

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DU GÈNE
MURIN DE LA SYNCYTINE-A DANS LE PLACENTA

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

ANTOINE BEAULIEU

DÉCEMBRE 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire 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

Ce travail a été réalisé au département des sciences biologiques de l'Université du Québec À Montréal sous la direction du Dr Benoît Barbeau, membre du centre de recherche BioMed.

Je tiens à remercier sincèrement Benoît de m'avoir offert une place dans son laboratoire et un projet de maîtrise lorsque j'étais encore indécis sur mon avenir après le Baccalauréat. Merci à Julie Lafond pour ses conseils lors du cours de séminaire et merci aussi à Éric Rassart pour ses commentaires lors du congrès BioMed. Des remerciements spéciaux aux laboratoires du Dr Nicolas Pilon de l'UQAM, du Dre Julie Lavoie de l'Université de Montréal-CHUM et du Dre Géraldine Delbès de l'INRS-Institut-Armand-Frappier pour m'avoir fourni des placentas de souris et de rat, sans lesquels mon projet n'aurait jamais pu commencer.

Je tiens à remercier aussi spécialement les membres de mon laboratoire avec lesquels j'ai passé la majorité de mes deux dernières années. Merci d'abord à Melissha Dawe d'avoir posé les premières fondations de ce projet. Un merci particulier à Caroline Toudic pour m'avoir formé et guidé tout au long du projet. Merci à Yong pour ses précieux conseils sur les clonages. Merci aussi à Xavier, Clément, Zhenlong et Maïke pour votre présence et votre aide. Je dédie finalement ce travail à ma famille, qui par leur support, m'a permis de rester motivé durant ces deux années. Un merci particulier à mes parents et mon beau-père, Diane, Pierre et Rémi, pour m'avoir instruit les ressources, la curiosité et la persévérance nécessaire pour me rendre à la maîtrise. Merci à mon frère Jérôme pour l'assistance technique et merci à ma sœur Charlotte dont le cœur d'enfant contagieux nous permet de garder le sourire.

DÉDICACE

The universe has a beginning, but no end. -Infinite.

Stars, too, have their own beginnings, but their own power results in their destruction.

- Finite.

It the wise who are the most foolish. History has shown us this.

The fish in the sea know naught of the land. Were they to possess wisdom, they too would experience decline.

It is more absurd that humans should surpass the speed of light than it is that fish should start living on the land.

This is the story of those who fought against God's final ultimatum.

This is the epigraph of their obsession.

-Okabe Rintaro

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Placenta.....	4
1.2 Les Rétrovirus.....	10
1.3 Morphologie.....	12
1.4 Glycoprotéines d'enveloppe virale.....	12
1.5 Rétrovirus endogène (ERV).....	13
1.6 Les syncytines humaines.....	16
1.7 Présence de syncytines chez d'autres espèces.....	18
1.8 Syncytines chez la souris.....	19
1.9 Rôle des syncytines A et B dans des tissus autres que placentaires.....	24
1.10 Caractérisation des transcrits de syncytine-A et syncytine-B.....	25
1.11 Régulation de la traduction par le 5'UTR.....	27

CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	34
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE	36
3.1 Culture cellulaire.....	36
3.2 Alignement des exons non-codants de la syncytine-A de la souris et prédiction chez le rat.	37
3.3 Extraction des ARN totaux des placentas de souris et de rat.	37
3.4 Détection des exons non-codants de la syncytine-A par RT-PCR.....	38
3.5 5'RACE.....	40
3.6 Clonage des produits de RT-PCR et de 5'RACE dans Pjet1.2/blunt.....	41
3.7 Mutation du vecteur pGL3-Promoter.....	41
3.8 Clonage des exons non-codants de rat et de souris en amont du gène rapporteur luciférase.	42
3.9 Transfection des différentes constructions dans les cellules HEK293T, MCA205 et RAT-1.....	44
3.10 Dosage de l'activité luciférase et beta-galactosidase	45
3.11 Analyse de la présence des exons non-codants de la syncytine-A chez le hamster syrien doré, le campagnol des prairies et la souris sylvestre.....	45
3.12 Analyses RT-qPCR préliminaires.	46
3.13 Tests statistiques.....	47
CHAPITRE IV	
RÉSULTATS	48
4.1 Identification des exons non-codants dans les transcrits de syncytine-A de souris et de rat.....	48
4.1.1 Positionnement théorique des exons non-codants de la syncytine-A dans le génom de la souris et du rat.....	48
4.1.2 Conception des amorces pour l'amplification des exons non-codants de la syncytine-A	49
4.1.3 Amplification RT-PCR de la région 5'UTR des transcrits de syncytine-A chez la souris et le rat.....	50
4.1.4 Analyse des produits RT-PCR.....	52

4.1.5 Amplification de l'extrémité 5' des transcrits de syncytine-A par 5'RACE	54
4.1.6 Analyse de la région 5' des transcrits de la syncytine-A chez le rat et la souris et confirmation des résultats de RT-PCR	55
4.1.7 Positionnement final des exons non-codants de la syncytine-A sur le génome de la souris et du rat.....	61
4.2 Vérification du potentiel de régulation de la traduction des exons non-codants de la syncytine-A	63
4.2.1 Conception des constructions pour les essais luciférase	63
4.2.2 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de la syncytine-A par essais luciférase.....	65
4.3 Vérification de l'effet des exons non-codants sur la stabilité des transcrits de syncytine-A	73
4.4 Conservation des exons non-codants chez les autres membres de la super-famille des <i>Muroidea</i>	74
CHAPITRE V	
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	77
5.1 Confirmation de la présence des exons non-codants chez la souris, le rat et autres membres de la super-famille des <i>Muroidea</i>	77
5.2 Présence d'une boîte TATA conservée chez de multiples espèces et site alternatif d'initiation de transcription.....	81
5.3 Potentiel régulateur de la région 5'UTR des divers transcrits de la syncytine-A .	82
5.4 Présence des exons non-codants dans la région 5'UTR des transcrits de la syncytine-A dans d'autres types cellulaires.	87
5.5 Conclusion	88
BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Comparaison anatomique entre le placenta de souris (A) et le placenta humain (B).....	6
1.2 Comparaison des systèmes d'échange entre le sang maternel et fœtal chez l'humain et chez la souris	7
1.3 Schématisation de trois modèles de barrière placentaire	9
1.4 Cycle de reproduction d'un rétrovirus, le VIH en exemple	11
1.5 Structure d'une glycoprotéine d'enveloppe d'origine virale	13
1.6 Endogénéisation d'un rétrovirus et capture des gènes syncytine dans les espèces mammifères	15
1.7 Phylogénie de l'ordre des <i>Rodentia</i> et les gènes de syncytines.....	21
1.8 Organisation génomique de la syncytine-A et la syncytine-B	26
1.9 Représentation des exons non-codants des ARNm de la syncytine-A et -B obtenus par recherche <i>in silico</i> dans GenBank	27
1.10 Différents mécanismes de contrôle de la traduction par les uORFs	29
1.11 Conditions pouvant affecter l'efficacité d'un uORF à influencer la traduction	30
1.12 Dégradation des ARNm <i>No-Go</i>	32

4.1	Schématisation des exons des transcrits de la syncytine-A	48
4.2	Amplification RT-PCR des exons non-codants de la syncytine-A à partir d'ARN totaux de placenta de souris au jour embryonnaire 12.5	50
4.3	Amplification RT-PCR des exons non-codants de la syncytine-A à partir d'ARN totaux de placenta de rat au jour embryonnaire 12.5	51
4.4	Confirmation de la présence des exons non-traduits de la syncytine-A en plus de leur épissage alternatif chez la souris et le rat obtenue par le séquençage des produits RT-PCR.....	52
4.5	Amplification finale 5'RACE à partir du début de l'exon 7 du transcrit de la syncytine-A de souris.	54
4.6	Amplification finale 5'RACE à partir du début de l'exon 7 du transcrit de la syncytine-A de rat.	54
4.7	Alignement des résultats de séquençage de 5'RACE de souris	56
4.8	Alignement des résultats de séquençage de 5'RACE de souris (vue d'ensemble).	57
4.9	Alignement des résultats de séquençage de 5'RACE de rat.	58
4.10	Alignement des résultats de séquençage de 5'RACE de rat (vue d'ensemble).....	59
4.11	Schématisation des exons du transcrit de la syncytine-A de souris et de rat selon les résultats de RT-PCR et 5'RACE	61
4.12	Schéma des différentes combinaisons d'exons clonés en amont du gène rapporteur luciférase	63

4.13 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de souris du groupe 1 (avec exon 1, 2, 5 et 7).....	65
4.14 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de souris du groupe 3 (site d'initiation alternatif).....	67
4.15 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de rat (transcrits exons 2, 5, 7).....	70
4.16 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de rat (site d'initiation alternatif)	72
4.17 Conservation des exons 2, 5 et 7 non-codants entre différentes espèces	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
Tableau 3.1 : Liste des amorces PCR.....	39
Tableau 3.2 : Amorces utilisées pour chaque construction luciférase.....	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

AV : Villosités ancrées

iCTB : Cytotrophoblaste invasif

vCTB : Cytotrophoblaste villeux

EIAV : *Equine infections anemia virus*

env : *viral envelope gene*

EST : *Expressed sequence tag*

ERV : Rétrovirus endogène

ERVW-1 : *Endogenous retrovirus group W envelope member 1*

FV : Villosités flottantes

gag : *group-specific antigen*

GCM1 : *Glial cells missing homolog 1*

hASCT1/2 : *Human sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1/2*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SpT : Spongiotrophoblaste

SU : Sous-unité de surface

SynT : Syncytiotrophoblastes

SynA/B : Syncytine-A/B

TGC : Cellules trophoblastiques géantes

TIS : *Translation initiation site*

TM : Domaine Transmembranaire

5'UTR : *5' untranslated region*

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C : Degrés Celsius

L : litre

g : gramme

μ : micro

m : milli

n : nano

% : pourcentage

h : heure

RÉSUMÉ

Les syncytines sont des protéines d'origine endorétrovirale ayant notamment un rôle dans la formation du placenta par leur forte propriété fusogénique. Des gènes encodant ces protéines ont été identifiés chez la souris, soit syncytine-A et syncytine-B et existent sous une forme orthologue chez d'autres membres des *Muroidea*. Des études antérieures suggèrent que le gène syncytine-A de souris possède 6 exons non-codants, suivi d'un seul exon codant. L'objectif de cette étude était de confirmer la présence de ces exons dans les transcrits de la syncytine-A chez la souris et le rat, en plus d'évaluer leur implication dans la régulation post-transcriptionnelle. Des RT-PCR sur les ARN de placentas, suivis de 5'RACE, ont démontré que les 6 exons non-codants pour la souris étaient présents dans les transcrits à la suite d'épissages alternatifs. Chez le rat, seulement les exons 2 et 5 ont pu être identifiés. Afin d'évaluer l'influence possible des exons non-codants du gène syncytine-A du rat et de la souris, ces derniers furent clonés en amont du gène luciférase en orientation sens et antisens. Après transfection dans les cellules HEK293T, MCA205 et RAT-1, la disposition des exons non-codants et le type cellulaire ont démontré un impact important sur l'activité luciférase mesurée, avec une tendance générale vers une expression plus marquée lorsque les exons non-traduits sont orientés en position sens (comparativement en position antisens), particulièrement pour les exons de rat. Nos résultats suggèrent donc que les exons non-codants régulent de façon post-transcriptionnelle le gène syncytine-A murin dans le placenta. L'étude de la fonction régulatrice des exons non-codants de la syncytine-A permettra de mieux saisir les mécanismes de régulation de l'expression de ce gène important pour la formation du placenta.

Mots clés: Reproduction, Épissage, Placenta, Syncytine, 5'UTR

INTRODUCTION

La présence d'un placenta est l'une des principales caractéristiques définissant les mammifères euthériens. Cet organe est connu notamment pour son rôle dans le développement de l'embryon jusqu'à la maturité du fœtus avant l'accouchement. En général, le placenta est défini comme une barrière d'échange entre la mère et le fœtus en développement. Ayant un rôle crucial pour le développement adéquat de ce dernier, il est normal que le placenta soit objet d'études sur les maladies ayant une origine prénatale. En effet, malgré le fait que de nombreux nourrissons naissent parfaitement en santé, divers désordres associés à la grossesse et à un défaut de fonctionnement placentaire sont reconnus pour mener à des complications chez le fœtus et la mère. Ces maladies incluent, entre autres, la pré-éclampsie et la paralysie cérébrale (Redline *et al.*, 2007).

Il existe un type de protéines commun aux mammifères placentaires ayant un rôle important dans la formation du placenta, soit les syncytines. Ces protéines d'origine endorétrovirale sont connues pour avoir un rôle dans la formation du syncytiotrophoblaste grâce à leur propriété fusogénique. Il est soupçonné qu'un dérèglement dans l'expression de ces protéines chez l'humain peut causer des problèmes de développement du placenta et par conséquent affecter le bon développement du fœtus (Vargas *et al.*, 2011). Chez la souris et les autres membres de la super-famille *Muroidea*, il existe deux syncytines : la syncytine-A et la syncytine-B (Dupressoir *et al.*, 2005). Ces protéines ont des caractéristiques similaires à leur équivalent chez l'humain, soit la syncytine-1 et la syncytine-2. Une différence majeure entre les syncytines murines et humaines serait la présence d'exons non-

codants qui forment en large partie le 5'UTR (5' *Untranslated region*) des transcrits d'ARNm. Ces derniers ont principalement été identifiés par approche *in silico* et RT-PCR (Dupressoir *et al.*, 2005).

Il est connu que le 5'UTR de divers ARNm peut jouer un certain rôle dans la régulation de l'expression au niveau post-transcriptionnel (Mockenhaupt et Makeyev, 2015). Dès lors, il serait impératif de comprendre le rôle de ces divers exons non-codants dans l'expression des syncytines chez les muridés et plus particulièrement au niveau de la régulation de la syncytine-A. Ainsi, les objectifs de cette étude étaient de :

1. Confirmer la présence de ces exons non-codants et leur épissage alternatif dans les transcrits d'ARNm de la syncytine-A
2. Déterminer leur possible impact sur l'expression de la protéine.
3. Établir la présence de ces exons non codants chez d'autres espèces de *Muroidea*.

Pour ce faire, des expériences RT-PCR et 5'RACE ont été réalisées sur des extraits d'ARN de placentas de souris et de rat, afin d'identifier la présence des exons non-codants. Par la suite, ces exons furent clonés en amont du gène codant pour la luciférase dans un vecteur pGL3-Promoter. Ces constructions ont été transfectées dans des cellules HEK293T, MCA205 et RAT-1 avant de quantifier l'activité luciférase. Des analyses *in silico* de banque de données génétiques et transcriptomiques ont été réalisées afin d'étendre l'étude de la présence des exons non-codants aux autres membres de la super-famille *Muroidea*. Finalement, une tentative d'analyse *in silico* sur la présence d'uORFs et de structures secondaires dans les exons non-codants de la syncytine-A fut réalisée dans le but d'identifier leur possible implication dans la régulation engendrée par les exons non-codants.

Ce projet visait ainsi à approfondir les connaissances sur la régulation de l'expression de la syncytine-A chez les *Muroidea* et par conséquent les mécanismes de régulation génique sous-jacents menant à la formation du placenta chez ces espèces. Un approfondissement des connaissances à ce sujet permettra de mieux connaître ce modèle murin afin d'étudier plus adéquatement certaines maladies humaines obstétriques, telles que la pré-éclampsie.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Placenta

Le placenta est un organe connectant l'embryon (et puis le fœtus) à la paroi utérine de la mère. Cet organe est responsable de l'échange de divers composés permettant le maintien et le développement du fœtus, tels que l'oxygène et divers nutriments. C'est aussi cet organe qui est responsable de l'évacuation des déchets métaboliques de l'embryon, tels que l'urée et le dioxyde de carbone (Marieb et Hoehn, 2010). En plus de ses rôles bien connus dans la nutrition, la respiration et l'évacuation des déchets, il est établi que le placenta possède des fonctions endocrines, immunitaires et d'immunotolérance (Laliberté *et al.*, 1981). Chez les mammifères, le placenta est un organe partagé par tous les thériens, groupe comprenant les euthériens (placentaire) et les métathériens (groupe comprenant principalement les marsupiaux). Alors que le placenta est un organe fort complexe et indispensable à la croissance de l'embryon chez les placentaires, les marsupiaux ne possèdent qu'un placenta primitif, la majorité de la croissance de la larve se passant hors de l'utérus (Campbell et Reece, 2007).

Les placentas murin et humain présentent plusieurs similarités et sont en fait composés de types cellulaires semblables : des cellules trophoblastiques prolifératives, des cellules trophoblastiques invasives ainsi que des cellules trophoblastiques fusionnées, formant ainsi un syncytium nommé syncytiotrophoblaste (Malassiné *et al.*, 2003). Les deux placentas sont de type hémochorial, c'est-à-dire que les capillaires fœtaux sont enrobés de couches de trophoblastes et baignent

directement dans le sang maternel. Ainsi, dans ces deux types de placentas, aucune cellule maternelle ne se retrouve dans la région d'échange entre la mère et le fœtus (Mirbod, 2018).

Il est possible de diviser les placentas murin et humain en trois couches. Chez la souris, on retrouve la decidua maternelle dérivée des cellules stromales utérines. C'est dans cette couche que l'on retrouve les artères acheminant le sang maternel au fœtus. La zone de jonction agit comme deuxième couche où se trouvent les veines maternelles. Finalement, on retrouve le labyrinthe, qui est une large zone hautement ramifiée où ont lieu les échanges entre le sang maternel et fœtal (Figure 1.1).

Chez l'homme, on retrouve des couches analogues. La première couche est une decidua maternelle où se localisent les artères spiralées, suivies de la plaque basale qui est similaire à la zone de jonction murine. Finalement, on retrouve un espace intervilleux, similaire au labyrinthe des muridés, mais avec des villosités moins densément distribuées dans un espace plus ouvert que le labyrinthe murin (Rai, 2015). Alors que l'espace intervilleux humain peut être comparé à une piscine dans laquelle les villosités fœtales y flottant sont ancrées au fond, le labyrinthe murin a une structure s'apparentant à une éponge formée par les villosités fœtales, gorgée par le sang maternel (Figure 1.2).

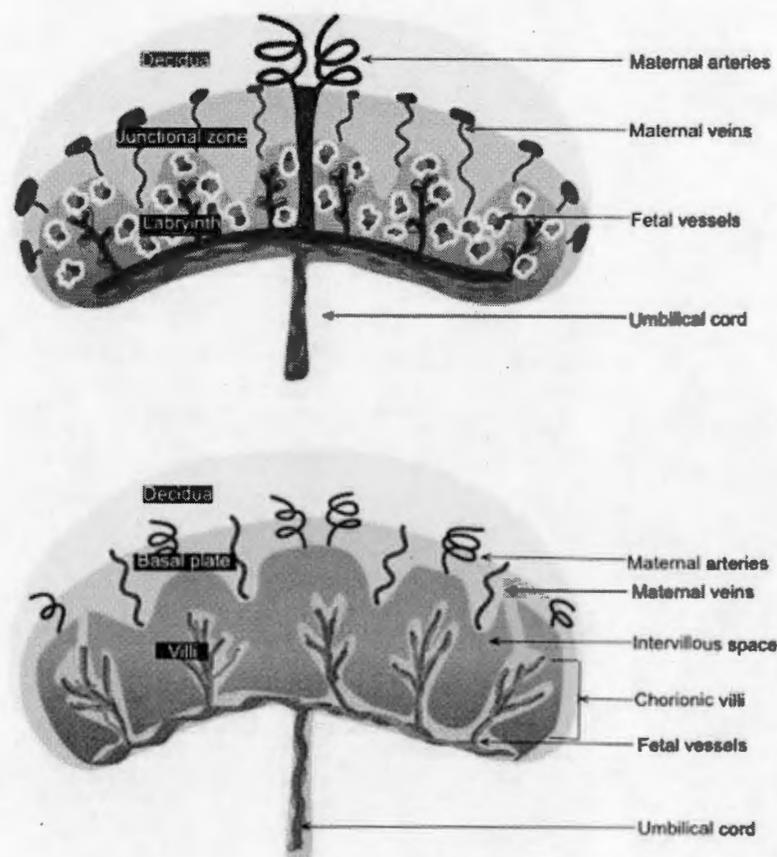


Figure 1.1: Comparaison anatomique entre le placenta de souris (A) et le placenta humain (B) (Rai, 2015). Tous deux possèdent trois couches : la couche extérieure d'origine maternelle est la decidue. La deuxième couche est connue comme étant la couche de jonction ou plaque basale respectivement pour la souris et l'humain. Finalement, la couche interne où se produisent les échanges entre le sang maternel et fœtal se nomme le labyrinthe chez la souris et les villosités de l'espace intervilloux chez l'humain.

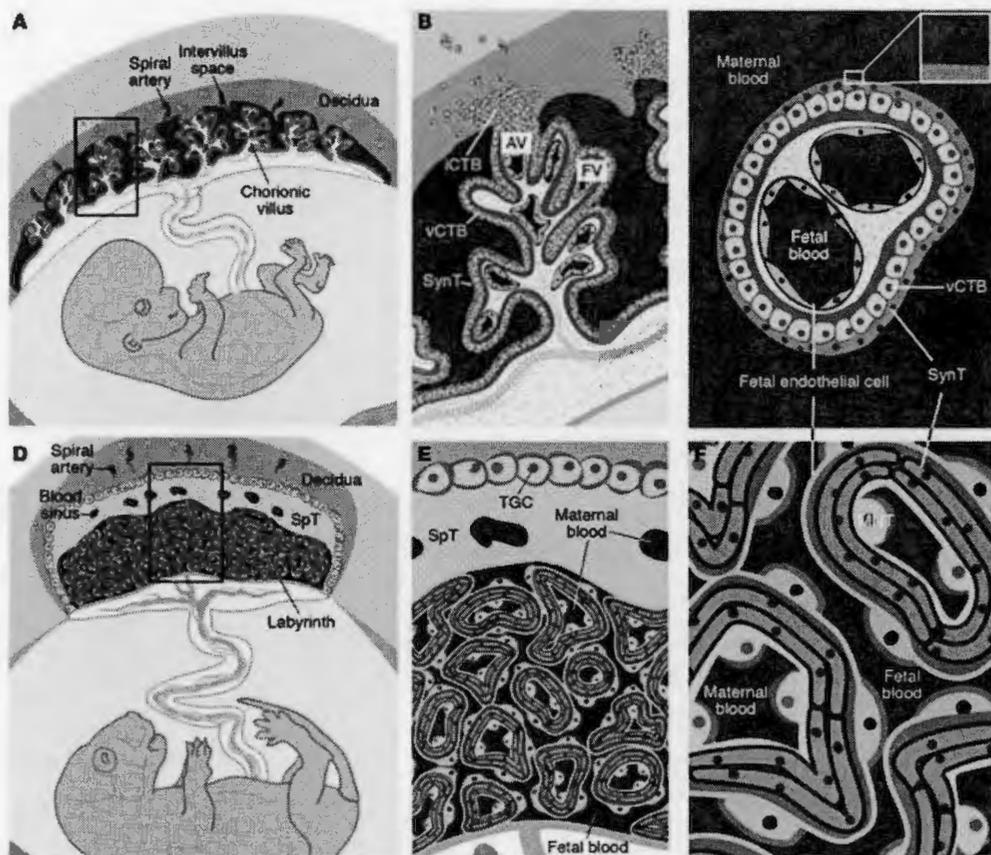


Figure 1.2 : Comparaison des systèmes d'échange entre le sang maternel et fœtal chez l'humain et chez la souris (Maltepe *et al.*, 2010). (A) (Humain) Les artérioles spiralées de la decidua perfusent les villosités chorioniques dans l'espace intervilloux. (B) Sur les villosités flottantes (FV), on retrouve un syncytium (SynT) issu de la fusion de plusieurs cytotrophoblastes qui est en contact avec le sang maternel. Sous cette couche se retrouve une population de cellules mononucléaires cytotrophoblastes progénitrices (vCTB). Sur la paroi utérine, des cytotrophoblastes invasifs (iCTB) envahissent la paroi utérine et forment les villosités ancrées (AV). (C) À la surface des villosités flottantes, le SynT est agrémenté de microvillosités. Les vaisseaux sanguins ramifiant le milieu des villosités transportent le sang fœtal. (D) (Souris) Le sang maternel des artérioles spiralées se déverse dans des sinus parsemant le spongio-trophoblaste (SpT) avant de se rendre au labyrinthe. (E) Les cellules trophoblastiques géantes (TGC), tout comme les iCTBs chez l'homme, ancrent le placenta à la paroi utérine. (F) Chez la souris, le sang maternel est en contact direct avec une couche de cellules trophoblastes mononucléaires (MNT) entourée de deux couches de SynT, ces dernières étant en contact avec les capillaires fœtaux.

Malgré la ressemblance entre le placenta des deux espèces, il existe tout de même des différences au niveau de leur morphologie, des fonctions endocrines et de leur développement. L'une des principales différences morphologiques entre le placenta

humain et celui de la souris est que le premier est hémomonochorial, alors que le second est hémotrichorial (Figure 1.3).

Hémomonochorial fait référence aux placentas ayant une barrière placentaire composée d'une couche de cellule, les syncytiotrophoblastes, formant alors un syncytium unique. C'est le type retrouvé chez l'homme et les autres simiens, en plus d'autres espèces, telles que le cochon d'Inde et le chinchilla. Chez le rat, la souris et les autres membres de la super-famille *Muroidea*, dont le placenta est de type hémotrichorial, la barrière placentaire est composée de trois couches de cellules : deux syncytia composés de cellules fusionnées et une dernière couche composée de cytotrophoblaste en contact direct avec le sang maternel (Mikkelsen *et al.*, 2017). Étonnamment, la formation du syncytiotrophoblaste, dont le rôle est primordial lors de la grossesse, a recours à des gènes cellulaires qui proviennent des rétrovirus.

