

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION ET FONCTION DES GÈNES *env* ASSOCIÉS AUX HERVs DANS
LES CELLULES TROPHOBLASTIQUES HUMAINES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
AMANDINE VARGAS

JANVIER 2008

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.01-2006). 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.»

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein du Département des sciences biologiques à l'Université du Québec à Montréal. Je tiens à remercier toutes les personnes du centre de recherche BioMed qui ont contribué au bon déroulement de ma maîtrise.

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Dr Benoit BARBEAU qui a dirigé l'ensemble de ce projet et qui a su me faire confiance.

Un très grand merci tout particulier à Julie MOREAU pour toute son aide, sa patience et son soutien quotidien mais aussi sa générosité, ses encouragements et surtout son amitié. Travailler à ses côtés me manquera.

Je voudrais aussi grandement remercier Sébastien LANDRY et Marilène HALIN pour leur disponibilité, leur aide, leur conseil et surtout pour l'expérience qu'ils m'ont permis de vivre.

J'ai également eu le privilège de travailler avec l'équipe du Dre Julie LAFOND qui a su prendre le temps de répondre à mes nombreuses questions.

J'exprime à ces personnes toute ma gratitude pour m'avoir accueillie et permis que ma maîtrise se déroule dans une bonne humeur permanente.

Enfin je remercie mes parents, ma mamie, mon conjoint et mes amis (es) qui ont su m'encourager à continuer mes études graduées et sans qui je n'aurais sans doute pas trouvé la force de surmonter certains obstacles et épreuves douloureuses.

A mon grand père et ma mamie Emile et Yvette Guirado...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I.....	4
ÉTATS DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Les rétrovirus.....	4
1.1.1 Structure des rétrovirus.....	4
1.1.2 Organisation génomique.....	7
1.1.3 Cycle de réplication.....	9
1.2 Les rétrovirus endogènes.....	11
1.2.1 Leur origine.....	11
1.2.2 Organisation génomique des rétrovirus endogènes.....	12
1.2.3 Classification des rétrovirus endogènes.....	13
1.2.4 Expression des rétrovirus endogènes.....	14
1.3 Biologie placentaire.....	17
1.3.1 Anatomie placentaire.....	17
1.3.2 Structure du tissu placentaire.....	19
1.3.3 Implantation du blastocyste dans l'utérus et formation du syncytiotrophoblaste.....	20

1.4	Le trophoblaste et les modèles d'études	22
1.5	HERVs et placenta.....	23
1.5.1	Découverte de la Syncytine-1 et son rôle potentiel.....	23
1.5.2	Intéraction de la Syncytine-1 et système de transport.....	25
1.5.3	Régulation de l'expression de la Syncytine-1	26
1.5.4	Rôles et fonctions controversés de la Syncytine-1	27
1.5.5	HERV-FRD.....	29
1.5.6	Autres protéines d'enveloppes	30
1.6	Hypothèses de travail.....	31
CHAPITRE II		33
ARTICLE 1		33
2.1	Contributions.....	33
2.2	Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor	34
2.2.1	Abstract	35
2.2.2	Introduction	36
2.2.3	Materials and Methods.....	37
2.2.4	Results and Discussion.....	40
2.2.5	Acknowledgments.....	43
2.2.6	Figure Legends.....	44
2.2.7	Figures.....	45
CHAPITRE III.....		50
ARTICLE 2		50
3.1	Contributions.....	50
3.2	Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells	51
3.2.1	Abstract	52

3.2.2	Introduction	53
3.2.3	Materials and Methods.....	55
3.2.4	Results.....	62
3.2.5	Discussion	69
3.2.6	Acknowledgments.....	74
3.2.7	Figure legends.....	75
3.2.8	Table.....	79
3.3.9	Figure legends (Supplementary material)	80
3.3.10	Figures.....	81
3.3.11	Supplementary material	93
CHAPITRE IV		95
DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AUX ARTICLES ET CONCLUSION..		95
4.1	Importance des tyrosines kinases et impact de l'activité des protéines tyrosines phosphatases dans les événements fusogéniques des trophoblastes humains et phénomènes de différenciation cellulaire.....	95
4.2	Modulation de l'expression des différentes enveloppes, à court, moyen ou long terme par des agents inducteurs de la fusion cellulaire.....	97
4.3	Activités promotrices des LTR-5'.....	99
4.4	Patron d'expression de nouvelles protéines d'enveloppe retrovirales	100
4.5	Expression des protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2 dans les lignées JEG-3 et Jar	102
4.6	Effet de l'inhibition des protéines d'enveloppe sur l'état de la fusion cellulaire	103
4.7	Système de quantification de la fusion cellulaire	104
4.8	Localisation cellulaire des protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2	105
4.9	Conclusion	106

ANNEXES..... 108

RÉFÉRENCES..... 113

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique de la structure d'un rétrovirus	5
Figure 1.2 : Représentation schématique de la glycoprotéine de surface (SU) associée à la protéine transmembranaire (TM)	6
Figure 1.3 : Schéma de la structure de l'ARN transcrit d'un rétrovirus.....	8
Figure 1.4 : Représentation des étapes d'infection, d'intégration et de réplication d'un rétrovirus dans une cellule.....	10
Figure 1.5 : Représentation schématique du placenta vers le quatrième mois en section sagittale.....	18
Figure 1.6 : Photographie d'un placenta représentant la face maternelle et la face fœtale	19
Figure 1.7 : Représentation schématique de l'implantation du blastocyste dans l'utérus et formation du syncytiotrophoblaste.....	22
Figure 1.8 : Représentation schématique de la structure d'une protéine d'enveloppe rétrovirale.....	25
Figure 1.9 : Régulation du gène Syncytine-1.....	27
Figure 1.10 : Résultat de l'alignement des séquences en acide aminé Syncytine-1 et Syncytine-2.....	30
Figure 2.1 : Effect of forskolin and bpV[pic] on cAMP levels and cell fusion.....	45-47
Figure 2.2 : Effect of forskolin and bpV[pic] on Syncytin-1 expression.....	48-49
Figure 3.1 : Characterization of Syncytin-2 mRNA by 5'/3'RACE analysis.....	81-82
Figure 3.2 : Syncytin-1 and Syncytin-2 expression in cultured primary human trophoblast cells.....	83
Figure 3.3 : Syncytin-1 and Syncytin-2 expression in trophoblastic cells lines following activation.....	84-85

Figure 3.4 : Syncytin-1 and Syncytin-2 promoter activity following stimulation of BeWo cells.	86
Figure 3.5 : Cellular localisation of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cells upon stimulation.....	87-88
Figure 3.6 : Efficiency and specificity of Syncytin-1 and Syncytin-2 siRNA in transfected BeWo cells.....	89-90
Figure 3.7 : BeWo cell fusion following RNA interference on Syncytin-1 and Syncytin-2 expression.....	91-92
Figure 3.S1 : Detection of Syncytin-2 by an anti-Syncytin-2 polyclonal antibodies..	93
Figure 3.S2 : Detection of Syncytin-2 on paraformaldehyde-fixed BeWo cells.....	94

LISTE DES TABLEAUX

Table 3.1 : Sequences of the tested siRNAs in BeWo cell transfection.....	79
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : Adénine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ASCT : Système de transport d'acide aminé neutre

bpV[pic] : Bis-peroxovanadium [pic] : inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase

C : Cytosine

CA : Capside

CRE : Élément de réponse à l'AMPc

CREB : Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

dUTP : Déoxyuridine triphosphate

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

env : Enveloppe

ERV : Rétrovirus endogène

forsk : Forskoline

G : Guanosine

gag : Antigène de groupe

GCM-1 : *Glial Cell Missing-1*

GFP : *Green fluorescent protein*

GST : *Glutathione-s-transferase*

hCG : Hormone gonadotrophine chorionique humaine

HELLP : *Hemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelet count*

hPL : Hormone placentaire lactogène humaine

HERV : Rétrovirus endogène humain

IN : Intégrase

Kda : Kilodalton

L : *Leader*

LINE : *Long interspersed element*

LTR : *Long terminal repeat*

M : Molaire

MA : Matrice protéique

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NC : Nucléocapside

nt : Nucléotide

pb : Paire de bases

PBS : *Phosphate buffered saline*

PBS : Site de liaison de l'ARNt utilisé par la transcriptase inverse

PCR : *Polymerase chain reaction*

Pol : *Polymerase*

PPT : *PolyPurine Tract*

PR : Protéase

R : Région unique répétée

RDR : Récepteur rétroviral mammifère de type D

RT : Rétro-transcriptase

SiRNA : *Small interfering RNA*

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SU : Glycoprotéine de surface

T : Thymidine

T_m : *Temperature melting point*

TM : Glycoprotéine transmembranaire

U3 / U5 : Séquences uniques répétées

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES SYMBOLES

°C : Degrés celsius

h : Heure

kb : Kilobase

kg : Kilogramme

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mM : Milimolaire

μ : Micro, 10^{-6}

n : Nano, 10^{-9}

sec : Seconde

U : Unité

μg : Microgramme

μl : Microlitre

RÉSUMÉ

Près de 8% du génome humain est constitué de séquences d'origine rétrovirale. Ces séquences nommées HERVs (*Human Endogenous RetroVirus*) représentent des vestiges d'intégrations rétrovirales ancestrales qui font maintenant partie de notre génome. Certaines de ces séquences sont toujours aptes à produire des protéines typiques aux rétrovirus, telles que les protéines de l'enveloppe ou certaines protéines régulatrices. La présence des HERVs dans le génome humain peut se révéler être associée à divers phénomènes biologiques, favorisant ainsi l'idée qu'une corrélation entre ces rétrovirus endogènes et certaines pathologies, telles que la sclérose en plaque, la schizophrénie ou encore la pré-éclampsie pourrait exister. Cependant, il a été suggéré qu'une protéine d'enveloppe appartenant à une séquence d'HERV, nommée Syncytine-1, pourrait participer au développement du placenta. La fonction de cette dernière serait de provoquer des événements de fusion cellulaire entre les cellules cytotrophoblastiques du placenta, permettant la formation de la structure cellulaire nommée syncytiotrophoblaste. Cependant, d'autres protéines d'enveloppe d'HERVs découvertes récemment, telle que la Syncytine-2, pourraient aussi participer à ces événements fusogéniques de façon équivalente, voir plus importante que la Syncytine-1. L'étude menée ici a tout d'abord eu pour but d'approfondir et de présenter des mécanismes possibles de régulation du gène Syncytine-1 ainsi que d'un autre gène *env* d'HERVs, soit la Syncytine-2, possiblement impliquée dans les événements fusogéniques des cellules trophoblastiques. D'abord, des expériences de 5'/3' RACE ont permis de caractériser les extrémités du transcrite Syncytine-2. L'expression de ces enveloppes rétrovirales a été ensuite étudiée en utilisant la technique RT-PCR. En effet, l'ARN total a été extrait de différentes lignées cellulaires de choriocarcinomes trophoblastiques (BeWo, Jar et JEG-3), stimulées ou non avec les agents activateurs, forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) et bpV[pic] (un inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase) dont l'impact dans les événements de fusion a été étudié parallèlement. D'autres amplifications par RT-PCR, utilisant l'ARN de cellules primaires humaines placentaires, ont été envisagées, afin de mettre en évidence l'expression de ces gènes dans un contexte plus représentatif du placenta. D'autre part, une étude des différentes activités promotrices a été réalisée à l'aide de différents clonages des régions LTR-5' de ces deux gènes dans un vecteur rapporteur de la luciférase. Dans un second temps, il s'agissait d'étudier l'implication fonctionnelle de ces deux protéines d'enveloppe d'HERVs, au cours de la syncytialisation des trophoblastes, par différentes expériences de fusion en présence d'inhibiteurs de l'expression de ces enveloppes rétrovirales telles que des molécules d'ARN Interférents. Enfin, leur localisation cellulaire a été mise en évidence au travers de la microscopie confocale.

MOTS CLÉS : HERV, rétrovirus endogène, *env*, Syncytine-1, Syncytine-2, placenta, trophoblaste, fusion, syncytium, expression, transcription, LTR, localisation, siRNA.

INTRODUCTION

Il est apparu récemment que les chromosomes que nous recevons de nos parents et transmettons à nos enfants portent la trace de virus : c'est ce que nous appelons les rétrovirus endogènes. Ces éléments, appelés ERV (*Endogenous RetroVirus*), se comportent comme des gènes mendéliens stables et sont transmis de façon verticale à la génération suivante. On présume que ces séquences endogènes dérivent d'événements intégratifs de rétrovirus exogènes (transmission horizontale) dans la lignée germinale d'un hôte spécifique. Durant l'évolution, ces séquences endogènes ont modelé le génome de presque tous les vertébrés. A l'heure actuelle, environ 8 % du génome humain est composé de séquences rétrovirales endogènes nommées HERVs (*Human Endogenous RetroVirus*) (Lander et al., 2001). Comme en témoigne la persistance de certains cadres de lecture ouverts dans notre génome ainsi que l'abondance des séquences de régulation, ils doivent ainsi depuis des millions d'années influencer sur leurs hôtes et sur l'évolution de ceux-ci. C'est ainsi que les rétrovirus endogènes et les mammifères ont évolué conjointement, à leur avantage mutuel (Bannert and Kurth, 2004). Mais quelle est leur exacte signification biologique? La littérature fait état de l'implication des HERVs dans des contextes pathologiques comme les cancers ou encore des maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaque, ainsi que de la grande complexité de leur profil d'expression selon l'état de différenciation du tissu concerné (Clerici et al., 1999; Kurth, 1986). C'est ainsi que de nombreuses recherches sont menées aujourd'hui, afin d'identifier les mécanismes par lesquels les rétrovirus endogènes pourraient participer au développement des tumeurs ou d'autres pathologies, et de caractériser les gènes rétroviraux impliqués.

Par ailleurs, ces gènes captifs, d'origine rétrovirale, semblent intervenir aussi dans la biologie placentaire humaine. Ils doivent favoriser l'augmentation des échanges materno-fœtaux dans le placenta et peut-être contrôler l'invasion de la

déciduale et du myomètre (couche musculieuse interne de la paroi utérine), processus soigneusement orchestré au cours des grossesses normales auquel sont associées certaines insuffisances (Durig et al., 1999; Knerr et al., 2002; Muller et al., 1998). Citons notamment la pré-éclampsie, une hypertension artérielle gravidique, ainsi que le syndrome HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes & Low Platelet count*), une association syndromique d'une anémie hémolytique, d'une cytolysé hépatique et d'une thrombopénie chez une femme enceinte (Collinet et al., 2006; Gordin et al., 2007; Prakash et al., 2006). Afin de lutter contre ces pathologies et insuffisances, il devient important d'identifier et de caractériser les différents acteurs intervenant dans la biologie placentaire. Cette biologie fait notamment intervenir le cytotrophoblaste, qui apparaît comme l'élément clé du placenta humain. Cette cellule, d'origine embryonnaire, est directement impliquée dans les processus biologiques indispensables à l'établissement, au maintien et au développement d'une grossesse, que sont l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, la tolérance immunitaire de l'allogreffe, ainsi que le développement et la croissance fœto-placentaire. Il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes réglant les diverses activités du cytotrophoblaste au cours de ces processus, faisant intervenir notamment, prolifération, migration, invasion, différenciation par fusion cellulaire et coopérativité intercellulaire.

