A. 2006. On the role of galectins in signal transduction. *Methods Enzymol*, 417 : 273-289.

Nakaya M, Xiao Y, Zhou X, Chang JH, Chang M, Cheng X, Blonska M, Lin X et Sun SC. 2014. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. *Immunity*, 40 : 692-705.

Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL et Silver DL. 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*, 509 : 503-506.

Noda M, Kurihara M et Takano T. 1982. Retrovirus-related sequences in human DNA: detection and cloning of sequences which hybridize with the long terminal repeat of baboon endogenous virus. *Nucleic Acids Res*, 10 : 2865-2878.

Noorali S, Rotar IC, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A et Bagasra O. 2009. Role of HERV-W syncytin-1 in placentation and maintenance of human pregnancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17 : 319-328.

O'Brien SJ, Bonner TI, Cohen M, O'Connell C et Nash WG. 1983. Mapping of an endogenous retroviral sequence to human chromosome 18. *Nature*, 303 : 74-77.

O'Connell C, O'Brien S, Nash WG et Cohen M. 1984. ERV3, a full-length human endogenous provirus: chromosomal localization and evolutionary relationships. *Virology*, 138 : 225-235.

Obermann J, Priglinger CS, Merl-Pham J, Geerlof A, Priglinger S, Gotz M et Hauck SM. 2017. Proteome-wide Identification of Glycosylation-dependent Interactors of Galectin-1 and Galectin-3 on Mesenchymal Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells. *Mol Cell Proteomics*, 16 : 1528-1546.

Oliveira-de-Abreu E, Silva-Dos-Santos D, Lepletier A, Ramos TDP, Ferreira-Reis R, Vasconcelos-Fontes L, Ramos MT, Torres RC, Cotta-de-Almeida V, Carvalho VF et Villa-Verde DMS. 2018. Lack of Galectin-3 Disrupts Thymus Homeostasis in Association to Increase of Local and Systemic Glucocorticoid Levels and Steroidogenic Machinery. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9 : 365.

Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Herrmann J, Groten T, Schleussner E, Markert UR et Morales-Prieto DM. 2016. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Transl Res*, 172 : 61-72.

Ouellet M, Mercier S, Pelletier I, Bounou S, Roy J, Hirabayashi J, Sato S et Tremblay MJ. 2005. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol*, 174 : 4120-4126.

Ouyang Y, Bayer A, Chu T, Tyurin VA, Kagan VE, Morelli AE, Coyne CB et Sadovsky Y. 2016. Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta*, 47 : 86-95.

Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J et Titani K. 1995. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology*, 5 : 255-261.

Pan BT et Johnstone RM. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33 : 967-978.

Park AM, Hagiwara S, Hsu DK, Liu FT et Yoshie O. 2016. Galectin-3 Plays an Important Role in Innate Immunity to Gastric Infection by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 84 : 1184-1193.

Paulesu L, King A, Loke YW, Cintorino M, Bellizzi E et Boraschi D. 1991. Immunohistochemical localization of IL-1 alpha and IL-1 beta in normal human placenta. *Lymphokine Cytokine Res*, 10 : 443-448.

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E et Kloog Y. 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, 20 : 7486-7493.

Peleg D, Kennedy CM et Hunter SK. 1998. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician*, 58 : 453-460, 466-457.

Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ et Baum LG. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378 : 736-739.

Pidoux G, Gerbaud P, Gnidehou S, Grynberg M, Geneau G, Guibourdenche J, Carette D, Cronier L, Evain-Brion D, Malassine A et Frenco JL. 2010. ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298 : C1517-1526.

Pillay P, Maharaj N, Moodley J et Mackraj I. 2016. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*, 46 : 18-25.

Piller SC, Dubay JW, Derdeyn CA et Hunter E. 2000. Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. *J Virol*, 74 : 11717-11723.