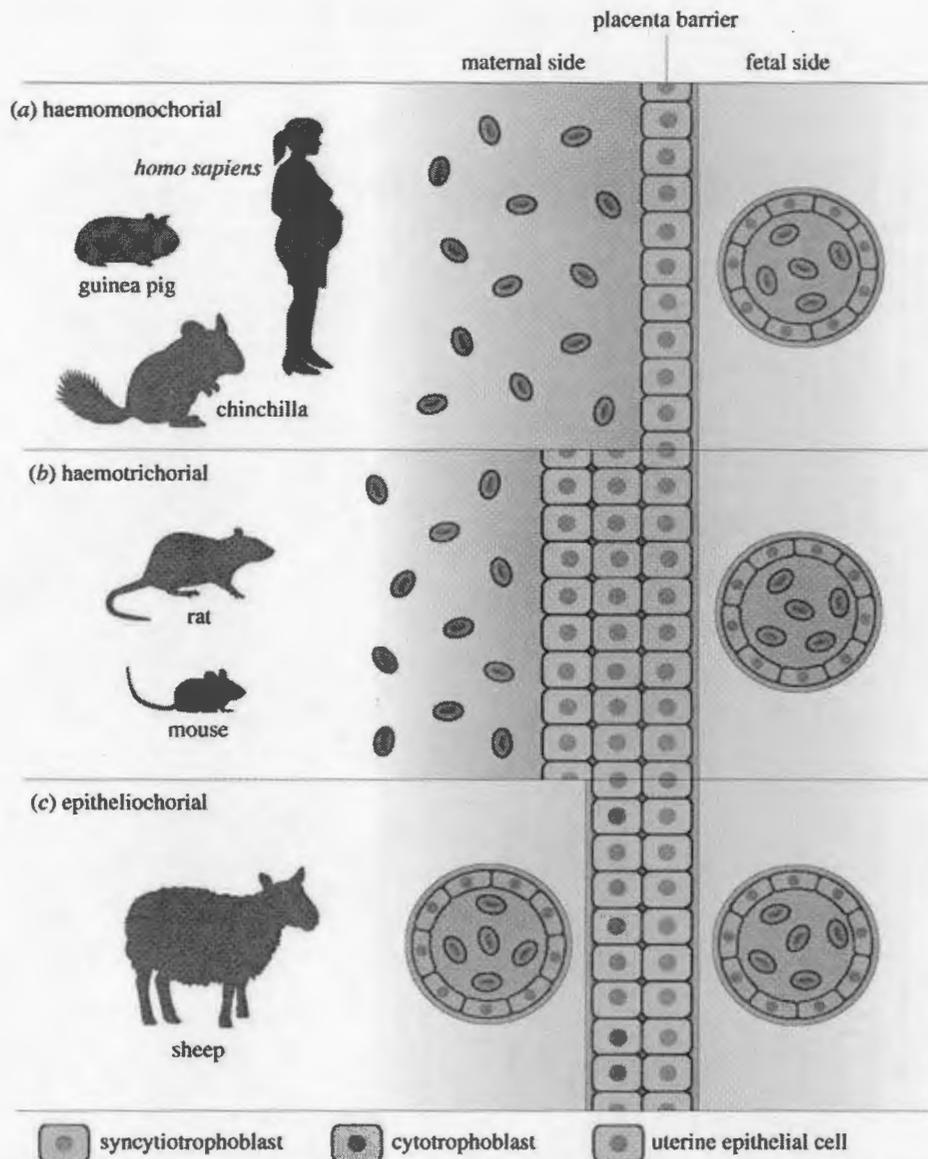


Figure 1.3 : Schématisation de trois modèles de barrière placentaire (Mikkelsen *et al.*, 2017). (A) Barrière placentaire hémomonochoriale, où l'on y retrouve une seule couche de syncytiotrophoblastes (bleu). Elle est présente chez l'humain et les autres primates, tout comme chez le cochon d'Inde et le chinchilla. (B) Barrière placentaire hémotrichoriale, composée de deux couches successives de syncytiotrophoblastes (bleu), suivies d'une couche de cellules cytotrophoblastiques (vert). Elle est présente chez les membres de la super-famille *Muroidea*, tels que le rat et la souris. (C) Barrière placentaire épithéliochoriale présente chez la famille des bovidés, qui comprend notamment le bœuf et le mouton. Ici, les capillaires fœtaux ne baignent pas directement dans le sang maternel, mais sont plutôt séparés des capillaires maternels par une couche de cellules cytotrophoblastiques (vert) et une couche de cellules épithéliales utérines (jaune).

1.2 Les Rétrovirus

Les rétrovirus ont un cycle de réplication unique parmi les virus (Figure 1.4). Ce sont des virus qui possèdent un génome de type ARN et qui contiennent deux molécules d'ARN simple brin à polarité positive. Contrairement aux virus possédant un matériel génétique de type ADN, qui est directement traduit pour obtenir des protéines virales, les rétrovirus ont recours au phénomène de rétrotranscription grâce à une enzyme virale présente dans la particule virale : la transcriptase inverse. En effet, la transcriptase inverse rétrotranscrit l'ARN en ADN bicaténaire, qui sera ensuite intégré dans le génome de la cellule infectée grâce à l'intégrase, pour former un provirus. Le provirus contient trois gènes de structure, soit *gag*, *pol* et *env*. Le gène *gag* (*group specific antigens*) code pour les protéines structurales de la matrice, de la capsid et de la nucléocapsid. Le gène *pol* code pour la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéase, l'endonucléase et une ARNase H. Finalement, le gène *env* code pour les protéines d'enveloppe du virion (Campbell et Reece, 2007).

Les rétrovirus possèdent une forte variabilité génétique, puisque la transcriptase inverse a tendance à commettre des erreurs lors de la rétrotranscription (Marieb et Hoehn, 2010). C'est ce phénomène qui complique les efforts actuellement déployés afin de trouver un remède pour le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Cet ensemble de symptômes est causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), un rétrovirus du genre lentivirus dont les gènes, et plus particulièrement ceux codant pour les deux glycoprotéines transmembranaires de l'enveloppe (gp120 et gp41), mutent constamment. Les lentivirus sont une sous-famille de rétrovirus possédant les caractéristiques communes de ces derniers, mais ils se démarquent notamment par leur long temps d'incubation et leur capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, telles que les hépatocytes, les neurones, les monocytes et les macrophages (Fouchier *et al.*, 1997 ; Klimatcheva *et al.*, 1999). De ce fait, l'utilisation de lentivirus

est l'une des méthodes les plus efficaces pour le transfert de gène dans le domaine de la biotechnologie (Klimatcheva *et al.*, 1999). Les lentivirus possèdent aussi des gènes de régulation supplémentaires en rapport aux autres rétrovirus (Fouchier *et al.*, 1997).

Certains rétrovirus sont aussi connus comme agent causal de certains cancers. En effet, certains rétrovirus possèdent un oncogène et peuvent ainsi promouvoir la prolifération incontrôlée des cellules, créant ainsi des tumeurs (Luo et Ou, 2015). Il existe aussi des exemples de rétrovirus menant à des pathologies différentes que le SIDA ou le cancer. En exemple, le virus EIAV (*equine infections anemia virus*) est un lentivirus infectant les équidés, leur causant lors de l'infection, une thrombocytopénie et une hyperthermie (Leroux *et al.*, 2005). Le virus visna-maëdi, un autre lentivirus, cause une encéphalite ou une pneumonie chronique chez les moutons (Benavides *et al.*, 2009).

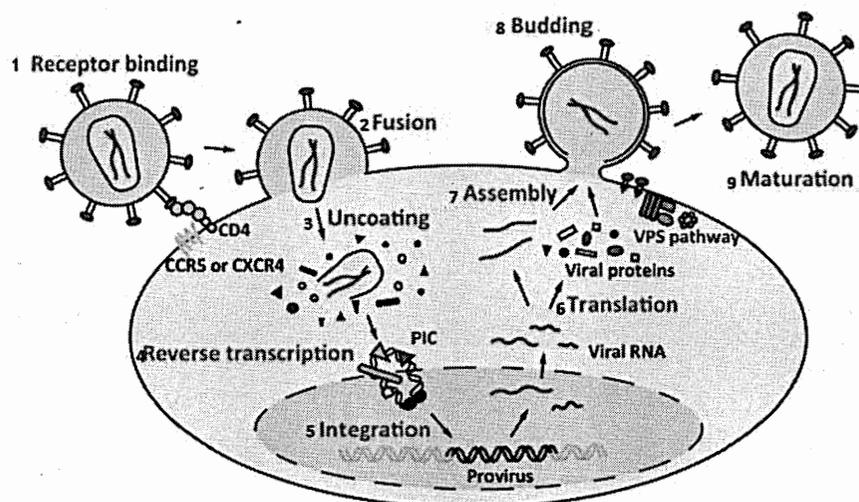


Figure 1.4 : Cycle de réplication d'un rétrovirus, le VIH en exemple (Suzuki et Suzuki, 2011). Il est possible de résumer le cycle de réplication des rétrovirus en 8 étapes : 1. Liaison à un récepteur membranaire sur la cellule cible. 2. Fusion des membranes. 3. Décapsidation. 4. Transcription inverse. 5. Intégration du provirus. 6. Transcription des gènes viraux et traduction en protéines viraux. 7. Assemblage du matériel viral (ARN et protéine). 8. Bourgeonnement hors de la cellule. 9. Maturation finale.

1.3 Morphologie

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, c'est-à-dire que leur capsid est entourée d'une membrane de phospholipides. Les particules virales acquièrent cette membrane lors de l'étape finale de leur cycle de réplication, où ils bourgeonnent hors de la cellule, emportant avec eux une partie de la membrane cellulaire, ce qui peut ultimement causer la mort de la cellule infectée. Cette membrane est de plus supplémentée des protéines d'enveloppe codées par le gène *env* du virus, leur octroyant leur capacité infectieuse en plus d'une certaine protection contre le système immunitaire (Marieb et Hoehn, 2010).

Les rétrovirus sont d'une taille allant de 110 à 125 nanomètres. L'ARN qui siège au centre de la particule virale est sous la forme diploïde, les deux brins d'ARN monocaténares étant reliés par des ponts hydrogènes à leur extrémité. Cet ARN est entouré d'une capsid, une structure composée de plusieurs capsomères, unités formées à partir de protéines virales. C'est cette capsid qui, en plus de contenir le matériel génétique, contient aussi la transcriptase inverse et l'intégrase, deux enzymes essentielles au cycle de réplication des rétrovirus.

1.4 Glycoprotéines d'enveloppe virale.

Les protéines d'enveloppe des rétrovirus sont vitales pour les fonctions de ces derniers. C'est grâce à ces protéines que les rétrovirus reconnaissent une cellule cible adéquate et peuvent poursuivre leur cycle répliatif par la fusion de leur enveloppe avec la membrane plasmique de la cellule (Lavialle *et al.*, 2013).

Le gène *env* code pour un précurseur qui est ensuite clivé lors de son transport dans la cellule, générant ainsi deux sous-unités : la sous-unité de surface (SU) et la sous-unité

transmembranaire (TM). Ces sous-unités restent associées sous la forme d'un hétérodimère pour finalement s'associer en un trimère à la surface de l'enveloppe (Figure 1.5). La SU possède un domaine qui permet d'interagir avec les récepteurs à la surface des cellules cibles. La TM, quant à elle, possède un peptide de fusion N-terminal qui permet la fusion du virus avec la membrane cellulaire lors de son insertion dans cette dernière. De plus, la TM possède un domaine transmembranaire qui permet d'insérer l'hétérodimère dans l'enveloppe du virion. Finalement, elle possède aussi un domaine immunosuppresseur (Lavialle *et al.*, 2013).

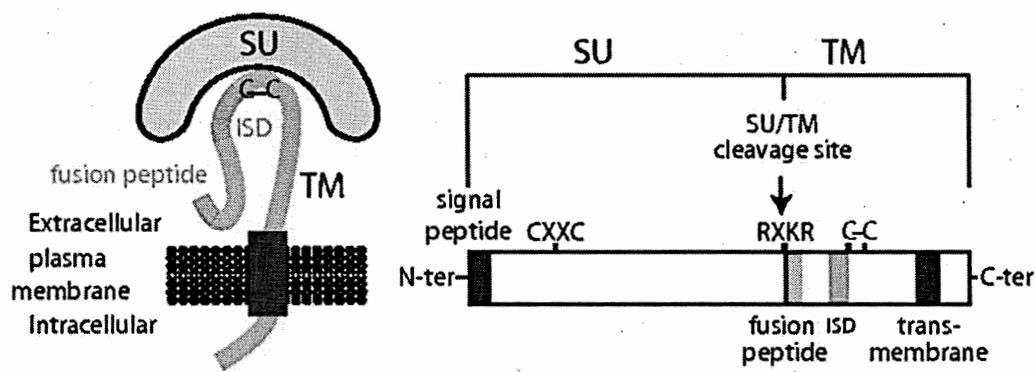


Figure 1.5 : Structure d'une glycoprotéine d'enveloppe d'origine virale (Cornelis *et al.*, 2013). Schéma représentant une protéine rétrovirale Env. On peut y voir la sous-unité de surface (SU) en jaune et la sous-unité transmembranaire (TM) en orange. Le schéma comprend aussi le motif CXXC impliqué dans l'interaction entre les deux sous unités, le site de clivage furine RXKR, le peptide signal hydrophobique (mauve), le peptide fusion (vert), le domaine immunosuppresseur (bleu) et le domaine transmembranaire (rouge).

1.5 Rétrovirus endogène (ERV)

De nos jours, il est estimé que 8% du génome humain et 10% du génome murin sont d'origine rétrovirale, aussi connue sous le nom de rétrovirus endogène (Dupressoir *et al.*, 2005). En effet, au cours de plusieurs millions d'années, plusieurs événements

d'intégration d'ADN rétroviraux eurent lieu dans le génome de diverses espèces (Figure 1.6) (Lavialle *et al.*, 2013). Alors que la majorité de ce matériel génétique acquis ne possède pas de rôle particulier (soit par des protéines codantes ou par régulation génique via les séquences rétrovirales promotrices), certains gènes d'origine rétrovirale ont un rôle fonctionnel important. Les syncytines sont parmi les meilleurs exemples. Les gènes codant pour ces protéines furent intégrés au génome de certains mammifères à la suite de l'infection de cellules germinales par des rétrovirus (Figure 1.6). En tant que protéines d'enveloppe de ces virus, elles étaient responsables de la liaison du virus à la cellule cible et de la fusion subséquente des membranes virales et cellulaires, permettant ainsi l'entrée du virus. Lors de l'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules germinales, celui-ci a été transmis aux descendants de l'individu infecté et cette transmission a perduré sur plusieurs générations. Au cours de l'évolution, la majorité des séquences rétrovirales ont été mutées ou excisées du génome hôte, mais certains gènes d'enveloppe ont été maintenus et codent pour des protéines toujours fonctionnelles aujourd'hui, telles que les syncytines. Ces événements d'intégration d'ADN viraux se sont passés indépendamment chez différentes espèces de mammifères, il y a environ 40 millions d'années pour les primates et 25 millions d'années pour les rongeurs (Dupressoir *et al.*, 2005).

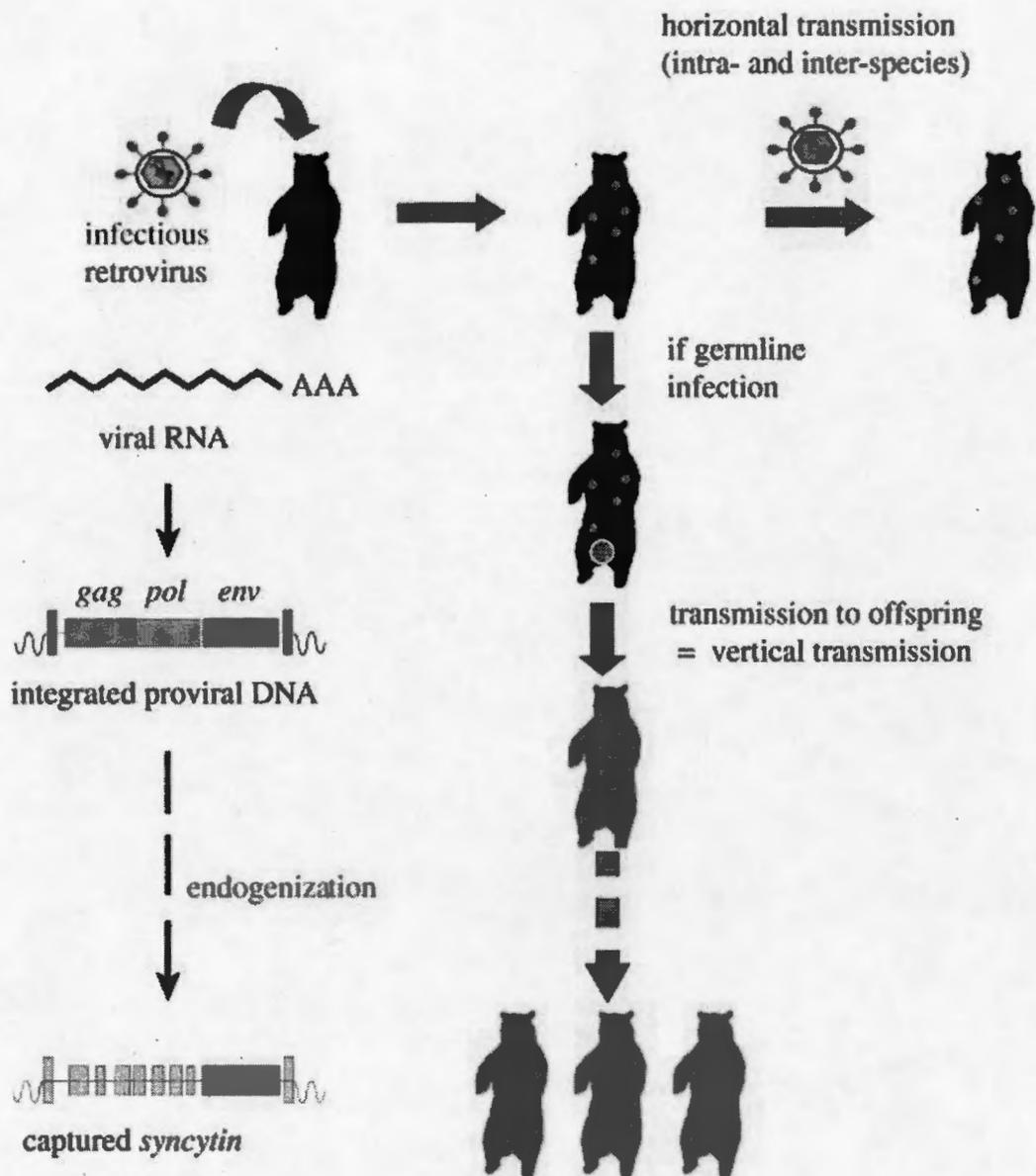


Figure 1.6 : Endogénéisation d'un rétrovirus et capture des gènes syncytine dans les espèces mammifères (Lavialle *et al.*, 2013). Au cours de plusieurs millions d'années, divers ADN proviraux furent introduits par transmission verticale dans le génome de différentes espèces mammifères (et ce de manière indépendante) à la suite d'une infection des cellules germinales. Chez certains ADN proviraux, le gène d'enveloppe a été préservé chez différentes espèces et est aujourd'hui connu sous le nom de syncytine.

1.6 Les syncytines humaines

Une étude visant à dépister la présence de rétrovirus endogènes (ERV) avec un long cadre de lecture ouvert (ORF) chez l'humain (HERV) a permis d'identifier 18 gènes ayant le potentiel de coder des protéines d'enveloppe (Parseval *et al.*, 2003). Parmi ces gènes, deux premières syncytines furent identifiées, soit la syncytine-1 et la syncytine-2. Ces deux protéines ont une fonction importante dans la formation du placenta. En effet, ce sont les syncytines qui, grâce à leur capacité d'induire la fusion cellulaire, sont responsables de la formation du syncytium dans le placenta (Vargas *et al.*, 2009). C'est ce syncytium qui recouvre les villosités et qui permet les échanges entre le sang maternel et fœtal (Figure 1.2).

La syncytine-1 est une protéine d'enveloppe codée par le gène ERVW-1 (*endogenous retrovirus group W envelope member 1*) (Mi *et al.*, 2000; Blond *et al.*, 2000). Ce dernier fait partie d'ERVWE1, un provirus situé sur le chromosome 7, dont l'ADN viral se serait intégré au génome humain, il y a 25 à 40 millions d'années selon des comparaisons phylogénétiques, où la période d'intégration du provirus est déterminée selon la présence de ce dernier avant la séparation de deux sous-familles (Voisset *et al.*, 1999). Il est aussi possible de trouver dans la même région les vestiges des gènes *gag* et *pol*, mais ces derniers sont désormais non-codants à cause de la présence de mutations non-sens (Voisset *et al.*, 1999). Il est connu que la syncytine-1 a pour récepteur hASCT2 et hASCT1 (*human sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2/1*, respectivement aussi connu sous les noms SLC1A4 et SLC1A5) (Lavilette *et al.*, 2002).

Pour ce qui est de sa structure, tout comme les protéines d'enveloppe de rétrovirus exogènes, la syncytine-1 est composée d'une sous-unité de surface (SU) et d'une sous-unité transmembranaire (TM), qui forment un hétérodimère. La sous-unité

transmembranaire contient trois domaines fonctionnels: le peptide de fusion, le domaine immunosuppresseur et le domaine d'ancrage à la membrane. Bien que le peptide fusion joue un rôle majeur dans la capacité fusogénique de la protéine, il a aussi été montré que la queue cytoplasmique possédait un rôle dans la régulation de la fusion. En effet, lorsque la queue est tronquée pour ne laisser que 14 résidus, l'activité de fusion est augmentée (Cheynet *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que la syncytine-1 possède une activité immunosuppressive (Tolosa *et al.*, 2012).

La syncytine-2 est codée par le gène d'origine rétroviral ERVFRD-1 (*endogenous retrovirus group FRD member 1*). Ce dernier se trouve sur le chromosome 6 et a été acquis, il y a 40 millions d'années (Blaise *et al.*, 2003). La syncytine-2 possède une structure semblable à la syncytine-1, étant composée des sous-unités SU et TM et ayant conservé les trois domaines fonctionnels de la sous-unité TM (Blaise *et al.*, 2003). Il a aussi été démontré que la syncytine-2 possède une activité immunosuppressive (Mangeny *et al.*, 2007). Une différence notable entre les deux syncytines se retrouve dans leur distribution cellulaire. En effet, il a été observé que, dans des cellules trophoblastiques humaines isolées de placentas, la syncytine-1 est distribuée de façon ponctuelle et souvent aux points de contact entre les cellules alors que la syncytine-2 est distribuée uniformément à la membrane plasmique (Vargas *et al.*, 2009). De plus, au niveau tissulaire, la syncytine-1 est exprimée à l'interface cytotrophoblaste-syncytiotrophoblaste du placenta dans les deux types cellulaires, alors que la syncytine-2 est seulement détectée dans les cytotrophoblastes (Malassiné *et al.*, 2008). La fonction fusogénique de la syncytine-2 dépend de son interaction avec un récepteur cellulaire différent de ceux identifiés pour la syncytine-1, soit le récepteur MFSD2a (*Major Facilitator Superfamily Domain-containing protein 2A*) (Esnault *et al.*, 2008).

1.7 Présence de syncytines chez d'autres espèces

Suite à la découverte des syncytines chez l'humain et aux études de leurs rôles, des protéines rétrovirales avec des fonctions apparentées ont été identifiées chez d'autres espèces de mammifères euthériens. Un des premiers gènes qui ont été découverts par ces démarches fut le gène *syncytin-Ory1*, retrouvé chez la famille des *Leporidae* (lapin et lièvre). Ce gène aurait été conservé dans cette famille depuis 12 millions d'années. Son récepteur est le même que celui de la syncytine-1, soit ASCT-2. Cette protéine aurait aussi un rôle dans la formation des syncytiotrophoblastes du placenta (Heidmann *et al.*, 2009).

Un second gène fut ensuite découvert chez 26 espèces de l'ordre *Carnivora*, le *syncytin-Car1*. La capture de ce gène aurait eu lieu, il y a de cela 80 millions d'années : il serait ainsi le plus vieux gène apparenté à la syncytine connu à ce jour. La syncytine-Car1 possède les mêmes caractéristiques que les autres syncytines: elle possède une activité fusogénique, elle est spécifiquement exprimée dans le placenta et elle est d'origine endorétrovirale (Cornelis *et al.*, 2012).

Un troisième gène, *syncytin-Rum1*, fut identifié chez 16 espèces du super-ordre *Ruminantia*. Les espèces de cette sous-famille (comprenant bœuf, mouton, cerf, girafe, etc.) ne possèdent pas un syncytium élaboré comme les autres mammifères mentionnés précédemment. Toutefois, ces espèces ont une placentation dite synépithéliochoriale, c'est-à-dire que la fusion cellulaire est très limitée, occasionnant la formation de cellules trinuéclées plutôt que des cellules contenant un nombre élevé de noyaux. La capture du gène aurait eu lieu il y a 30 millions d'années. Il est à noter que la syncytine-Rum1 semble être à l'origine des placentas avec une structure synépithéliochoriale, puisque cette syncytine et ce type de barrière placentaire sont exclusifs au super-ordre *Ruminantia* (Cornelis *et al.*, 2013).

Alors que les syncytines sembleraient être exclusives aux mammifères euthériens par le fait que ces derniers ont le placenta le mieux développé du règne animal, ce n'est point le cas. Il fut découvert récemment que les marsupiaux, qui ont divergé des mammifères euthériens, il y a de cela 190 millions d'années, possèdent aussi une syncytine, la syncytine-Opo1. Plus précisément, le gène fut retrouvé dans plusieurs espèces du genre *Monodelphis*, les opossums à queue courte. Encore ici, cette syncytine possède les mêmes caractéristiques que ses congénères: elle est fusogénique et elle est spécifiquement exprimée dans le placenta des marsupiaux (Cornelis *et al.*, 2015). Plus étonnant encore, une syncytine fut retrouvée chez les lézards du genre *Mabuya*, la syncytine-Mab1. Ces lézards ont un mode de reproduction vivipare et possèdent une structure similaire à un placenta. Cette nouvelle syncytine possède les mêmes caractéristiques que ces prédécesseurs (Cornelis *et al.*, 2017).

Les deux gènes syncytines les plus étudiées autres que ceux chez l'humain demeurent néanmoins les gènes de la souris qui ont permis l'utilisation de ce modèle murin pour des études fonctionnelles subséquentes.