Pour certains rétrovirus endogènes, un rôle physiologique a pu être mis en évidence. Il a ainsi été montré que la protéine *env* de HERV-W, nommée Syncytine-1, est responsable de la formation du syncytiotrophoblaste placentaire (cytotrophoblastes ayant fusionné) (Blond et al., 2000; Lavillette et al., 2002; Potgens et al., 2004). Aussi, des évidences de l'altération de l'expression de la Syncytine-1 dans certaines anomalies liées à la grossesse, notamment à un dysfonctionnement du placenta, ont été démontrées (Knerr et al., 2004). Malgré les évidences concernant l'implication de cette protéine dans la syncytialisation des trophoblastes, de nombreuses questions restent aujourd'hui sans réponse et ne font qu'accroître la possibilité que d'autres facteurs cellulaires puissent aussi être impliqués (Potgens et

al., 2004). En effet, la localisation cellulaire de cette protéine ne semble pas être clairement définie (Huppertz et al., 2006; Potgens et al., 2004). Ainsi, la corrélation entre l'expression de la Syncytine-1 et la fusion des trophoblastes ne demeure pas si évidente, d'autant plus que de nombreuses lignées cellulaires trophoblastiques non fusogéniques expriment fortement cette protéine (Borges et al., 2003; Muir et al., 2006). D'autres études ont révélé l'existence de nouvelles protéines fusogéniques appartenant à des séquences d'HERVs et fortement exprimées dans le placenta (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2004; Malassine et al., 2007; Polavarapu et al., 2006). Récemment découverte et appartenant à ces séquences d'HERVs, la Syncytine-2 pourrait elle aussi jouer un rôle dans la fusion des trophoblastes humains (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2005; Blaise et al., 2004; Malassine et al., 2007; Malassine et al., 2005; Renard et al., 2005). Dans le cadre du projet, il devient intéressant d'élargir la connaissance des rôles physiologiques de ces protéines d'enveloppe d'HERVs, mais aussi celle des mécanismes de fusion cellulaire, dans l'une des étapes cruciales intervenant au cours de la placentation.

Ainsi, en premier lieu, une littérature pertinente au sujet sera exposée. Deux articles scientifiques, l'un publié et le second en soumission de publication, s'en suivront, et le mémoire terminera enfin par une discussion et une conclusion complémentaire aux articles, faisant état du bilan du travail entrepris pendant ma maîtrise.

CHAPITRE I

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 Les rétrovirus

1.1.1 Structure des rétrovirus

« Les virus sont des entités biologiques caractérisées par une structure nucléoprotéique simple et des propriétés fonctionnelles particulières. Le génome de ces agents est constitué d'un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN), associé à une structure protéique protectrice, la capsid et parfois l'enveloppe lipidique. Ce sont des parasites intra-cellulaires absolus car ils ne contiennent pas de système métabolique et de synthèse capable d'assurer une répliation autonome » (André Lwoff 1957). Les rétrovirus, représentant la famille des *Retroviridae*, se définissent par leur structure mais aussi par leur mode de répliation. Ce sont des virus globulaires enveloppés, d'un diamètre de 90 à 120 nanomètres, très répandus dans le monde animal. Ils sont la cause de différentes formes de cancer, d'immunodéficiences, dont le SIDA, et de dégénérescences du système nerveux central. Ils possèdent un génome composé de deux copies d'ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 7 à 11 kb pour chaque brin. L'ARN est constitué de deux chaînes identiques reliées ensemble à leur extrémité 5'. L'enveloppe extérieure est constituée d'une bicouche lipidique membranaire de la cellule hôte, enrichie par une protéine spécifique codée par le gène *env*. On dit souvent qu'elle est hérissée de spicules. Autour de l'ARN se trouve une capsid, formée de protéines codées par le gène *gag* (Figure 1.1).

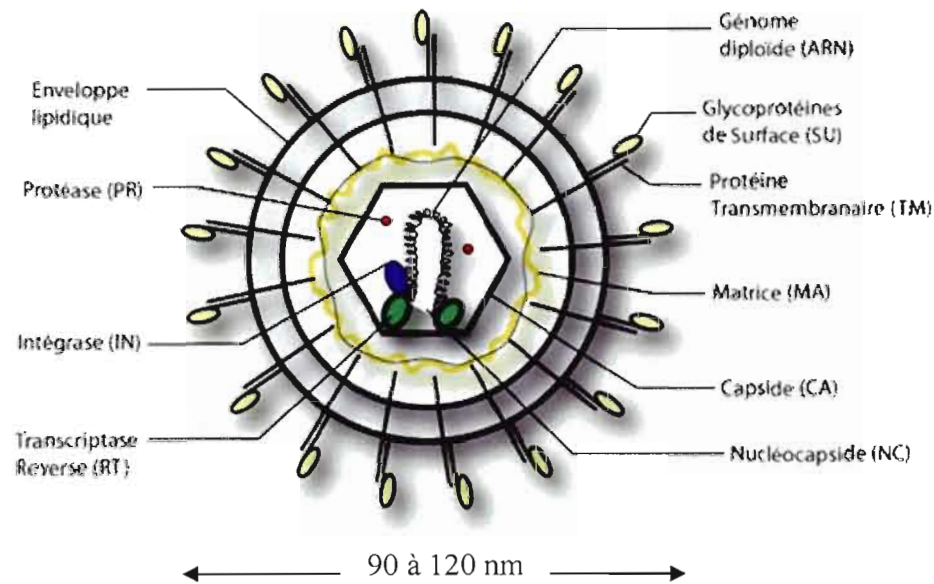


Figure 1.1 : Représentation schématique de la structure d'un rétrovirus. Image tirée du livre « Principles of Molecular Virology » de Alan Cann. Le matériel génétique sous forme d'ARN est contenu dans la capside en présence de la nucléocapside et des enzymes transcriptase inverse, protéase et intégrase. La capside est entourée de la matrice, laquelle est recouverte d'une membrane de phospholipides provenant de la cellule hôte. Les glycoprotéines sont présentes à la surface des virions.

De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve l'enveloppe virale ou lipidique entourant la nucléocapside. Directement récupérée de la cellule infectée à l'étape du bourgeonnement, l'enveloppe est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et d'une glycoprotéine virale : i) la glycoprotéine de surface (SU), qui est un antigène viral majeur, est glycosylée et excrétée. Sous la forme d'un bouton, c'est la protéine qui est responsable de la fixation sur les récepteurs spécifiques. Elle est associée à la portion transmembranaire TM de façon non-covalente. ii) La partie transmembranaire (TM) traversant l'enveloppe virale, n'est pas glycosylée et correspondant à la partie interne de l'enveloppe.

L'ensemble (SU et TM) fait saillie à la surface du virus sous forme de spicules qui correspondent à des trimères de cette glycoprotéine (Figure 1.2).

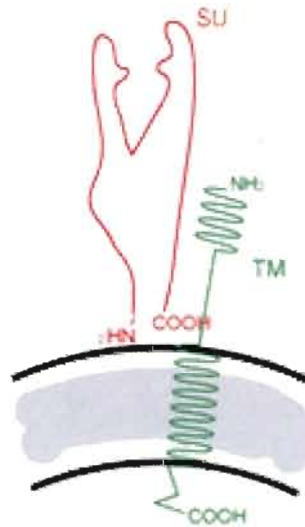


Figure 1.2 : Représentation schématique de la glycoprotéine de surface (SU) associée à la protéine transmembranaire (TM). Image tirée du livre « Principles of Molecular Virology » de Alan Cann. Les glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus sont synthétisées sous forme d'un précurseur protéique qui transite par le Golgi avant d'atteindre la membrane cellulaire. Lors de ce trajet, ce précurseur est sous forme d'un oligomère qui est glycosylé et clivé en glycoprotéine de surface (SU) et transmembranaire (TM). Les protéines SU et TM demeurent associées grâce à des liaisons de faible énergie et sont ancrées dans la membrane cellulaire par l'intermédiaire de l'hélice hydrophobe transmembranaire de la TM. Par son interaction spécifique avec un ou des récepteur(s) cellulaire(s), la SU est responsable de la reconnaissance de la cellule cible. L'interaction SU/récepteur(s) induit des changements conformationnels aussi bien de la SU que de la TM. Ceci déclenche l'exposition d'un peptide fusionnant situé à l'extrémité NH_2 -terminale de la TM, ce qui provoque la fusion entre l'enveloppe virale portant la TM avec la membrane de la cellule cible.

A l'intérieur de l'enveloppe se trouve le *core* viral ainsi entouré, comprenant deux molécules d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales : i) la matrice protéique (MA), codée par le gène *gag* et constituant la frontière intérieure de l'enveloppe, ii) la capsid (CA), aussi codée par le gène *gag*, protégeant le génome et faite de protéines virales polymérisées. C'est la protéine la plus abondante. La capsid a une conformation géométrique qui, selon les virus est, soit tubulaire, soit

polyédrique. iii) La nucléocapside (NC) est la structure compacte formée par l'assemblage de la capsid autour du génome. Elle est codée par le gène *gag* et protège le génome ; c'est l'assemblage entre l'ARN et la NC avec en plus quelques protéines qui vont former le *core*. iv) La protéase (PR) est codée par le gène *pol* et, est générée par auto-clivage du précurseur *gag-pro*. Elle intervient dans la maturation des particules virales en clivant les précurseurs des protéines virales excepté celui des protéines d'enveloppe. v) La rétro-transcriptase (RT), est codée par le gène *pol* et est responsable de la rétrotranscription en un ADNc qui va ensuite s'intégrer dans le génome. Enfin, vi) l'intégrase (IN) est codée par le gène *pol* et elle sert à l'intégration du génome viral au génome cellulaire.

1.1.2 Organisation génomique

Le génome des rétrovirus non défectifs ayant une longueur d'environ 7-11 Kpb, est flanqué de chaque côté par des séquences répétitives, deux unités promotrices identiques appelées LTRs (*Long Terminal Repeat*). Il est aussi composé de trois gènes de base, soit *gag*, *pol* et *env*. Dans les capsides des rétrovirus, on retrouve deux ARNs simple brin (+) qui ont une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' (Figure 1.3). Ces deux molécules d'ARN génomiques sont liées par des ponts hydrogènes. Il y a d'autres types d'acides nucléiques présents dans les particules : ADN cellulaire et ARNt (par exemple, ARNt^{Pro}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Trp}). Le génome des rétrovirus possède quatre caractères principaux : i) ce sont les seuls virus à être véritablement diploïdes; ii) de plus, ils sont aussi les seuls virus à ARN dont le génome est produit par la machinerie cellulaire de transcription, iii) ce sont également les seuls virus dont le génome va nécessiter un ARN cellulaire spécifique pour la réplication et, iv) l'ARN cellulaire est un ARNt. Les différents composants décrits plus loin (séquences de régulation et gènes) du génome viral se décomposent tel qu'illustré dans la Figure 1.3:



Figure 1.3 : Schéma de la structure de l'ARN transcrit d'un rétrovirus. Image inspirée du livre « Principles of Molecular Virology » de Alan Cann. Les génomes des rétrovirus contiennent les gènes *gag*, *pol*, *env*, encadrés par deux LTRs constitués des régions U3, R et U5.

L'organisation génomique classique des rétrovirus comporte alors ces différentes régions :

- U5 : cette séquence unique répétée variant de 75 à 250 nt, forme la première partie du génome viral qui va être rétro-transcrite et ainsi l'extrémité 3' de l'ADNc.
- PBS (*Primer Binding Site*) : cette séquence représente le site d'attachement de l'ARNt sur l'ARN génomique et elle est complémentaire des 16 à 19 nucléotides de la région 3' de l'ARNt. L'extrémité de cette ARNt servira alors d'initiateur pour la rétrotranscription. Il existe aussi des sites additionnels tels que PPT (*PolyPurine Tract*), une région riche en purine comportant 10 à 12 nt, notamment nécessaire à l'amorçage du brin (+) pendant la rétro-transcription. Dans le cas des lentivirus, on retrouve deux PPT, l'une centrale et l'autre terminale.
- L (*Leader*) : cette région située à la fin de la région PBS et au début de la région codante du gène *gag*, varie entre 250 et 300 nt. Cette séquence a une grande importance de par les signaux qu'elle porte : i) elle serait impliquée dans l'encapsulation des ARN viraux (Darlix, 1986; Nishizawa et al., 1985; Shank and Linial, 1980), ii) elle participe à la formation des dimères d'ARN, par l'intermédiaire de ponts hydrogènes (Dhar et al., 1980; Haseltine et al., 1977), iii) elle contient les signaux nécessaires à la fixation des ribosomes sur la molécule d'ARN (Patschinsky et al., 1986).
- Les gènes : ce sont *gag*, *pol* et *env*, bien que certains rétrovirus possèdent des gènes additionnels tels que *rev*, *tat* ou *tax*.

- U3 : Cette région unique répétée non codante variant de 200 à 1200 nt, forme l'extrémité 5' de l'ADNc et contient des signaux contrôlant la transcription du provirus et sera utilisé dans l'ADN proviral.
- R : cette petite région variant de 18 à 250 nt forme une région unique répétée à chacune des extrémités du génome viral. Elle contient deux types de signaux différents : i) le signal permettant la polyadénylation de l'ARN viral, AAUAAA, bordant l'ARN en 3', ii) un deuxième type de signal contrôlant la transcription du provirus et sera utilisé dans l'ADN proviral. La numérotation des nucléotides du LTR (U3-R-U5) situé en 5' se fait de façon négative à partir du premier nucléotide de la séquence R (noté, lui, +1) selon le sens utilisé lors de transcription de l'ADN. Ainsi, le signal de polyadénylation AATAAA est située en position -2 à -7 dans la séquence U3 du LTR 5' (Chen and Barker, 1984; Montell et al., 1983).

1.1.3 Cycle de réplication

Les rétrovirus nécessitent la machinerie cellulaire d'une cellule hôte pour se répliquer. Le cycle de réplication des rétrovirus débute par l'attachement de la particule virale à des récepteurs membranaires spécifiques à la cellule cible. Ensuite, les glycoprotéines virales engendrent la fusion des membranes cellulaires et rétrovirales. La particularité des rétrovirus est l'intégration de leur génome dans celui de la cellule hôte après une étape de rétrotranscription de leur ARN en ADN double brin (Figure 1.4). Cette étape est réalisée par une enzyme codée par les rétrovirus: la rétro-transcriptase, évoquée précédemment. Sous leur forme intégrée, les rétrovirus sont nommés provirus. Les rétrovirus persistent dans l'organisme de l'hôte malgré l'existence d'une réponse immunitaire spécifique. Il s'ensuit le transport de l'ADN proviral dans le noyau et son intégration dans le génome de la cellule hôte à l'aide de l'enzyme Intégrase. Les séquences régulatrices présentes dans les LTRs viraux, notamment la région U3, permettront un épissage et ainsi activeront la transcription et la traduction du matériel nécessaire à l'assemblage de particules virales et, il y aura

bourgeonnement des virions à l'extérieur de la cellule. Ces nouveaux rétrovirus seront à leur tour capable d'infecter de nouvelles cellules.

Aujourd'hui, deux types de rétrovirus se distinguent selon la complexité de leur génome : i) les virus simples, ne comportant que les gènes essentiels à leur réplication (*gag*, *pro*, *pol* et *env*) et, ii) les virus complexes qui possèdent en plus de ces quatre gènes, des gènes dits accessoires comme *vpr* et *tat* du VIH (*Virus d'Immunodéficience Humaine*), permettant la régulation de leur cycle répliatif.