Platt JL, Zhou X, Lefferts AR et Cascalho M. 2016. Cell Fusion in the War on Cancer: A Perspective on the Inception of Malignancy. *Int J Mol Sci*, 17.

Plitman Mayo R, Olsthoorn J, Charnock-Jones DS, Burton GJ et Oyen ML. 2016. Computational modeling of the structure-function relationship in human placental terminal villi. *J Biomech*, 49 : 3780-3787.

Poirier F et Robertson EJ. 1993. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development*, 119 : 1229-1236.

Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL et Rigby PW. 1992. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development*, 115 : 143-155.

Popa SJ, Stewart SE et Moreau K. 2018. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol*, 83 : 42-50.

Prieto-Sanchez MT, Ruiz-Palacios M, Blanco-Carnero JE, Pagan A, Hellmuth C, Uhl O, Peissner W, Ruiz-Alcaraz AJ, Parrilla JJ, Koletzko B et Larque E. 2017. Placental MFSD2a transporter is related to decreased DHA in cord blood of women with treated gestational diabetes. *Clin Nutr*, 36 : 513-521.

Rabinovich GA et Toscano MA. 2009. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 9 : 338-352.

Rancourt A, Dufresne SS, St-Pierre G, Levesque JC, Nakamura H, Kikuchi Y, Satoh MS, Frenette J et Sato S. 2018. Galectin-3 and N-acetylglucosamine promote myogenesis and improve skeletal muscle function in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J* : fj201701151RRR.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ et Geuze HJ. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183 : 1161-1172.

Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I et Miller AD. 1999. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 : 2129-2134.

Redelsperger F, Cornelis G, Vernochet C, Tennant BC, Catzeflis F, Mulot B, Heidmann O, Heidmann T et Dupressoir A. 2014. Capture of syncytin-Mar1, a fusogenic endogenous retroviral envelope gene involved in placentation in the Rodentia squirrel-related clade. *J Virol*, 88 : 7915-7928.

Redelsperger F, Raddi N, Bacquin A, Vernochet C, Mariot V, Gache V, Blanchard-Gutton N, Charrin S, Tired L, Dumonceaux J, Dupressoir A et Heidmann T. 2016. Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. *PLoS Genet*, 12 : e1006289.

Redman CW et Sargent IL. 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308 : 1592-1594.

Reiling JH, Clish CB, Carette JE, Varadarajan M, Brummelkamp TR et Sabatini DM. 2011. A haploid genetic screen identifies the major facilitator domain containing 2A (MFSD2A) transporter as a key mediator in the response to tunicamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 : 11756-11765.

Rein A, Mirro J, Haynes JG, Ernst SM et Nagashima K. 1994. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *J Virol*, 68 : 1773-1781.

Renard M, Varela PF, Letzelter C, Duquerroy S, Rey FA et Heidmann T. 2005. Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. *J Mol Biol*, 352 : 1029-1034.

Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D, Devraj K, Depboylu C, Landfried B, Arnold B, Plate KH, Hoglinger G, Sultmann H, Altevogt P et Momma S. 2014. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol*, 12 : e1001874.

Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M et Bakardjiev AI. 2010. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog, 6 : e1000732.

Roberts J, August P, Bakris G, Barton J et al. e. 2013. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol, 122 : 1122-1131.

Roff CF et Wang JL. 1983. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. J Biol Chem, 258 : 10657-10663.

Roland CS, Hu J, Ren CE, Chen H, Li J, Varvoutis MS, Leaphart LW, Byck DB, Zhu X et Jiang SW. 2016. Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. Cell Mol Life Sci, 73 : 365-376.

Romaniuk MA, Croci DO, Lapponi MJ, Tribulatti MV, Negrotto S, Poirier F, Campetella O, Rabinovich GA et Schattner M. 2012. Binding of galectin-1 to $\alpha 5 \beta 1$ integrin triggers "outside-in" signals, stimulates platelet activation, and controls primary hemostasis. FASEB J, 26 : 2788-2798.