1.8 Syncytines chez la souris

Une recherche *in silico* à l'aide de bases de données génomiques de souris a permis d'identifier deux gènes d'enveloppe codants en copie unique et n'ayant aucune ressemblance aux autres env d'ERVs murins connus. Ces gènes sont maintenant connus sous la désignation de syncytine-A et syncytine-B (Dupressoir *et al.*, 2005). L'introduction des gènes de la syncytine-A et -B aurait eu lieu, il y a de cela environ 25 millions d'années, avant la spéciation des muridés (Robinson *et al.*, 1997). De ce fait, il a été possible de retrouver des protéines orthologues à la syncytine-A et -B dans diverses espèces de la super-famille *Muroidea* (Figure 1.7), telles que les souris

(*Mus musculus*, *Peromyscus maniculatus*), le rat (*Rattus Norvegicus*), les hamsters (*Cricetulus griseus*, *Mesocricetus auratus*), les campagnols (*Microtus ochrogaste*, *Myodes glareolus*) et les rats-taupes (*Spalax Galili*, *Spalax Carmeli*, *Spalax leucodon*, *Myospalax myospalax*) (Dupressoir *et al.*, 2005; Vernochet *et al.*, 2014). Fait intéressant, la présence des syncytines-A et -B semble être associée à la présence d'un placenta hémotrichorial. En effet, chez toutes les espèces où on retrouve des protéines orthologues à la syncytine-A et -B, le placenta adopte une structure hémotrichoriale. Cependant, dans le cas des rats-taupes, il semble que, malgré le fait que la barrière placentaire soit composée de trois couches cellulaires, une seule possède les caractéristiques d'un syncytium (Vernochet *et al.*, 2014).

Chez les sous-familles de rongeurs apparentés au cochon d'Inde et à l'écureuil, il fut impossible de détecter des protéines orthologues à la syncytine-A et -B. De nouvelles syncytines ont cependant été identifiées chez ces deux sous-familles : la syncytine-Mar1 chez l'écureuil (Redelsperger *et al.*, 2014) et la *syncytin-like env-Cav1* chez le cochon d'Inde (Vernochet *et al.*, 2011), qui furent toutes deux acquises de manière indépendante aux syncytines des *Muroidea*. Fait intéressant, ces rongeurs ont une barrière placentaire de type hémomonochorial, comme chez l'humain (Vernochet *et al.*, 2014; Mikkelsen *et al.*, 2017).

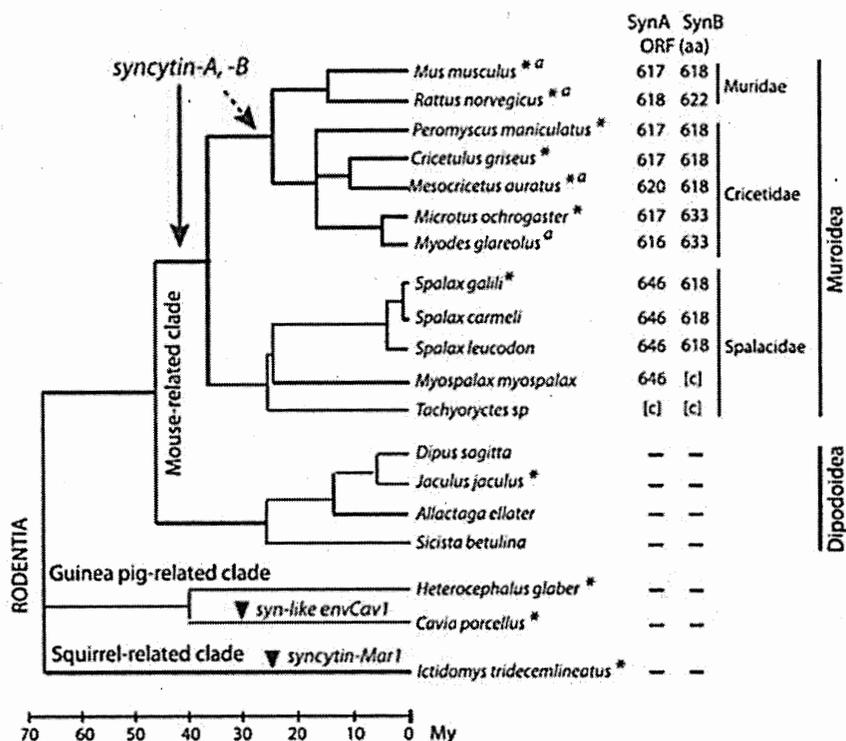


Figure 1.7 : Phylogénie de l'ordre des *Rodentia* et les gènes de syncytines (Vernoche *et al.*, 2014). Représentation de la phylogénie des différentes espèces de rongeurs et présence de gènes de syncytine dans leur génome. * = espèce dont la séquence du génome est accessible. ^a = espèce dont la présence des gènes de syncytines fut découverte par Dupressoir *et al.*, 2005.

L'étude de la séquence en acides aminés des syncytines-A et -B montre qu'elles ont les caractéristiques communes aux protéines d'enveloppe venant de rétrovirus: elles possèdent un site de clivage canonique entre la SU et la TM et un domaine hydrophobique correspondant au peptide de fusion. On y retrouve aussi un domaine CWVC, responsable de l'interaction entre les deux sous-unités, en plus d'un domaine immunosuppresseur. D'ailleurs, les séquences en acides aminés des deux protéines présentent une homologie de 67% (Dupressoir *et al.*, 2005). Les gènes et donc l'ADN proviral codant pour ces deux protéines se sont intégrés dans deux chromosomes différents. La syncytine-A se retrouve sur le chromosome 5 à la position 5qG2, alors que la syncytine-B se retrouve sur le chromosome 14 à la position 14qD1.

Comme la syncytine-1 et -2, les syncytines murines sont exprimées spécifiquement au placenta, n'étant présentes que modestement dans d'autres organes tels que le cerveau, les ovaires et les testicules. L'expression des syncytines murines est la plus élevée entre 9.5 et 14.5 jours postcoitum (Dupressoir *et al.*, 2005). Plus spécifiquement, la syncytine-A est exprimée dans la première couche de syncytiotrophoblaste (ST-I), alors que la syncytine-B se retrouve dans la deuxième couche (ST-II) (Simmons *et al.*, 2008).

Il fut aussi démontré que les syncytines-A et -B possèdent aussi des caractéristiques fusogéniques. Des tests de fusion *ex vivo* effectués dans plusieurs types cellulaires ont pu démontrer la capacité de ces protéines à induire la fusion cellulaire. Alors que la syncytine-A induit la fusion des cellules MCA205, LOK, VERO et HEK293T, qui sont des lignées cellulaires dérivant de la souris, du singe et de l'humain, la syncytine-B n'a pu qu'engendrer la fusion que des cellules MDCK, une lignée cellulaire épithéliale de rein de chien. Il est alors probable que l'activité fusogénique de ces protéines soit médiée par des récepteurs différents (Dupressoir *et al.*, 2005). De plus, ces résultats de fusion cellulaire diffèrent de ceux qui ont été obtenus pour la syncytine-1 et la syncytine-2 lors d'expériences similaires (Blaise *et al.*, 2003).

Des expériences de "Knockout" de la syncytine-A ont permis d'observer l'importance de la syncytine-A dans la formation du placenta et la survie de l'embryon. La première expérience fut réalisée chez des souris ayant subi une délétion de l'ORF de la syncytine-A à l'aide du système Cre/LoxP. Une mortalité des embryons a été observée à partir du stade 11.5E pour finalement atteindre 100% de mortalité à partir du stade E14.5. L'analyse des placentas des souris SynA^{-/-} a permis d'observer une perturbation dans leur structure au niveau du labyrinthe, montrant des trophoblastes non-fusionnés et un syncytium nettement moins dense (ST-I), occasionnant ainsi une surprolifération des cellules aux dépens de l'espace sanguin

foetal (Dupressoir *et al.*, 2009). On retrouve aussi une malformation du labyrinthe lorsque le gène de la syncytine-B est à son tour inactivé, puisque les souris $SynB^{-/-}$ montrent une malformation du deuxième syncytium (ST-II) semblable à celle du ST-1 sous-développé des souris $SynA^{-/-}$. Cependant, il existe une différence en ce qui concerne la vascularisation du placenta de ces souris mutantes. Alors que les souris $SynA^{-/-}$ ont un espace sanguin foetal réduit, il n'en est rien chez les souris $SynB^{-/-}$, ce qui montre que la surprolifération des trophoblastes ayant causé la réduction de l'espace sanguin foetal chez les souris mutantes $SynA^{-/-}$ n'a pas eu lieu chez les souris $SynB^{-/-}$. On retrouve plutôt, chez les placentas $SynB^{-/-}$, une malformation du réseau vasculaire maternel, ce dernier se retrouvant dilaté et plus abondant dans les placentas mutants (Dupressoir *et al.*, 2011). Étonnamment, les souris $SynB^{-/-}$ sont viables à la naissance, ayant pour seules conséquences un retard de croissance et une réduction du nombre de nouveau-nés. Lorsque les souris sont à la fois inactivées pour les gènes de la syncytine-A et de la syncytine-B, une mortalité embryonnaire plus précoce est observée comparativement aux souris $SynA^{-/-}$, soit dès le stade 9.5E pour finalement atteindre 100% au stade 11.5E (Dupressoir *et al.*, 2011).

Une seconde expérience avec des souris *knock-out* conditionnel pour la syncytine-A fut réalisée dans le but de reproduire la déficience en syncytine-1 de patientes atteintes de pré-éclampsie, qui a lieu entre le deuxième et troisième trimestre. Une fois de plus, une forte mortalité (80%) fut remarquée à E17.5 après *knockout* à E11.5. Avec ce modèle, des changements majeurs au niveau de la vascularisation placentaire et de l'expression de plusieurs marqueurs d'angiogenèse furent notés (Qiao *et al.*, 2017).

Alors que les récepteurs chez l'humain sont connus depuis quelques années, des recherches récentes semblent avoir identifié un récepteur potentiel pour la syncytine-A, soit LY6E (*lymphocyte antigen 6E*). LY6E est une protéine ancrée à la membrane

par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'expression de LY6E dans des cellules exprimant la syncytine-A engendre la fusion, alors que le *knockdown* du récepteur dans des cellules humaines HEK293T réduit grandement la fusion cellulaire induite par la surexpression de la syncytine-A (Bacquin *et al.*, 2017).

Une expérimentation de *knockout* du récepteur LY6E *in vivo* semble supporter ces résultats. Les placentas ayant subi le *knockout* avaient des malformations diverses, comprenant une vascularisation réduite, une formation accrue de vacuoles dans différentes couches de la barrière placentaire hémotrichoriale et une réduction dans la formation du syncytiotrophoblaste de la première couche (ST-I) (Langford *et al.*, 2018).

1.9 Rôle des syncytines A et B dans des tissus autres que placentaires

Bien que les syncytines-A et -B sont toutes deux fortement exprimées dans le placenta, elles pourraient jouer certains rôles dans des tissus autres que ce dernier. En premier lieu, il a été découvert que ces syncytines avaient un rôle important à jouer dans la formation des muscles, principalement chez les souris mâles. Il a en effet été démontré par la délétion de la syncytine-B que celle-ci possède un rôle dans la fusion des myoblastes. Les souris SynB^{-/-} avaient une réduction de leur masse musculaire de plus de 20%. La syncytine-B jouerait aussi un rôle dans la régénération des muscles. Finalement, le rôle direct des syncytines dans la fusion des myoblastes a été confirmé *ex vivo* par l'utilisation de siRNAs spécifiques aux syncytines (Redelsperger *et al.*, 2016).

L'implication de la syncytine-A (et de la syncytine-1 chez l'homme) dans la formation des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption des os, a aussi été suggérée (Søe *et al.*, 2011 ; Ethiraj *et al.*, 2018). Ces cellules sont formées par la

fusion de précurseurs mononucléées, les cytotrophoblastes. Chez l'homme, la présence de la syncytine-1 et de son récepteur ASCT2 à la surface des ostéoclastes a également été démontrée. L'utilisation d'un peptide inhibant l'activité de la syncytine-1 a diminué de 30% le nombre de noyaux par ostéoclastes (Søe *et al.*, 2011). Chez la souris, il a été démontré que la suppression de la syncytine-A inhibe la formation d'ostéoclastes en culture *in vitro*. De plus, la syncytine-A semble importante dans le contrôle de l'autophagie des cellules préostéoclastes. Lorsque ces cellules ont été traitées avec des siRNAs spécifiques à la syncytine-A, leur activité autophagique fut diminuée (Ethiraj *et al.*, 2018).

1.10 Caractérisation des transcrits de syncytine-A et syncytine-B

Comme mentionné précédemment, les syncytines murines sont exprimées principalement dans le placenta, n'étant exprimées que modestement dans d'autres organes tels que le cerveau, les ovaires et les testicules. Il fut démontré par RT-qPCR que les deux transcrits avaient un profil d'expression similaire tant au niveau quantitatif (accumulation des transcrits lors du développement du placenta) que qualitatif (localisation similaire des transcrits). À ce jour, on en connaît très peu sur l'expression des transcrits de syncytine-A, mais il est soupçonné que le facteur de transcription Gcm1 (*Glial cells missing-1*) y jouerait un rôle clé. En effet, son profil d'expression est similaire à celui de la syncytine-A et -B (Basyuk *et al.*, 1999). Qui plus est, les souris étant dépourvues de ce facteur de transcription ont des malformations dans leur placenta, caractérisées par une absence de syncytiotrophoblaste (Schreiber *et al.*, 2000). Des expériences en RT-PCR ont d'ailleurs permis d'observer une régulation à la baisse des transcrits de la syncytine-A chez des embryons de souris déficients en facteur de transcription Gcm1 (Schubert *et al.*, 2008). Cependant, l'implication du facteur de transcription Gcm1 dans la régulation des syncytines de souris demeure incertaine, puisque des expérimentations

d'infection avec le virus Influenza A n'ont mené à une augmentation des transcrits encodant Gcm1 et la syncytine-B, mais pas la syncytine-A (Asp *et al.*, 2007).

Lors de la découverte des deux syncytines murines, la structure des transcrits d'ARN fut partiellement analysée par RT-PCR et par recherche *in silico* dans des bases de données de séquences EST (*expressed sequence tag*) et ADNc. Ces analyses ont permis de révéler plusieurs types d'épissage alternatif de la syncytine-A et -B, plus particulièrement au niveau du 5'UTR (Dupressoir *et al.*, 2005). L'analyse des séquences bordant l'ORF de la syncytine-A et -B a également démontré la présence d'éléments proviraux dégénérés. On y retrouve d'ailleurs quelques régions ayant des homologies avec le gène rétroviral *pol*, tout comme des séquences terminales longues répétées (LTR) d'origine ERV ou MaLR (*mammalian apparent LTR Retrotransposons*). Finalement, on y retrouve aussi des éléments répétitifs murins B1, B2 et LINE (Figure 1.8). Selon la base de données GenBank, il semble possible que le gène de la syncytine-A possède un total de 6 exons dans la région 5'UTR (5' *Untranslated Region*), alors que celui de la syncytine-B en aurait 8 (Figure 1.9).

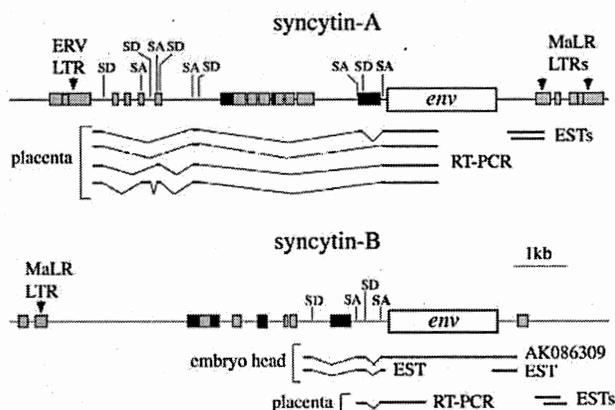


Figure 1.8 : Organisation génomique de la syncytine-A et la syncytine-B (Dupressoir *et al.*, 2005). On y retrouve l'ORF codant la protéine (*env*), les séquences associées au gène *pol* (boîtes noires), les éléments répétés murins (boîtes grises) et les sites donneurs et accepteurs d'épissages (SA-SD). Les différents transcrits obtenus par RT-PCR ou par recherche *in silico* dans les banques EST/ADNc sont schématisés.

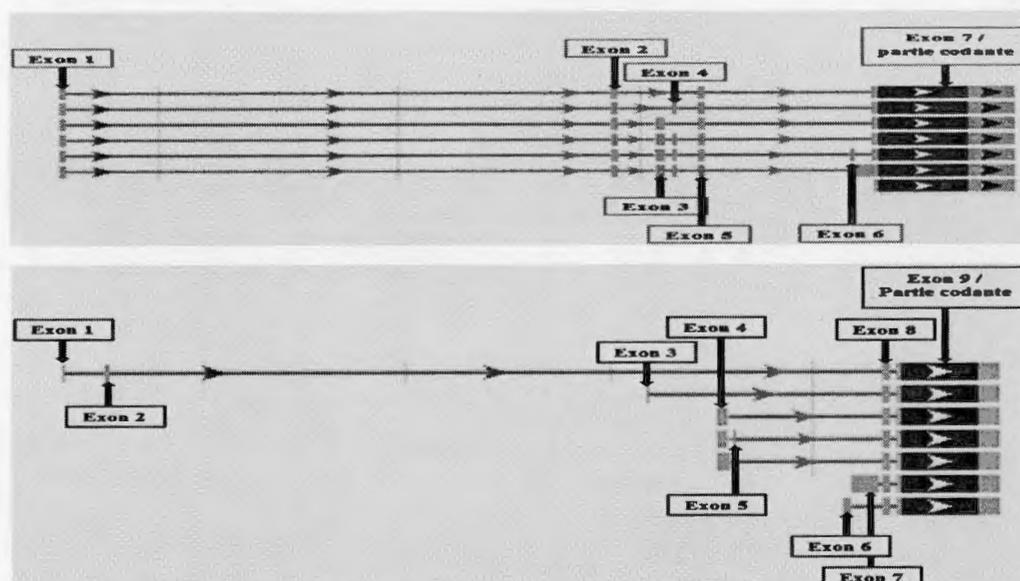


Figure 1.9: Représentation des exons non-codants des ARNm de syncytine-A et -B obtenus par recherche *in silico* dans GenBank. La syncytine-A semble posséder 7 exons au total, dont 6 seraient non-codants, alors que la syncytine-B en possède un total de 9, 8 étant non-codants. Selon la base de données de GenBank, l'existence de sept transcrits différents issus d'épissages alternatifs est prédite pour la syncytine-A et la syncytine-B.

1.11 Régulation de la traduction par le 5'UTR

Alors que l'expression des gènes eucaryotes est contrôlée par l'épissage, elle est parfois aussi fortement contrôlée par la traduction et la stabilité des ARNm. Les 5'UTR joueraient un rôle important dans cette régulation. L'acquisition de 5'UTR différents se fait principalement par deux méthodes : la première étant l'utilisation d'un site d'initiation de transcription alternatif qui peut dépendre de l'existence d'un promoteur alternatif et la deuxième étant par l'ajout d'exons différents non-codants en 5' par épissage alternatif. En effet, une analyse d'épissage alternatif et de sites alternatifs d'initiation de transcription (ASTI: *Alternative Splicing and transcriptional initiation*) chez six différentes espèces eucaryotiques a permis d'estimer que la région 5'UTR d'un nombre significatif de gènes eucaryotes subit un épissage alternatif (Nagasaki *et al.*, 2005).

Il existe trois mécanismes principaux par lesquels les 5' UTR peuvent agir sur la régulation de la traduction des ARNm : les “ *upstream open reading frames* ” uORFs, les structures secondaires de l'ARNm et les séquences à proximité de l'ORF principal favorisant sa lecture par le ribosome, telles que la séquence Kozak (Mockenhaupt *et al.*, 2015 ; Noderer *et al.*, 2014).

Les uORFs ont tendance à réduire l'efficacité de traduction de l'ORF principal en aval selon plusieurs mécanismes (Figure 1.10) (Barbosa *et al.*, 2013). Généralement, les uORFs agissent sur la traduction en interagissant avec le ribosome. Ils peuvent ainsi nuire à la traduction en agissant en tant que compétiteurs de l'ORF principal: lorsque le ribosome finit de traduire l'uORF, il quitte le transcrit sans traduire l'ORF (Figure 1.10B). Il est aussi possible que le peptide produit par l'uORF bloque le ribosome, empêchant ainsi la traduction en aval (Figure 1.10C). Une autre possibilité est que le codon-stop de l'uORF soit reconnu comme étant prématuré, ce qui déclenche alors la dégradation du transcrit par un système de dégradation des ARNm non-sens médié par la protéine UPF1 (Figure 1.10D) (Mockenhaupt *et al.*, 2015 ; He *et al.*, 2015). Un exemple connu de régulation de traduction par uORF est le gène “ *adiponectin receptor 1* ” (AdipoR1), responsable de la régulation de l'assimilation du glucose par les cellules. Il a été montré que l'utilisation d'un second promoteur pour ce gène cause le remplacement de l'exon 1 habituel par un exon 1 alternatif, ce qui engendre alors l'apparition de deux uORFs qui réduisent la traduction des séquences codantes en aval (Ashwal *et al.*, 2011).

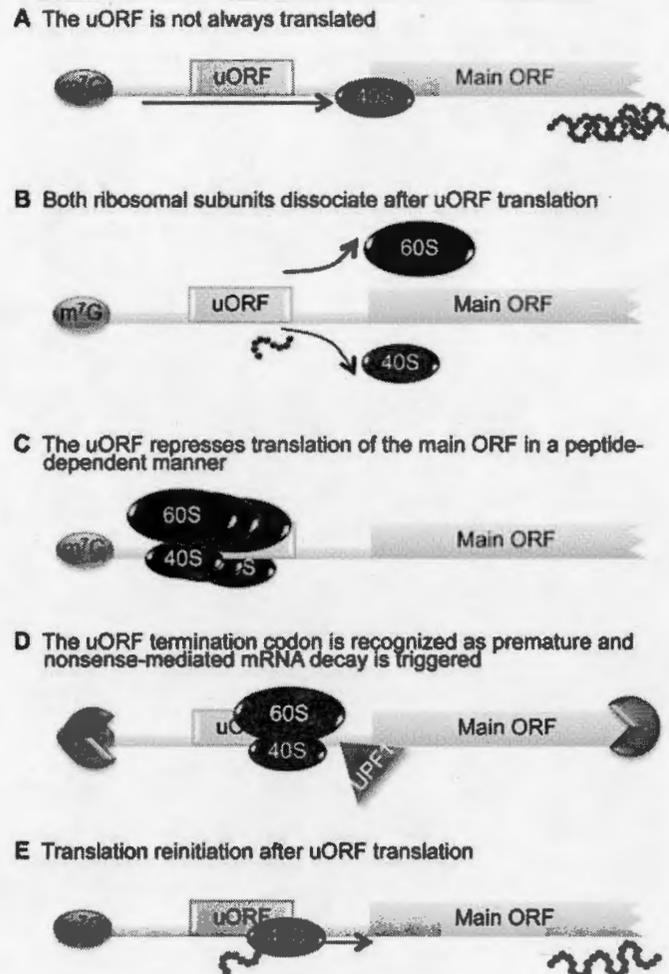


Figure 1.10 : Différents mécanismes de contrôle de la traduction par les uORFs (Barbosa *et al.*, 2013). (A) En premier lieu, il est possible que l'uORF ne soit pas reconnu par l'unité ribosomale 40S, ce qui n'engendre alors aucune conséquence sur la traduction de l'ORF principal. (B) Les sous-unités ribosomales reconnaissent l'uORF et traduisent un petit peptide. Les sous-unités ribosomales peuvent alors se détacher du transcrit, l'ORF principal restant non traduit. (C) La répression peut être causée directement par le peptide produit par l'uORF, ce dernier bloquant le ribosome. (D) Le codon stop de l'uORF est reconnu comme étant prématuré, occasionnant alors la déstabilisation de l'ARN par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens impliquant la protéine UPF1 et des ribonucléases. (E) Malgré le fait que l'uORF est reconnu par le ribosome et traduit, la machinerie de traduction peut rester associée au transcrit d'ARN et reconnaître l'ORF principal en aval.

Il existe plusieurs conditions pouvant affecter l'efficacité d'un uORF à influencer la traduction. Certaines de ses conditions dépendent de l'efficacité d'un ORF principal à être traduit, telles que la présence de séquence consensus Kozak, la distance entre la

coiffé et l'ORF ou la présence de structures secondaires. D'autres facteurs peuvent influencer le potentiel d'action des uORFs, tels que leur nombre par transcrite, leur longueur ou leur distance par rapport à l'ORF principal (Figure 1.11).

Features affecting the efficiency of the uORF-mediated translational repression

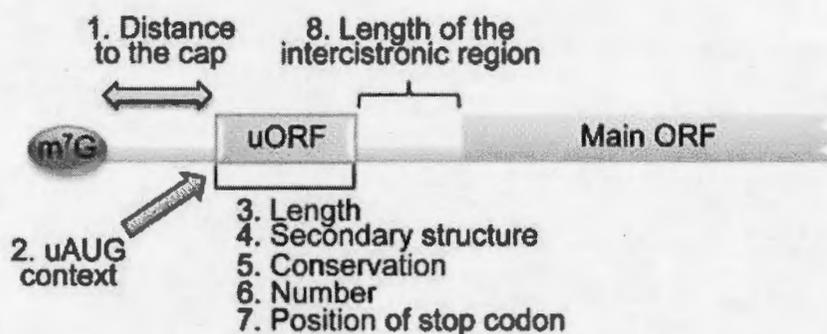


Figure 1.11 : Conditions pouvant affecter l'efficacité d'un uORF à influencer la traduction (Barbosa et al., 2013). 1. La distance entre la coiffe de l'ARNm et l'AUG de l'uORF. 2. Le contexte dans lequel l'uORF se retrouve (présence de la séquence consensus Kozak, etc.). 3. La longueur de l'uORF. 4. La présence de structures secondaires. 5. La conservation entre les espèces. 6. Le nombre d'uORFs par transcrite. 7. La position du codon de terminaison de l'uORF (position en amont ou en aval de l'AUG de l'ORF principal). 8. La longueur entre l'uORF et l'ORF principal.

Une autre stratégie de régulation par les 5'UTR est la formation de structures secondaires telles que les tiges-boucles (Mockenhaupt *et al.*, 2015). Ces structures peuvent influencer de manière positive ou négative la traduction d'un transcrite selon les mécanismes engagés.