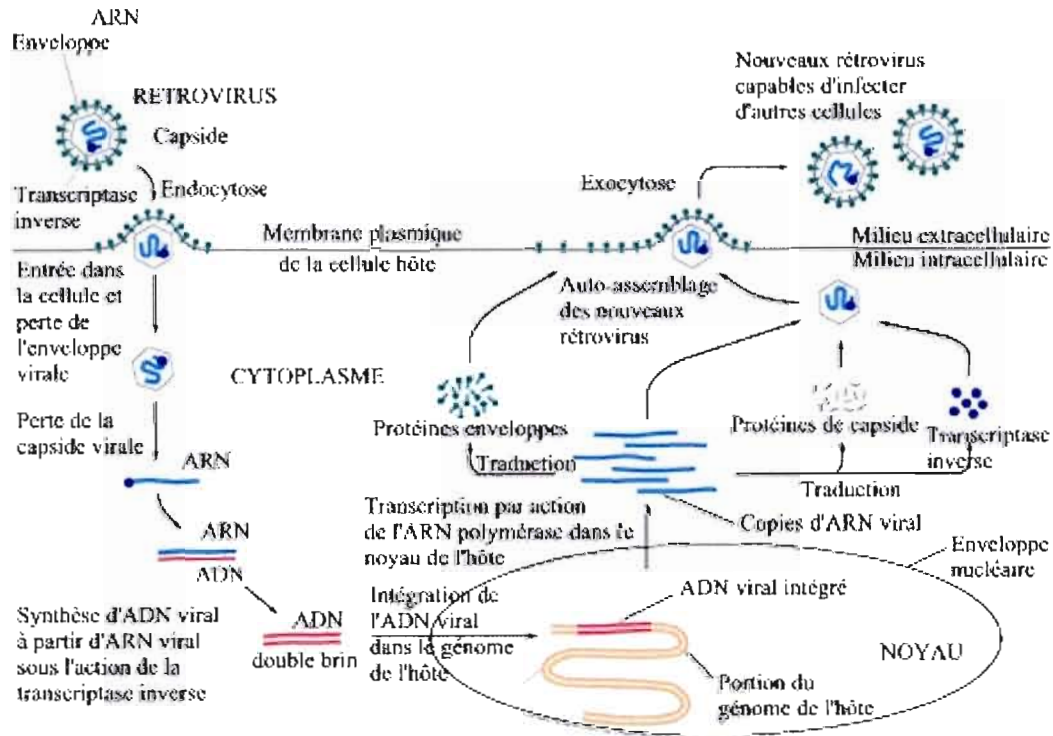


Figure 1.4 : Représentation des étapes d'infection, d'intégration et de réplication d'un rétrovirus dans une cellule. Image adaptée et tirée du livre « Principles of Molecular Virology » de Alan Cann. Pour infecter une cellule, le rétrovirus se fixe d'abord à la membrane cellulaire hôte par un récepteur spécifique. L'ARN génomique est ensuite libéré dans le cytoplasme, rétrotranscrit en ADN et une fois au noyau, l'ADN résultant est intégré au génome cellulaire et utilise la machinerie de synthèse de la cellule hôte pour produire de nouvelles particules virales. Ces dernières pourront ainsi aller infecter d'autres cellules.

1.2 Les rétrovirus endogènes

1.2.1 Leur origine

Les rétrovirus sont des virus ayant la capacité de pénétrer les cellules permissives par voie infectieuse grâce à une protéine d'enveloppe codée par le génome viral. Si la cellule infectée est d'origine germinale, le génome viral intégré, l'ADN proviral, peut éventuellement au cours des années devenir une constituante stable du génome de l'hôte infecté, ce qui fut le cas pour les séquences rétrovirales communément appelées rétrovirus endogènes ou ERV. Ces séquences sont alors transmises de génération en génération comme n'importe quel gène cellulaire. Il y a ainsi en nous et chez de nombreuses espèces, des séquences virales, qui nous accompagnent depuis des millions d'années, transmis à travers notre bagage génétique.

Les rétrovirus endogènes ayant intégré la lignée germinale à différents temps, on distingue deux types d'ERV : les « anciens » et les « modernes ». Les ERV anciens sont présents au niveau d'un même site d'intégration chez plusieurs espèces. Chez l'Humain, l'insertion de certains HERVs (*Human Endogenous RetroVirus*) anciens date de plus de 60 millions d'années. L'existence de ces HERVs est connue depuis longtemps, mais leur abondance n'était pas soupçonnée, jusqu'à ce que le séquençage du génome humain révèle que 45% de notre ADN est composé d'éléments transposables comme les rétroéléments (séquence LINE, pour *long interspersed element*, et Alu) et les transposons, et, qu'environ 8% de la totalité de notre génome est constitué de séquences ayant des homologies avec des rétrovirus infectieux. Les HERVs ont accumulé de très nombreuses mutations et/ou des délétions dans leurs régions codantes ou régulatrices (Lefranc et al., 2001). Les ERVs modernes quant à eux ont été introduits dans la lignée germinale plus récemment et montrent ainsi une hétérogénéité génétique considérable dans les sites d'insertion d'une espèce à une autre. Ils n'ont pas été identifiés chez toutes les espèces de

vertébrés. En effet, malgré la présence de rétrovirus endogènes modernes chez la souris, le poulet et de nombreux primates, les humains ne les possèdent pas dans leur génome (Perron et al., 1997). Les rétrovirus endogènes modernes montrent beaucoup moins de mutations et il existe parfois des rétrovirus exogènes circulants qui leur sont très proches génétiquement.

1.2.2 Organisation génomique des rétrovirus endogènes

Les copies rétrovirales endogènes, organisées de la même façon que les provirus exogènes, possèdent des gènes de structure et des gènes codant pour des enzymes bordées par deux LTRs. Le génome de la plupart des rétrovirus endogènes est dit simple puisqu'il ne présente pas de gène de régulation, à l'exception de HERV-K (HML-2) qui code pour une protéine nommée *Rec* similaire à *Rev* du VIH (Dewannieux et al., 2006; Mayer et al., 2004). En effet, une équipe Lyonnaise a réussi à produire un rétrovirus infectieux et répliquatif, alors appelé « Phoenix », à partir de différents fragments du rétrovirus endogène HERV-K (Dewannieux et al., 2006).

Le génome des rétrovirus endogènes est composé de gènes de structure *gag* et *env* et de gènes codant pour les fonctions enzymatiques *pro* et *pol*, (Benit et al., 2001). Le gène *gag* (*Antigène de groupe*), codant pour les protéines de matrice, de nucléocapside et de capsid, est essentiel dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Le gène *env* (*enveloppe*) code pour un précurseur qui est clivé afin de donner la glycoprotéine de surface (SU) et transmembranaire (TM) constituant avec les protéines de la membrane cellulaire, l'enveloppe virale. Le gène *pro* (*protéase*) code pour deux enzymes, la protéase (PR) et la déoxyuridine triphosphatase (dUTPase). La dUTPase est capable de prévenir les incorporations de dUTP (déoxyUridine TriPhosphate) par la rétro-transcriptase lors de la rétrotranscription. Le gène *pol* (*polymérase*) code pour les enzymes essentielles à la réplication virale : la transcriptase inverse associée à l'activité ribonucléase H (RNase H) et l'intégrase (IN). L'extrémité 5' de l'ARN viral débute par une courte séquence R (*Repeat*) suivie par une région unique nommée U5. L'extrémité 3'

contient la séquence U3 et la région R. Ainsi l'organisation générale de l'ARN viral est R-U5- *gag-pro-pol-env*-U3-R. L'ADN viral obtenu après la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN se retrouve encadré à chaque extrémité par des séquences de régulation identiques et répétées : les LTRs, formés des régions U3-R-U5. Ces séquences LTRs sont nécessaires à l'intégration et à l'expression du virus.

La plupart des rétrovirus endogènes présentent des mutations ou des délétions, les rendant incompetents pour la réplication ou transcriptionnellement inactifs. En effet, il semble qu'aucun HERV ne soit capable de compléter un cycle réplcatif. De plus, on retrouve toujours de très nombreuses différences entre les deux LTRs des HERVs anciens. Il existe aussi de nombreux LTRs solitaires résultant de la recombinaison entre les deux séquences LTRs d'un même HERV. Ces LTRs solitaires sont des éléments de contrôle transcriptionnel de gènes cellulaires. En effet, certains peuvent même être reliés à des pathologies humaines comme il a déjà été démontré précédemment concernant le gène *Mid1* responsable du syndrome d'Opitz caractérisé par l'association d'anomalies cranio-faciales, des anomalies uro-génitales, des malformations du larynx, du pharynx et/ou de la trachée et moins fréquemment d'autres anomalies de la ligne médiane (Landry et al., 2002). D'autres LTRs peuvent avoir un rôle dans la transcription de gènes non reliés à des pathologies humaines. Citons notamment les gènes codant pour le récepteur à l'endothéline B et l'apolipoprotéine C-I (Medstrand et al., 2001).

1.2.3 Classification des rétrovirus endogènes

Les séquences endogènes humaines ont d'abord été classées selon la lettre de l'acide aminé spécifique à l'ARNt complémentaire du site de liaison (PBS) utilisé par la rétro-transcriptase. Par exemple, HERV-K appartient à la famille des HERVs utilisant un ARNt Lysine comme amorce de la rétrotranscription alors que HERV-H utilise un ARNt Histidine. Mais ce système de classement s'est révélé peu approprié pour deux raisons. Premièrement, beaucoup de rétrovirus endogènes possèdent le

même PBS et donc le même type d'ARNt et, deuxièmement, de nombreuses familles d'HERVs n'ont été que partiellement caractérisées ; ainsi la séquence du PBS n'est pas encore connue. Récemment, l'homologie de séquence du gène *pol* entre les HERVs et les différents genres de rétrovirus exogènes a permis de diviser les HERVs en trois classes (I,II,III). Chaque classe comprend plusieurs sous-groupes nommés selon la nomenclature basée sur le type d'ARNt utilisé. Les HERVs de la classe I sont apparentés aux gammarétrovirus, dont fait partie le virus de la leucémie murine (MLV), et ils comprennent les sous-groupes HERV-W et HERV-H. Les HERVs de la classe II quant à eux, apparentés aux bêtarétrovirus, dont fait partie le virus de la tumeur mammaire de la souris, comprennent le sous-groupe HERV-K. Enfin, les HERVs appartenant à la classe III, sont apparentés aux spumavirus et quelques un de leurs sous-groupes sont HERV-L et HERV-S. L'analyse des sites d'intégration et de la divergence des LTRs des HERVs a permis d'estimer leur âge. Il semble que les HERVs de la classe I et III soient les plus anciens, alors que les HERVs de la classe II seraient apparus plus récemment, dans les cinq derniers millions d'années.

1.2.4 Expression des rétrovirus endogènes

Malgré les similitudes avec leurs équivalents exogènes, les rétrovirus endogènes sont souvent défectifs mais certains ayant conservé des cadres de lecture ouverts intacts pour un ou plusieurs gènes et, des éléments de régulation transcriptionnelle fonctionnels peuvent être transcrits, voir traduits dans certaines cellules. En effet, de nombreuses expressions transcriptionnelles de séquences endogènes ont été détectées dans différents tissus humains sains ou pathologiques et dans des lignées cellulaires normales ou tumorales (Sugimoto et al., 2001; Yi et al., 2004; Yi and Kim, 2004). Une expression protéique est également observée et des études en microscopie électronique ont révélé une production de particules virales des endogènes humains HERV-K et HERV-W, proches structurellement des rétrovirus exogènes. (Boller et al., 1983; Perron et al., 1997; Urnovitz and Murphy, 1996).

En effet, une protéine d'enveloppe nommée Syncytine-1 et appartenant à une séquence de la famille des HERV-W est produite dans le cerveau d'individus atteints de sclérose en plaque et dans un type cellulaire impliqué dans la neuro-inflammation et la démyélinisation ainsi que dans des lésions démyélinisées (Antony et al., 2004). Il est apparu *in vitro*, que cette protéine semble intervenir dans la production de molécules inflammatoires et de réactifs d'oxydo-réduction entraînant une démyélinisation des neurones. Ces réactifs d'oxydo-réduction entraînent à forte concentration d'importants dommages dans le cerveau. Cette protéine d'origine rétrovirale semble ainsi avoir un rôle pathogénique en induisant la démyélinisation des neurones. Cependant, et inversement, il apparaît que son expression persévérante dans les lésions, provoque un stress au sein des cellules gliales induisant ainsi une remyélinisation (Antony et al., 2004). D'autre part, il apparaît aussi que cette protéine d'enveloppe est exprimée de façon spécifique et restreinte dans les macrophages lors de lésions précoces de sclérose multiple (Perron et al., 2005). De ce fait, la transcription de la protéine Env de HERV-W semble être modulée dans la sclérose multiple, elle pourrait avoir une action antagoniste. Une équipe de recherche du Centre National de la Recherche Scientifique-bioMérieux fait état de particules de HERV-W, MSR (Multiple Sclerosis-associated RetroVirus) produites à partir de monocytes en culture provenant de patients atteints de sclérose multiple (Perron et al., 1997). Ces virions ont été aussi isolés à partir d'échantillons de plasma et de sérum de malades atteints de sclérose multiple.

L'implication pathologique potentielle des HERVs est aussi illustrée à travers l'expression de la super-famille HERV-K dans les cancers. Des chercheurs soulignent l'association entre la protéine de régulation Rec codée par HERV-K (HML-2) et le processus de tumorigenèse testiculaire. Dans le cas du cancer du sein, des transcrits de la protéine d'enveloppe appartenant à la famille des HERV-K ont été détectés dans la plupart des cancers du sein humains (Wang-Johanning et al., 2003; Wang-Johanning et al., 2001). On retrouve une prédominance du transcrit de type 1 (409 pb) par rapport au type 2 (701 pb) dans les cancers du sein et les lignées cellulaires issues de cancer du sein (Wang-Johanning et al., 2003). On perçoit cette différence au niveau des transcrits

des gènes *np9*, une protéine nucléaire et *rec*, une protéine de régulation, avec une prédominance des transcrits *np9* par rapport à *rec*. Alors que des transcrits de HERV-K de type 1 sont exprimés dans de nombreux tissus sains et tumoraux, aucun transcrit du gène *np9* n'est généré dans les tissus normaux humains (Armbruester et al., 2002). Ainsi, cette spécificité de l'expression de *np9* dans les tissus tumoraux et spécialement dans les carcinomes mammaires, suggère une implication potentielle de ce gène dans la tumorigénicité. Finalement, dans une lignée de cellules mammaires cancéreuses T47D où il a déjà été observé une production de particules virales (Seifarth et al., 1995), des études effectuées *in vitro* ont démontré que l'expression de HERV-K peut être induite par des glucocorticoïdes (Ono et al., 1987).

Ainsi, ces expressions protéiques d'HERVs détectées au sein de nombreux tissus malades pourraient avoir un rôle dans certaines pathologies telles que des cancers ou encore des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Kurth, 1986). La détection d'expression des rétrovirus endogènes dans les tissus normaux ou sains, nous amène à discuter du rôle qu'ils jouent chez leur hôte. La théorie de l'évolution prédirait que les rétrovirus endogènes ont un effet bénéfique pour l'hôte plus que délétère à la vue de leur longue présence au sein des génomes. En effet, ces protéines pourraient potentiellement jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, ou encore posséder des propriétés immunosuppressives. Enfin, elles pourraient aussi jouer avoir une action protectrice face aux infections de rétrovirus exogènes dans certains tissus par un mécanisme d'interférence de récepteurs.

D'autre part, les protéines des rétrovirus endogènes sont pour certaines exprimées dans de nombreux tissus alors que pour d'autres, l'expression est tissu spécifique. L'expression des rétrovirus endogènes dans l'appareil génital et le placenta d'espèces animales variées est décrite depuis au moins une trentaine d'années, favorisant l'idée que ces séquences endogènes ont entre autres une importance dans l'évolution de la placentation des mammifères. Chez l'humain, il a été montré que la formation du syncytiotrophoblaste placentaire est réalisée, en partie, par des protéines codées par des séquences rétrovirales endogènes, plus particulièrement par le gène *env* d'une famille

d'HERV possédant un cadre de lecture ouvert intact : HERV-W (Frendo et al., 2003).