Romero R, Kusanovic JP, Than NG, Erez O, Gotsch F, Espinoza J, Edwin S, Chafetz I, Gomez R, Nien JK, Sammar M, Pineles B, Hassan SS, Meiri H, Tal Y, Kuhnreich I, Papp Z et Cuckle HS. 2008. First-trimester maternal serum PP13 in the risk assessment for preeclampsia. Am J Obstet Gynecol, 199 : 122 e121-122 e111.

Royo F, Cossio U, Ruiz de Angulo A, Llop J et Falcon-Perez JM. 2019. Modification of the glycosylation of extracellular vesicles alters their biodistribution in mice. Nanoscale, 11 : 1531-1537.

Ruebner M, Strissel PL, Langbein M, Fahlbusch F, Wachter DL, Faschingbauer F, Beckmann MW et Strick R. 2010. Impaired cell fusion and differentiation in placenta

from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes. *J Mol Med (Berl)*, 88 : 1143-1156.

Ruebner M, Langbein M, Strissel PL, Henke C, Schmidt D, Goecke TW, Faschingbauer F, Schild RL, Beckmann MW et Strick R. 2012. Regulation of the human endogenous retroviral Syncytin-1 and cell-cell fusion by the nuclear hormone receptors PPARgamma/RXRalpha in placentogenesis. *J Cell Biochem*, 113 : 2383-2396.

Ruebner M, Strissel PL, Ekici AB, Stiegler E, Dammer U, Goecke TW, Faschingbauer F, Fahlbusch FB, Beckmann MW et Strick R. 2013. Reduced syncytin-1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promoter region. *PLoS One*, 8 : e56145.

Sabapatha A, Gercel-Taylor C et Taylor DD. 2006. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol*, 56 : 345-355.

Saito S, Motoyoshi K, Saito M, Kato Y, Enomoto M, Nishikawa K, Morii T et Ichijo M. 1993. Localization and production of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) in human placental and decidual tissues. *Lymphokine Cytokine Res*, 12 : 101-107.

Sakaguchi M, Arruda-Carvalho M, Kang NH, Imaizumi Y, Poirier F, Okano H et Frankland PW. 2011. Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. *Mol Brain*, 4 : 33.

Salomon C, Yee SW, Mitchell MD et Rice GE. 2014a. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions. *Biomed Res Int*, 2014 : 693157.

Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD et Rice GE. 2013a. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS One*, 8 : e79636.

Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, Kobayashi M, Ashman K, Mitchell M et Rice GE. 2013b. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One*, 8 : e68451.

Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE et Rice GE. 2017. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 102 : 3182-3194.

Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, Illanes SE, Mitchell MD et Rice GE. 2014b. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One*, 9 : e98667.

Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, Illanes SE, Mitchell MD et Rice GE. 2014c. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front Pharmacol*, 5 : 175.

Sampey GC, Saifuddin M, Schwab A, Barclay R, Punya S, Chung MC, Hakami RM, Zadeh MA, Lepene B, Klase ZA, El-Hage N, Young M, Iordanskiy S et Kashanchi F. 2016. Exosomes from HIV-1-infected Cells Stimulate Production of Pro-inflammatory Cytokines through Trans-activating Response (TAR) RNA. *J Biol Chem*, 291 : 1251-1266.

Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE et Salomon C. 2014. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med*, 12 : 204.

Sato S et Hughes RC. 1994. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. *Eur J Immunol*, 24 : 216-221.

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P et Nieminen J. 2009. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol Rev*, 230 : 172-187.

Scalise M, Pochini L, Console L, Losso MA et Indiveri C. 2018. The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology. *Front Cell Dev Biol*, 6 : 96.

Schrier SL, Godin D, Gould RG, Swyryd B, Junga I et Seeger M. 1971. Characterization of microvesicles produced by shearing of human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 233 : 26-36.