En effet, il est connu que la formation de tige-boucles et autres structures secondaires à partir du 5'UTR peut influencer négativement la traduction du transcrite en provoquant un blocage du ribosome (Hall *et al.*, 1982; Barbendure *et al.*, 2006).

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans ces activités de régulation. Un des modèles les plus fréquents est la formation d'une structure bloquant le ribosome et empêchant ainsi le balayage du transcrit par ce dernier (Tollervey, 2006 ; Leppék *et al.*, 2018). Entre autres, un ribosome bloqué sur un transcrit peut recruter le complexe protéique Dom34/Hbs1 qui ensuite clivera l'ARNm, procédé connu sous le nom de la dégradation *No-Go* des ARNm (Figure 1.12) (Tollervey, 2006). Les structures secondaires peuvent aussi agir en *trans* sur la régulation de la traduction en recrutant des protéines pouvant se lier sur ces structures. Ces protéines peuvent ensuite inhiber, ou au contraire, augmenter la traduction d'un transcrit (Leppék *et al.*, 2018).

Un des procédés les plus connus de régulation de la traduction médiée par une structure secondaire formée dans le 5'UTR est le système IRE (*Iron Responsive Element*). La ferritine est une protéine qui séquestre les atomes de fer dans le cytoplasme pour protéger la cellule des effets toxiques de ce métal en forme libre. Les ARNm de cette protéine possèdent tous une tige-boucle conservée dans leur 5'UTR, nommée IRE. Lorsque la concentration en fer est basse, une protéine régulatrice s'y lie et empêche par conséquent le complexe de préinitiation de la traduction de s'y former. Une fois que la concentration en fer libre dans la cellule augmente, ce dernier se lie au répresseur et occasionne un changement conformationnel qui libère alors l'ARNm et permet la traduction (Leppék *et al.*, 2018).

Un exemple connu de tige-boucle ayant un effet positif sur la traduction est le transcrit RNP-4F chez la drosophile. Le transcrit existe sous deux formes: une forme courte et une forme longue, cette dernière étant formée par la rétention d'un intron de 177 nucléotides. La rétention de cet intron cause la formation d'une tige-boucle qui favorise la traduction des séquences codantes en aval (Chen, 2013). Alors que le mécanisme d'action demeure toujours inconnu, deux modèles ont été proposés : un modèle en *trans*, où la tige-boucle lie des protéines permettant de déformer la tige-

boucle, donnant ainsi l'accès aux ribosomes de se lier au AUG, et un second modèle en *cis*, où la rétention de l'intron pourrait mener à la formation d'un élément IRES (*internal ribosome entry site*), une structure permettant l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe (Chen, 2013).

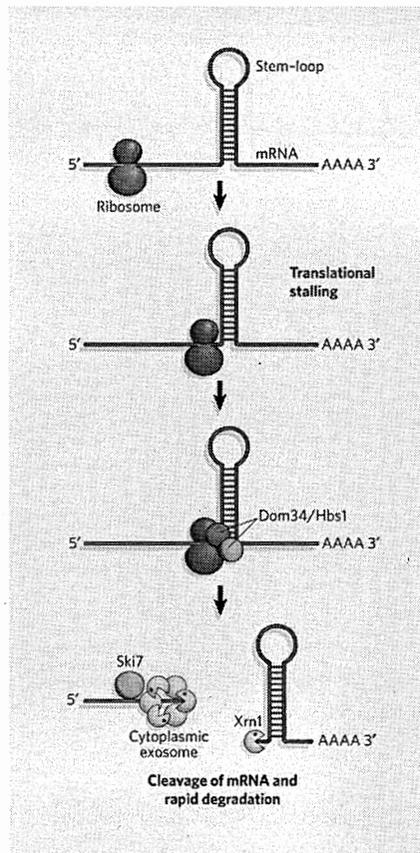


Figure 1.12 : Dégradation des ARNm *No-Go* (Tollervey, 2006). Les ribosomes bloqués par une tige-boucle sur un ARNm peuvent recruter un complexe protéique impliquant Dom34 et Hbs1 qui va ensuite être impliqué dans le clivage de l'ARNm. Les terminaisons libres de ces fragments d'ARNm sont alors digérées en 5' par l'enzyme Xrn1, tandis que le complexe enzymatique exosome recruté par Ski7 digérera l'extrémité 3'.

Finalement, il est connu que les cellules eucaryotes peuvent contrôler l'initiation de la traduction. La traduction chez les eucaryotes suit en général un modèle de balayage du transcrit, où l'appareil de préinitiation de la traduction sonde le transcrit à partir de la coiffe et forme finalement le complexe de traduction après avoir trouvé l'AUG

d'initiation de traduction. Cependant, le complexe de préinitiation ne commence pas la traduction à tous les AUG. Ceci dépend de la séquence du site d'initiation de la traduction (TIS, *translation initiation site*), qui est composé du codon AUG et des séquences environnantes (Noderer *et al.*, 2014). Il existe de nombreux TIS différents, mais le plus connu est la séquence Kozak. Ce TIS de consensus GCCRCCAUGG, où R = A ou G, est connu pour augmenter grandement l'initiation de la traduction (Kozak, 1986). Les nucléotides -3R et 4G+ (en relation au A de l'AUG) semblent les plus importants pour former un TIS fonctionnel (Noderer *et al.*, 2014).

Les uORFs, les structures secondaires et les TIS n'agissent pas indépendamment : chacun peut naturellement influencer les autres. Comme il fut mentionné plus tôt, les TIS peuvent influencer grandement le potentiel d'un uORF à recruter le complexe d'initiation de la traduction (Figure 1.11) (Mockenhaupt et Makeyev, 2015), tout comme il est aussi possible pour une structure secondaire de bloquer l'accès à un uORF (Leppek *et al.*, 2018).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

À ce jour, la région 5'UTR et l'épissage alternatif des transcrits de la syncytine-A n'ont pas été étudiés, malgré l'abondance d'études démontrant l'existence de cet ORF chez différentes espèces animales. Afin d'apporter de nouvelles connaissances et confirmer la présence des exons non-codants en 5'UTR et leur rôle possible dans la régulation de la traduction de la syncytine-A, les hypothèses de recherche associées à ce projet sont les suivantes :

Hypothèse 1 : L'épissage alternatif d'exons non-codants est bien présent sur les transcrits d'ARN de syncytine-A, non seulement chez la souris, mais aussi chez les autres espèces de la super-famille *Muroidea*.

Objectif 1 : Vérifier la présence des exons non-codants chez le rat et la souris en laboratoire et poursuivre des recherches *in silico* chez les autres espèces de la super-famille *Muroidea*.

Hypothèse 2 : Les exons non-codants de la syncytine-A ont un impact sur la régulation post-transcriptionnelle de la protéine, soit au niveau de la stabilité des transcrits ou l'influence de différentes structures (uORF / structure secondaire) sur la traduction.

Objectif 2 : Vérifier la capacité des exons non-codants à réguler la production d'une protéine à l'aide d'un système rapporteur et poursuivre des analyses *in silico* pour l'identification de tiges-boucles et d'uORF conservés dans la séquence 5' UTR.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE

3.1 Culture cellulaire

La réalisation de ce projet a requis la culture de trois lignées cellulaires : les cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293*), les cellules MCA205 (*Mouse Sarcoma Cells*) et les cellules RAT-1 (*Rat Fibroblast Cells*). L'utilisation de ces trois types cellulaires a permis de vérifier si les effets observés lors des essais de luciférase étaient conservés dans différents modèles cellulaires. Alors que les cellules MCA205 et RAT-1 ont été sélectionnées pour leur appartenance aux espèces à l'étude, les cellules HEK293T furent sélectionnées pour leur facilité de manipulation et de transfection. Qui plus est, les cellules HEK293T sont le modèle cellulaire utilisé le plus souvent dans des analyses de régulation post-transcriptionnelle. L'utilisation de trois modèles cellulaires appartenant à des espèces différentes permet de vérifier si l'effet des exons non-codants sur l'activité luciférase est dépendant d'un mécanisme commun ou spécifique. Les lignées HEK293T et RAT-1 ont été mises en culture dans le milieu DMEM alors que les cellules MCA205 ont été cultivées dans le milieu RPMI. Ces deux milieux ont été supplémentés de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules ont été maintenues en culture à 37 °C, 5% CO₂ et 95% d'humidité relative.

3.2 Alignement des exons non-codants de la syncytine-A de la souris et prédiction chez le rat.

Comme première étape, les différents transcrits de syncytine-A de la souris qui ont été identifiés et issus de GenBank ont été analysés en détail afin d'y trouver les exons non-codants (numéro d'accèsion : XM_011240874.2, XM_006504404.3, XM_011240875, XM_006504406.3, XM_011240877.2, XM_017320789.1). Le positionnement des exons sur le génome de la souris a été réalisé suite à un alignement sur le chromosome 5 de la souris (numéro d'accèsion : AF289664.1) à l'aide de BLAST et du logiciel CLC Sequence Viewer 8.0. Par la suite, afin de démontrer l'existence de ces mêmes exons non-codants chez le rat, ces derniers ont été alignés sur le chromosome 12 du rat (numéro d'accèsion : AC096474.12) à l'aide de BLAST et du logiciel CLC Sequence Viewer 8.0.

3.3 Extraction des ARN totaux des placentas de souris et de rat.

Des placentas de souris au jour embryonnaire 12.5 ont tout d'abord été obtenus du laboratoire du Dr Nicolas Pilon (UQAM) et du laboratoire de la Dre Julie Lavoie (CR CHUM). Les placentas de rat ont été obtenus du laboratoire de la Dre Géraldine Delbès (INRS-Institut-Armand-Frappier). Les placentas furent conservés à -80°C. Les ARN totaux des placentas furent ensuite extraits à l'aide du kit *RNAeasy Mini Kit* de la compagnie Qiagen™, selon les instructions du fournisseur. Le dosage des ARN a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre *NanoDrop 2000* selon les instructions du fournisseur, où la concentration en ng/μl de la suspension d'ARN est calculée selon l'absorbance de la lumière à une longueur d'onde de 260 nm. De plus, la pureté des échantillons a été vérifiée par le calcul du ratio A260/A280, où les échantillons ayant obtenu une valeur de 2.0 étaient considérés comme purs (Thermofisher™).

3.4 Détection des exons non-codants de la syncytine-A par RT-PCR

Les ARN totaux de placenta de rat et de souris (5µg) ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide d'amorces Oligo(dT)₁₈ et de 200 unités de la rétrotranscriptase M-MLV de ThermoFisher™ dans le tampon *5X First-Strand Buffer* (250 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂) supplémenté de DTT (0.1 M) et d'un mélange de dNTP (10 mM). Par la suite, les ADNc ont été utilisés pour une amplification PCR en présence de Vent® Polymérase (1 U) dans le tampon ThermoPol® de *New England Biolabs* (20 mM de Tris-HCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 10 mM de KCl, 2mM de MgSO₄, 0,1% de Triton® X-100 à pH 8.8) dans un volume total de réaction de 50 µl, comprenant les amorces (0.5 µM) permettant d'amplifier la région d'intérêt. La liste des amorces utilisées se retrouve dans le tableau 3.1. Les réactions PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de trois étapes répétées pendant 30 cycles i) dénaturation 95°C, 30 secondes, ii) appariement des amorces selon la température spécifiée pendant 30 secondes, iii) élongation à 72 °C pendant 1 minute pour finalisation de la réaction d'amplification avec une extension finale à 72°C pendant 5 minutes. Pour la souris, les amorces Souris Ex1 F et Souris Ex7 R furent utilisées avec une température d'appariement de 63°C. Chez le rat, 8 paires ont été testées avec les amorces suivantes : Rat Ex1 F, Rat Ex1'F, Rat Ex2 F, Rat Ex2'F, Rat Ex7 R et Rat Ex7'F avec une température d'appariement de 54°C. Les paires d'amorces GAPDH Souris F/R (56°C appariement) et GAPDH Rat F/R (58°C appariement) furent utilisées comme contrôle pour les réactions de rétrotranscriptions et de PCR.

Tableau 3.1 Liste des amorces PCR.

Nom de l'amorce	Séquence
SP1 Rat	5'-GGCTCTTCACCAGTGGCC-3'
SP2 Rat	5'-GTCGCTTACTGAGTCCAGGA-3'
SP3 Rat	5'-CGGTTCTACTTATGGAAGCTGGAC-3'
SP1 Souris	5'-GGCTCTTCAGGAGTGGCCC -3'
SP2 Souris	5'-AAGGCAAGGCTTCGCTCAGTCCA-3'
SP3 Souris	5'-CGGTTGTGCTTATGGAGGTTGGAC-3'
Oligo Dt Anchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
PCR Anchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTV
Ex1 Rat F	5'-GCATGAGATATCTGTTTGCCTCTTAATGAAGCTCCGA-3'
Ex1' Rat F	5'-GCATGAGATATCTATAGCCAAGCCTTTAACCA-3'
Ex2 Rat F	5'-GCATGAGATATCAACTATGCTCTCTCATTATACATAGCC-3'
Ex2 Rat F Switch	5'-GCATGAGAGGCCCCAACTATGCTCTCTCATTATACATAGCC-3'
Ex2' Rat F	5'-GCATGAGATATCATGCTGGATGAAGCCTTCCATC-3'
Ex7' Rat R	5'-GCATGAGAGGCCCCGTCTACTTATGGAAGCTGGAC-3'
Ex7 Rat R	5'-GCATGAGGCCCCGGCTCTTCACCAGTGGCC-3'
Ex7 Rat R Switch	5'-GCATGAGATATCGGCTCTTCACCAGTGGCC-3'
PromoSeq	5'-GAGCTATTCAGAAGTAGTGA-3'
GAPDH Rat F	5'-CAGCCGCATCTTCTTGTGCAG-3'
GAPDH Rat R	5'-GGGTGCAGCGAAGTTTATGATGG-3'
GADPH Souris F	5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3'
GAPDH Souris R	5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'
Ex1 Souris F	5'-GCATGGATATCTCAGCAGTTCAGTGGACGAAGCTGCT-3'
Ex1 Souris F Switch	5'-GCATGAGGCCCCTCAGCAGTTCAGTGGACGAAGCTGCT
Ex7 Souris R	5'-TCAGATGAGGCCCCGGCTCTTCAGGAGTGGCCCCACGGCC-3'
Ex7 Souris R Switch	5'-TCAGATGATATCGGCTCTTCAGGAGTGGCCCCACGGCC-3'
MutPGL3 EcoRV	5'-TCAGATGATATCGTACCGGAATGCCAAGCTT-3'
MutPGL3 APA1	5'-TCAGATGAGGCCCCGTGGTAAAGCCACCATGG-3'
GFPex F	5'-GCATGAGATATCCATGAAGCAGCAGCACTCTTCAAGTCC-3'
GFPex F Switch	5'-GCATGAGGCCCCCATGAAGCAGCAGCACTCTTCAAGTCC-3'
GFPex R	5'-TCAGCTGAGGCCCCGTGGTTGTCGGGCAGCAGCA-3'
GFPex R Switch	5'-TCAGCTGATATCGTGGTTGTCGGGCAGCAGCA-3'
Ex2-C Rat F	5'-GCATGAGATATCAGTGTACGTGGGCACTCATGAA-3'
Ex2-C F Rat Switch	5'-GCATGAGGCCCCAGTGTACGTGGGCACTCATGAA-3'
Ex2-C Souris F	5'-GCATGAGATATCAGTCTACTTGGGCACGAACAAGCCGTC-3'
Ex2-C Souris F Switch	5'-GCATGAGGCCCCAGTCTACTTGGGCACGAACAAGCCGTC-3'
Oligo(dT) ₁₈	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
pJETF	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
qPCR GAPDH-F	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
qPCR GAPDH-R	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'
qPCR Luci-F	5'-TTTGTGCCAGAGTCCTTCGA-3'
qPCR Luci-R	5'-CACGCAGGCAGTCTATGAGG-3'
qPCR eGFP-F	5'-CCACATGAAGCAGCAGGACTT-3'
qPCR eGFP-R	5'-GGTGCGCTCCTGGACGTA-3'

Jaune = EcoRV Mauve = Apa1

3.5 5'RACE

Des analyses 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA End*) ont été effectuées sur les ARN totaux de placenta de souris et de rat à l'aide du kit 5'/3' RACE kit, 2nd Generation de la compagnie RocheTM, selon les instructions du fournisseur. La première étape du 5'RACE a consisté en une rétrotranscription (RT) ciblant exclusivement les transcrits d'intérêts. La synthèse de ce premier brin d'ADN s'effectue à l'aide de la transcriptase inverse (1 U) fournie dans le kit et du tampon *cDNA Synthesis Buffer* (250 mM de Tris-HCl, 40 mM de MgCl₂, 150 mM de KCl, 5 mM de dithiothreitol, pH 8.5). Pour l'ARN de souris, l'amorce spécifique SP1 Souris fut choisie, alors que SP1 Rat a été utilisée pour le rat. Le produit de la RT a ensuite été purifié à l'aide du kit *EZ-10 Spin Colum PCR Products Purification Kit* de la compagnie BioBasic.

La troisième étape a ensuite consisté en l'ajout d'une queue polyA à l'extrémité 5' de l'ADNc à l'aide de la *Terminal Transferase* (1U) dans le tampon *Reaction buffer* (100 mM de Tris-HCl, 15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, pH 8.3). Une première PCR nichée a été alors réalisée dans le but d'amplifier l'ADNc à partir de cette même queue polyA. Les amorces utilisées ont été la OligoDt Anchor et les amorces spécifiques SP2 Souris/Rat à une température d'appariement de 58°C. La polymérase Vent fut utilisée avec les mêmes conditions décrites pour les RT-PCR.

La dernière étape, une seconde PCR nichée à partir de l'amplicon obtenu à la première PCR, a été effectuée à l'aide des amorces PCR Anchor et SP3 Souris/Rat. La polymérase Vent fut utilisée avec les mêmes conditions décrites pour les RT-PCR.

3.6 Clonage des produits de RT-PCR et de 5'RACE dans Pjet1.2/blunt

Les produits de RT-PCR et de 5'RACE ont été isolés à l'aide du kit de purification de produit PCR (BioBasic) et clonés directement dans le vecteur pJET1.2/blunt à l'aide du kit *CloneJET PCR Cloning* (ThermoFisher™). Des bactéries *E. Coli* DH5 α compétentes ont été utilisées pour la transformation bactérienne. La croissance des bactéries fut effectuée sur ampicilline (100 μ g/ml) et la sélection des colonies transformées a été directe, puisque pJET1.2/blunt possède un gène suicide. L'ADN plasmidique des bactéries a été extrait à l'aide d'un kit *EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps* (BioBasic) et a ensuite été séquencé à l'aide de l'amorce pJETF à la plateforme de séquençage et génotypage (CRCHUL) de l'Université Laval.

3.7 Mutation du vecteur pGL3-Promoter

Afin de reproduire le modèle expérimental d'Ashwal *et al.* (2011), permettant d'évaluer l'influence de la région 5'UTR sur la régulation post-transcriptionnelle des transcrits, un vecteur pGL3-Promoter mutant a été construit. Un nouveau vecteur pGL3-Promoter fut généré en premier lieu par PCR inverse, dans lequel les sites de restrictions ApaI et EcoRV furent introduits.

Une réaction PCR inverse fut premièrement réalisée sur 0.5 μ g du vecteur pGL3-Promoter avec la polymérase *Phusion® High Fidelity DNA Polymerase* (1 U) dans le tampon *Phusion Buffer* (New England BioLabs). Les amorces utilisées étaient Mut PGL3 EcoRV et Mut PGL3 APAI. Les réactions PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de trois étapes répétées pendant 35 cycles i) dénaturation à 95°C pendant 45 secondes, ii) appariement des amorces à 63°C pendant 45 secondes, iii) élongation à 72 °C pendant 5 minutes pour finir avec une extension finale à 72°C pendant 7 minutes. Par la suite,

les produits PCR ont été traités à la PNK (10U) (*T4 Polynucleotide Kinase*) avec le tampon *T4 PNK Reaction Buffer* avant de procéder à une ligation à 4 °C pendant la nuit à l'aide de la T4 DNA Ligase (120U) dans le tampon *T4 DNA Ligase Buffer* (New England Biolabs). Avant de procéder à la transformation, le mélange a été traité à l'enzyme DPNI (10U) dans le buffer Cutsmart® (New England Biolabs) à 37°C pendant 20 minutes, afin d'éliminer les traces d'ADN plasmidique pGL3-Promoter non-muté. Les bactéries *E. Coli* DH5 α compétentes ont été transformées par le produit de ligation et cultivées dans l'ampicilline. Le plasmide des différentes colonies a ensuite été extrait à l'aide du kit *EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps*.

3.8 Clonage des exons non-codants de rat et de souris en amont du gène rapporteur luciférase.

Afin de tester la capacité à réguler des exons non-codants de souris et de rat, ces derniers ont été clonés devant le gène de la luciférase dans le vecteur mutant pGL3-Promoter préparé précédemment. Pour chaque construction, une version contrôle inversée a été également créée. Ces dernières ont été obtenues en amplifiant la même région, mais avec les sites enzymatiques ApaI et EcoRV interchangeés entre l'amorce *forward* et l'amorce *reverse*. Ces amorces ont été identifiées par le terme "switch". La liste des constructions se retrouve au tableau 3.2. Chaque construction a été obtenue en suivant la même méthodologie générale : (1) amplification PCR de la région voulue à l'aide d'amorces spécifiques comportant les sites enzymatiques EcoRV en 5' et ApaI en 3' (Tableau 3.1). Pour la version inversée, le site ApaI se retrouve en 5' et le site EcoRV se retrouve en 3'. Les constructions pJET1.2 contenant les différentes combinaisons d'exons d'intérêts ont été utilisées comme ADN de départ. Pour les constructions Témoin Sens et Antisens, un plasmide pLVX-GFP fut utilisé comme ADN de départ afin de fournir une séquence d'ADN aléatoire. Les

conditions PCR sont les mêmes que celles utilisées lors des RT-PCR avec des températures d'appariement allant de 54 °C à 63 °C. (2) Migration du produit PCR sur gel d'agarose 1% et isolation de l'amplicon avec le kit *EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Minipreps Kit* de la compagnie BioBasic. (3) Digestion des inserts nouvellement isolés ainsi que du vecteur pGL3-Promoter mutant avec les enzymes EcoRV et ApaI. (4) Ligation à 4°C pendant la nuit avec la T4 ADN ligase. (5) Transformation des bactéries *E. Coli* DH5 α avec les mélanges de ligation, suivie de l'extraction des plasmides avec le kit *EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps*. (6) Séquençage des constructions avec l'amorce Promoseq à la plateforme de séquençage et génotypage (CRCHUL). (7) Préparation de Maxi Prep à l'aide du kit *EZ-500 Column Plasmid DNA Maxi-preps Kit* de la compagnie *New England BioLabs*.

Tableau 3.2 : Amorces utilisées pour chaque construction luciférase

Constructions	Matériel de départ	Amorces utilisées
Souris 1257	Pjet-Exon1257-Souris-C1	Ex1 Souris F
		Ex7 Souris R
Souris 7521	Pjet-Exon1257-Souris-C1	Ex1 Souris F Switch
		Ex7 Souris R Switch
Souris 257-C	Pjet-Exon1257-Souris-C1	Ex2-C Souris F
		Ex7 Souris R Switch
Souris 752-C	Pjet-Exon1257-Souris-C1	Ex2-C Souris F Switch
		Ex7 Souris R Switch
Rat 257	Pjet-Exon257-Rat-C1	Ex2 Rat F
		Ex7 Rat R
Rat 752	Pjet-Exon257-Rat-C1	Ex2 Rat F Switch
		Ex7 Rat R Switch
Rat 27	Pjet-Exon27-Rat-C1	Ex2 Rat F
		Ex7 Rat R
Rat 72	Pjet-Exon27-Rat-C1	Ex2 Rat F Switch
		Ex7 Rat R Switch
Rat 257-C	Pjet-Exon257-Rat-C1	Ex2-C Rat F
		Ex7 Rat R
Rat 752-C	Pjet-Exon257-Rat-C1	Ex2-C F Rat Switch
		Ex7 Rat R Switch
Témoin Sens	PhCMV-GFP	GFPex F
		GFPex R
Témoin Antisens	PhCMV-GFP	GFPex F Switch
		GFPex R Switch

3.9 Transfection des différentes constructions dans les cellules HEK293T, MCA205 et RAT-1.

Pour chaque type cellulaire, 50 000 cellules/puits ont été déposées dans une plaque de 24 puits et laissées incuber à 37°C, et 5% CO₂ pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été transfectées en triplicata avec 400 ng du plasmide d'intérêt et 100 ng

du plasmide contrôle de transfection (pRc-Actin-LacZ) à l'aide d'une solution de polyéthylèneimine (PEI) 1mg/ml à un ratio de 1 µg d'ADN: 7 µl PEI. À 24 h après transfection, les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon adapté aux dosages de l'activité de la β-galactosidase et de la luciférase du kit Tropix® (Applied Biosystems). Les transfections ont été répétées indépendamment trois fois pour chaque condition.

3.10 Dosage de l'activité luciférase et beta-galactosidase

L'activité luciférase de chaque lysat cellulaire (section 3.9) a été mesurée par l'ajout d'un tampon contenant la luciférine (20 nM de tricine, 1.07 mM de $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,67 mM de MgSO_4 , 0,1 mM de EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*), 220 µM de coenzyme A, 4.7 µM de D-luciférine, 530 µM d'ATP et 33.3 mM de DTT). L'activité de la β-Galactosidase a été mesurée à l'aide du kit Tropix® (Applied Biosystems) selon les instructions du fournisseur. L'activité des deux enzymes a été mesurée en triplicata pour chaque lysat à l'aide du *Microtiter Plate Luminometer* (DYNEX MLX). Les résultats des essais de luciférase ont d'abord été normalisés sur les niveaux de β-galactosidase et ensuite mis en relation avec les résultats de transfection du vecteur pGL3-Promoter (vecteur vide) dont les valeurs ont été fixées à une valeur de 100%.