Afin d'élucider et de comprendre comment et pourquoi certains rétrovirus endogènes sont exprimés dans le placenta, certains éléments de la biologie placentaire doivent être rappelés.

1.3 Biologie placentaire

Le placenta humain, un organe transitoire, médie les échanges physiologiques entre la mère et le fœtus. Programmé génétiquement pour une durée de vie de 9 mois, il est constitué d'une partie maternelle et d'une partie fœtale. Ces cellules sont alors originaires de deux génotypes bien distincts. Lorsque le complexe foeto-placentaire est considéré pareillement à une allogreffe naturelle, résistante au rejet, des implications immunologiques importantes ont lieu. Afin de bien comprendre la structure placentaire, il devient essentiel de connaître la structure des membranes extra-embryonnaires et de l'endomètre utérin. Si l'association placentaire place les circulations fœtale et maternelle dans une situation de proximité importante, celles-ci sont néanmoins séparées par une couche tissulaire appelée barrière placentaire. Les éléments nutritifs ainsi que l'oxygène sont transférés du sang maternel au sang fœtal, tandis que l'acide carbonique et une large gamme de déchets métaboliques empruntent le sens opposé. Le placenta, considéré comme une interface d'échange importante, fonctionne de manière temporaire tout comme les poumons, les reins et l'intestin fœtal. En outre, le placenta assure également un rôle de glande endocrine qui préside au contrôle de la sécrétion d'hormones d'origine ovarienne, hypophysaire antérieure et hypothalamique. On saisit alors l'importance de l'autonomie fonctionnelle et le rôle régulateur du placenta durant toute la grossesse (Roux, 1972).

1.3.1 Anatomie placentaire

Il advient important, et ce afin de bien comprendre l'évolution chronologique des villosités choriales, de disposer d'une vision d'ensemble de l'anatomie placentaire.

Dans le schéma présenté ci-dessous, le placenta est âgé d'environ 4 mois. On peut y distinguer les structures constitutives essentielles, à savoir le cordon ombilical, l'amnios, la plaque chorale, l'arborisation déjà complexe des villosités, la plaque basale et enfin la structure des cotylédons (arborisation des villosités choriales) (Figure 1.5). À la naissance, le placenta est constitué de deux surfaces : la surface maternelle et la surface foetale (Enders, 1981) (Figure 1.6).

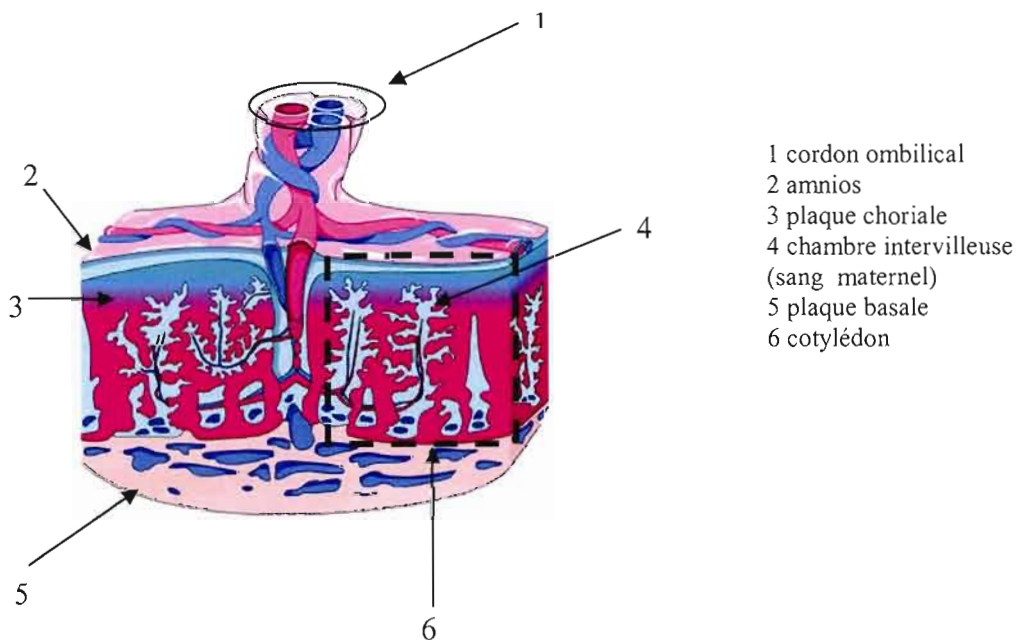


Figure 1.5 : Représentation schématique du placenta vers le quatrième mois en section sagittale. Image adaptée et tirée du livre « LifeART » produit par *Medical illustrators* dans la collection *Pediatrics 1*.

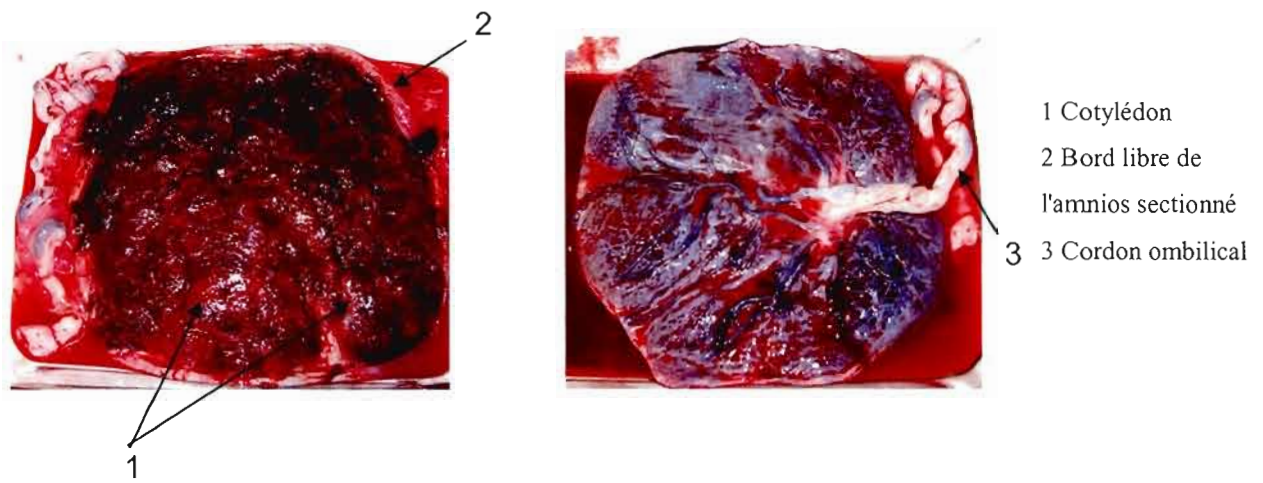


Figure 1.6 : Photographie d'un placenta représentant la face maternelle (à gauche) et la face fœtale (à droite). © Photographie prise par Amandine Vargas, Laboratoire materno-fœtal, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

1.3.2 Structure du tissu placentaire

Les tissus maternels et fœtaux s'organisent en deux entités étroitement intriquées au niveau du placenta. Il s'agit tout d'abord de la partie fœtale du placenta, qui est constituée de la plaque chorale avec les villosités placentaires, la coque cytotrophoblaste et les espaces intervilloux. La plaque chorale, partie profonde du placenta du côté fœtal est formée de l'amnios, du mésenchyme extraembryonnaire, du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste. Aussi, la plaque basale, partie externe du placenta au contact de la paroi utérine, d'origine composite, est formée par des tissus embryonnaires (cytotrophoblaste, syncytiotrophoblaste) et des tissus maternels (caduque basilaire) (Figure 1.5). La partie maternelle du placenta est constituée de la caduque basilaire, de vaisseaux et de glandes utérines.

1.3.3 Implantation du blastocyste dans l'utérus et formation du syncytiotrophoblaste.

Après la fécondation entre l'ovule et le spermatozoïde, le zygote qui provient de cette fusion, subit alors une série de divisions sans croissance cellulaire. Au bout de quatre jours après la fécondation, le zygote est alors nommé *morula* (de huit à seize cellules, jusqu'à trente-deux environ). Dès que la *morula* atteint le stade de huit cellules, les cellules de la périphérie s'aplatissent et se polarisent, conduisant ainsi à la ségrégation de quelques cellules au centre de la *morula* et d'autres à la périphérie. La masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon est appelée embryoblaste. La partie externe de cette masse est constituée de la première membrane du placenta : le trophoblaste. Au quatrième jour de développement, il se crée une cavité au sein de la *morula* nommée blastocèle. Aussi, les cellules de l'embryoblaste sont localisées d'un côté de la cavité formant un amas compact mais différencié en deux couches : l'épiblaste (se trouvant contre le trophoblaste) et l'hypoblaste (situé entre l'épiblaste et le blastocèle). Les cellules trophoblastiques s'ordonnent alors en un épithélium. Dès lors, où l'embryon est nommé blastocyste, le côté rencontrant l'embryoblaste constitue le pôle embryonnaire, alors que le pôle opposé est appelé abembryonnaire. Le blastocyste arrivant dans la cavité utérine, se sépare de la zone pellucide, une membrane transparente, striée, entourant l'ovule, contenant le cytoplasme, et constituant l'essentiel du corps cellulaire, et, interagit directement avec l'endomètre (McLaren, 1974). Ainsi, ce contact permet aux cellules du trophoblaste de proliférer formant à la jonction du blastocyste et du tissu maternel, une masse protoplasmique multinucléée dont les limites cellulaires sont absentes : il s'agit du syncytiotrophoblaste (Kaufmann and Stegner, 1972). Le syncytiotrophoblaste provient de la fusion des cellules du cytotrophoblaste situées immédiatement en dessous (Figure 1.7). Le cytotrophoblaste consiste en une couche irrégulière de précurseurs cellulaires ovoïdes mononucléés. Le trophoblaste se différencie ainsi en deux couches, le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste. Ces deux couches cellulaires s'infiltrant

entre les cellules épithéliales de la muqueuse utérine en induisant leur apoptose et créent une brèche par laquelle le blastocyste pénètre dans l'endomètre. Une fois pénétré complètement, le point d'implantation se retrouve ainsi obstrué par un caillot de fibrine. Une cavité amniotique commence à se former dans l'épiblaste, par la suite s'agrandit et, une couche de cellules se différencie en amnioblaste pour la séparer du cytotrophoblaste. Des vacuoles extracytoplasmiques apparaissant dans le syncytiotrophoblaste, se rassemblent pour former des lacunes remplies de fluides tissulaires et de sécrétions utérines. En progressant dans l'endomètre, le blastocyste se rapproche des capillaires sanguins maternels. De par l'activité lytique du syncytiotrophoblaste, les parois des capillaires de l'endomètre sont digérées de façon progressive, ce qui permet au sang de s'écouler dans les lacunes du syncytiotrophoblaste. Celui-ci continue son extension, enveloppant de nombreux capillaires sanguins et étendant de ce fait son réseau lacunaire. Cette extension est indispensable à l'établissement d'un réservoir artériel et d'un système de drainage veineux. Ceci étant la première étape de la mise en place du placenta (Billington, 1971; Dallenbach-Hellweg and Nette, 1964; Enders, 1965; Finn, 1974; Kaufmann and Stegner, 1972; Knoth and Larsen, 1972).

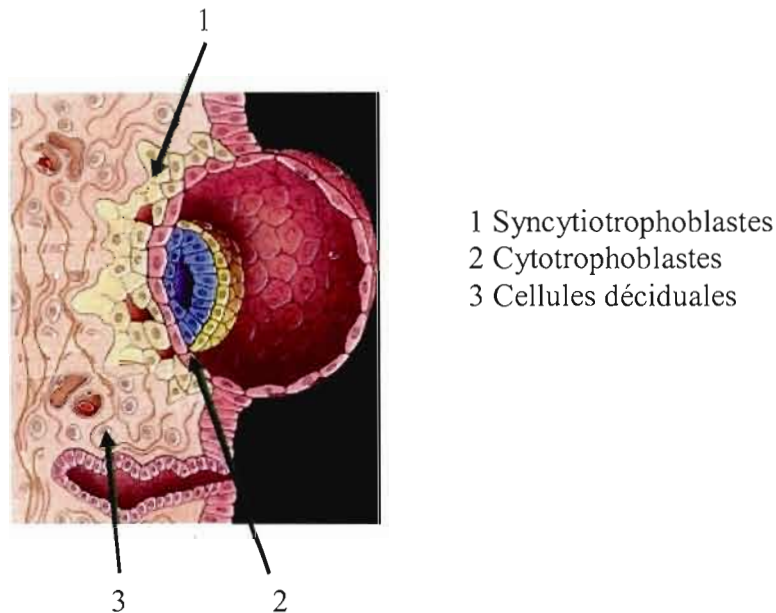


Figure 1.7 : Représentation schématique de l'implantation du blastocyste dans l'utérus et formation du syncytiotrophoblaste. Image adaptée de Tortora GJ. "Development during pregnancy in: principles of human anatomy"; neuvième édition de New York: John Wiley, 1999.

1.4 Le trophoblaste et les modèles d'études

Il a été estimé qu'environ 12 à 15% des grossesses conduisent à des complications pouvant avoir des causes multiples dont des anomalies génétiques du fœtus, des dysfonctionnements anatomo-physiologiques de la mère ou fonctionnels du placenta (Fournier et al., 1995; Haram et al., 2000a; Haram et al., 2000b; Wolf et al., 2001). Certaines complications comme la pré-éclampsie, qui associe hypertension et protéinurie maternelle, semblent résulter d'un défaut d'invasion des cytotrophoblastes (Blond et al., 1999a; Voisset et al., 2000). Nul ne sait actuellement si ce défaut d'invasion trophoblastique est intrinsèque au cytotrophoblaste, lié à une anomalie déciduale, à une anomalie immunitaire ou à une particularité des artères

utérines maternelles. On pourrait penser que cette complication serait liée à un défaut de différenciation et de fusion cellulaire des cytotrophoblastes. Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la fusion cellulaire des cytotrophoblastes pour former le syncytiotrophoblaste, des modèles tels que les cellules de choriocarcinome semblent trouver leur place. Plusieurs lignées de choriocarcinome ont été établies à partir de tumeurs placentaires. Ces cellules aneuploïdes ont conservé des propriétés de prolifération et d'invasion du trophoblaste précoce, telle une sécrétion hormonale de la hCG (*human chorionic gonadotropin*), de la hPL (*human placental lactogen*) et de progestérone, pour les lignées Jar, JEG-3 et BeWo, la présence de microvillosités et la possibilité de fusionner *in vitro* pour la lignée BeWo en présence d'AMPc (Benveniste and Scommegna, 1981; Bergemann et al., 2003; Obringer et al., 1997; Rote, 2005; Zygmunt et al., 1998). Cependant, si ces lignées constituent des modèles facilement accessibles, elles ne représentent en aucun cas une approche exacte des fonctions physiologiques du cytotrophoblaste. C'est pourquoi, il est important de confirmer tout résultat obtenu à partir de ces lignées tumorales en utilisant un contexte physiologique plus approprié, à savoir au sein des cellules primaires placentaires humaines.