Schubert SW, Abendroth A, Kilian K, Vogler T, Mayr B, Knerr I et Hashemolhosseini S. 2008. bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMA/Gcm1 in trophoblast cells. *Nucleic Acids Res*, 36 : 3834-3846.

Schulz H, Kuhn C, Hofmann S, Mayr D, Mahner S, Jeschke U et Schmoeckel E. 2018. Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9. *Int J Mol Sci*, 19.

Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, Salehi LB et Ricci A. 2018. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci*, 19.

Segura MM, Garnier A, Di Falco MR, Whissell G, Meneses-Acosta A, Arcand N et Kamen A. 2008. Identification of host proteins associated with retroviral vector particles by proteomic analysis of highly purified vector preparations. *J Virol*, 82 : 1107-1117.

Seifarth W, Skladny H, Krieg-Schneider F, Reichert A, Hehlmann R et Leib-Mosch C. 1995. Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J Virol*, 69 : 6408-6416.

Sekizawa A, Purwosunu Y, Yoshimura S, Nakamura M, Shimizu H, Okai T, Rizzo N et Farina A. 2009. PP13 mRNA expression in trophoblasts from preeclamptic placentas. *Reprod Sci*, 16 : 408-413.

Sherwin SA et Todaro GJ. 1979. A new endogenous primate type C virus isolated from the Old World monkey *Colobus polykomos*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 : 5041-5045.

Shi X, Huang Y, Wang H, Zheng W et Chen S. 2018. MFSD2A expression predicts better prognosis in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*.

Shukla SD, Berriman J, Coleman R, Finean JB et Michell RH. 1978. Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *FEBS Lett*, 90 : 289-292.

Simner C, Novakovic B, Lillycrop KA, Bell CG, Harvey NC, Cooper C, Saffery R, Lewis RM et Cleal JK. 2017. DNA methylation of amino acid transporter genes in the human placenta. *Placenta*, 60 : 64-73.

Simon D, Derer A, Andes FT, Lezuo P, Bozec A, Schett G, Herrmann M et Harre U. 2017. Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis. *Bone*, 105 : 35-41.

Simpson RJ, Kalra H et Mathivanan S. 2012. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles*, 1.

Singh PP, Smith VL, Karakousis PC et Schorey JS. 2012. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo. *J Immunol*, 189 : 777-785.

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM et Breakefield XO. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10 : 1470-1476.

Skokos D, Le Panse S, Villa I, Rousselle JC, Peronet R, Namane A, David B et Mecheri S. 2001. Nonspecific B and T cell-stimulatory activity mediated by mast cells is associated with exosomes. *Int Arch Allergy Immunol*, 124 : 133-136.

Soe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard B, Larsson LI et Delaisse JM. 2011. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone*, 48 : 837-846.

Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R et Carmen Martinez M. 2012. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 53 : 2159-2170.

Soleymanlou N, Jurisicova A, Wu Y, Chijjiwa M, Ray JE, Detmar J, Todros T, Zamudio S, Post M et Caniggia I. 2007. Hypoxic switch in mitochondrial myeloid cell leukemia factor-1/Mtd apoptotic rheostat contributes to human trophoblast cell death in preeclampsia. *Am J Pathol*, 171 : 496-506.

Soygur B et Moore H. 2016. Expression of Syncytin 1 (HERV-W), in the preimplantation human blastocyst, embryonic stem cells and trophoblast cells derived in vitro. *Hum Reprod*, 31 : 1455-1461.

Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Kuhnreich I et Meiri H. 2007. Second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index and maternal serum PP13 as markers of pre-eclampsia. *Prenat Diagn*, 27 : 258-263.

Spinola M, Falvella FS, Colombo F, Sullivan JP, Shames DS, Girard L, Spessotto P, Minna JD et Dragani TA. 2010. MFSD2A is a novel lung tumor suppressor gene modulating cell cycle and matrix attachment. *Mol Cancer*, 9 : 62.