3.11 Analyse de la présence des exons non-codants de la syncytine-A chez le hamster syrien doré, le campagnol des prairies et la souris sylvestre

Les banques de données de GenBank furent analysées afin de trouver des transcrits chez d'autres espèces de la super-famille *Muroidea*. Deux différents transcrits ont été trouvés chez le hamster et la souris sylvestre (numéro d'accèsion, XM_021233118.1, XM_021233119.1, XM_016001127.1, NM_001305389.1). Chez le campagnol des

prairies, un seul transcrit a été répertorié (NM_001305390.1). Les transcrits sont classifiés comme étant prédits ou réels. Les transcrits prédits (numéro d'accèsion commençant par XM) représentent des modèles obtenus à partir du système d'annotation du génome de NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) ou obtenus à partir des soumissions annotées générées informatiquement du INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*). Ils représentent les transcrits prédits à partir des contigs NCBI RefSeq. Les transcrits réel (NM) sont des transcrits qui ont été soumis à la base de données RefSeq par des équipes de recherche. Ces nouveaux transcrits ont été alignés avec les exons 2, 5 et la partie non codante de l'exon 7 du rat et de la souris, à l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer 8.0.

3.12 Analyses RT-qPCR préliminaires.

Six millions de cellules HEK293T ont été déposées dans 6 boîtes de pétris de 10 cm (1 000 000 cellules / puits) et laissées incubées à 37°C, et 5% CO₂ pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été co-transfectées en duplicata avec 2,5 µg du plasmide d'intérêt (pGL3-Promoter, Souris 1257 ou Souris 7521) et 2,5 µg du plasmide contrôle de transfection (pLVX-eGFP) à l'aide d'une solution de polyéthylèneimine (PEI) 1mg/ml à un ratio de 1 µg d'ADN: 7 µl PEI. Les ARN totaux des cellules transfectées furent ensuite extraits à l'aide du kit *RNAeasy Mini Kit* de la compagnie Qiagen™ avant d'être traités avec une ADNase sans présence d'ARNase, selon les instructions du fournisseur. Le dosage de l'ARN a été réalisé tel que décrit à la section 3.3. Les échantillons d'ARN (1µg) ont ensuite été rétrotranscrits à l'aide de la rétrotranscriptase M-MLV de ThermoFisher™ selon les conditions de la section 3.4. La qPCR fut ensuite réalisée à l'aide d'un *CFX96 Touch Thermal cycler* (Bio-Rad) en utilisant le mélange à qPCR *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad). De courtes régions de la GADPH, eGFP et luciférase ont été amplifiées en utilisant

respectivement les paires d'amorces : qPCR GAPDH-F / qPCR GAPDH-R, qPCR eGFP-F / qPCR eGFP-R et qPCR Luci-F / qPCR Luci-R. Le programme qPCR consiste en une première étape à 95°C suivie par 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 30 secondes à 58°C. Les résultats de l'expression quantitative du gène de la luciférase ont été normalisés sur les niveaux d'expression de eGFP (contrôle de transfection) et l'expression de GAPDH (contrôle de rétrotranscription).

3.13 Tests statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Lors des transfections, une même construction était transfectée dans trois puits différents. Les activités luciférase et β -galactosidase de ces puits ont été mesurées à leur tour en triplicata et les expériences ont été répétées 3 fois indépendamment. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm l'écart-type. Les analyses statistiques ANOVA suivie des tests post hoc Tukey HSD ont été réalisées avec le programme JMP.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Identification des exons non-codants dans les transcrits de syncytine-A de souris et de rat

4.1.1 Positionnement théorique des exons non-codants de la syncytine-A dans le génome de la souris et du rat

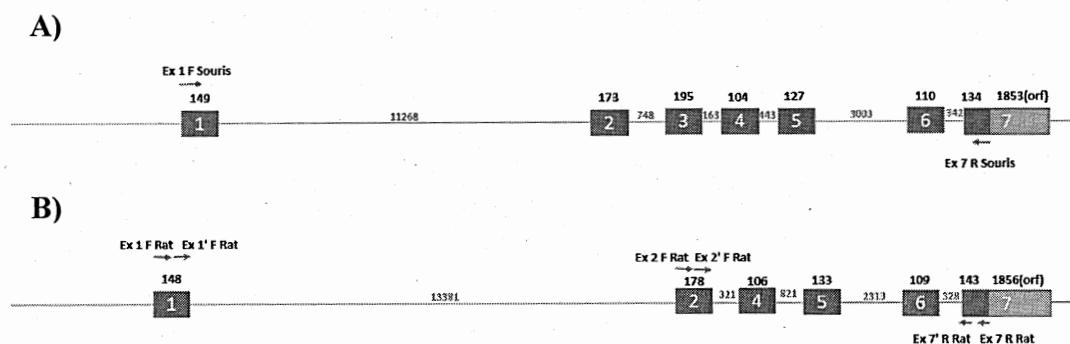


Figure 4.1 : Schématisation des exons des transcrits de la syncytine-A. Boîtes bleues = exons non-codants, boîtes vertes = exons codants, flèches orange : amorces (A). L'analyse des transcrits de la syncytine-A prédits par GenBank et identifiés par Dupressoir *et al.* (2005) permet de positionner les divers exons non-codants retrouvés sur le chromosome 5 de souris. (B) En comparant les exons prédits chez la souris avec le génome du rat, il a ensuite été possible d'identifier des séquences similaires sur le chromosome 12 de rat. Les amorces marquées d'un « ' » sont positionnées au milieu de l'exon. Les nombres dans les exons représentent la longueur des exons en pb, alors que les nombres entre les exons représentent la longueur des introns (pb).

Dans le but de mieux comprendre la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène syncytine-A chez la superfamille des *Muroidea*, nous avons débuté notre

étude par une comparaison de l'emplacement potentiel des exons non-codants de la syncytine-A entre le génome de la souris et celui du rat. Pour se faire, les différents exons retrouvés dans les transcrits prédits de souris ont d'abord été positionnés sur son chromosome 5. En recherchant les séquences équivalentes de ces exons dans le génome de rat, il fut alors possible de positionner de tels exons non-codants potentiellement inclus dans les transcrits de la syncytine-A de rat. Ces analyses ont démontré que la disposition et la séquence de ces exons non-codants sur leur chromosome respectif semblent être fortement conservées, sauf à l'exception de l'exon 3, qui ne semble pas avoir d'équivalent chez le rat. Les séquences des introns étaient cependant moins conservées, comme attendu.

4.1.2 Conception des amorces pour l'amplification des exons non-codants de la syncytine-A

Afin de confirmer la présence des exons non-codants mentionnés à la figure 4.1 dans les transcrits de la syncytine-A, des analyses de RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN totaux isolés de placentas de souris et de rat. Pour ce faire, des amorces spécifiques aux exons non-codants prédits ont été conçues pour amplifier la région 5'UTR des transcrits.

Puisque les transcrits de souris ont été obtenus à l'aide de GenBank et étaient basés sur une analyse plus fiable, une paire d'amorces commençant à l'extrémité 5' de l'exon 1 (**EX 1 F Souris**) et finissant par l'extrémité 3' de la partie non-codante de l'exon 7 (**Ex 7 R Souris**) fut générée en premier lieu. Cette paire d'amorces permettrait alors d'avoir en théorie une amplification complète du 5'UTR du transcrit. Pour ce qui est du rat, puisque le positionnement des exons dépendait d'une comparaison avec la souris, la conception de plusieurs amorces différentes fut requise. Alors que les amorces **Ex 1 F Rat** et **Ex 2 F Rat** commencent à l'extrémité 5' des exons prédits, les versions **Ex 1' F Rat** et **Ex 2' F Rat** sont spécifiques à une séquence interne prédite de l'exon. Pour ce qui est des amorces "reverses", l'amorce

Ex 7' R Rat représente l'extrémité 5' de l'exon 7, alors que l'amorce **Ex 7 R Rat** est spécifique à l'extrémité 3' de la région non-codante de l'exon 7. L'utilisation de ces différentes paires d'amorces permettait ainsi un dépistage de la présence des exons prédits chez le rat, en dépit du fait qu'un des exons est absent ou incomplet.

4.1.3 Amplification RT-PCR de la région 5'UTR des transcrits de syncytine-A chez la souris et le rat

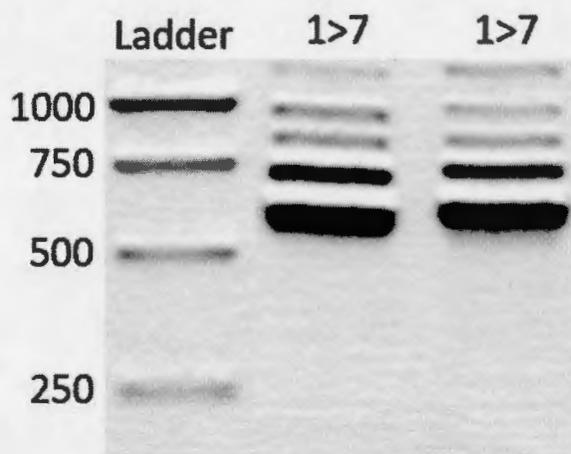


Figure 4.2 : Amplification RT-PCR des exons non-codants de syncytine-A à partir d'ARN totaux de placenta de souris au jour embryonnaire 12.5. Une RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN total d'un placenta de souris au jour embryonnaire 12.5 avant d'être migrée sur un gel d'agarose 1%. Les puits 2 et 3 représentent une amplification d'un transcrit bordée par les exons 1 et 7 (duplicata). Les amorces utilisées sont représentées à la figure 4.1A. Le standard de poids moléculaire est le GeneRuler™ 1kb DNA ladder.

Des analyses RT-PCR à partir des ARN totaux de rat et de souris ont été réalisées dans le but d'amplifier les régions 5'UTR des transcrits de la syncytine-A contenant les exons non-codants et de les cloner dans un vecteur Pjet1.2 pour ultimement les séquencer. Tel qu'indiqué à la figure 4.2, l'amplification de la région entre l'extrémité 5' de l'exon 1 jusqu'à l'extrémité 3' de la partie non-codante de l'exon 7 du transcrit de la syncytine-A chez la souris est un succès. De plus, la présence de cinq bandes distinctes (1200, 970, 870, 730 et 600 pb) témoigne de l'existence d'un épissage

alternatif tel que prédit par GenBank et observé précédemment par Dupressoir *et al*, (2005).

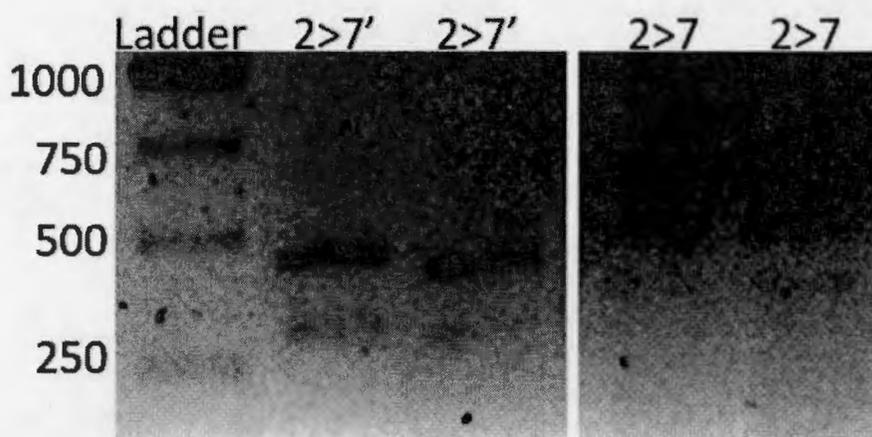


Figure 4.3 : Amplification RT-PCR des exons non-codants de la syncytine-A à partir d'ARN totaux de placenta de rat au jour embryonnaire 12.5. Une analyse RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN total d'un placenta de rat au jour embryonnaire 12.5 avant d'être migrée sur un gel d'agarose 1%. Les puits 2 et 3 représentent une amplification en duplicata entre l'extrémité 5' de l'exon 2 et l'extrémité 5' de l'exon 7 (2>7'). Les puits 4 et 5 représentent une amplification en duplicata entre l'extrémité 5' de l'exon 2 et l'extrémité 3' de la région non-codante de l'exon 7 (2>7). Les amorces utilisées sont représentées à la figure 4.1B. Le standard de poids moléculaire est le GeneRuler™ 1kb DNA ladder.

Suite à l'analyse RT-PCR effectuée chez le rat (figure 4.3), quelques différences ont été observées comparativement aux résultats obtenus chez la souris. En premier lieu, aucun amplicon n'a été détecté à la suite d'analyses RT-PCR effectuées avec une amorce forward spécifique à l'exon 1 (résultats non présentés), ce qui suggère que ce dernier semble être absent des transcrits de rat. Ce n'est qu'en amplifiant à partir de l'exon 2 qu'un produit PCR est généré (puits 1 à 4, résultats avec l'amorce 2' non présentés). Deux bandes furent obtenues pour les deux amplifications. Pour l'amplification entre l'extrémité 5' de l'exon 2 et l'extrémité 5' de l'exon 7 (2>7'), la première bande a une longueur d'un peu moins de 500 pb, alors que la deuxième est d'environ 300 pb. Pour l'amplification entre l'extrémité 5' de l'exon 2 et l'extrémité 3' de la région non-codante de l'exon 7 (2>7), la première bande a une longueur

quelque peu au-dessus de 500 pb, alors que la deuxième bande a une longueur d'environ 400 pb. Il est à noter que pour l'amplification 2>7, la deuxième bande est beaucoup moins apparente que l'amplification 2>7'. La présence de deux bandes permet pour l'instant de soupçonner que les transcrits de la syncytine-A chez le rat subissent eux aussi un épissage alternatif comme chez la souris, quoique moins divers puisque cinq bandes ont été obtenues lors des analyses RT-PCR chez la souris (Figure 4.2) contrairement à deux chez le rat. Afin de déterminer les séquences de ces épissages alternatifs, le produit PCR correspondant à l'amplification 2>7 chez le rat (Figure 4.3, puits 4 et 5), ainsi que le produit PCR de la figure 4.2 ont été directement purifiés et clonés dans le vecteur pJet1.2 à des fins de séquençage. L'amplicon 2>7 chez le rat a été choisi puisqu'il contenait la plus grande séquence, commençant au début de l'exon 2 et finissant à la fin de la partie non-codante de l'exon de 7.

4.1.4 Analyse des produits RT-PCR

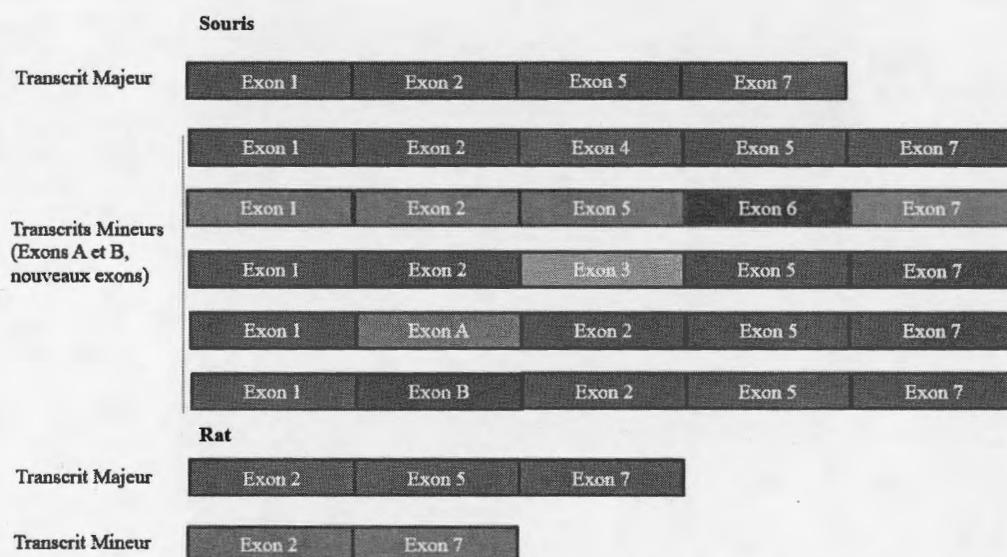


Figure 4.4 : Confirmation de la présence des exons non traduits de la syncytine-A en plus de leur épissage alternatif chez la souris et le rat obtenue par séquençage des produits RT-PCR. Les produits des analyses RT-PCR de la souris (puits 2 et 3, Figure 4.2) et du rat (puits 4 et 5, Figure 4.3) furent clonés dans un vecteur pJet1.2/blunt et séquencés.

Après le séquençage des produits de RT-PCR, différents types de transcrits ont été identifiés chez les deux espèces, particulièrement chez la souris. Il fut premièrement observé qu'un transcrit majeur comportant les exons 1, 2, 5 et la partie non-codante de l'exon 7 (pour une longueur totale de 583 pb) était présent. Il était aussi possible de constater la présence d'un épissage alternatif, où les exons 3, 4 ou 6 se rajoutent aux transcrits, mais à une fréquence moindre que le transcrit majeur. Ces résultats de séquençage correspondent seulement en partie aux résultats obtenus lors des expériences de RT-PCR (Figure 4.2). Alors que la bande correspondant à une longueur d'environ 600 pb correspond bien au transcrit majeur séquencé et que la bande d'une longueur d'environ 730 pb pourrait correspondre aux transcrits mineurs ayant l'exon 3 ou 6 (778 pb ou 693 pb), les bandes de longueurs supérieures (870 pb, 970 pb et 1200 pb) ne correspondent pas aux séquences obtenues. L'amplicon ayant la plus grande taille, soit celui incorporant l'exon 3, n'a qu'une longueur de 778 pb. La fréquence des différents épissages alternatifs observés lors du séquençage (Figure 4.4) est cependant concordante à l'intensité des signaux de RT-PCR chez la souris (Figure 4.2). Le signal correspondant au transcrit majeur (bande d'environ 600 pb) est en effet celui étant le plus élevé, alors que les signaux les plus faibles semblent correspondre aux transcrits alternatifs moins fréquents. Deux nouveaux exons (Exon A et Exon B) (absents dans les banques de données de GenBank), se retrouvant entre l'exon 1 et 2 dans leur transcrit respectif, ont aussi été identifiés. Il est à noter que, contrairement aux exons 3, 4 et 6 qui ont été retrouvés sur plusieurs transcrits, ces nouveaux exons (Exon A et Exon B) n'ont été identifiés pour un seul clone séquencé.

Chez le rat, la diversité des transcrits est nettement moindre comparativement à la souris. En effet, seuls deux types de transcrits différents ont été identifiés, le premier comportant les exons 2, 5 et 7 et le second contenant les exons 2 et 7. Tout comme la souris, il semble y avoir présence d'un transcrit majeur correspondant à la majorité des clones identifiés. Cependant, les résultats de séquençage chez le rat montrent

certaines divergences avec les résultats obtenus en RT-PCR (Figure 4.3). Le transcrit majeur (exons 2, 5 et 7) et le transcrit mineur (exons 2 et 7) ont respectivement une longueur de 454 pb et 321 pb, alors que les bandes retrouvées dans les puits 4 et 5 de la figure 4.3 correspondent à une longueur d'un peu plus de 500 pb et 400 pb. Comme chez la souris, la bande correspondant au transcrit majeur semble correspondre au signal le plus abondant.

4.1.5 Amplification de l'extrémité 5' des transcrits de syncytine-A par 5'RACE

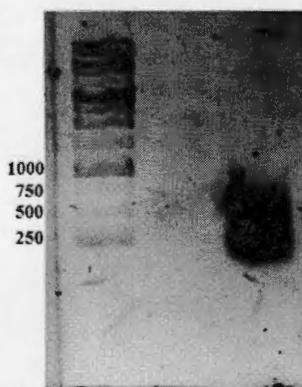


Figure 4.5 : Amplification finale 5'RACE à partir du début de l'exon 7 du transcrit de la syncytine-A de souris. Une analyse 5'RACE fut réalisée à partir de l'ARN total de placentas de souris au jour embryonnaire 12.5. Le produit de l'amplification finale a été migré sur un gel d'agarose 1%. Le standard de poids moléculaire est le GeneRuler™ 1kb DNA ladder.

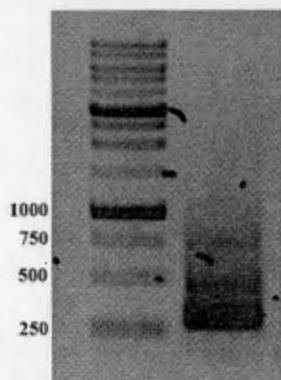


Figure 4.6 : Amplification finale 5'RACE à partir du début de l'exon 7 du transcrit de la syncytine-A de rat. Une analyse 5'RACE fut réalisée à partir de l'ARN total de placentas de rat au jour embryonnaire 12.5. Le produit de l'amplification finale a été migré sur un gel d'agarose 1%. Le standard de poids moléculaire est le GeneRuler™ 1kb DNA ladder.

Des analyses de type 5'RACE ont été effectuées par la suite afin de répondre à trois objectifs : (i) confirmer les résultats de RT-PCR, (ii) identifier la présence potentielle d'exons en amont de l'exon 1 chez la souris et en amont de l'exon 2 chez le rat et (iii) finalement identifier l'extrémité 5' réelle des transcrits ciblés. Les figures 4.5 et 4.6 montrent le produit d'amplification final obtenu par 5'RACE respectivement pour la souris et le rat. Une différence notable entre les deux espèces est la présence de bandes claires et distinctes chez le rat, alors que les signaux chez la souris sont moins nets.

4.1.6 Analyse de la région 5' des transcrits de la syncytine-A chez le rat et la souris et confirmation des résultats de RT-PCR

Une fois les clones de 5'RACE séquencés, ces derniers ont pu être alignés contre une séquence témoin composée des exons 1-2-3-4-5-6-7 (partie non-codante) chez la souris et 2-5-7 (partie non-codante) chez le rat afin de répondre aux objectifs de la section 4.1.5.

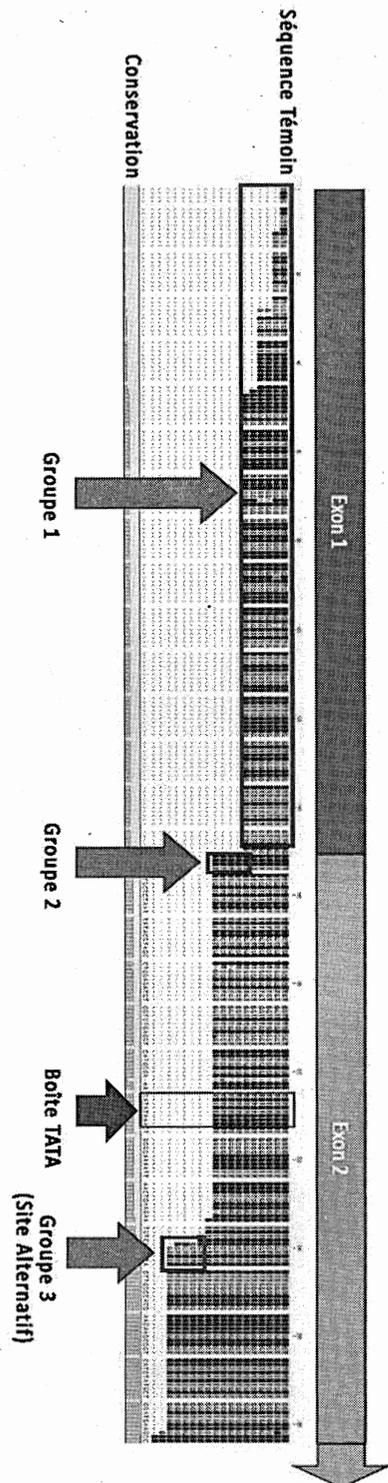


Figure 4.7 : Alignement des résultats de séquençage de S'RACE de souris. Les produits d'amplification S'RACE des transcrits de la syncytine-A de souris furent clonés dans le vecteur pJet1.2/blunt. Les constructions ont ensuite été séquencées. Les séquences ont été alignées selon leur correspondance à la séquence témoin. La flèche rouge pointe la boîte TATA. Les flèches bleues pointent les différents groupes dans lesquels on peut diviser les transcrits.

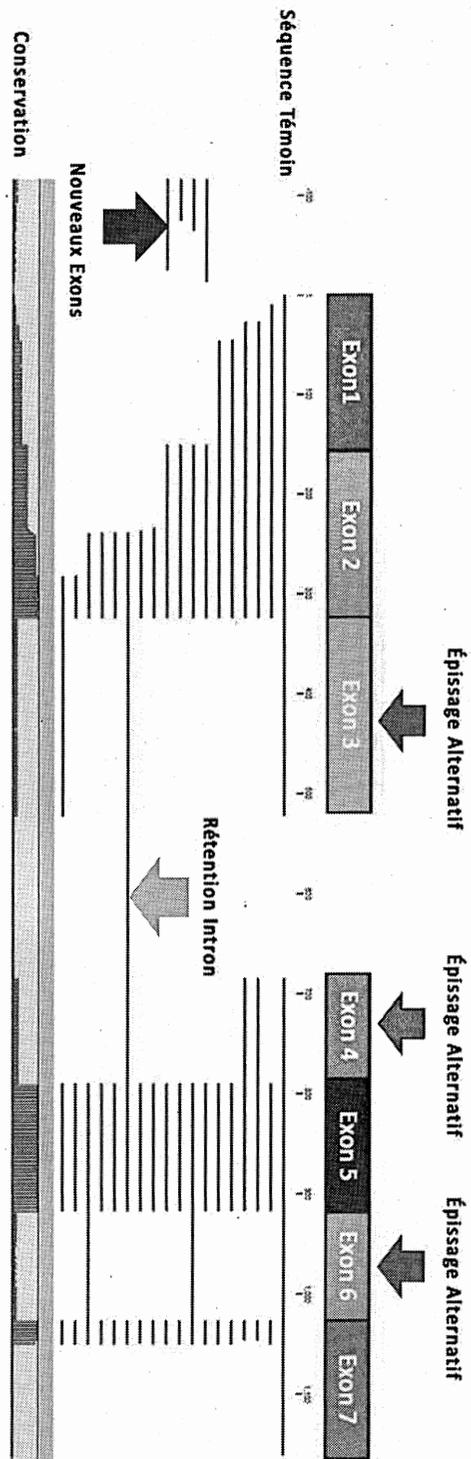


Figure 4.8 : Alignement des résultats de séquençage de *SIRACE* de souris (vue d'ensemble). Représentation en vue d'ensemble des résultats de la figure 4.7. Les flèches bleues indiquent les différents événements d'épissage alternatifs. La flèche mauve indique la présence de nouveaux exons. La flèche verte indique la présence d'une rétention d'intron.