1.5 HERVs et placenta

1.5.1 Découverte de la Syncytine-1 et son rôle potentiel

La famille HERV-W est constituée d'un nombre imposant de membres et en moyenne font partie du génome des primates depuis 25 millions d'années. En 2000, *Mi et al* ont identifié un membre de la famille HERV-W à un locus baptisé ERVWE1 qui encodait pour une protéine de 60 kDa : la Syncytine-1 (Blond et al., 1999a; Mi et al., 2000). Cette protéine d'origine rétrovirale est composée de différents domaines, une glycoprotéine de surface et une région transmembranaire, où se trouve notamment la région du peptide fusion (Figure 1.8). La Syncytine-1 contient également une région

immunosuppressive qui pourrait aussi jouer un rôle dans la protection du fœtus face à la réponse immune maternelle (Cheynet et al., 2005; Costas, 2002). L'équipe du Massachusetts démontra que l'expression du gène de la Syncytine-1 chez l'Humain est limitée (sur 23 tissus étudiés) au testicule et surtout au placenta (Mi et al., 2000). En recherchant dans les banques de données, il est apparu que la séquence du gène Syncytine-1 avait une très grande similitude avec la séquence du gène *env* codant pour des protéines d'enveloppe d'un rétrovirus humain endogène précédemment identifié sur le plan moléculaire par une équipe lyonnaise (Blond et al., 1999a). Dans le génome humain, indépendamment de multiples séquences d'ADN retrouvées dans divers chromosomes, il semble que le véritable gène soit situé à la position chromosomique 7q21-22. Il est flanqué de séquences attestant qu'il provient bien du virus prototype de la famille HERV-W (Mi et al., 2000). Sur coupes de régions villeuses placentaires, l'hybridation *in situ* montre que l'expression de la Syncytine-1 est limitée aux syncytiotrophoblastes. Comme les protéines d'enveloppe des rétrovirus interviennent dans la fusion des cellules, le rôle de la Syncytine-1 a été étudié dans des cellules COS en culture. La transfection des cellules COS entraîne la formation de grands syncytia (cellules multinucléées résultant d'événements de fusion entre cellules) par fusion des cellules. L'action fusogénique directe de la Syncytine-1 a été démontrée. Des cellules COS transfectées avec un vecteur d'expression de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*), sont mises en co-culture avec deux populations de cellules appartenant à une lignée humaine de choriocarcinome trophoblastique BeWo, les unes transfectées avec un vecteur d'expression de la Syncytine-1 et les autres transfectées avec un vecteur portant un gène Syncytine-1 inversé (témoin négatif). De plus importantes zones fluorescentes ont été observées dans les cellules fusionnées sous l'action de la Syncytine-1 (Mi et al., 2000). Au sein de la lignée fusogénique BeWo, il avait été démontré que l'addition de la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) a pour effet d'engendrer la formation de syncytia (Lyden et al., 1993). En réponse à cette addition de la forskoline, il a été remarqué une augmentation de l'expression de la Syncytine-1 (Mi et al., 2000). En revanche, dans une autre lignée de choriocarcinome

JEG-3, qui ne forme pas de syncytia en présence de forskoline, aucune augmentation de sa transcription n'est observée. Finalement, *in vitro*, le niveau d'expression transcriptionnel et protéique de la Syncytine-1 est augmenté au cours de la différenciation et de la fusion des cytotrophoblastes en culture (Frendo et al., 2003). Ainsi, la protéine codée par ce gène *env* de HERV-W a été suggérée comme étant responsable de la fusion des cellules cytotrophoblastiques pour former la couche syncytiale du placenta (Blond et al., 2000; Frendo et al., 2003).

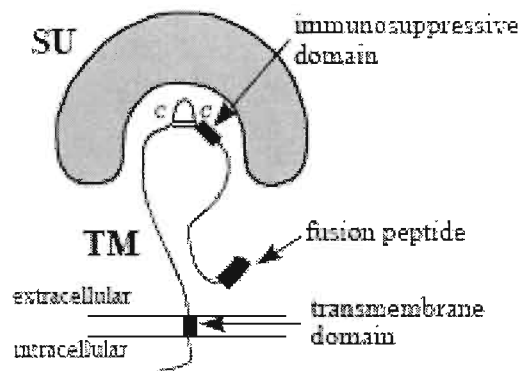


Figure 1.8 : Représentation schématique de la structure d'une protéine d'enveloppe rétrovirale. Plusieurs domaines y sont indiqués : La glycoprotéine de surface (SU), le domaine transmembranaire (TM), le domaine immunosuppresseur, le peptide fusion, C-C : représente des ponts disulfures. Image tirée de Parseval N. *et al.*, 2005 (de Parseval and Heidmann, 2005).

1.5.2 Intéraction de la Syncytine-1 et système de transport

Blond *et al.* (2000) ont identifié le récepteur de la Syncytine-1. Il s'agit du RDR, un récepteur rétroviral mammifère de type D, plus communément connu comme étant un système de transport d'acide aminé neutre nommé

ASCT2/ATBO/SLC1A5 (Kekuda et al., 1996; Lavillette et al., 2002; Rasko et al., 1999). Un deuxième système de transport a aussi été mis en évidence comme potentiel récepteur de la Syncytine-1 ; il s'agit de ASCT1 (Blond et al., 2000; Kudo and Boyd, 2002; Lavillette et al., 1998; Marin et al., 2003). Le système ASC (système de transport sodium dépendant des acides aminés neutres) ne comprend pas plus que ces deux acteurs ASCT2 (RDR) et ASCT1. Dans la lignée de choriocarcinome BeWo, l'addition de la forskoline (induisant l'expression de la Syncytine-1) et la diminution de la concentration en oxygène (menant à la répression concomitante de l'expression de la Syncytine-1 et des événements de fusion des cellules trophoblastiques) n'avait aucun effet sur le niveau d'expression du récepteur RDR (Knerr et al., 2003; Kudo et al., 2003). Pötgens *et al.* suggèrent différents modèles d'interaction entre la Syncytine-1 et son récepteur: dans un état fusogénique, la Syncytine-1 et ou le RDR sont sur-exprimés ou sous-exprimés comparativement à un état non fusogénique. Ainsi les cytotrophoblastes peuvent fusionner grâce à une restriction spatiale, locale ou encore, à une surexpression d'une ou de ces deux protéines (Potgens et al., 2004). Tout ceci requiert une régulation coordonnée de l'expression et de l'exposition de ces protéines.

1.5.3 Régulation de l'expression de la Syncytine-1

L'un des régulateurs de l'expression de la Syncytine-1 est le facteur transcriptionnel GCM1 (*glial cell missing-1*). GCM1 est un facteur de transcription placentaire spécifique requis dans le développement du placenta chez la souris. GCM1 est capable de réguler le niveau d'expression de la Syncytine-1 *via* deux sites de liaison GCM1 situés en amont du LTR-5' de la Syncytine-1, dans les cellules BeWo et JEG-3 (à l'opposé, aucun effet n'est noté dans les cellules HeLa) (Yu et al., 2002) (Figure 1.9). L'ARNm de GCM1 et la protéine sont localisés dans un sous ensemble des cytotrophoblastes villosités montrant des signes morphologiques révélateurs d'une forte différenciation ; à savoir, exprimé par un nombre élevé de

mitochondries, la présence de réticulum endoplasmique rugueux, des ribosomes libres (Baczyk et al., 2004; Yamada et al., 2000). Ainsi, puisque GCM1 est régulé à la hausse dans les cytotrophoblastes avant la fusion et que la Syncytine-1 est promue à s'exprimer, il devient apparent que GCM1 est possiblement un régulateur indispensable dans la fusion des trophoblastes humains.

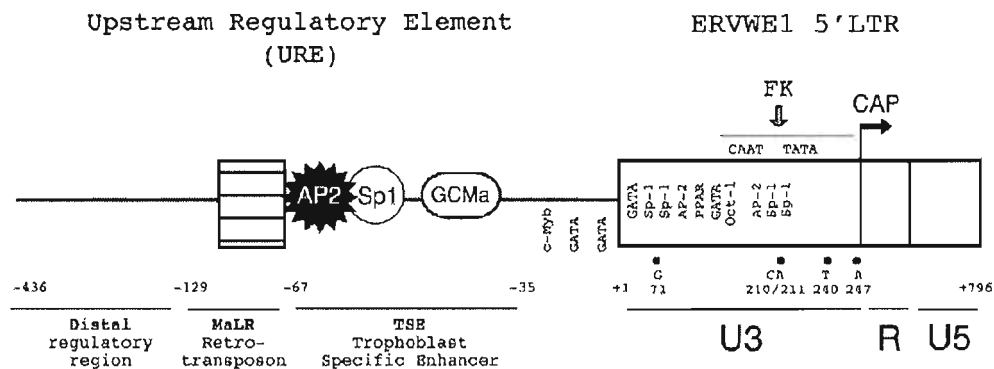


Figure 1.9 : Régulation du gène Syncytine-1. GCMA = GCM1 en amont du LTR-5'. Image Tirée de « A Retroviral Promoter and a Cellular Enhancer Define a Bipartite element Which Controls env ERVWE1 Placental Expression » (Prudhomme et al., 2004).

1.5.4 Rôles et fonctions controversés de la Syncytine-1

De nombreuses évidences concernant l'implication de la Syncytine-1 dans la fusion des trophoblastes ont été mises en avant, mais sa fonction et surtout sa localisation dans le placenta humain restent controversées (Frendo et al., 2003). En effet en 2000, Mi *et al.* par hybridation *in situ* et ce afin de détecter le niveau d'expression de la Syncytine-1 à terme et avant terme dans des tissus placentaires, ont trouvé une expression d'ARNm restreinte aux cytotrophoblastes. Ils démontrent également par immunohistochimie que la protéine est localisée dans la partie basale cytoplasmique du syncytiotrophoblaste dans des placentas normaux à un âge de gestation de 21 à 40 semaines. Parallèlement, l'équipe de Cosset détecte la protéine

principalement au niveau du syncytiotrophoblaste et partiellement au niveau du cytotrophoblaste dans des placentas de 13 semaines de gestation (Blond et al., 2000). Peu de temps après, en 2001, Lee *et al.* ont tenté de localiser la Syncytine-1 dans des placentas pré-éclampsiques et la détectent dans la partie apicale du syncytiotrophoblaste (Lee et al., 2001), alors que Yu *et al.* publient que la protéine est uniformément localisée dans le cytotrophoblaste dans des placentas à terme et avant terme (Yu et al., 2002). Utilisant des techniques comme l'immunobuvardage et l'immunohistochimie, Smallwood et ses collègues montrent un plus haut niveau d'expression de la Syncytine-1, principalement détectable au niveau du trophoblaste extra-villeux et du syncytiotrophoblaste, dans des placentas issus du premier trimestre, en comparaison avec des tissus issus de placentas prélevés à terme (Smallwood et al., 2003). Tous ces faits contradictoires nous amènent à discuter du rôle de cette protéine et à élucider son mécanisme d'action. Finalement, et de façon intéressante Huppertz *et al.* en 2002 ont conduit des expériences *in vitro* avec des explants villeux incubés avec des oligonucléotides antisens contre la Syncytine-1 ou transfectés avec un vecteur d'expression renfermant la Syncytine-1. Ils prétendent que tant une augmentation ou une diminution du taux de la Syncytine-1, conduit à un signal de non syncytialisation dans les trophoblastes humains. Ainsi, l'implication de cette protéine rapportée par sa localisation cellulaire ne semble pas être approprié quand au rôle à assurer (Blond et al., 2000; Huppertz et al., 2006; Knerr et al., 2004; Lavillette et al., 2002; Potgens et al., 2004). En réalité, peu de choses sont véritablement connues concernant la Syncytine-1, sa localisation, ses fonctions et ses interactions. Il n'en reste pas moins que son rôle et sa fonction sont encore à élucider d'autant plus qu'il pourrait apparaître que d'autres facteurs tels que d'autres protéines d'enveloppe d'origine rétrovirale pourraient avoir un rôle crucial dans ces événements fusogéniques.

1.5.5 HERV-FRD

Une seconde protéine fusogénique appartenant à une autre séquence d'HERV a été décrite comme pouvant potentiellement avoir un rôle physiologique dans la placentation humaine. Il s'agit de la Syncytine-2 (Blaise et al., 2003). Elle est codée par le gène *env* de la famille HERV-FRD, suite à un événement d'intégration qui a eu lieu il y a 40 millions d'années (Renard et al., 2005). Cette protéine de 57 kDa est exprimée spécifiquement au niveau du placenta (Blaise et al., 2003). Cette nouvelle protéine d'enveloppe possède un profil hydrophobique similaire à celui de la protéine d'enveloppe appartenant à la famille des HERV-W. Blaise *et al.* (2003) ont induit des événements fusogéniques de nombreuses lignées cellulaires transitoirement transfectées avec un vecteur d'expression pCMV-HERV-FRD *env*. De plus, la structure cristalline de la portion centrale de la protéine lui confère une fonction fusogénique. Ce caractère fusogénique reste aujourd'hui encore à prouver (Renard et al., 2005). Enfin, une comparaison de séquence en acide aminé entre les deux protéines Syncytine-1 et Syncytine-2 présente de nombreuses similitudes au niveau de leur domaine transmembranaire (>50% d'homologie) (Figure 1.10). Ainsi, la Syncytine-2 pourrait posséder des fonctions similaires à celles de la Syncytine-1 et ainsi avoir une action fusogénique conduisant à la formation du syncytiotrophoblaste placentaire. Cependant, elle interagirait avec des récepteurs différents de ceux concernant la Syncytine-1 (Blaise et al., 2003). Elle pourrait également agir dans des étapes multiples de la placentation (Malassine et al., 2007; Malassine et al., 2005).

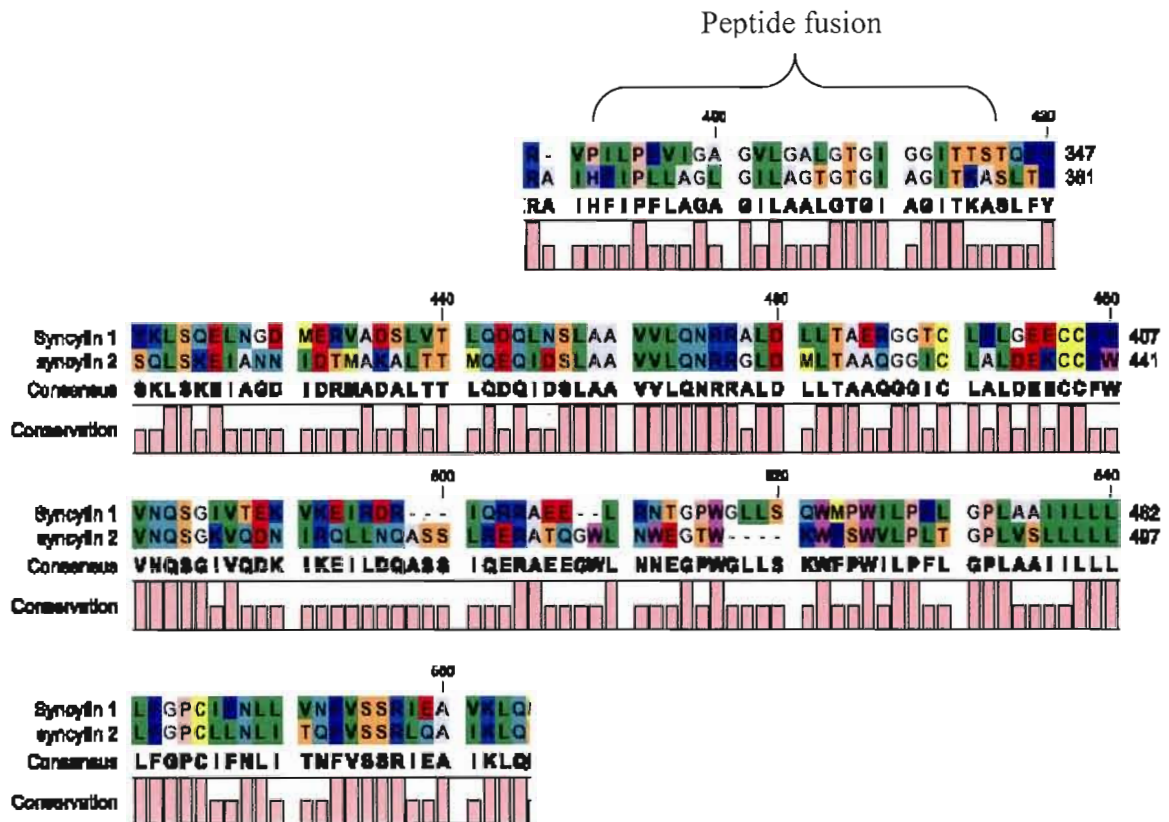


Figure 1.10 : Résultat de l'alignement des séquences en acide aminé des enveloppes Syncytine-1 et Syncytine-2 (domaine transmembranaire). Alignement obtenu à l'aide du logiciel CLC Free Workbench 3.