St-Pierre C, Manya H, Ouellet M, Clark GF, Endo T, Tremblay MJ et Sato S. 2011. Host-soluble galectin-1 promotes HIV-1 replication through a direct interaction with glycans of viral gp120 and host CD4. *J Virol*, 85 : 11742-11751.

Stancic M, van Horssen J, Thijssen VL, Gabius HJ, van der Valk P, Hoekstra D et Baron W. 2011. Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37 : 654-671.

Stanley P, Schachter H et Taniguchi N. 2009. N-Glycans. Dans : nd, *et al.* éds. *Essentials of Glycobiology*. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California., Cold Spring Harbor NY.

Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, Bassil R, Croci DO, Cerliani JP, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury SJ et Rabinovich GA. 2012. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*, 37 : 249-263.

Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ et Pijnenborg R. 2010. Pre-eclampsia. *Lancet*, 376 : 631-644.

Stenqvist AC, Nagaeva O, Baranov V et Mincheva-Nilsson L. 2013. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol*, 191 : 5515-5523.

Stewart SE, Menzies SA, Popa SJ, Savinykh N, Petrunkina Harrison A, Lehner PJ et Moreau K. 2017. A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface. *J Cell Sci*, 130 : 3234-3247.

Stolz M, Zeisler H, Heinzl F, Binder J et Farr A. 2018. An sFlt-1:PlGF ratio of 655 is not a reliable cut-off value for predicting perinatal outcomes in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 11 : 54-60.

Strick R, Ackermann S, Langbein M, Swiatek J, Schubert SW, Hashemolhosseini S, Koscheck T, Fasching PA, Schild RL, Beckmann MW et Strissel PL. 2007. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. *J Mol Med (Berl)*, 85 : 23-38.

Strissel PL, Ruebner M, Thiel F, Wachter D, Ekici AB, Wolf F, Thieme F, Ruprecht K, Beckmann MW et Strick R. 2012. Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets. *Oncotarget*, 3 : 1204-1219.

Stuchell MD, Garrus JE, Muller B, Stray KM, Ghaffarian S, McKinnon R, Krausslich HG, Morham SG et Sundquist WI. 2004. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*, 279 : 36059-36071.

Subra C, Laulagnier K, Perret B et Record M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89 : 205-212.

Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M et Record M. 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*, 51 : 2105-2120.

Sun J, Yang M, Ban Y, Gao W, Song B, Wang Y, Zhang Y, Shao Q, Kong B et Qu X. 2016a. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway. *PLoS One*, 11 : e0147186.

Sun Y, Zhu H, Song J, Jiang Y, Ouyang H, Dong T, Tao R, Fan X et Zhang G. 2017. Expression of Leukocytic Syncytin-1 in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Lab*, 63 : 1567-1574.

Sun Y, Zhu H, Song J, Jiang Y, Ouyang H, Huang R, Zhang G, Fan X, Tao R, Jiang J et Niu H. 2016b. Upregulation of Leukocytic Syncytin-1 in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Med Sci Monit*, 22 : 2392-2403.

Tan SS, Yin Y, Lee T, Lai RC, Yeo RW, Zhang B, Choo A et Lim SK. 2013. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J Extracell Vesicles*, 2.

Taylor DD et Gercel-Taylor C. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110 : 13-21.

Tetsuka K, Takanaga H, Ohtsuki S, Hosoya K et Terasaki T. 2003. The L-isomer-selective transport of aspartic acid is mediated by ASCT2 at the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 87 : 891-901.

Than NG, Sumegi B, Than GN, Berente Z et Bohn H. 1999. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal protein. *Placenta*, 20 : 703-710.

Than NG, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN et Sumegi B. 2004. Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur J Biochem*, 271 : 1065-1078.

Than NG, Erez O, Wildman DE, Tarca AL, Edwin SS, Abbas A, Hotra J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan SS, Espinoza J, Papp Z et Romero R. 2008a. Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 21 : 429-442.

Than NG, Abdul Rahman O, Magenheim R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J, Jr., Romero R et Papp Z. 2008b. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch*, 453 : 387-400.

Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagyi A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z et Wildman DE. 2009. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 : 9731-9736.

Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O et Amigorena S. 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 3 : 1156-1162.

Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G et Amigorena S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*, 147 : 599-610.

Thijssen VL et Griffioen AW. 2014. Galectin-1 and -9 in angiogenesis: a sweet couple. *Glycobiology*, 24 : 915-920.

Thijssen VL, Heusschen R, Caers J et Griffioen AW. 2015. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*, 1855 : 235-247.

Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F et Griffioen AW. 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*, 70 : 6216-6224.

Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F et Griffioen AW. 2006. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 : 15975-15980.

Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP et Xiao ZD. 2013. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol*, 228 : 1487-1495.

Tirado-Gonzalez I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M et Blois SM. 2013. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 19 : 43-53.

Tkach M, Kowal J et Thery C. 2018. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373.

Tkach M, Kowal J, Zucchetti AE, Enserink L, Jouve M, Lankar D, Saitakis M, Martin-Jaular L et Thery C. 2017. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *EMBO J*, 36 : 3012-3028.

Todaro GJ, Sherr CJ, Sen A, King N, Daniel MD et Fleckenstein B. 1978. Endogenous New World primate type C viruses isolated from owl monkey (*Aotus trivirgatus*) kidney cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 : 1004-1008.

Toledo KA, Fermino ML, Andrade Cdel C, Riul TB, Alves RT, Muller VD, Russo RR, Stowell SR, Cummings RD, Aquino VH et Dias-Baruffi M. 2014. Galectin-1 exerts inhibitory effects during DENV-1 infection. *PLoS One*, 9 : e112474.

Tolosa JM, Schjenken JE, Clifton VL, Vargas A, Barbeau B, Lowry P, Maiti K et Smith R. 2012. The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta*, 33 : 933-941.

Tong M, Chen Q, James JL, Stone PR et Chamley LW. 2017. Micro- and Nano-vesicles from First Trimester Human Placentae Carry Flt-1 and Levels Are Increased in Severe Preeclampsia. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8 : 174.

Toufaily C, Lokossou AG, Vargas A, Rassart E et Barbeau B. 2015. A CRE/AP-1-like motif is essential for induced syncytin-2 expression and fusion in human trophoblast-like model. *PLoS One*, 10 : e0121468.

Toufaily C, Vargas A, Lemire M, Lafond J, Rassart E et Barbeau B. 2013. MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion. *Placenta*, 34 : 85-88.

Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr. et Heine U. 1981. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 645 : 63-70.

Trejbálová K, Blázková J, Matoušková M, Kucerová D, Pecnová L, Vernerová Z, Heráček J, Hirsch I et Hejnar J. 2011. Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic Acids Res*, 39 : 8728-8739.

Tribulatti MV, Cattaneo V, Hellman U, Mucci J et Campetella O. 2009. Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 86 : 371-380.

Tristem M. 2000. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J Virol*, 74 : 3715-3730.

Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von

Heijne G, Nielsen J et Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347 : 1260419.

Ungaro F, Tacconi C, Massimino L, Corsetto PA, Correale C, Fonteyne P, Piontini A, Garzarelli V, Calcaterra F, Della Bella S, Spinelli A, Carvello M, Rizzo AM, Vetrano S, Petti L, Fiorino G, Furfaro F, Mavilio D, Maddipati KR, Malesci A, Peyrin-Biroulet L, D'Alessio S et Danese S. 2017. MFSD2A Promotes Endothelial Generation of Inflammation-Resolving Lipid Mediators and Reduces Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 153 : 1363-1377 e1366.

Unverdorben L, Haufe T, Santoso L, Hofmann S, Jeschke U et Hutter S. 2016a. Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *Int J Mol Sci*, 17.