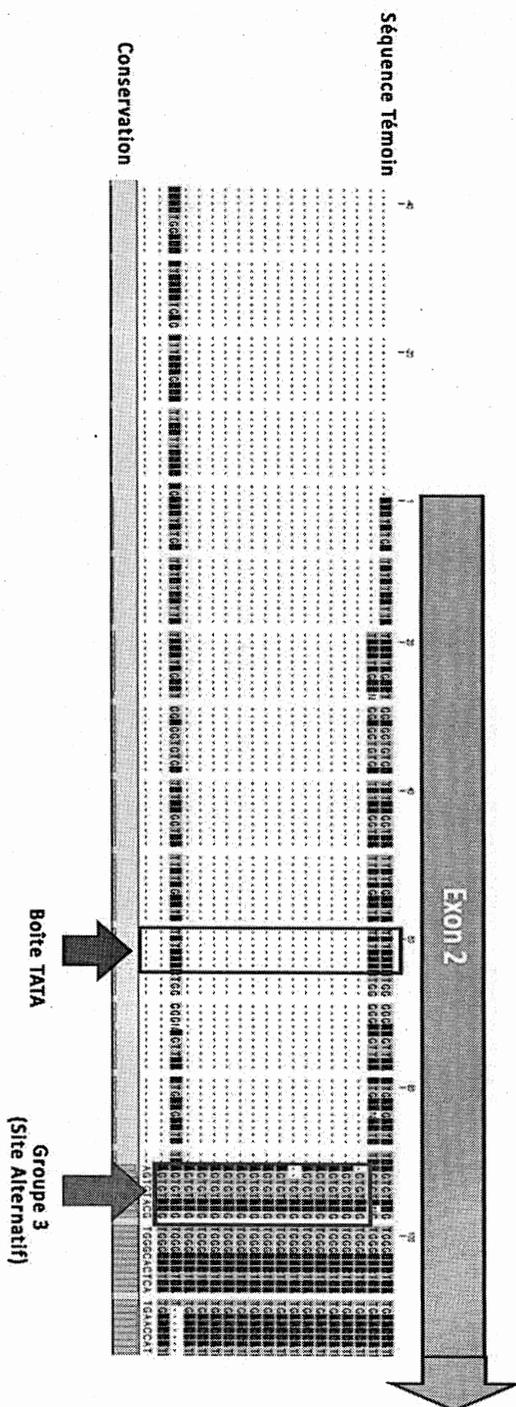


Figure 4.9 : Aligement des résultats de séquençage de 5'RACE de rat. Les produits d'amplification 5'RACE des transcrits de la syncytine-A de rat furent clonés dans le vecteur pJet1.2/blunt. Les constructions ont ensuite été séquencées. Les séquences ont été alignées selon leur correspondance à la séquence témoin. La flèche rouge pointe la boîte TATA. Les flèches bleues pointent les différents groupes dans lesquels on peut diviser les transcrits.

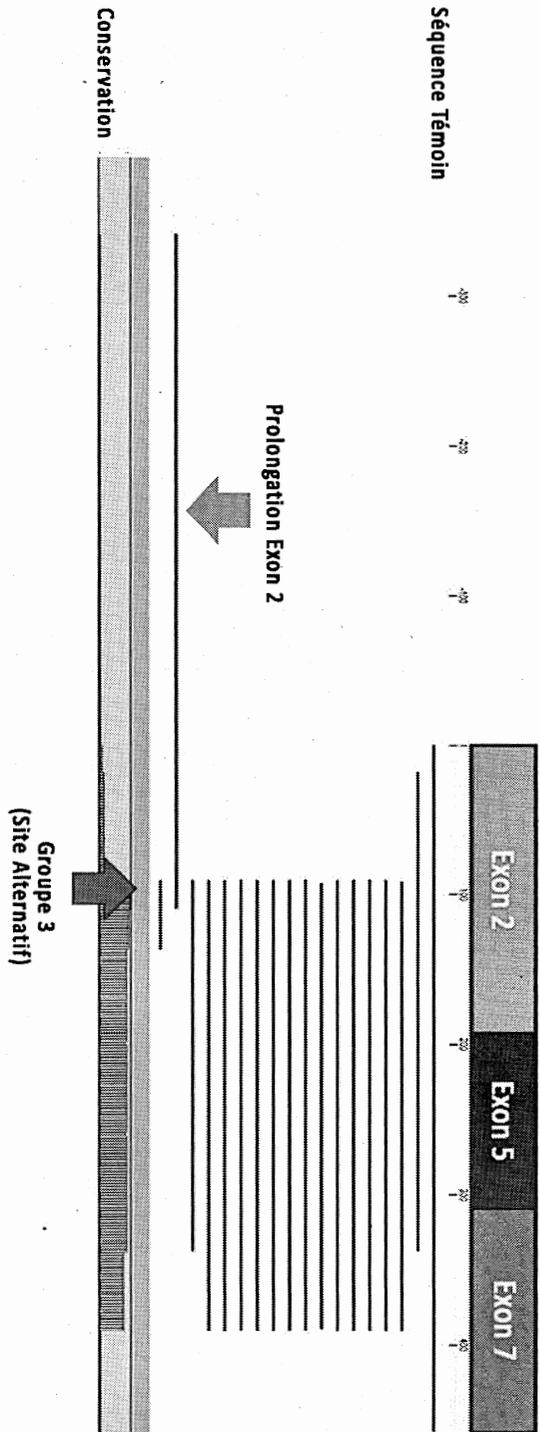


Figure 4.10 : Alignement des résultats de séquençage de 5'RACE de rat (vue d'ensemble). Représentation en vue d'ensemble des résultats de la figure 4.9. La flèche bleue indique les transcrits obtenus par l'utilisation d'un promoteur et site d'initiation de transcription alternatif (Groupe 3). La flèche orange indique un prolongement de l'exon 2.

À la suite des alignements des séquences 5'RACE des transcrits de la syncytine-A chez la souris (Figure 4.7 et 4.8), il est possible de constater une variation plus importante que celle suggérée dans les analyses RT-PCR dans l'ensemble des transcrits identifiés. Ainsi, peuvent les transcrits peuvent être classifiés en 3 grands groupes. Le groupe 1 est celui dont les transcrits incluent l'exon 1 sans pour autant atteindre l'extrémité 5' qui fut prédite par GenBank et identifiée en RT-PCR. Un second groupe correspond à des séquences dont l'alignement à la séquence témoin s'arrête subitement à l'extrémité 5' de l'exon 2 (Figure 4.7). Cependant, une analyse plus fine de ces transcrits suggère l'existence d'un exon supplémentaire en amont de l'exon 2. Ces nouveaux exons ne correspondent pas à l'exon 1. De plus, lorsque l'on compare le degré de conservation de ces nouveaux exons (Figure 4.8), il semblerait que ces nouveaux exons soient tous différents. Finalement, un troisième groupe est formé de transcrits ayant un site d'initiation de transcription alternatif situé dans l'exon 2. D'ailleurs, à la figure 4.7, une boîte TATA se retrouve à environ 26 nucléotides de ce site d'initiation de transcription.

Enfin, il est possible de confirmer certains des résultats observés en RT-PCR. En effet, les exons 3,4 et 6 sont présents dans certains des transcrits, confirmant alors l'existence de l'épissage alternatif. De plus, il semble qu'un des transcrits possède deux exons supplémentaires (exon 3 et 4), en plus de l'intron séparant ces deux exons.

Les résultats obtenus chez le rat (Figures 4.9 et 4.10) permettent en premier lieu de confirmer qu'il y a un nombre moindre de transcrits différents comparativement à la souris, tel que constaté précédemment dans les analyses RT-PCR. En effet, parmi toutes les séquences obtenues, trois différents transcrits ont été identifiés. Une fois de plus, l'exon 1 prédit à la figure 4.1 semble aussi être absent, ce qui suggère que ce dernier est exclu des transcrits de la syncytine-A chez le rat.

Il semble exister une similitude fort intéressante entre les résultats chez la souris et chez le rat. En effet, on retrouve chez le rat des transcrits similaires à ceux de la souris qui ont été regroupés dans le groupe 3 à la figure 4.7 : ils commenceraient tous à un site d'initiation de transcription alternatif, soit 26 nucléotides en aval d'une boîte TATA fortement conservée dans ce qui a été identifié comme étant l'exon 2 des deux espèces. Cependant, chez le rat, les transcrits utilisant ce site d'initiation de transcription alternatif se retrouvent en large majorité, alors qu'il en est autrement chez la souris.

Finalement, un produit de 5'RACE obtenu chez le rat présente une séquence prolongée en amont de l'exon 2 (Figure 4.10). En comparant cette nouvelle séquence avec le génome du rat, il est possible de confirmer que ces nucléotides en surplus seraient en fait une version prolongée de l'exon 2 lui-même, et reflètent donc l'ajout des séquences introniques situées en amont.

4.1.7 Positionnement final des exons non-codants de la syncytine-A sur le génome de la souris et du rat

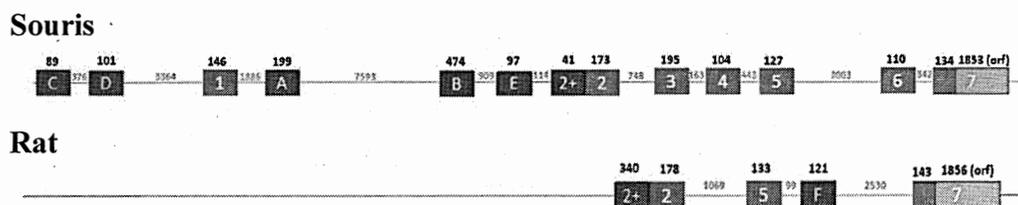


Figure 4.11 : Schématisation des exons des transcrits de la syncytine-A de souris et de rat selon les résultats de RT-PCR et 5'RACE. Les résultats obtenus en RT-PCR et 5'RACE ont permis d'identifier de nouveaux exons non-codants en plus de confirmer la présence des exons prédits par GenBank chez la souris. Les nouveaux exons sont identifiés par les lettres A à F, selon l'ordre de leur découverte. La boîte 2+ représente un prolongement de l'exon 2. Les nombres en noir représentent la longueur des exons en pb et les nombres en bleu représentent la longueur des introns en pb.

À la suite des résultats obtenus en RT-PCR et 5'RACE chez le rat et la souris, il fut possible de mettre à jour le schéma de la figure 4.1 (Figure 4.11). Chez la souris, les exons A et B furent découverts par RT-PCR. Un des quatre nouveaux exons identifiés par 5'RACE (Figure 4.8) est en fait un prolongement de l'exon 2. Les trois autres nouveaux exons identifiés en rouge sont sous la désignation C, D et E. Il est à noter que, parmi les cinq nouveaux exons identifiés chez la souris, deux (C et D) sont situés en amont de l'exon 1 sur le génome et le substituent dans les transcrits où ils ont été identifiés, confirmant que différents sites d'initiations de transcription et des promoteurs alternatifs peuvent exister pour les transcrits de la syncytine-A de la souris. Enfin, tous les exons prédits chez la souris ont été confirmés par nos analyses de RT-PCR et 5' RACE.

Pour ce qui est du rat, les résultats obtenus permettent d'alléger le schéma. Seuls les exons 2 et 5 prédits précédemment ont été repérés dans les transcrits de la syncytine-A analysées par RT-PCR et 5' RACE. L'identification de transcrits avec une extension de l'exon 2 ou contenant un nouvel exon (exon F) découle aussi de nos analyses (la séquence de l'exon F n'est pas représentée dans les résultats à cause d'un artefact de PCR empêchant l'alignement).

4.2 Vérification du potentiel de régulation de la traduction des exons non-codants de la syncytine-A

4.2.1 Conception des constructions pour les essais luciférase

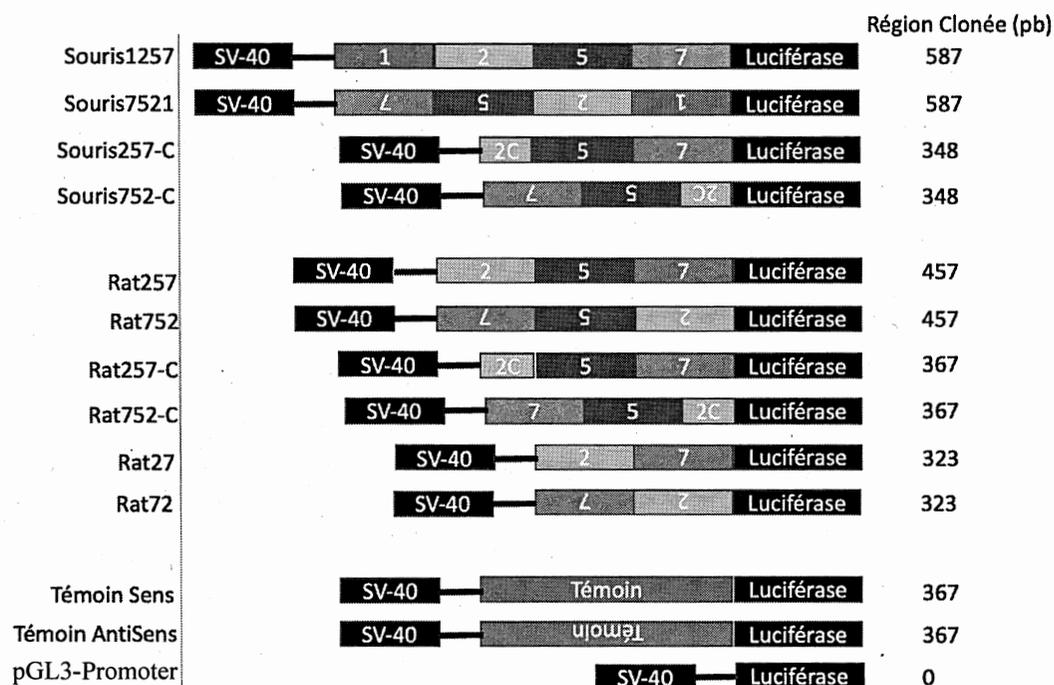


Figure 4.12 : Schéma des différentes combinaisons d'exons clonés en amont du gène rapporteur luciférase. Les différentes constructions ont été obtenues en amplifiant par PCR la région voulue à partir des constructions Pjet1.2 obtenues précédemment par RT-PCR (Figure 4.4) suivi de leur clonage dans le vecteur pGL3-Promoter. Les constructions Témoin Sens et Témoin Antisens contiennent une région du gène de la GFP choisie de façon aléatoire.

Afin de déterminer si les exons non-codants identifiés dans les transcrits de la syncytine-A de souris et de rat pouvaient moduler la traduction de ces derniers, il a été nécessaire de construire des vecteurs d'expression contenant ces différentes régions clonées en amont du gène de la luciférase, pour ensuite les transférer dans

différentes lignées cellulaires et finalement mesurer l'activité de l'enzyme. Les différents plasmides furent obtenus en amplifiant les régions d'intérêts à partir des constructions Pjet1.2 contenant les différentes combinaisons des exons résultant de nos analyses RT-PCR, qui ont ensuite été clonées dans le vecteur pGL3-Promoter mutant entre le promoteur SV40 et le gène luciférase. Pour chaque construction, une version inversée (contrôle négatif) a été générée en parallèle. Avec ces constructions contrôles inversées, il a ainsi été possible de voir si l'effet observé sur l'activité de la luciférase dépend d'éléments qui agissent spécifiquement dans une orientation donnée (uORF, structures secondaires, etc.) ou bien si l'effet observé découle uniquement de l'espacement additionnel ainsi engendré entre le promoteur SV40 et le gène rapporteur, qui est connu pour influencer la traduction.

De plus, afin de refléter les résultats obtenus en 5'RACE, des vecteurs d'expression contenant une séquence 5'UTR semblable à celle provenant des transcrits produits à partir du site d'initiation de transcription alternatif observé aux figures 4.7 et 4.9 (Groupe 3) ont été construits. Ces constructions sont désignées par le suffixe '-C' (Souris257-C, Souis752-C, Rat257-C et Rat752-C). Finalement, en guise de contrôle supplémentaire, des constructions témoins contenant une région interne du gène GFP de longueur similaire aux constructions Souris257-C, Souis752-C, Rat257-C et Rat752-C ont été réalisées. Ces deux témoins permettent de contrôler une fois de plus l'effet d'espacement produit par l'insertion d'un fragment entre le promoteur SV40 et le gène de la luciférase. Ces derniers ont été transfectés dans les cellules uniquement lorsque l'expérience réalisée comporte au moins une des constructions terminant par le suffixe '-C'.

4.2.2 Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de la syncytine-A par essais luciférase

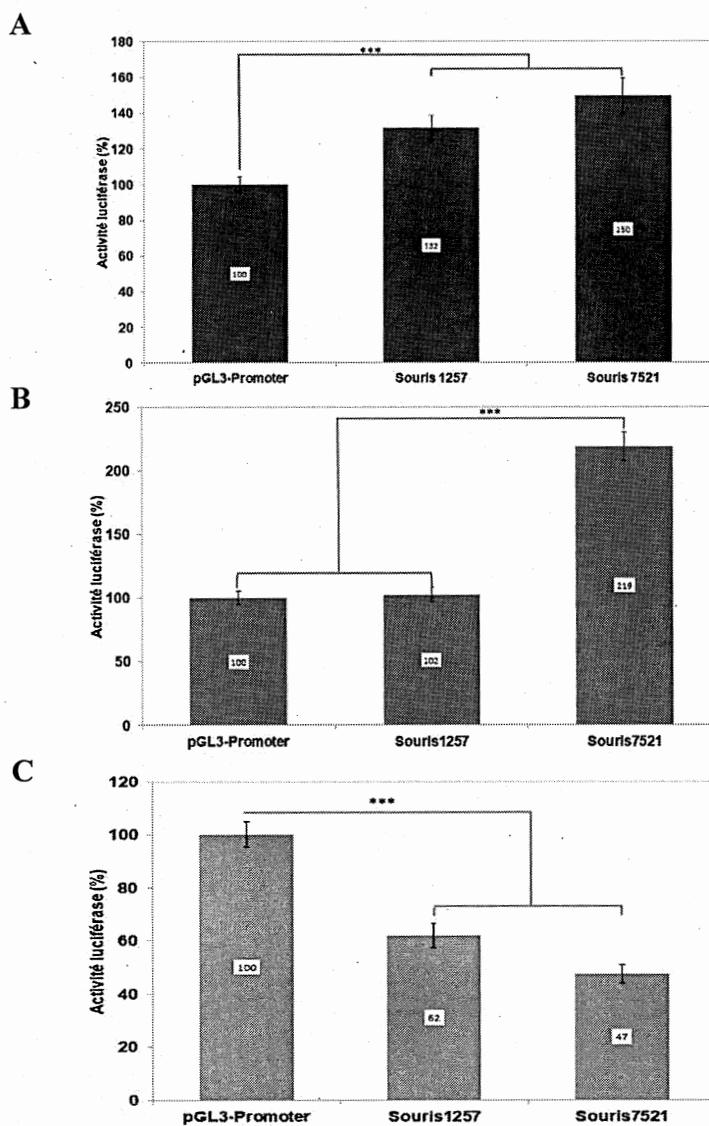


Figure 4.13 : Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de souris du groupe 1 (avec exon 1, 2, 5 et 7). Les cellules HEK293T (A), MCA205 (B) et RAT-1 (C) ont été co-transfectées en triplicata avec 400 ng du plasmide d'intérêt (pGL3-Promoter : vecteur vide) et 100 ng de pRc-Actin-LacZ à un ratio PEI 1 :7. Après 24h, les cellules ont été lysées et les essais de luciférase ont été réalisés en triplicata. Les résultats présentés sont normalisés en fonction de l'activité β -Gal pour ensuite être comparés à celui obtenu avec le vecteur pGL3-Promoter (fixé à 100%). Les expériences ont été réalisées à trois reprises avec 3 cultures indépendantes.

Les premiers essais de luciférase ont été effectués avec les constructions comportant les exons 1257 de souris. Trois lignées cellulaires, les cellules HEK293T (humain), les cellules MCA205 (souris) et les cellules RAT-1 (rat) ont été transfectées par ces vecteurs et analysées pour leur activité luciférase.

Les résultats obtenus à la figure 4.13 montrent que l'ajout des exons non-codants de souris 1, 2, 5 et la partie non codante de l'exon 7 a un impact différent selon la lignée cellulaire transfectée. Bien que toutes ces constructions résultent en une activité luciférase légèrement différente lorsque comparées à la construction **pGL3-Promoter**, cette activité est augmentée dans les cellules HEK293T transfectées par ces vecteurs alors qu'elle est réduite dans les cellules RAT-1. De plus, la version inversée contrôle n'a pas un effet significativement différent de la version sens.

Les résultats sont différents dans les cellules MCA205 transfectées. Aucune différence en activité luciférase n'a été observée entre les résultats obtenus pour les constructions **pGL3-Promoter** et **Souris 1257**. Cependant, l'activité luciférase dans les cellules transfectées par la construction **Souris 7521** est significativement différente. Bien que pour ce type de cellule, l'orientation de la séquence possède un rôle dans la régulation de l'expression de la luciférase, suggérant alors l'influence d'un élément qui dépend de l'orientation, l'ensemble des résultats de transfection ne démontre aucune tendance générale suggérant une régulation causée par la séquence d'exons non-traduits testés.

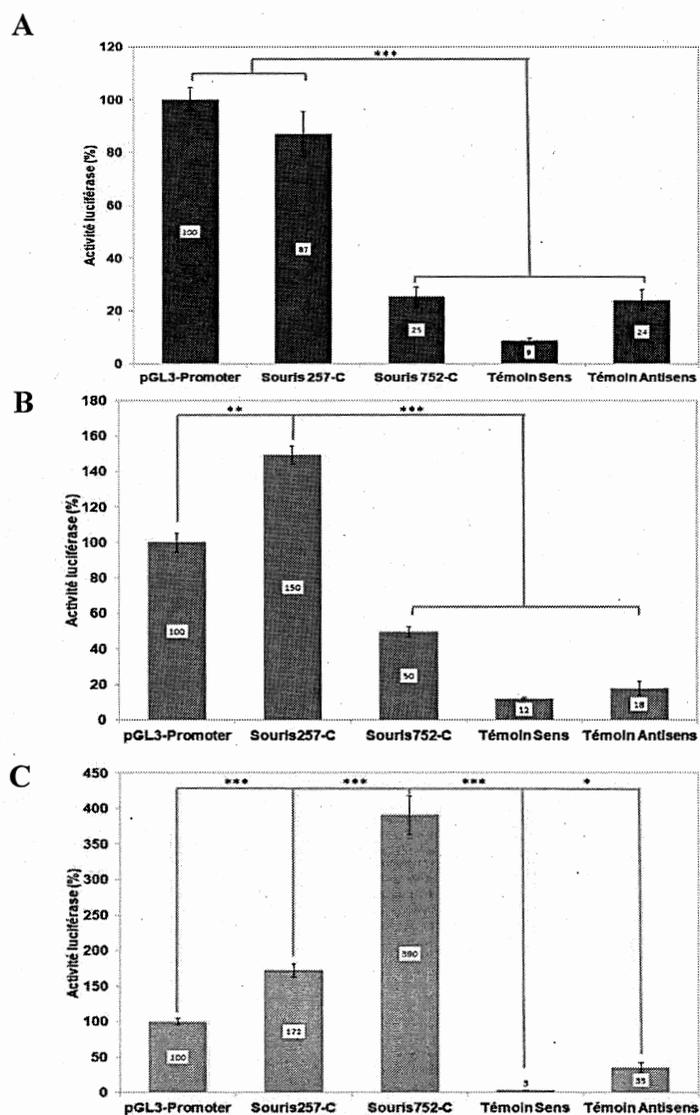


Figure 4.14 : Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de souris du groupe 3 (site d'initiation alternatif). Les cellules HEK293T (A), MCA205 (B) et RAT-1 (C) ont été co-transfectées en triplicata avec 400 ng du plasmide d'intérêt (pGL3-Promoter : vecteur vide) et 100 ng de pRc-Actin-LacZ à un ratio PEI 1 :7. Après 24h, les cellules ont été lysées et les essais de luciférase ont été réalisés en triplicata. Les résultats présentés sont normalisés en fonction de l'activité β -Gal pour ensuite être comparés à celui obtenu avec le vecteur pGL3-Promoter (fixé à 100%). Les expériences ont été réalisées à trois reprises avec 3 cultures indépendantes.

À la suite des résultats obtenus à la Figure 4.13, il fut intéressant d'évaluer le potentiel régulateur des constructions reproduisant les régions 5'UTR des transcrits majeurs basées sur les analyses 5' RACE (groupe 3), soit les transcrits débutant par le site alternatif d'initiation de transcription (Figure 4.14). Pour les cellules HEK293T, aucune différence significative n'a été observée au niveau des activités luciférase dérivées des constructions **Souris 257-C** et **pGL3-Promoter**, alors que la version inversée de cette construction (**752-C**) génère une activité significativement réduite. Il en est de même pour les deux témoins sens et antisens, qui génèrent une activité luciférase réduite de façon significative. Il semblerait donc que l'orientation de la région 5' UTR dans ces constructions soit déterminante pour leur capacité régulatrice de l'activité luciférase.

Lorsque l'on porte une attention aux résultats obtenus dans les cellules MCA205 (Figure 4.14B), il est possible de constater une variation presque identique aux cellules HEK293T : alors qu'aucune différence significative ne fut trouvée entre les constructions **Souris 257-C** et **pGL3-Promoter** transfectées dans les cellules HEK293T, ce n'est pas le cas pour les cellules MCA205, où l'on observe une activité luciférase significativement augmentée pour la construction **Souris 257-C**. Tout comme ce qui fut observé avec les cellules HEK293T, l'activité luciférase pour la construction **Souris 752-C** est significativement réduite comparativement à celle obtenu avec la construction **Souris 257-C**.

Pour ce qui est des résultats dans les cellules RAT-1, chacune des constructions donne une activité luciférase significativement différente l'une de l'autre. Les constructions **Souris 257-C** et **Souris 752-C** mènent à une augmentation significative de l'activité luciférase en comparaison à la construction contrôle **pGL3-Promoter**. En fait, l'activité luciférase pour la construction **Souris 752-C** est grandement augmentée dans les cellules RAT-1, atteignant en moyenne presque 4 fois les valeurs obtenues

avec la construction **pGL3-Promoter**, ce qui va à l'encontre des deux autres types cellulaires, où la valeur obtenue était plus basse, soit respectivement 25% et 50% dans les cellules HEK293T et les cellules MCA205. Dans les cellules RAT-1, les deux témoins donnent une activité réduite, lorsque comparés à la construction **pGL3-Promoter**.