1.5.6 Autres protéines d'enveloppes

Récemment, d'autres protéines d'enveloppe ont été identifiées et pourraient susciter un intérêt aussi particulier que celui porté envers la Syncytine-1 et la Syncytine-2. Il s'agit notamment de EnvP(b), s'apparentant au gène *env* d'un provirus de l'espèce *Danio rerio* (Poisson zèbre) et ainsi appartenant à la famille ZFERV. Quelques-unes des caractéristiques intéressantes de EnvP(b) sont qu'elle est ubiquitaire, notamment exprimée dans le placenta et possède un puissant pouvoir fusogénique (Blaise et al., 2005). Ce pouvoir fusogénique n'a cependant pas été testé sur les cellules trophoblastiques humaines. Enfin, une nouvelle protéine d'origine rétrovirale appelée EnvV identifiée aussi récemment, et ce d'après une étude menée sur

différentes lignées cellulaires (excepté sur une lignée trophoblastique), ne possède aucun pouvoir fusogénique. Néanmoins, son expression est placenta spécifique.

Toutes ces protéines d'enveloppe rétrovirales pourraient intervenir à différents niveaux dans le placenta : la fusion cellulaire, la suppression de la réponse immunitaire contre le placenta, l'interférence sur des infections par des virus exogènes, la différenciation cellulaire et enfin le bon développement du fœtus. Leur étude deviendra donc primordiale afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la placentation.

1.6 Hypothèses de travail

L'étude de toutes ces protéines d'enveloppe entre autres, Syncytine-1, Syncytine-2, EnvP(b) et EnvV, est devenue nécessaire afin de mieux comprendre ce qui lie les rétrovirus endogènes au placenta. L'hypothèse sur laquelle le projet est basé réside dans le fait que l'un des processus majeurs orchestrés au cours de la placentation, à savoir la formation des syncytiotrophoblastes, pourrait impliquer d'autres protéines d'enveloppe que la Syncytine-1 et, que la régulation de leur expression pourrait être en étroite corrélation avec celui-ci. Concernant le gène Syncytine-1, de nombreuses études ont été réalisées. Aujourd'hui la structure du transcrit ainsi que son mode de régulation sont relativement bien connus (Lee et al., 2003; Lee et al., 2001; Malassine et al., 2005). En effet, certains mécanismes possibles de régulation du gène ont déjà été présentés. Cependant, il n'en est pas de même pour les autres gènes mentionnés ci-dessus, dont celui de la Syncytine-2. Les avancées concernant celle-ci sont moindres et ses rôles, possiblement majeurs dans les événements de fusion des trophoblastes humains intervenant au cours de la placentation, restent à établir.

Ainsi, le projet avait pour but d'approfondir les mécanismes de régulation du gène Syncytine-1, impliqués dans les événements fusogéniques des cellules

trophoblastiques et aussi de commencer ce type d'étude sur le gène Syncytine-2. *In vitro*, ces phénomènes de fusion peuvent notamment être induits par des agents dits stimulateurs. Nos agents de choix étaient la forskoline et surtout bpV[*pic*], un inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase, dont l'impact, probablement majeur dans la fusion cellulaire, a été parallèlement étudié. Aussi, il s'agissait de se pencher sur l'implication fonctionnelle de ces deux protéines d'enveloppe rétrovirales au cours de la syncytialisation des trophoblastes.

La Syncytine-2 pourrait jouer un rôle bien plus essentiel que celui joué par la Syncytine-1 au cours de la placentation et la régulation de son expression pourrait être en meilleure adéquation avec la syncytialisation des cytotrophoblastes. L'étude ici présentée visait donc à mettre en évidence les profils d'expression et la caractérisation transcriptionnelle de ces deux protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2, leur implication fonctionnelle et enfin leur localisation cellulaire.

CHAPITRE II

ARTICLE 1

2.1 Contributions

Titre de l'article :

INDUCTION OF TROPHOBLAST CELL FUSION BY A PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE INHIBITOR

Auteure principale: Amandine Vargas

Collaborateurs : Julie Moreau, Frédérique Le Bellego et Julie Lafond

Directeur de recherche : Benoit Barbeau

Cet article a été rédigé par moi-même, Amandine Vargas, avec les précieux conseils d'écriture de mon directeur de recherche. La réalisation des expériences ainsi que les tests statistiques en découlant ont aussi été réalisés par moi-même. La partie concernant les cellules primaires trophoblastiques, le suivi des patientes et les accouchements ont été effectués à l'unité d'obstétrique et de gynécologie de l'hôpital St-Luc à Montréal, sous la direction du Dr André Masse et ses collaborateurs. La préparation des cellules a été effectuée au sein du laboratoire materno-fœtal du Dre Julie Lafond, avec l'aide de Frédérique Le Bellego.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant la mise en forme. Cependant, la version soumise au journal *Placenta* a été modifiée selon les exigences du journal.

2.2 Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor

**Amandine Vargas, Julie Moreau, Frédérique Le Bellego, Julie Lafond and
Benoit Barbeau***

*Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques and BioMed
Research Center, Montréal, Québec, Canada*

Running title: PTPs regulate trophoblast cell fusion

*Corresponding author:

Université du Québec à Montréal

Département des sciences biologiques

2080 St-Urbain

Montreal (Qc), Canada, H2X 3X8

Phone: (514) 987-3000 (#4576). Fax: (514) 987-4647

E-MAIL: barbeau.benoit@uqam.ca

Number of characters (abstract): 986; Number of characters (manuscript): 15989;

Number of illustrations: 2

2.2.1 Abstract

In the placenta, trophoblast cell fusion leads to the formation of the syncytiotrophoblast, which plays an essential role in the diffusion of nutrients and hormones from the mother to the foetus. Different protein tyrosine kinases are involved in the modulation of this biological process. Herein, we investigated the impact of a protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor (bpV[pic]) on trophoblast fusion. Upon bpV[pic] or forskolin treatment, primary and BeWo trophoblastic cells demonstrated higher cAMP levels and a more potent induction of cell fusion, while non-fusogenic JEG-3 cells were non-responsive to these treatments. RT-PCR analyses on stimulated BeWo cells or primary cytotrophoblast cells demonstrated an increase in Syncytin-1 mRNA levels, which was more pronounced upon forskolin/bpV[pic] treatment. Using the luciferase gene upstream of the Syncytin-1 promoter, similar results were obtained in BeWo cells after stimulation. These results demonstrate that PTPs act negatively on cell fusion in human trophoblasts and could control the timing of syncytiotrophoblast formation during placenta development.

2.2.2 Introduction

The placenta is constituted of trophoblast cells which, upon differentiation, form either invasive trophoblasts or a multinuclear structure, termed the syncytiotrophoblast (Midgley et al., 1963). Invasive trophoblasts anchor the foetus to the uterus and displace the endothelial cell lining of maternal spiral arteries, thereby forming vessels with high capacitance for blood flow. Throughout pregnancy, the syncytiotrophoblast functions as a continuous epithelial cell layer located at the villous surface of the placenta and facing the maternal blood. One of the essential roles played by this placental barrier is to provide the crucial nutrients to the foetal circulation. Characteristics related to trophoblast differentiation include the production of hormones (i.e. human chorionic gonadotropin and human placental lactogen) (Kliman et al., 1986; Morrish et al., 1987; Strauss et al., 1992). However, morphological changes, which involve fusion of cytotrophoblasts to form the syncytiotrophoblast layer, represent a hallmark of this differentiation. Past years have highlighted the implication of former envelope viral proteins derived from Human Endogenous Retroviruses (HERVs) in trophoblast cell fusion (Muir et al., 2004), of which Syncytin-1 seems to be of high importance (Frendo et al., 2003; Mi et al., 2000).

Cell signalling involved in trophoblast differentiation has been previously studied. As an intrinsic part of signal transduction pathways, tyrosine phosphorylation mediates the regulation of these cascades and is controlled by two opposing enzymatic activities, i.e. protein tyrosine kinases (PTK) and protein tyrosine phosphatases (PTP). We and others have previously shown that various PTKs are expressed in trophoblast cells and act upon differentiation and proliferation. (Daoud et al., 2006; Hamlin and Soares, 1995; Kamei et al., 1997; Rebut-Bonneton et al., 1993). No studies have however addressed the impact of PTP activity on trophoblast differentiation.

2.2.3 Materials and Methods

2.2.3.1 Cell culture

BeWo and JEG-3 were respectively maintained in Ham's F12 (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada) and MEM (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) medium supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), L-glutamine (2mM), penicillin (100U/ml) and streptomycin (100µg/ml) and grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Human primary cytotrophoblasts were isolated from placenta of uncomplicated term pregnancies (37-41 weeks) and cultured up until day 4 as previously described (Belkacemi et al., 2003).

2.2.3.2 Fusion assay

Cells (2×10^5) were treated for 24 h with 50µM forskolin (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and/or 10µM bpV[pic] (Alexis Corp, Burlington Canada), stained with anti-desmoplakin antibody along with an Alexa Fluor 488-labelled goat anti mouse IgG (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and propidium iodide (PI) as previously described (Daoud et al., 2006) and analysed using a MRC1024 confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad, Hercules, CA). Cell fusions events were considered when three or more nuclei shared the same cytoplasm with no intervening desmosomal staining.

2.2.3.3 cAMP measurement

Cells (3×10^5) were cultured for 24 h and treated for 5 min. The cAMP concentration was measured from cell lysates through the Biotrak™ cAMP EIA kit (Bernatchez et al., 2003). Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t-test* with StatGraphics. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

2.2.3.4 RT-PCR analysis

BeWo were stimulated for 48 h while primary cytotrophoblast cells were treated at day 1 for 24 h. RNA was extracted using the TriZol reagent (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada), treated with Turbo DNase (Ambion, Austin, TX) and incubated with 25 ng/μl oligo dT, 10 mM DTT, 100μM dNTP, SuperScript reverse transcriptase (10U) (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada) and SUPERase-In (20U) at 42°C for 50 minutes. PCR amplification was then conducted in the presence of 2U Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering, Canada), 1X ThermoPol buffer, 100μM dNTP and 15 μM of each primer. Primers for Syncytin-1 cDNA amplification were: 5'-ATTGGCGGTATCACAACCT-3' (forward) and 5'-CCAGTGTTCGAAGCTCCT-3' (reverse) and for β-actin: 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC-3' (forward) and 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3' (reverse). PCR conditions were as followed: a denaturation step (94°C-4 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C-30 sec), annealing (56°C-30 sec) and extension (72°C-30 sec). Real-time RT-PCR reactions were performed with 1 μl cDNA, 0.5 μM of each Syncytin-1 primer (5'-GAAGGCCCTTCATACCAATGA-3' (reverse) and 5'-GATATTTGGCTAAGGAGGTGATGTC-3' (forward)), and a 1× reaction mix, including Taq DNA polymerase, the reaction buffer, and SYBR green (SYBR^R Premix Ex TaqTM : Perfect Real Time). Thermal cycling for quantification of the transcript was initiated with a denaturation step (95°C-10 s), followed by 50 cycles (denaturation at 94°C-3 s, annealing at 57°C-15 s, and elongation at 72°C-12 s). Amplification of the HPRT-1 (Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1) cDNA was used as an internal control. As a quality control, dissociation curves were run for all reactions and amplified products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel.

2.2.3.5 Transient transfection and luciferase assay.

The Syncytin-1 promoter and 5' transcribed regions were PCR amplified from genomic DNA with the forward (5'-TTCAACATCCATTCCAACACCACC-3') and reverse (5'-CTGAGTCTTAAGTCCGGTGGCCT-3') primers and cloned into pGL3-Basic. The resulting pGL3-Syncytin-1prom (or pGL3-Basic) vector (0.1µg) was co-transfected with the βgal-expressing vector, pRcActin-LacZ (0.1µg) in BeWo cells using FuGene 6 according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Sixteen hours post transfection, cells were treated with 50µM forskolin and/or 10µM bpV[pic] for 12 h. Enzymatic activities were measured using a home-made luciferase buffer and the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MS). Read-outs were performed with a Dynex MLX microplate luminometer (Lemieux et al., 2004). Luciferase activities were calculated as the mean Relative Light Unit (RLU) value ± standard deviation of three transfected samples normalized by β-gal activity. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's *t-test*.

2.2.4 Results and Discussion

The aim of this study was to determine the impact of PTP activity in the process of trophoblast cell fusion. JEG-3 and BeWo are trophoblast cell lines, only the latter undergoing fusion upon stimulation with cAMP-inducing agents. Human primary trophoblast cells isolated from the placenta were also included and start fusing at day 2.

As cAMP have been associated with trophoblast differentiation (Kliman et al., 1986), we first measured cAMP levels in JEG-3, BeWo and primary trophoblast cells upon forskolin and bpV[pic] treatment. As expected, forskolin induced cAMP levels in all tested cells (Figure 2.1). Treatment with our PTP inhibitor alone also increased cAMP levels in these cells, an increase which was more pronounced in the presence of forskolin. Cell fusion was also assessed by the labelling of desmoplakin on cell periphery (Figure 2.1B, D, F). As previously demonstrated (Al-Nasiry et al., 2006), JEG-3 cells were not fusogenic upon forskolin stimulation (as judged by the absence of multinucleated cells). Addition of bpV[pic] did not lead to cell fusion. In contrast, cell fusion was observed in forskolin-treated BeWo cells when compared to control cells. Interestingly bpV[pic] induced BeWo cell fusion, whereas a forskolin/bpV[pic] treatment further increased fusion. We next tested whether forskolin and/or bpV[pic] could accelerate fusion in primary trophoblast cells. In control cells, a few multinucleated cells were visible at day 2, while treatment with either agent or their combination showed a marked and significant increment in the number of syncytia.

These results illustrate that PTP inhibition augments both cell fusion and cAMP levels and agree with previous studies stating that PTK inhibitors negatively affect trophoblast cell differentiation and cell fusion (Daoud et al., 2006; Hamlin and Soares, 1995; Kamei et al., 1997). In JEG-3, although cAMP was also induced upon stimulation, no fusion was apparent, which supports the reported dichotomy between morphological and biochemical differentiation in trophoblast cells (Al-Nasiry et al., 2006). Although the induction of cAMP levels occurs much earlier than cell fusion,

cAMP-mediated pathways are important for the differentiation process of BeWo cells (Wice et al., 1990). Clear links between PTPs and cAMP-induced pathways have been previously reported: in fact, raf kinase can directly act upon adenylate cyclase activity (Champion-Arnaud et al., 1991; Feldman and Gros, 2007) and might therefore be involved in this upregulation of cAMP levels following bpV[pic] treatment, although more studies will be required to characterize this pathway.