Unverdorben L, Jeschke U, Santoso L, Hofmann S, Kuhn C, Arck P et Hutter S. 2016b. Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells in vitro. *Histol Histopathol*, 31 : 1095-1111.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ et Lotvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9 : 654-659.

van den Brule FA, Price J, Sobel ME, Lambotte R et Castronovo V. 1994. Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates with the invasive phenotype of trophoblastic tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 201 : 388-393.

Vargas A, Thierry M, Lafond J et Barbeau B. 2012. Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts. *Virology*, 425 : 1-10.

Vargas A, Toufaily C, LeBellego F, Rassart E, Lafond J et Barbeau B. 2011. Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reprod Sci*, 18 : 1085-1091.

Vargas A, Zhou S, Ethier-Chiasson M, Flipo D, Lafond J, Gilbert C et Barbeau B. 2014. Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB J*, 28 : 3703-3719.

Vargas A, Moreau J, Landry S, LeBellego F, Toufaily C, Rassart E, Lafond J et Barbeau B. 2009. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol*, 392 : 301-318.

Vasen G, Battistone MA, Croci DO, Brukman NG, Weigel Munoz M, Stupirski JC, Rabinovich GA et Cuasnicu PS. 2015. The galectin-1-glycan axis controls sperm fertilizing capacity by regulating sperm motility and membrane hyperpolarization. *FASEB J*, 29 : 4189-4200.

Vasta GR. 2009. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*, 7 : 424-438.

Vasta GR, Feng C, Gonzalez-Montalban N, Mancini J, Yang L, Abernathy K, Frost G et Palm C. 2017. Functions of galectins as 'self/non-self'-recognition and effector factors. *Pathog Dis*, 75.

Verma SK, Leikina E, Melikov K, Gebert C, Kram V, Young MF, Uygur B et Chernomordik LV. 2018. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J Biol Chem*, 293 : 254-270.

Vernochet C, Heidmann O, Dupressoir A, Cornelis G, Dessen P, Catzeflis F et Heidmann T. 2011. A syncytin-like endogenous retrovirus envelope gene of the guinea pig specifically expressed in the placenta junctional zone and conserved in Caviomorpha. *Placenta*, 32 : 885-892.

Vernochet C, Redelsperger F, Harper F, Souquere S, Catzeflis F, Pierron G, Nevo E, Heidmann T et Dupressoir A. 2014. The captured retroviral envelope syncytin-A and syncytin-B genes are conserved in the Spalacidae together with hemotrichorial placentation. *Biol Reprod*, 91 : 148.

Vicovac L, Jankovic M et Cuperlovic M. 1998. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod*, 13 : 730-735.

Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, Martinez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M et Sanchez-Madrid F. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4 : 2980.

Villesen P, Aagaard L, Wiuf C et Pedersen FS. 2004. Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology*, 1 : 32.

Vinik Y, Shatz-Azoulay H, Hiram-Bab S, Kandel L, Gabet Y, Rivkin G et Zick Y. 2018. Ablation of the mammalian lectin galectin-8 induces bone defects in mice. *FASEB J*, 32 : 2366-2380.

Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F et Paranhos-Baccala G. 1999. Phylogeny of a novel family of human endogenous retrovirus sequences, HERV-W, in humans and other primates. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15 : 1529-1533.

von Dadelszen P, Magee LA et Roberts JM. 2003. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 22 : 143-148.

von Wolff M, Wang X, Gabius HJ et Strowitzki T. 2005. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod*, 11 : 189-194.

Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner EI et Kanwar YS. 1997. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J Clin Invest*, 99 : 2452-2461.

Walton JR, Frey HA, Vandre DD, Kwiek JJ, Ishikawa T, Takizawa T, Robinson JM et Ackerman WEt. 2013. Expression of flotillins in the human placenta: potential implications for placental transcytosis. *Histochem Cell Biol*, 139 : 487-500.

Wang JL, Gray RM, Haudek KC et Patterson RJ. 2004. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*, 1673 : 75-93.