Généralement, en comparant les résultats d'activité luciférase générés par les constructions et leur contrôle antisens pour les trois modèles cellulaires, il est possible de conclure que la séquence transcrite a un impact sur la régulation et que l'effet observé n'est pas seulement dû à la distance ajoutée entre le promoteur SV40 et le gène luciférase, ce qui suggère alors l'influence d'un élément qui dépend de l'orientation.

Lorsque les résultats obtenus à la figure 4.13 sont comparés à ceux de la figure 4.14, l'absence de l'exon 1 et d'une large partie de l'exon 2 modifie grandement les résultats. À titre d'exemple, en comparant les constructions **Souris 7521** et **Souris 752-C** dans les cellules MCA205, on observe des résultats inverses. Alors que la transfection de la construction **Souris 7521** donne une valeur de 219% en comparaison à la transfection de **pGL3-Promoter**, la transfection de la construction **Souris 752-C** donne une activité réduite de 50% en comparaison aux valeurs obtenues avec **pGL3-Promoter**. Comme autre exemple, lorsque l'on compare l'activité luciférase entre les constructions **Souris 1257** et **Souris 257-C**, des variations importantes sont notées entre chacune des lignées cellulaires. Alors que la construction **Souris 1257** donne une activité luciférase, qui comparativement à la construction **pGL3-Promoter**, est soit augmentée (HEK293T), équivalente (MCA205) ou diminuée (RAT-1), la construction **Souris 257-C** génère des résultats comparables à ceux de la construction **pGL3-Promoter** dans les cellules HEK293T, mais significativement différents dans les cellules MCA205 et les cellules RAT-1.

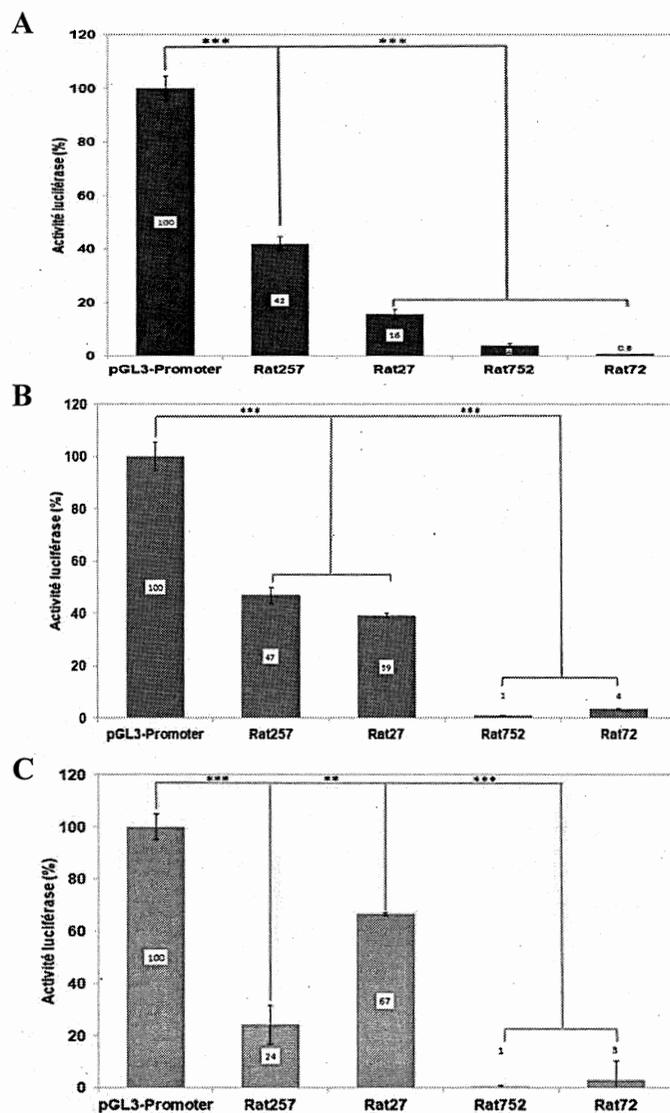


Figure 4.15 : Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de rat (transcrits exons 2, 5 et 7). Les cellules HEK293T (A), MCA205 (B) et RAT-1 (C) ont été co-transfectées en triplicata avec 400 ng du plasmide d'intérêt (pGL3-Promoter : vecteur vide) et 100 ng de pRc-Actin-LacZ à un ratio PEI 1 :7. Après 24h, les cellules ont été lysées et les essais de luciférase ont été réalisés en triplicata. Les résultats présentés sont normalisés en fonction de l'activité β -Gal pour ensuite être comparés à celui obtenu avec le vecteur pGL3-Promoter (fixé à 100%). Les expériences ont été réalisées à trois reprises avec 3 cultures indépendantes.

Une première étape pour l'évaluation de la capacité régulatrice des exons non-codants de la syncytine-A du rat fut de construire des vecteurs basés sur les résultats de RT-PCR. Quatre constructions furent testées et contenaient soit la région 5'UTR correspondant aux exons 2, 5 et 7 (transcrit majeur) ou la région 5'UTR constituée des exons 2 et 7 (transcrit mineur) ainsi que leur version inversée.

En observant les résultats de la figure 4.15, il est possible de noter certaines tendances. Premièrement, chaque construction contenant les exons en position sens (**Rat 257** et **Rat 27**) génère une activité luciférase diminuée en comparaison à la construction **pGL3-Promoter**. De plus, sauf pour les cellules MCA205, ces deux constructions ont un effet significativement différent selon la ligné cellulaire. La construction **Rat 257** mène à une activité luciférase plus élevée que la construction **Rat 27** lorsque transfectée dans les cellules HEK293T, alors que l'on observe les résultats inverses pour les cellules RAT-1.

Ensuite, il est possible de voir que les versions inversées de ces deux constructions (**Rat 752** et **Rat 72**) génèrent une activité luciférase encore plus basse que leur version sens pour toutes les lignées cellulaires testées, ce qui implique un rôle de l'orientation de la séquence dans la régulation. Il existe cependant une exception : pour les cellules HEK293T, les différences observées ne semblent pas significatives entre les constructions **Rat 27** et **Rat 72**, bien qu'une certaine tendance soit notée.

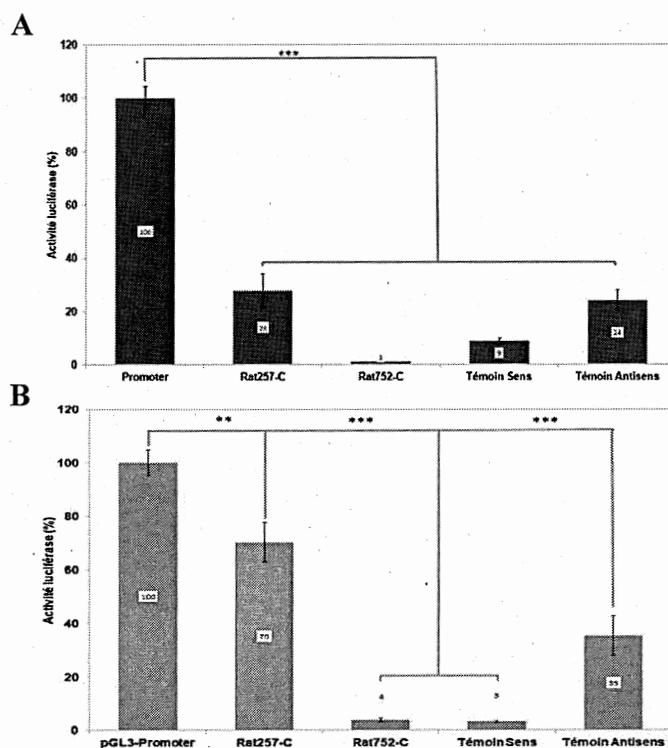


Figure 4.16 : Analyse de l'activité régulatrice des exons non-codants de rat (site d'initiation alternatif). Les cellules HEK293T (A) et RAT-1 (B) ont été co-transfectées en triplicata avec 400 ng du plasmide d'intérêt (pGL3-Promoter : vecteur vide) et 100 ng de pRc-Actin-LacZ à un ratio PEI 1 :7. Après 24h, les cellules ont été lysées et les essais de luciférase ont été réalisés en triplicata. Les résultats présentés sont normalisés en fonction de l'activité β -Gal pour ensuite être comparés à celui obtenu avec le vecteur pGL3-Promoter (fixé à 100%). Les expériences ont été réalisées à trois reprises avec 3 cultures indépendantes.

Tout comme chez la souris, il fut intéressant d'évaluer le potentiel de régulation des exons non-codants en fonction des résultats obtenus en 5'RACE, soit en prenant en considération le site d'initiation de transcription majeur identifié (Figure 4.9). Il a ainsi une fois de plus été démontré que les constructions **Rat 752-C** et **Rat 257-C**, une fois transfectées, donnent une activité luciférase réduite comparativement à la construction **pGL3-Promoter**. De plus, la version inversée mène à une activité fortement réduite (comparée avec **Rat 257-C**), telle que les résultats présentés pour la construction **Rat 752** (Figure 4.15). Cependant, certains résultats dans les cellules

HEK293T sont contraires à cette tendance générale. Premièrement, il n'y aurait pas de différence significative entre les résultats obtenus pour la construction **Rat 257-C** et la version inversée, **Rat 752-C**. Il est tout de même possible de noter une baisse de l'activité luciférase, puisque la construction **Rat 257-C** donne une valeur d'activité luciférase de 28%, alors que la construction **Rat 752-C** donne une valeur de seulement 1%. Afin d'augmenter le nombre de répétitions (n), des expériences additionnelles seront nécessaires et devraient réduire la variation obtenue lors des transfections avec la construction **Rat 257-C** pour donner des résultats significatifs. En second lieu, le **Témoin Antisens** (séquence GFP) présente des résultats similaires à ceux de la construction **Rat 257-C** pour les cellules HEK293T. Cependant, lorsque l'on observe les résultats d'activité luciférase dans les cellules RAT-1, des différences significatives entre la construction **Rat 257-C**, sa version inversée et les deux constructions Témoins sont clairement apparentes.

4.3 Vérification de l'effet des exons non-codants sur la stabilité des transcrits de syncytine-A

Afin de vérifier si les résultats obtenus lors des essais de luciférase étaient causés par un changement de la stabilité des transcrits dû aux exons non-codants, des expérimentations en RT-qPCR ont été tentées à partir de transfections de cellules HEK293T. Malheureusement, les résultats obtenus lors de ces expériences ne peuvent être considérés valides puisque les contrôles négatifs (ARN sans RT) donnaient des signaux positifs, témoignant d'une contamination par les plasmides. De ce fait, il ne fut pas possible de continuer ces analyses afin de déterminer si les résultats précédents découlent d'une différence au niveau de la stabilité des transcrits.

4.4 Conservation des exons non-codants chez les autres membres de la super-famille des *Muroidea*

Dans le but de poursuivre l'analyse des exons non-codants de la syncytine-A au-delà de la souris et du rat, nous avons effectué un alignement entre les transcrits prédits et réels appartenant à d'autres espèces de la super-famille des *Muroidea*, soit le **hamster doré syrien**, la **souris sylvestre** et le **campagnol des prairies**. L'alignement fut effectué avec les exons 2, 5 et la partie non-codante de l'exon 7 du rat et de la souris, puisque ces exons les mieux conservés entre les deux espèces.

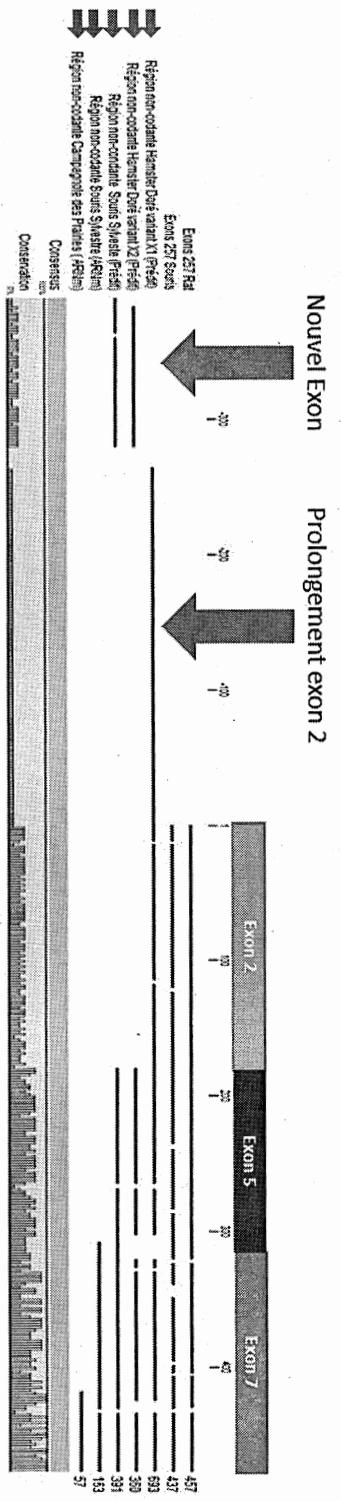


Figure 4.17: Conservation des exons 2, 5 et 7 non-codants entre différentes espèces. Des transcrits (prédits ou réels) de la syncytine-A du hamster doré syrien, de la souris sy/vestre et du campagnol des prairies ont été obtenus à partir de GenBank. L'alignement des séquences fut réalisé avec le logiciel CLC Sequence Viewer 8.0, à partir des exons 2, 5 et le début de l'exon 7 du rat et de la souris comme témoin. Les flèches vertes pointent des séquences prédites, alors que les flèches orange pointent des séquences obtenues d'analyses RT-PCR ou 5'RACE en provenance de GenBank. Les flèches bleues pointent un nouvel exon et un prolongement de l'exon 2.

La conservation de ces exons est fortement élevée entre ces différentes espèces (Figure 4.17). Alors que la séquence du transcrit réel du campagnol se limite à l'exon 7 et que le transcrit de la souris sylvestre inclut quelques nucléotides de l'exon 5, les transcrits prédits de la souris sylvestre et du hamster doré syrien couvrent en totalité l'exon 5. De plus, un des deux transcrits prédits chez le hamster couvre aussi la totalité de l'exon 2, en plus de prolonger ce dernier dans la séquence intronique en amont, comme il fut observé dans les résultats de 5'RACE chez le rat et la souris (Figures 4.8 et 4.10).

Un nouvel exon semble aussi être présent dans l'un des transcrits prédits du hamster doré et celui de la souris sylvestre. Fait plus intéressant, cet exon serait le même chez les deux espèces. En comparant la séquence de ce nouvel exon avec les exons connus de la souris et du rat, aucune similarité ne fut découverte. Ce nouvel exon semblerait se substituer à l'exon 2, puisque ce dernier est absent des transcrits dans lesquels il a été découvert. Il est tout de même important de se rappeler que ces transcrits sont prédits *in silico* sur GenBank et n'ont donc pas été détectés dans les placentas de ces espèces. Cependant, des prédictions similaires chez la souris ont permis de suggérer l'existence de plusieurs exons non-codants du gène syncytine-A que nous avons identifiés dans notre étude. Il est donc probable que la présence de ces mêmes exons soit confirmée suite à des analyses de RT-PCR et de 5'RACE des placentas de souris sylvestres et de hamster syriens.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Lors de cette étude, nos objectifs étaient de confirmer la présence d'exons non-codants dans le 5'UTR des transcrits de souris, de rat et des autres membres de la super-famille des *Muroidea* et étudier leur effet sur la régulation post-transcriptionnelle, tout cela dans le but d'améliorer nos connaissances fondamentales sur la syncytine-A et sa régulation.

5.1 Confirmation de la présence des exons non-codants chez la souris, le rat et autres membres de la super-famille des *Muroidea*.

À la suite des résultats obtenus en 5'RACE et RT-PCR à partir d'ARN totaux isolés de placentas de souris, nous avons confirmé la présence des exons non-codants précédemment prédits par GenBank dans les transcrits de la syncytine-A. Également, cinq nouveaux exons chez la souris, en plus d'une version prolongée de l'exon 2, ont été identifiés par ces analyses. Nos résultats indiquent ainsi que plusieurs formes du transcrit de la syncytine-A existent et que celles-ci sont issues de différents épissages alternatifs. Nos résultats confirment ainsi ceux de Dupressoir *et al.* (2005), mais ajoutent de nouvelles informations sur l'existence de nouveaux exons. Il a aussi été possible de démontrer la présence d'exons non-codants dans la région 5'UTR des transcrits de la syncytine-A chez le rat en utilisant les exons de souris comme source de comparaison, malgré le fait qu'un nombre moindre d'exons non-codants ont été découverts pour cette espèce. Seulement les exons 2,5 et 7 furent retrouvés dans les transcrits de rat, en plus d'un exon supplémentaire (exon F) et d'un prolongement de

l'exon 2. Ces transcrits étaient aussi sujets à de l'épissage alternatif. De plus, les résultats de séquençage de 5'RACE confirment les patrons de migration des signaux de 5'RACE observés pour les deux espèces (Figures 4.5 et 4.6). En effet, la présence de bandes claires et distinctes chez le rat, contrairement aux signaux plus diffus obtenus chez la souris, reflète la présence d'un nombre moindre de transcrits de tailles différentes. La multitude de transcrits aux différentes tailles pourrait alors générer un tel signal, contrairement au rat où il ne semble y avoir que quelques transcrits distincts. Une différence de longueur par rapport à la théorie avait été notée lors des migrations des produits RT-PCR sur gel d'agarose 1%, mais lorsque les produits PCR ont été séquencés, la taille des produits séquencés correspondait à ce que nous nous attendions.

Il est intéressant que certains des exons conservés dans le génome du rat (1, 4 et 6) ne soient pas présents dans les transcrits de la syncytine-A de rat, alors que, chez la souris, tous les exons identifiés dans le génome se retrouvent dans les transcrits séquencés. Une hypothèse plausible pour cette différence entre le rat et la souris sur la présence des exons 4 et 6 dans les transcrits de la syncytine-A serait une perte de la conservation de séquence spécifique intra-exonique, les *activateurs d'épissage des exons* (AEE). Il est connu que les séquences consensus d'épissage aux frontières exon/intron (G/GU en 5' et AG/G en 3') sont requises pour l'épissage, mais elles ne sont pas suffisantes (Karp, 2010). En effet, ces séquences consensus peuvent se trouver au sein d'un intron sans pour autant être reconnues comme signaux d'épissages. Les séquences *activatrices d'épissages des exons* (AEE) sont des séquences spécifiques situées au milieu des exons qui permettent à la machinerie d'épissage de distinguer les exons des introns (Karp, 2010). Il est alors possible que certaines de ces séquences spécifiques aient été mutées chez le rat dans les exons 4 et 6, rendant ces derniers inactifs pour la machinerie d'épissage. Une explication différente cependant expliquerait l'absence chez le rat de l'exon situé à l'extrémité 5'

du transcrit de la syncytine-A de la souris (exon 1). Il est probable que le promoteur en amont de cet exon 1 ne soit pas actif chez le rat dans le contexte étudié (placenta). Il est donc possible que les deux espèces aient un promoteur actif commun (expliquant la présence de transcrits commençant par l'exon 2 tronqué chez les deux espèces), et que seule la souris possède un second promoteur situé en amont de l'exon 1.

La présence peu fréquente de nouveaux exons non prédits dans les transcrits de la syncytine-A (exons A, B, C, D et E chez la souris et exon F chez le rat) est un phénomène intéressant. Alors qu'il est possible que ceux-ci soient issus d'une forme rare d'épissage alternatif fonctionnel des transcrits de la syncytine-A, il est probable que ces rares événements soient dus à un manque de précision de la machinerie d'épissage. En effet, cette machinerie d'épissage n'étant pas infaillible, de rares erreurs peuvent arriver et causer alors l'inclusion de séquences semblables aux exons sans pour autant qu'elles soient impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle de ces gènes (Hsu et Hertel, 2009). L'ajout de ces rares exons serait ainsi sans conséquence sur l'expression du gène.

Ces exons non-codants ont aussi été étudiés chez d'autres espèces de la super-famille des *Muroidea*, soit le hamster syrien doré, le campagnol des prairies et la souris sylvestre par des analyses *in silico* (Figure 4.17). Grâce à cette analyse, il a été possible de confirmer que les exons 2, 5 et la partie non-codante de l'exon 7 sont fortement conservés entre ces espèces (à l'exception du campagnol des prairies où le transcrit se limitait à l'exon 7). L'analyse de ces transcrits a aussi permis d'identifier un nouvel exon non-traduit partagé entre le hamster syrien doré et la souris sylvestre qui ne correspond à aucun exon de la syncytine-A identifié chez le rat ou la souris.

Puisque les exons 2,5 et la partie non-codante de l'exon 7 sont fortement apparentés et prédits comme étant présents dans les transcrits des différentes espèces analysées, il est fort probable que ces exons non-codants jouent un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la syncytine-A. En effet, si ces exons n'avaient aucun rôle, il est possible que ces derniers aient divergé en termes de séquence depuis le point de séparation, il y a de cela des millions d'années. Il est de plus intéressant qu'une certaine partie des exons non-codants de la syncytine-A soit, en fait, dérivée d'éléments mobiles répétés murins (LINE, SINE) (Dupressoir *et al.*, 2005). De plus, certains de ces exons seraient issus de structures vestigiales des gènes rétroviraux *gag* et *pol* dérivant de la même séquence provirale ancestrale codant pour la syncytine-A (Dupressoir *et al.*, 2005). Ces observations semblent être corroborées par les recherches effectuées chez le rat-taupe, dont les transcrits de la syncytine-A sont sujet à un épissage alternatif incluant des exons en provenance de séquences d'origine provirale (Vernochet *et al.*, 2014). Il est intéressant que ces gènes vestiges, qui ont perdu leur fonction codante primaire, pourraient tout de même contribuer à une régulation post-transcriptionnelle de la syncytine-A.

Pour donner suite à ces analyses, il aurait été intéressant d'analyser des placentas de diverses espèces de la super-famille des *Muroidea*, telles que celles dont les transcrits ont été utilisés pour l'alignement à la figure 4.17. Puisque l'information dans les banques de données est limitée et que la plupart des transcrits retrouvés pour ces espèces étaient de forme prédite, des analyses de RT-PCR et de 5'RACE sur l'ARN de placentas de ces espèces auraient permis une meilleure caractérisation de ces transcrits.

5.2 Présence d'une boîte TATA conservée chez de multiples espèces et site alternatif d'initiation de transcription

Les résultats de 5'RACE ont permis d'approfondir les résultats de RT-PCR. L'une des découvertes les plus importantes est la présence d'un site inattendu d'initiation de transcription et l'identification d'une boîte TATA dans la région de l'exon 2, tous deux étant fortement conservés entre le rat et la souris. Cette même boîte TATA se retrouve aussi fortement conservée dans un des transcrits de la syncytine-A prédits du hamster doré syrien. Cependant, aucun transcrit de hamster utilisant ce site d'initiation de transcription n'a été trouvé dans les banques de données. Chez le rat, les transcrits utilisant ce site d'initiation de transcription étaient majoritaires (Figures 4.9 et 4.10), mais beaucoup moins chez la souris (Figures 4.7 et 4.8). L'utilisation d'un site d'initiation de transcription alternatif est un mécanisme important expliquant en partie la variété des transcrits d'un même gène chez les eucaryotes, au même titre que l'épissage alternatif et l'utilisation de sites de polyadénylation alternatifs. En fait, cela serait le principal mécanisme menant à la formation de différents transcrits à partir d'un gène chez l'humain (Reyes et Huber, 2018). Tout comme l'épissage alternatif, la sélection d'un site alternatif d'initiation de transcription peut ainsi réguler différentes étapes menant à l'expression d'un gène en affectant notamment la traduction des transcrits (Gabut *et al.*, 2011 ; Pozner *et al.*, 2007). La présence d'un tel site d'initiation de transcription alternatif implique l'intervention d'un promoteur alternatif qui est probablement sujet à une régulation transcriptionnelle différente de celle de l'autre promoteur se retrouvant en amont de l'exon 1 (souris) ou l'exon 2 (rat). L'analyse de l'ARNm de placentas de hamster aurait possiblement permis de confirmer l'existence de ce transcrit alternatif chez cette espèce.

5.3 Potentiel régulateur de la région 5'UTR des divers transcrits de la syncytine-A

Comme il a été constaté dans nos expériences de transfection avec le gène rapporteur luciférase, la région 5'UTR des transcrits de la syncytine-A du rat et de la souris, contenant les exons non-codants, semble influencer la traduction directement ou indirectement. Alors que les résultats découlant de l'analyse des exons non-codants 5'UTR de souris démontrent certaines différences entre les types cellulaires et qu'il soit difficile d'en tirer une conclusion globale, une tendance générale semble ressortir des résultats obtenus à partir des constructions des exons non-codants de rat et aussi en partie chez la souris. En effet, les transfusions de constructions d'exons en orientation sens ont tendance à générer une activité luciférase supérieure en comparaison avec leur contrôle antisens, ce dernier générant une activité luciférase comparable au niveau basal de détection de la luciférase chez le rat. Ces résultats démontrent, qu'en général, la régulation post-transcriptionnelle engendrée par les exons non-codants de la syncytine-A dépend de l'orientation de la séquence et non seulement d'un effet de distance entre le promoteur SV40 et le gène rapporteur luciférase. De ce fait, il est possible que l'effet observé sur l'activité luciférase dépend d'éléments qui agissent spécifiquement dans une orientation donnée (uORF, structures secondaires) et que ces derniers aient un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de la syncytine-A. Il est tout de même à noter que cette observation n'est pas universelle pour tous les constructions et types cellulaires testés, tel que le suggèrent les résultats obtenus avec les constructions Souris 1257 et Souris 7521 dans les cellules HEK293T et RAT-1 (Figure 4.13). La différence de résultats entre les lignées cellulaires est probablement due à la présence ou l'absence de différents facteurs cellulaires spécifiques qui agissent sur la régulation post-transcriptionnelle. Un exemple d'un tel facteur est le facteur de transcription eIF3. Ce dernier est connu pour son rôle principal dans la formation du complexe de préinitiation 43S, mais aussi pour inhiber ou activer certains ARNm spécifiques en se

liant à une structure secondaire dans leur 5'UTR (Leppek *et al.*, 2018). Or, il est aussi connu que ce facteur de transcription ne s'exprime pas également dans tous les types de tissus, son expression étant plus élevée dans des tissus prolifératifs tels que la moelle osseuse, le thymus et les tissus fœtaux (Pincheira *et al.*, 2001).