As PTP inhibition could alter cell fusion, expression of the HERV-derived Syncytin-1 gene was analysed by RT-PCR and real-time RT-PCR in BeWo cells. As depicted in Figure 2.2A, in unstimulated BeWo cells, Syncytin-1 mRNA level showed a basal level of expression, which was further upregulated upon addition of forskolin or bpV[pic] (albeit at modest level for the latter). When both agents were added, Syncytin-1 expression was more greatly induced. Real-time RT-PCR experiments on cultured and stimulated primary cytotrophoblast also revealed that bpV[pic] alone induced galectin-1 mRNA levels, while, with forskolin, it further increased this upregulation. None of these experiments demonstrated genomic DNA-derived amplification products as determined by PCR amplification of cDNA reaction conducted in the absence of RT (data not shown). To confirm that our PTP inhibitors had an effect on Syncytin-1 expression, the Syncytin-1 promoter (starting from -374 according to the +1 position of Cheng *et al.* (Cheng et al., 2004)) was amplified and positioned upstream of the luciferase reporter. Transfection of this construct in unstimulated BeWo cells produced a luciferase signal higher than that of pGL3-Basic (3285.4 ± 1646.3 vs. 3.3 ± 0.9 RLU, respectively) (Figure 2.2B). Importantly, bpV[pic], forskolin and their combination all led to a significant induction of luciferase activity in transfected BeWo cells, the latter again showing the most important induction.

Our results indicate that bpV[pic] induces cell fusion in BeWo and primary trophoblast cells concomitantly with an upregulation of Syncytin-1 transcription. The modulation of Syncytin-1 expression by PTP inhibitors was modest, but yet reproducible. However, in both cell systems, a more important upregulation of Syncytin-1 expression, cell fusion and cAMP levels was noted after bpV[pic]/forskolin

treatment and might suggest that both agents act upon optimising a common signalling pathway. Although the induction of Syncytin-1 expression in the tested conditions might suffice, other(s) HERV-envelope gene(s) might also be involved in the process of cell fusion.

Our results demonstrate for the first time the implication of PTPs in trophoblast differentiation, more specifically cell fusion. Peculiarly, a previous study had shown that tyrosine phosphorylation mediated by the p53/56^{lyn} PTK (important for rat trophoblast cell differentiation) was negatively modulated in the presence of a PTP inhibitor (Kamei et al., 1997). These results underscore the likely important and complex role played by PTPs in modulating the events related to trophoblast differentiation and thereby placenta development.

2.2.5 Acknowledgments

We thank Dr. Denis Flipo for his excellent technical assistance in confocal microscopy. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (BB). FLB holds a Strategic Training Initiative in Research in Reproductive Health Sciences post-doctoral fellowship. BB holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2).

2.2.6 Figure Legends

Figure 2.1. Effect of forskolin and bpV[pic] on cAMP levels and cell fusion.

BeWo and primary trophoblasts (**A, C, E**) were left untreated or treated with 50 μ M forskolin, 10 μ M bpV[pic] or a combination. Quantification of cAMP was performed by EIA. JEG-3, BeWo and purified primary trophoblasts (**B, D, F**) were similarly stimulated or left untreated. Cells were stained with PI (red) and anti-desmoplakin antibodies (green) and visualized by confocal microscopy (40X; scale bars, 100 μ m) (** $p < 0.01$ vs. CTL.). These results are representative of three independent experiments.

Figure 2.2. Effect of forskolin and bpV[pic] on Syncytin-1 expression.

BeWo cells were stimulated with forskolin (50 μ M), bpV[pic] (10 μ M) or a combination. RT-PCR (**A**) and real-time RT-PCR (**B**) analysis was conducted for Syncytin-1 with β -actin and HPRT-1 mRNA, respectively serving as controls. **C**. Isolated primary cytotrophoblast cells were stimulated or not after 1 day in culture and analysed by real-time RT-PCR for Syncytin-1 expression. **D**. BeWo cells were co-transfected with pGL3-Syncytin-1prom (or pGL3-Basic) along with pRcActin-LacZ and stimulated or not. Luciferase activities were calculated from cell lysates as mean RLU values. Results are represented as fold induction of treated over untreated cell samples (* $p < 0.05$ vs. CTL.). These results are representative of three independent experiments.

2.2.7 Figures

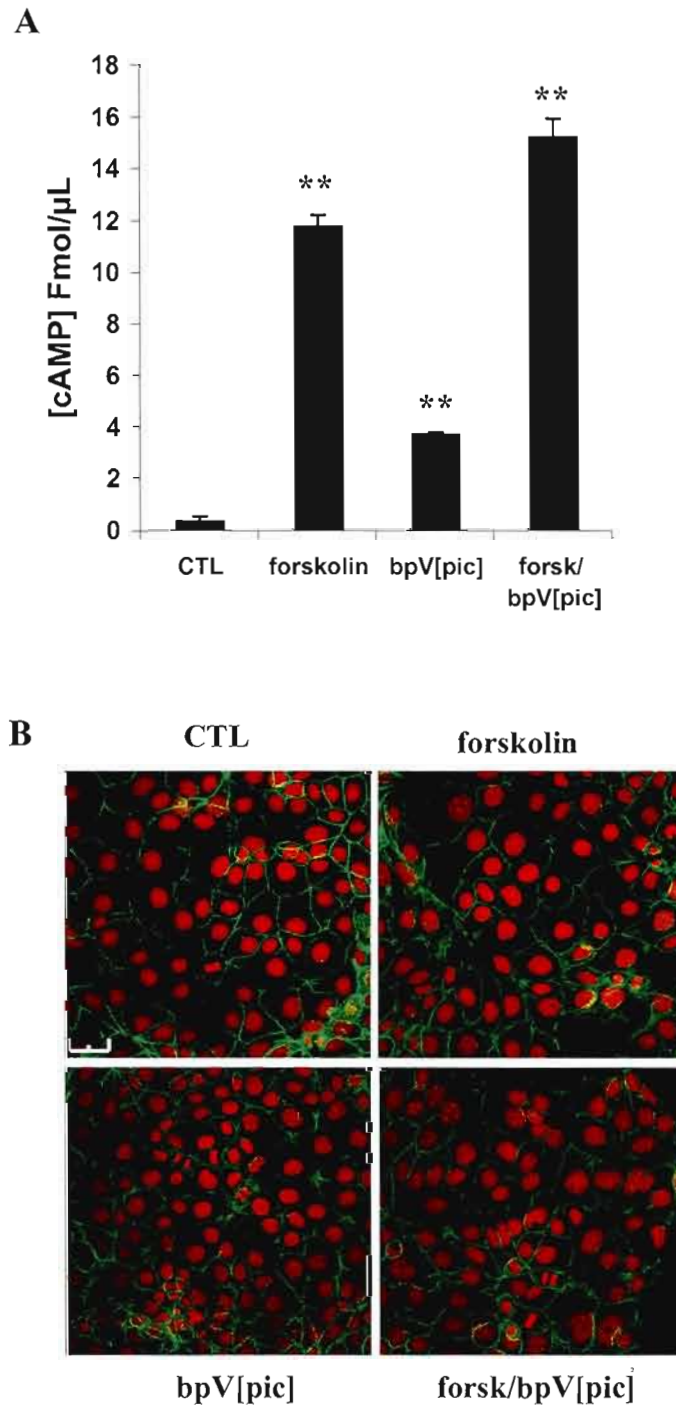
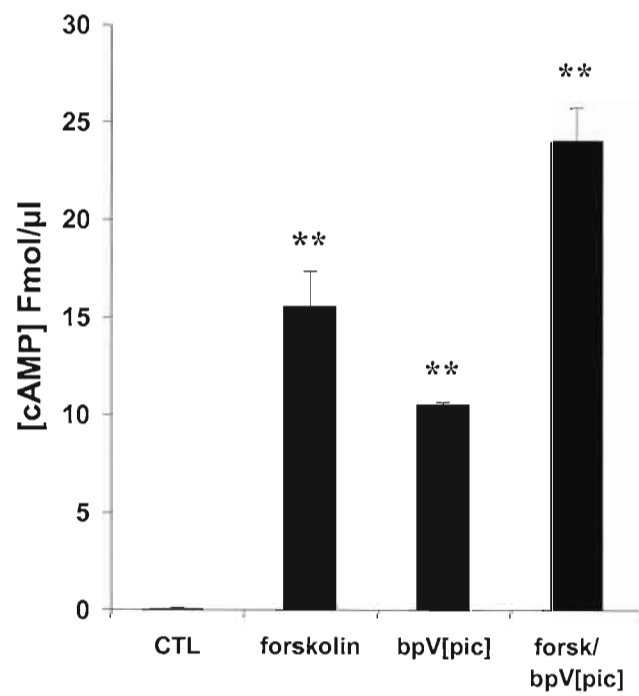


Figure 2.1

C



D

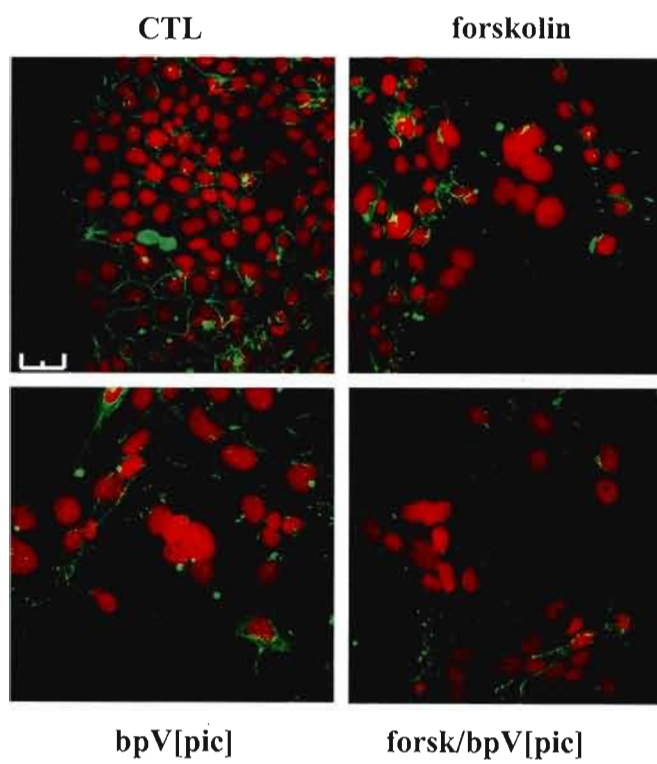


Figure 2.1

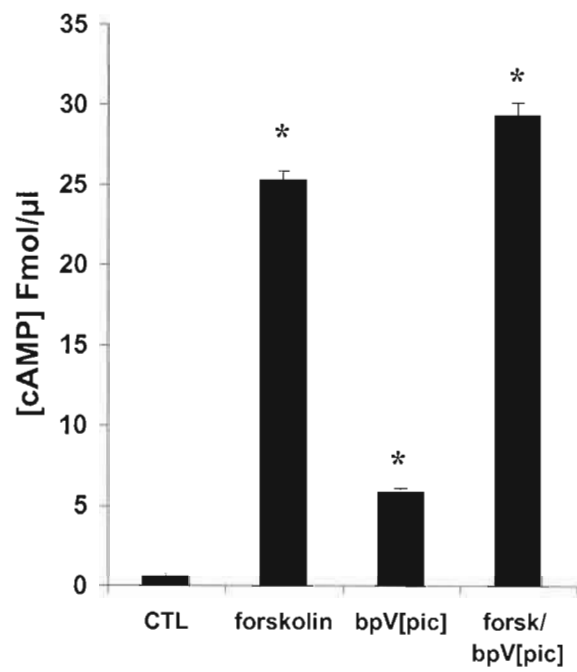
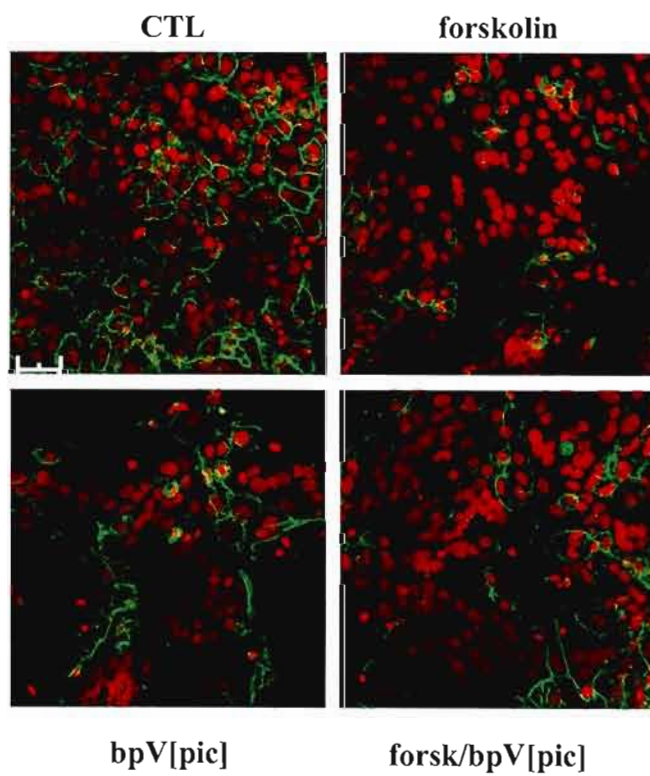
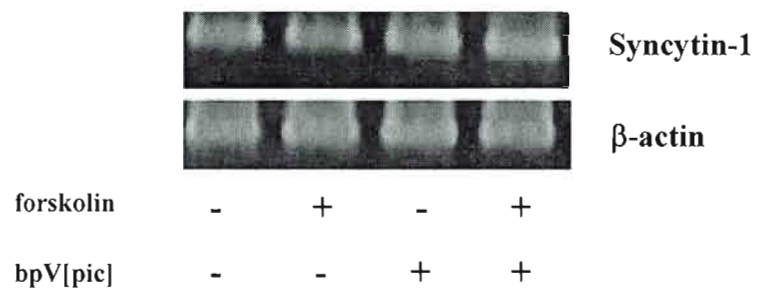
E**F**

Figure 2.1

A



B

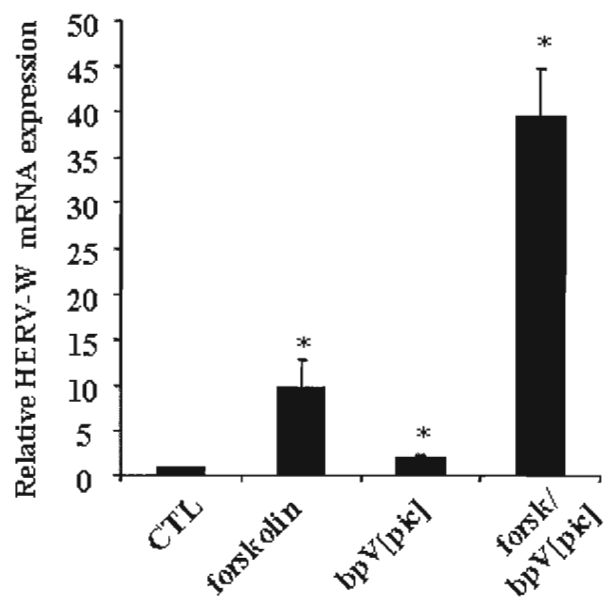
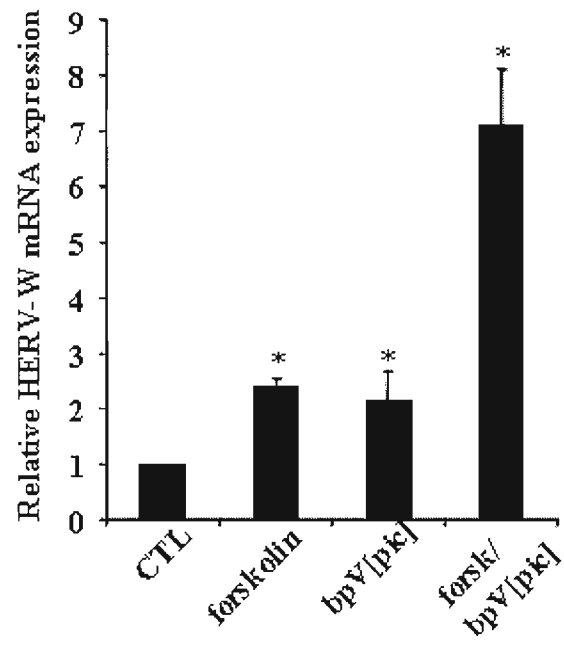