Wang SF, Tsao CH, Lin YT, Hsu DK, Chiang ML, Lo CH, Chien FC, Chen P, Arthur Chen YM, Chen HY et Liu FT. 2014. Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. *Glycobiology*, 24 : 1022-1035.

Wang X, Huang J et Zhu F. 2018. Human Endogenous Retroviral Envelope Protein Syncytin-1 and Inflammatory Abnormalities in Neuropsychological Diseases. *Front Psychiatry*, 9 : 422.

Weinstein L. 1982. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142 : 159-167.

Weiss RA. 2006. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, 3 : 67.

Wich C, Kausler S, Dotsch J, Rascher W et Knerr I. 2009. Syncytin-1 and glial cells missing a: hypoxia-induced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts. *Gynecol Obstet Invest*, 68 : 9-18.

Wolf P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13 : 269-288.

Wong BH, Chan JP, Cazenave-Gassiot A, Poh RW, Foo JC, Galam DL, Ghosh S, Nguyen LN, Barathi VA, Yeo SW, Luu CD, Wenk MR et Silver DL. 2016. *Mfsd2a* Is a Transporter for the Essential omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) in Eye and Is Important for Photoreceptor Cell Development. *J Biol Chem*, 291 : 10501-10514.

Woodward AM, Mauris J et Argueso P. 2013. Binding of transmembrane mucins to galectin-3 limits herpesvirus 1 infection of human corneal keratinocytes. *J Virol*, 87 : 5841-5847.

Xue J, Fu C, Cong Z, Peng L, Peng Z, Chen T, Wang W, Jiang H, Wei Q et Qin C. 2017. Galectin-3 promotes caspase-independent cell death of HIV-1-infected macrophages. *FEBS J*, 284 : 97-113.

Yan TL, Wang M, Xu Z, Huang CM, Zhou XC, Jiang EH, Zhao XP, Song Y, Song K, Shao Z, Liu K et Shang ZJ. 2017. Up-regulation of syncytin-1 contributes to TNF-alpha-enhanced fusion between OSCC and HUVECs partly via Wnt/beta-catenin-dependent pathway. *Sci Rep*, 7 : 40983.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostendorf MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH et De Wever O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4 : 27066.

Yang H, Taylor HS, Lei C, Cheng C et Zhang W. 2011a. Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. *Reprod Sci*, 18 : 1118-1127.

Yang ML, Chen YH, Wang SW, Huang YJ, Leu CH, Yeh NC, Chu CY, Lin CC, Shieh GS, Chen YL, Wang JR, Wang CH, Wu CL et Shiao AL. 2011b. Galectin-1 binds to influenza virus and ameliorates influenza virus pathogenesis. *J Virol*, 85 : 10010-10020.

Yockey LJ et Iwasaki A. 2018. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*, 49 : 397-412.

Yu C, Shen K, Lin M, Chen P, Lin C, Chang GD et Chen H. 2002. GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem*, 277 : 50062-50068.

Yu H, Liu T, Zhao Z, Chen Y, Zeng J, Liu S et Zhu F. 2014. Mutations in 3'-long terminal repeat of HERV-W family in chromosome 7 upregulate syncytin-1 expression in urothelial cell carcinoma of the bladder through interacting with c-Myb. *Oncogene*, 33 : 3947-3958.

Yusuf AM, Kahane A et Ray JG. 2018. First and Second Trimester Serum sFlt-1/PlGF Ratio and Subsequent Preeclampsia: A Systematic Review. *J Obstet Gynaecol Can*, 40 : 618-626.

Zhang W, Cao S, Martin JL, Mueller JD et Mansky LM. 2015. Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys*, 2 : 343-369.

Zhuang XW, Li J, Brost BC, Xia XY, Chen HB, Wang CX et Jiang SW. 2014. Decreased expression and altered methylation of syncytin-1 gene in human placentas associated with preeclampsia. *Curr Pharm Des*, 20 : 1796-1802.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G et Amigorena S. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, 4 : 594-600.