Une partie des constructions testées avait pour but de représenter les transcrits utilisant le site d'initiation de transcription alternatif identifié par les analyses 5'RACE (les constructions Souris 257-C, Souris 752-C, Rat 257-C et Rat 752-C des figures 4.14 et 4.16). L'utilisation de telles constructions a grandement changé les résultats obtenus chez la souris, comparativement aux constructions contenant l'exon 1 de pleine longueur, alors que les activités luciférase obtenues à la suite de la transfection de constructions contenant les exons non-codants de rat (Figures 4.15 et 4.16) restent semblables indépendamment de la longueur de la séquence de l'exon 2 ajouté. Il semblerait donc que l'utilisation d'un second promoteur et du site d'initiation de transcription dans l'exon 2 chez le rat ne change pas la fonction de régulation post-transcriptionnelle de la région 5'UTR comparativement à un transcrit possédant l'exon 2 complet. Chez la souris, l'utilisation de ce site d'initiation de transcription retire une partie de l'exon 2 et l'exon 1 au complet, ce qui expliquerait la différence observée entre les résultats des figures 4.13 et 4.14. Puisque les résultats de la figure 4.13 suggèrent qu'il n'y a généralement pas de différence significative entre les activités luciférase obtenues à partir de transfections de constructions possédant l'exon 1 en sens normal ou inversé, il est probable que l'effet observé découle uniquement de l'espacement additionnel engendré entre le promoteur SV40 et le gène rapporteur. Il est cependant intéressant qu'une différence significative entre la version normale et inversée soit observée dans les cellules MCA205, un modèle cellulaire de souris. Il serait alors possible qu'un élément dépendant de la séquence (uORF, structure secondaire) se retrouvant dans l'exon 1 ne soit actif que chez la souris.

Bien qu'il est seulement possible d'affirmer, en fonction de nos résultats, que les exons non-codants de rat et de souris ont une influence sur la régulation post-transcriptionnelle, et ce d'une manière positive ou négative selon la disposition des exons et le type cellulaire, nous pouvons tout de même affirmer que la partie 5'UTR la plus représentative (surtout chez le rat), celle découlant du site d'initiation de transcription alternatif, semble avoir un effet bénéfique sur l'expression de la syncytine-A en comparant au contrôle antisens. Ces résultats sont aussi supportés par la littérature. Il est connu que la région 5'UTR d'un transcrite peut comporter plusieurs éléments influençant la traduction d'un ORF en aval. Pour exemple, deux formes de transcrits existent et se distinguent par la présence de deux exons 1 différents (1A et 1B) pour le gène NOD2, un gène codant un récepteur immunitaire liant le composé de la paroi cellulaire muramyl-dipeptide. Il a été montré que l'utilisation de l'exon 1B au détriment de l'exon 1A ajoutait 3 uORFs au transcrite, occasionnant une inhibition de la synthèse du récepteur (Rosenstiel *et al.*, 2007). Un autre exemple est représenté par le gène SPA-A (*Surfactant protein A*), pour lequel quatre versions épissées du 5'UTR ont été identifiées. Ces 4 épissages alternatifs augmentent l'expression du gène rapporteur luciférase en comparaison à une construction contrôle sans la région 5'UTR. Ces observations seraient probablement liées à une augmentation de la stabilité des ARNm en présence de ces 5'UTR (Wang *et al.*, 2005).

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus à partir des essais de luciférase et d'identifier le mécanisme responsable de cette régulation, plusieurs analyses *in silico* ont été tentées. Comme première approche, nous avons analysé les séquences des régions 5' UTR pour la présence d'uORFs. Comme décrit à la figure 1.8, les uORFs dans les régions 5'UTR font partie des éléments pouvant influencer la traduction d'un gène par l'entremise de mécanismes différents. En tentant une telle analyse, un problème s'est vite imposé : le dépistage des uORFs dans les transcrits s'est avéré

difficile. En effet, alors que certains transcrits possédaient plusieurs uORFs possibles, d'autres n'en avaient aucun. Qui plus est, en comparant les transcrits de rat et de souris, aucun des uORFs identifiés n'était conservé entre ces deux espèces, ce qui diminuait les probabilités qu'ils soient importants. De plus, aucun TIS semblable à une séquence Kozak n'a pu être identifié à partir de ces uORFs. À la suite de ces analyses préliminaires, l'évaluation de la présence d'uORFs et de leur possible influence n'a pas été poursuivie. Il serait tout de même intéressant d'étudier plus en profondeur l'effet possible des uORFs par des mutations ponctuelles (Ashwal *et al.*, 2011).

La présence de structures secondaires dans la région 5'UTR a été analysée en second lieu. En effet, il est connu que la formation de structures secondaires dans un transcrit d'ARNm peut avoir une forte influence sur la traduction, soit en bloquant la lecture du transcrit par le ribosome ou en permettant l'interaction de certains facteurs avec le transcrit, pouvant alors promouvoir ou nuire à la traduction (Mokenhaupt *et al.*, 2015). Pour ce faire, la présence de structures secondaires a été analysée à l'aide du logiciel mFold. Une fois de plus, un autre problème fit surface. En effet, mFold, tout comme les autres logiciels de prédiction de structures secondaires, identifie toutes combinaisons possibles de repliement de l'ARN, si bien qu'il est possible de retrouver sur un même transcrit plus de 20 formes de tiges-boucles et autres structures secondaires. De ce fait, toutes séquences aussi longues que celles provenant des différents 5'UTR des transcrits de la syncytine-A génèrent des résultats difficiles à interpréter. D'ailleurs, la séquence d'ADN aléatoire Témoin du gène GFP utilisée dans nos expériences de transfection menait à la prédiction de structures secondaires similaires à ce que l'on retrouve pour les 5'UTR des transcrits de la syncytine-A du rat et de la souris. Afin de raffiner nos analyses, nous avons recherché des points de similitude entre les structures secondaires des 5'UTR donnant des résultats similaires en essai de luciférase tout en comparant les espèces pour vérifier si ces structures

étaient conservées. Malheureusement, aucune structure secondaire ne répondait à ces critères. Par manque de temps, cette partie du projet fut aussi abandonnée. Il serait tout de même intéressant de poursuivre ces analyses par l'utilisation de techniques analytiques plus avancées, telles que l'utilisation d'une ARNase spécifique à l'ARN double-brin, permettant alors d'identifier les régions sensibles d'un transcrit formant une structure secondaire (Seetin et Mathews, 2012). Une autre technique possible aurait été l'utilisation d'une sonde chimique, comme utilisée dans la technique SHAPE (*Selective 2'-Hydroxyl acylation Analysed by Primer Extension*). Cette technique utilise le *N*-methylisotoic anhydride, un composé qui a la propriété de réagir avec le squelette de l'ARN, mais avec une préférence pour les régions flexibles, c'est-à-dire généralement simple brin (Seetin et Mathews, 2012). Dans l'éventualité qu'une structure secondaire soit ainsi identifiée, il serait alors possible de tester son rôle en déstabilisant la structure par mutation et en faisant usage de nos vecteurs rapporteurs contenant les exons non-codants de rat et de souris (Chen, 2013 ; Barbendure *et al.*, 2006).

Une troisième tentative d'analyse des 5'UTR des transcrits de la syncytine-A avait pour but de dépister la présence de domaines permettant la liaison de divers facteurs protéiques à l'aide du logiciel en ligne ATTRACT, puisqu'il est connu que certaines protéines peuvent agir sur la régulation post-transcriptionnelle en se liant au 5'UTR (Sonenberg, 1994 ; Glisovic *et al.*, 2008). Ce complexe protéine-ARN peut alors agir sur la localisation des ARNm, l'épissage alternatif ou directement la traduction. Ces analyses se sont malheureusement retrouvées infructueuses. Les mêmes problèmes retrouvés pour l'analyse des uORFs et des structures secondaires refirent surface : le logiciel repérait de multiples domaines de liaisons de facteurs protéiques sur les séquences analysées, incluant la séquence GFP témoin, si bien qu'il était difficile d'en tirer une conclusion satisfaisante. De plus, les quelques sites de liaison de protéine identifiés ne semblaient pas être conservés entre le rat et la souris. Tout

comme les précédentes analyses, il serait intéressant de poursuivre cette direction pour éventuellement déterminer si certaines protéines se liant à la région 5'UTR seraient déterminantes dans ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de la syncytine-A.

Une dernière piste qui a été explorée dans le cadre de ce projet fut d'examiner la stabilité des transcrits. En effet, il est connu que plusieurs éléments d'un ARNm, que ce soit la coiffe, la queue polyA ou les extrémités 5'3' UTR, peuvent influencer la stabilité du transcrit avant que ce dernier soit traduit. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté d'établir un protocole de RT-qPCR en présence de l'actinomycine-D, un antibiotique capable de bloquer la synthèse des ARNm. Ce genre de protocole est fréquemment utilisé pour étudier la stabilité des transcrits d'ARNm (Wang *et al.*, 2005). Malheureusement, lors des premiers essais, les ARN totaux étaient contaminés par les plasmides utilisés lors de la transfection. Le kit utilisé pour isoler l'ARN possède une colonne éliminant l'ADN génomique, mais celle-ci ne semble pas être efficace pour l'ADN plasmidique. En effet, alors que l'amplification qPCR de la GAPDH sur les ARN totaux isolés ne donnait aucun amplicon, montrant ainsi que l'ADN génomique était bien éliminé par la colonne, les qPCR amplifiant le gène luciférase donnaient des amplicons à partir de l'ARN (sans RT). Un traitement à la ADNase des ARN extraits avant les analyses RT-PCR n'a pu mener à des résultats plus encourageants. Par manque de temps, cette partie du projet a alors été également abandonnée.

5.4 Présence des exons non-codants dans la région 5'UTR des transcrits de la syncytine-A dans d'autres types cellulaires.

Alors que ce projet s'est penché sur les exons non-codants en 5'UTR de la syncytine-A dans un contexte d'expression placentaire, il faut se rappeler que cette protéine

n'est pas uniquement exprimée dans le placenta. Bien que la syncytine-A s'exprime majoritairement dans ce tissu, il a été démontré que la syncytine-A jouait un rôle dans la formation des myoblastes et des ostéoclastes chez la souris (Redelsperger *et al.*, 2016 ; Ethiraj *et al.*, 2018). Nous avons donc essayé de reproduire les résultats de ce projet en analysant ces types cellulaires par RT-qPCR et analyse 5'RACE. Cependant, la détection de la syncytine-A à partir d'ARN totaux de cellules C2C12 (myoblastes de souris) et de cellules RAW.264 (macrophages précurseurs d'ostéoclastes) par RT-PCR fut non-concluante, malgré la présence d'un signal positif pour la GAPDH contrôle et l'amplification de la syncytine-A à partir de tissu placentaire (résultats non-présentés).

5.5 Conclusion

Pour conclure, ces résultats permettent de vérifier notre première hypothèse de travail. En effet, il est bel et bien possible d'observer un épissage alternatif d'exons non-codants des transcrits de la syncytine-A dans la région 5'UTR, non seulement chez la souris, mais aussi chez le rat et possiblement le hamster syrien doré et la souris sylvestre. Les expériences 5'RACE et RT-PCR démontrent que le gène de la syncytine-A possède une grande flexibilité au niveau de l'utilisation des exons non-codants et témoignent d'une diversité au niveau de l'extrémité 5' des transcrits, autant dans une même espèce qu'entre les espèces. Les tests de luciférase permettent de démontrer que les exons non-codants de la région 5'UTR des transcrits de la syncytine-A ont un impact sur la traduction du gène rapporteur, confirmant alors notre seconde hypothèse. D'une manière générale, les résultats de ce projet permettent d'approfondir les connaissances sur les transcrits de la syncytine-A, non seulement chez la souris, mais aussi chez d'autres membres de la super-famille des *Muroidea*. Malheureusement, le manque de temps et d'accès à certains matériaux biologiques a limité l'étendue de nos analyses. Premièrement, il aurait été fort

intéressant d'avoir accès à des placentas d'autres espèces, telles que la souris sylvestre ou le hamster, pour confirmer nos analyses *in silico*. Par la suite, alors qu'il a été possible de déterminer que les exons non-codants semblaient être impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de ce gène, le manque de temps et d'expertise a empêché la poursuite des analyses pour comprendre le mécanisme responsable de ce phénomène. Des essais de luciférase avec des mutations ponctuelles au niveau des uORF et des structures secondaires détectées *in silico* seraient une approche idéale pour vérifier leur rôle possible dans la régulation de la traduction des transcrits. Reprendre le protocole de RT-qPCR, tout en corrigeant les problèmes de contamination par les plasmides, permettrait de vérifier si l'effet observé dans les tests luciférase résulte d'une différence au niveau de la stabilité des transcrits. Une autre approche intéressante en RT-qPCR serait de quantifier le niveau d'expression des différents transcrits alternatifs dans les placentas, en utilisant directement les ARN totaux isolés à partir de ces derniers. Un approfondissement des connaissances sur la régulation de la syncytine-A permettra de mieux comprendre le rôle des syncytines, protéines clés chez les mammifères dans le phénomène de placentation.

BIBLIOGRAPHIE

- Ashwal, R., Hemi, R., Tirosh, A., Gordin, R., Yissachar, E., Cohen-Dayag, A., . . . Kanety, H. (2011). Differential expression of novel adiponectin receptor-1 transcripts in skeletal muscle of subjects with normal glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, *60*(3), 936-946. doi: 10.2337/db09-0532
- Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J. H. et Tsien, R. Y. (2006). Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*, *12*(5), 851-861. doi: 10.1261/rna.2309906
- Bacquin, A., Bireau, C., Tanguy, M., Romanet, C., Vernochet, C., Dupressoir, A. et Heidmann, T. (2017). A Cell Fusion-Based Screening Method Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Ly6e as the Receptor for Mouse Endogenous Retroviral Envelope Syncytin-A. *J Virol*, *91*(18). doi: 10.1128/JVI.00832-17
- Barbosa, C., Peixeiro, I. et Romao, L. (2013). Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet*, *9*(8), e1003529. doi: 10.1371/journal.pgen.1003529
- Basyuk, E., Cross, J. C., Corbin, J., Nakayama, H., Hunter, P., Nait-Oumesmar, B. et Lazzarini, R. A. (1999). Murine Gcm1 gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells. *Dev Dyn*, *214*(4), 303-311. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<303::AID-AJA3>3.0.CO;2-B
- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M. C., Garcia-Marin, J. F., Juste, R. A. et Perez, V. (2009). Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol*, *140*(1), 1-11. doi: 10.1016/j.jcpa.2008.07.010
- 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*(22), 13013-13018. doi: 10.1073/pnas.2132646100

- Blond, J. L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., . . . Cosset, F. L. (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(7), 3321-3329. doi: 10.1128/jvi.74.7.3321-3329.2000
- Campbell, N. A. et Reece, J. B. (2007). *Biologie* (3e éd.) Saint-Laurent : ERPI.
- Chen, J., Yang, J. T., Doctor, D. L., Rawlins, B. A., Shields, B. C. et Vaughn, J. C. (2013). 5'-UTR mediated translational control of splicing assembly factor RNP-4F expression during development of the *Drosophila* central nervous system. *Gene*, 528(2), 154-162. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.027
- Cheynet, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J. L., Boson, B., Vachot, L., . . . Mallet, F. (2005). Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol*, 79(9), 5585-5593. doi: 10.1128/JVI.79.9.5585-5593.2005
- Cornelis, G., Funk, M., Vernochet, C., Leal, F., Tarazona, O. A., Meurice, G., . . . 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(51), E10991-E11000. doi: 10.1073/pnas.1714590114
- Cornelis, G., Heidmann, O., Bernard-Stoecklin, S., Reynaud, K., Veron, G., Mulot, B., . . . 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(7), E432-441. doi: 10.1073/pnas.1115346109
- Cornelis, G., Heidmann, O., Degrelle, S. A., Vernochet, C., Laviaille, C., Letzelter, C., . . . 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(9), E828-837. doi: 10.1073/pnas.1215787110
- Cornelis, G., Vernochet, C., Carradec, Q., Souquere, S., Mulot, B., Catzeflis, F., . . . Heidmann, T. (2015). Retroviral envelope gene captures and syncytin exaptation for placentation in marsupials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(5), E487-496. doi: 10.1073/pnas.1417000112

- de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J. F., 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(19), 10414-10422. doi: 10.1128/jvi.77.19.10414-10422.2003
- 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(3), 725-730. doi: 10.1073/pnas.0406509102
- 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(29), 12127-12132. doi: 10.1073/pnas.0902925106
- 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(46), E1164-1173. doi: 10.1073/pnas.1112304108
- Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Vernochet, C., Bruls, T., Laviaille, C., Heidmann, T. (2008). A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(45), 17532-17537. doi: 10.1073/pnas.0807413105
- Ethiraj, P., Link, J. R., Sinkway, J. M., Brown, G. D., Parler, W. A. et Reddy, S. V. (2018). Microgravity modulation of syncytin-A expression enhance osteoclast formation. *J Cell Biochem*, 119(7), 5696-5703. doi: 10.1002/jcb.26750
- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. et Malim, M. H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J*, 16(15), 4531-4539. doi: 10.1093/emboj/16.15.4531
- Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O'Hanlon, D., Sung, H. K., Blencowe, B. J. (2011). An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*, 147(1), 132-146. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.023

- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. et Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett*, 582(14), 1977-1986. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.004
- Hall, M. N., Gabay, J., Debarbouille, M. et Schwartz, M. (1982). A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature*, 295(5850), 616-618. doi: 10.1038/295616a0
- He, F. et Jacobson, A. (2015). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu Rev Genet*, 49, 339-366. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-054639
- 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. doi: 10.1186/1742-4690-6-107
- Hsu, S. N. et Hertel, K. J. (2009). Spliceosomes walk the line: splicing errors and their impact on cellular function. *RNA Biol*, 6(5), 526-530. doi: 10.4161/rna.6.5.9860
- Karp, G. C. (2010). *Biologie cellulaire et moléculaire* (3e éd.) Bruxelles : de Boek.
- Klimatcheva, E., Rosenblatt, J. D. et Planelles, V. (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Front Biosci*, 4, D481-496.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283-292. doi: 10.1016/0092-8674(86)90762-2
- Kramer, M., Sponholz, C., Slaba, M., Wissuwa, B., Claus, R. A., Menzel, U., . . . Bauer, M. (2013). Alternative 5' untranslated regions are involved in expression regulation of human heme oxygenase-1. *PLoS One*, 8(10), e77224. doi: 10.1371/journal.pone.0077224
- Laliberté, F., Mucchielli, A., Ayraud, N. et Masseyeff, R. (1981). Antibody Transfer Mechanisms From Mother to Fetus Across Rat Yolk Sac Endoderm*. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1(6), 345-351. doi: 10.1111/j.1600-0897.1981.tb00070.x

- Langford, M. B., Outhwaite, J. E., Hughes, M., Natale, D. R. C. et Simmons, D. G. (2018). Deletion of the Syncytin A receptor Ly6e impairs syncytiotrophoblast fusion and placental morphogenesis causing embryonic lethality in mice. *Sci Rep*, 8(1), 3961. doi: 10.1038/s41598-018-22040-2
- 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(1626), 20120507. doi: 10.1098/rstb.2012.0507
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F. L. 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(13), 6442-6452. doi: 10.1128/jvi.76.13.6442-6452.2002
- Leppek, K., Das, R. et Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(3), 158-174. doi: 10.1038/nrm.2017.103
- Leroux, C., Montelaro, R. C., Sublimec, E. et Cadoré, J. L. (2005). EIAV (equine infectious anemia virus) : mieux comprendre la pathogénèse des infections lentivirales. *Virologie*, 9(4), 289-300.
- Luo, G. G. et Ou, J. H. (2015). Oncogenic viruses and cancer. *Virol Sin*, 30(2), 83-84. doi: 10.1007/s12250-015-3599-y
- Malassine, A., Frendo, J. L., Blaise, S., Handschuh, K., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., . . . Evain-Brion, D. (2008). Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology*, 5, 6. doi: 10.1186/1742-4690-5-6
- Malassine, A., Frendo, J. L. et Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update*, 9(6), 531-539. doi: 10.1093/humupd/dmg043
- Maltepe, E., Bakardjiev, A. I. et Fisher, S. J. (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest*, 120(4), 1016-1025. doi: 10.1172/JCI41211

- Mangoney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., . . . 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(51), 20534-20539. doi: 10.1073/pnas.0707873105
- Marieb, E. N. et Hoehn, K. (2010). *Anatomie et Physiologie Humaines* (4e éd.) Saint-Laurent : ERPI.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., . . . McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403(6771), 785-789. doi: 10.1038/35001608
- Mikkelsen, E., Lauridsen, H., Nielsen, P. M., Qi, H., Norlinger, T., Andersen, M. D., . . . Pedersen, M. (2017). The chinchilla as a novel animal model of pregnancy. *R Soc Open Sci*, 4(4), 161098. doi: 10.1098/rsos.161098
- Mirbod, P. (2018). Analytical model of the feto-placental vascular system: consideration of placental oxygen transport. *R Soc Open Sci*, 5(4), 180219. doi: 10.1098/rsos.180219
- Mockenhaupt, S. et Makeyev, E. V. (2015). Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development. *Semin Cell Dev Biol*, 47-48, 32-39. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.018
- Nagasaki, H., Arita, M., Nishizawa, T., Suwa, M. et Gotoh, O. (2005). Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene*, 364, 53-62. doi: 10.1016/j.gene.2005.07.027
- Noderer, W. L., Flockhart, R. J., Bhaduri, A., Diaz de Arce, A. J., Zhang, J., Khavari, P. A. et Wang, C. L. (2014). Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq. *Mol Syst Biol*, 10, 748. doi: 10.15252/msb.20145136
- Pincheira, R., Chen, Q. et Zhang, J. T. (2001, Jun 1). Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers. *Br J Cancer*, 84(11), 1520-1527. doi: 10.1054/bjoc.2001.1828

- Pozner, A., Lotem, J., Xiao, C., Goldenberg, D., Brenner, O., Negreanu, V., . . . Groner, Y. (2007). Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis. *BMC Dev Biol*, 7, 84. doi: 10.1186/1471-213X-7-84
- Qiao, S., Wang, F., Chen, H. et Jiang, S. W. (2017, Nov). Inducible knockout of Syncytin-A gene leads to an extensive placental vasculature deficiency, implications for preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 474, 137-146. doi: 10.1016/j.cca.2017.09.012
- Rai, A. (2015). *Development of Trophoblast Lined Blood Spaces In The Mouse Placenta* (Thèse). University of Calgary.
- Redelsperger, F., Cornelis, G., Vernochet, C., Tennant, B. C., Catzeflis, F., Mulot, B., . . . 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(14), 7915-7928. doi: 10.1128/JVI.00141-14
- Redelsperger, F., Raddi, N., Bacquin, A., Vernochet, C., Mariot, V., Gache, V., . . . Heidmann, T. (2016). Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. *PLoS Genet*, 12(9), e1006289. doi: 10.1371/journal.pgen.1006289
- Redline, R. W., Minich, N., Taylor, H. G. et Hack, M. (2007). Placental lesions as predictors of cerebral palsy and abnormal neurocognitive function at school age in extremely low birth weight infants (<1 kg). *Pediatr Dev Pathol*, 10(4), 282-292. doi: 10.2350/06-12-0203.1
- Robinson, M., Catzeflis, F., Briolay, J. et Mouchiroud, D. (1997). Molecular phylogeny of rodents, with special emphasis on murids: evidence from nuclear gene LCAT. *Mol Phylogenet Evol*, 8(3), 423-434. doi: 10.1006/mpev.1997.0424
- Rosenstiel, P., Huse, K., Franke, A., Hampe, J., Reichwald, K., Platzer, C., . . . Schreiber, S. (2007). Functional characterization of two novel 5' untranslated exons reveals a complex regulation of NOD2 protein expression. *BMC Genomics*, 8, 472. doi: 10.1186/1471-2164-8-472
- Schreiber, J., Riethmacher-Sonnenberg, E., Riethmacher, D., Tuerk, E. E., Enderich, J., Bosl, M. R. et Wegner, M. (2000). Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa. *Mol Cell Biol*, 20(7), 2466-2474. doi: 10.1128/mcb.20.7.2466-2474.2000

- Seetin, M. G. et Mathews, D. H. (2012). RNA structure prediction: an overview of methods. *Methods Mol Biol*, 905, 99-122. doi: 10.1007/978-1-61779-949-5_8
- Schubert, S. W., Lamoureux, N., Kilian, K., Klein-Hitpass, L. et Hashemolhosseini, S. (2008). Identification of integrin-alpha4, Rb1, and syncytin a as murine placental target genes of the transcription factor GCMa/Gcm1. *J Biol Chem*, 283(9), 5460-5465. doi: 10.1074/jbc.M710110200
- Simmons, D. G., Natale, D. R., Begay, V., Hughes, M., Leutz, A. et Cross, J. C. (2008). Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. *Development*, 135(12), 2083-2091. doi: 10.1242/dev.020099
- Soe, K., Andersen, T. L., Hobolt-Pedersen, A. S., Bjerregaard, B., Larsson, L. I. et Delaisse, J. M. (2011). Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone*, 48(4), 837-846. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.011
- Sonenberg, N. (1994). mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Genet Dev*, 4(2), 310-315.
- Suzuki, Y. et Suzuki, Y. (2011). Dans X. K. (dir.), *Viral Gene Therapy* (chap. Gene Regulatable Lentiviral Vector System). InTech.
- Tollervey, D. (2006). Molecular biology: RNA lost in translation. *Nature*, 440(7083), 425-426. doi: 10.1038/440425a
- Tolosa, J. M., Schjenken, J. E., Clifton, V. L., Vargas, A., Barbeau, B., Lowry, P., . . . 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(11), 933-941. doi: 10.1016/j.placenta.2012.08.004
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., . . . Barbeau, B. (2009). Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol*, 392(2), 301-318. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.025

- 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(11), 1085-1091. doi: 10.1177/1933719111404608
- 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(11), 885-892. doi: 10.1016/j.placenta.2011.08.006
- Vernochet, C., Redelsperger, F., Harper, F., Souquere, S., Catzeflis, F., Pierron, G., . . . 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(6), 148. doi: 10.1095/biolreprod.114.124818
- 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(17), 1529-1533. doi: 10.1089/088922299309810
- Voisset, C., Bouton, O., Bedin, F., Duret, L., Mandrand, B., Mallet, F. et Paranhos-Baccala, G. (2000). Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16(8), 731-740. doi: 10.1089/088922200308738