Figure 2.2

C



D

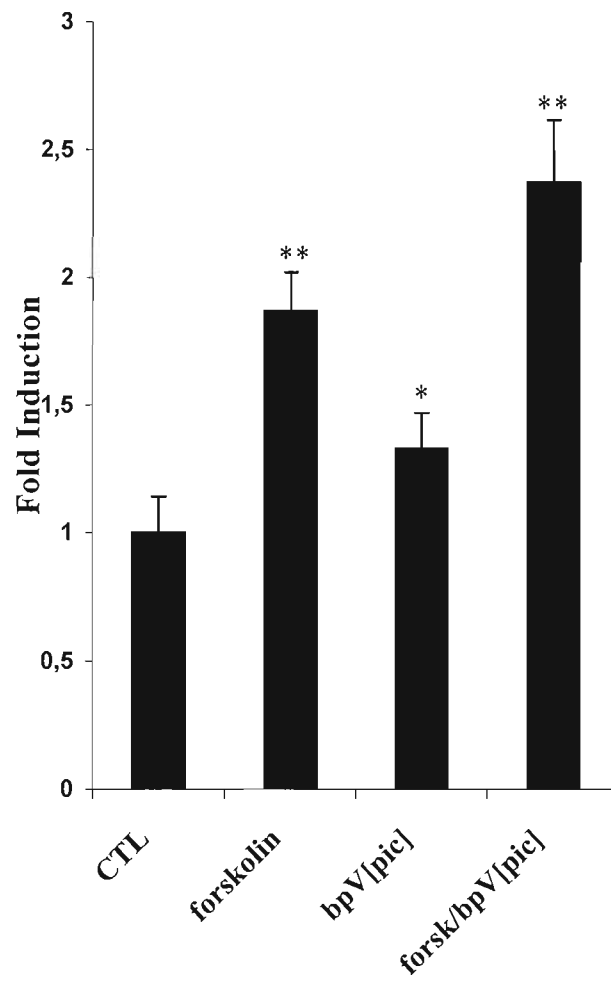


Figure 2.2

CHAPITRE III

ARTICLE 2

3.1 Contributions

Titre de l'article

SYNCYTIN-2 PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE FUSION OF HUMAN TROPHOBLAST CELLS

Auteure principale: Amandine Vargas

Collaborateurs : Julie Moreau, Frédérique Le Bellego et Julie Lafond

Directeur de recherche : Benoit Barbeau

Ce deuxième article a aussi été rédigé par moi-même, Amandine Vargas, avec les précieux conseils d'écriture de mon directeur de recherche. La réalisation des expériences ainsi que les tests statistiques en découlant ont aussi été réalisés, avec l'aide de grande valeur et les conseils de Julie Moreau, par moi-même. La partie concernant les cellules primaires trophoblastiques, le suivi des patientes et les accouchements ont été effectués à l'unité d'obstétrique et de gynécologie de l'hôpital St-Luc à Montréal, sous la direction du Dr André Masse et ses collaborateurs. La préparation des cellules a été effectuée au sein du laboratoire materno-fœtal du Dre Julie Lafond, avec l'aide de Frédérique Le Bellego.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant la mise en forme. Cependant, la version soumise au *Journal of Cell Science* a été modifiée selon les exigences du journal.

3.2 Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells

**Amandine Vargas, Julie Moreau, Frédérique Le Bellego, Sébastien Landry,
Julie Lafond and Benoit Barbeau ***

*Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques, Montréal,
Québec, Canada*

Running title: Syncytin-2 in trophoblast cell fusion

*Corresponding author. Mailing address:

Université du Québec à Montréal

Département des sciences biologiques, SB-R860

2080 St-Urbain

Montreal (Québec), Canada, H2X 3X8

Phone: (514) 987-3000 (ext. 4576). Fax: (514) 987-4647

Electronic address: barbeau.benoit@uqam.ca

Key word: trophoblast cells, syncytin, cell fusion

3.2.1 Abstract

Human Endogenous Retroviruses (HERVs) sequences are derived from ancestral integration events of retroviral DNA. The HERV-encoded Syncytin-1 protein has been suggested to play a major role in trophoblast cell fusion and thereby placenta development. Given that other HERV Env proteins could also be implicated in this process, we have herein compared the expression and functional implication of Syncytin-1 with the more recently described Syncytin-2 protein in various trophoblast cell lines. Initial characterization of the Syncytin-2 transcript showed a single spliced mRNA starting in the 5' LTR region downstream of a TATA box. RT-PCR and promoter studies in trophoblastic cells indicated that the activating agents, which specifically induces BeWo cell fusion (but not for Jar and JEG-3 cells) increased the expression of Syncytin-1, while having a marked upregulatory effect on the level of Syncytin-2 mRNA. Confocal microscopy experiments revealed that, in both unstimulated and stimulated BeWo cells, Syncytin-1 was present as a cytoplasmic structure migrating to regions of cell-to-cell contact. Syncytin-2 presented an inducible signal, which was present at the cytoplasmic membrane and also demonstrated punctuated signals in the cytoplasm extending to the plasma membrane. Experiments with siRNA-transfected cells finally demonstrated an important diminution in the number of cell fusion events upon repression of Syncytin-2 expression whereas transfection experiments with Syncytin-1 siRNA resulted in a more modest effect. Our results imply that Syncytin-2 is importantly implicated in BeWo cell fusion, although a role for Syncytin-1 is not excluded.

3.2.2 Introduction

Placenta development is a highly regulated process, which involves the differentiation and renewal of trophoblast cells. Trophoblast cells initially differentiate either in cytotrophoblasts or syncytiotrophoblast. Syncytiotrophoblast results from the fusion of trophoblast cells and its renewal is assured by cytotrophoblast fusion with this syncytiotrophoblast layer (Midgley et al., 1963). The syncytiotrophoblast plays a fundamental role in permitting the adequate exchange of nutrients and hormones as well as other components between the mother and the foetus (Benirschke and Kaufmann, 2000).

Formation of the syncytiotrophoblast, a process referred to as syncytialisation has been left unexplained for several years, until recently, when several studies have indeed shown that Env (envelope) proteins derived from Human Endogenous Retroviruses (HERVs) were important players in this biological process (Mi et al., 2000; Rote et al., 2004). HERVs are sequence of retroviral origin comprising 8% of the human genome and are estimated to have integrated the genome of primates from 10 to 50 million years ago (Larsson and Andersson, 1998; Löwer et al., 1996). Although mostly distributed in the genome as solo LTRs, HERV sequences are also occasionally present as nearly complete or complete retroviral genome in which all or some of the retroviral genes have been deleteriously mutated (Bannert and Kurth, 2004). In fact, some of the HERV genes are still able to produce proteins and the presence of complete viral particles have been associated with various human pathologies including cancer, multiple sclerosis,... (Antony et al., 2004; Löwer et al., 1996; Wang-Johanning et al., 2003)

The function of these HERV proteins remains mostly ill-defined. However, recent evidence has suggested that envelope-like HERV genes are crucial mediators of the fusion process involved in the syncytialisation of trophoblasts (for review, see (Muir et al., 2004)). Indeed, a first report had shown that a protein now termed Syncytin-1 played an essential role in these cellular fusion events (Blond et al., 2000;

Frendo et al., 2003; Mi et al., 2000). Results from other research groups further confirmed that Syncytin-1 indeed had a fusogenic capacity which went beyond trophoblast cells (Bjerregaard et al., 2006) but was even importantly associated as a mediator of multiple sclerosis (Antony et al., 2004). Furthermore, several links between the decrease in expression of Syncytin-1 and the occurrences of anomalies in pregnancies such as pre-eclampsia and Hemolysis Elevated Liver Enzymes and Low Platelets syndrome have been established (Knerr et al., 2004; Knerr et al., 2003; Kudo et al., 2003; Langbein et al., 2007; Soleymanlou et al., 2007). However, former studies on Syncytin-1 have left several unanswered questions and the expression of several HERV genes in the placenta has led to possible implication of other HERV Env protein in the process of trophoblast cell fusion (Potgens et al., 2004; Potgens et al., 2002). Recent studies have indeed suggested that other HERV-derived Env proteins could have the capacity to induce trophoblast cell fusion. The most serious candidate is termed Syncytin-2 (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2004; de Parseval et al., 2003; Malassine et al., 2006; Renard et al., 2005). Although no clear evidence have yet been presented in terms of its implication in placenta syncytialisation, its exclusive expression in placental tissue (especially in cytotrophoblast cells (Malassine et al., 2006)) and its fusogenic capacity (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2004; Renard et al., 2005) support the notion that this protein might be actively participating in the fusion of trophoblast cells.

Based on these recent studies, our objective was thus to determine the relative importance of Syncytin-1 and Syncytin-2 in trophoblast cell fusion. Using the well characterized cell fusion-inducible BeWo cell line, our results show that in terms of expression, cellular localisation and function, Syncytin-2 was a more compatible HERV Env protein in mediating BeWo cell fusion than Syncytin-1. These data are thus indicative that Syncytin-2 might be playing a more fundamental role in trophoblast development than Syncytin-1 and that trophoblast cell fusion would involve more than one HERV Env protein.

3.2.3 Materials and Methods

3.2.3.1 Cell culture

The trophoblastic cell lines BeWo, Jar and JEG-3 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, CA) and were respectively maintained in Ham's F12 (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada), RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Oakville Canada) and MEM (Sigma-Aldrich, Oakville Canada) medium supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich, Oakville Canada), L-glutamine (2mM), 1% Penicillin/Streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Human primary cytotrophoblasts were isolated from human placenta of uncomplicated term pregnancies (37-41 weeks) through our previously published protocol (Kliman et al., 1986) and maintained for a maximum of 4 days in culture in fully supplemented DMEM medium (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada). The use of human placental tissue was possible after obtaining informed consents from pregnant women and was approved by the Ethic Committee from the Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

3.2.3.2 RT-PCR and 5'/3' RACE analysis

Total RNA was extracted from BeWo cells treated with forskolin (50 µM) using TriZol (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada). Prior to RT, total RNA was treated with Turbo DNA-Free DNase (Ambion, Austin TX) for 5 minutes at 70°C. RNA (1 µg) was then incubated in the presence of 25 ng/µl oligo dT, 10 mM DTT, 100 µM dNTP, SuperScript reverse transcriptase (10 U) (Invitrogen Canada Inc, Burlington Canada) and SUPERase-In (20 U) at 42°C for 50 minutes. Aliquots from the RT reactions were then PCR amplified in the presence of 2 U Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering Canada), 1X ThermoPol buffer, 100 µM dNTP and 15 µM of each primer. Primers used for Syncytin-1 cDNA amplification were 5'-ATTGGCGGTATCACAACCT-3' (forward) and 5'-CCAGTGTTTCGAAGCTCCT-3' (reverse). For Syncytin-2 cDNA amplification,

the primers used were 5'-CCACCAACATCCTTTCAA-3' (forward) and 5'-CGTGAGAATGAGAACCAG-3' (reverse), while those for β -actin were 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3' (forward) and 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTT-3' (reverse). The conditions in the PCR reactions were as followed: a first step of denaturation at 94°C for 4 minutes followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 30 seconds), annealing (56°C for 30 seconds) and extension (72°C for 30 seconds). The 5' and 3' ends of Syncytin-2 RNA were determined from total RNA using the FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion, Austin TX) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cDNA was synthesized in presence of random decamers and 5' ends were amplified by 2 PCR rounds using outer and inner RACE primers and Syncytin-2-specific primers (5'-TGAACACGTGCACAACCTTCAGTA-3' and 5'-CTCGAGGCTTGGCTCTCTTCAAGTGCACT-3') successively, both being positioned at the 5' end of the coding region. For the 3'RACE protocol, cDNA synthesis was performed in the presence of the supplied 3'RACE adaptor. PCR amplification was achieved through inner and outer 3'RACE primers and two Syncytin-2-specific primers derived from the sequence downstream of the Syncytin-2 stop codon (5'-CTCGAGGCTTGGCTCTCTTCAAGTGCACT-3' and 5'-TGAACACGTGCACAACCTTCAGTA-3', respectively). Amplified products were subsequently cloned and sequenced.

3.2.3.3 Real-time RT-PCR

RNA was first isolated from unstimulated or stimulated BeWo cells by the Rneasy^(R) Plus mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR reactions were then performed in the presence of each specific primer. Briefly, reactions were initiated in a final volume of 10 μ l, containing 1 μ l of cDNA, 0.5 μ M of each primer, and 1 \times reaction mix, including Taq DNA polymerase, the reaction buffer, and SYBR green (SYBR^R

Premix Ex TaqTM : Perfect Real Time). All primer sequences were generated using the Light Cycler Probe Design Software 2.0 (Roche) and checked for specificity using GenBank Blast analysis. The Syncytin 1 primers were the following: 5'-GAAGGCCCTTCATACCAATGA-3' (reverse) and 5'-GATATTTGGCTAAGGAGGTGATGTC-3' (forward). For Syncytin 2, the reverse and forward primers designed for these experiments were 5'-CCTTCACTAGCAGCCTACCG-3' and 5'-GCTGTCCCTGGTGTTCAGT-3', respectively. In all PCR reactions, negative controls consisting of a RT-like reaction step with no added reverse transcriptase in addition to a blank sample were carried out and showed no PCR amplification (data not shown). Thermal cycling for quantification of both transcripts was initiated with a denaturation step of 95°C for 10 seconds, followed by 50 cycles (denaturation at 94°C for 3 seconds, 57°C for annealing during 15 seconds, and elongation at 72°C for 12 seconds). Amplification of the human HPRT-1 (Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1) cDNA with sense and antisense primers (5'-AAGCTTGCGACCTTGACC-3' and 5'-GACCAGTCAACAGGGGACATAA-3', respectively) was used as an internal control to quantify the expression of a reference gene. To verify the amplification of each single product with its suitable melting temperature, and to provide an accurate quantification with the Rel Quant Software, dissociation curves were run for all reactions and amplified products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel.

3.2.3.4 Assay for cell fusion of trophoblast cells

Trophoblastic cell lines (2×10^5 cells) were either left untreated or stimulated with forskolin (50 μ M), bpV[*pic*] (10 μ M) or their combination for 36-48 hours. Isolated primary trophoblast cells were cultured between day 1 and day 4 before staining. Cells were subsequently labelled with a mouse monoclonal anti-desmosome antibody (Sigma-Aldrich, Oakville Canada) as previously described (Daoud et al., 2005). Briefly, cells were fixed in methanol at -20°C for 30 minutes and incubated in

PBS containing 2% FBS (v/v) for 30 minutes to eliminate non-specific binding. Alternatively, cells were fixed in the presence of 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 minutes. The cells were then rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse monoclonal anti-desmoplakin antibody (1:700) in PBS containing 0.2% BSA for 1½ hour at room temperature, washed 3 times with PBS and incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000) for 1 hour at room temperature. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (PI, 50 µg/ml) for an additional 30 minutes at room temperature, washed 3 times with PBS and visualised with a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, CA, USA) equipped with a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan). All observations were performed at a 40X magnification. A syncytium was defined as an agglomeration of two or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane staining. Fusion index was determined in cells transfected with Syncytin-1 and Syncytin-2 siRNAs as follow: a total of 200 nuclei were counted and a percentage was calculated for the number of nuclei comprised in syncytia. Five coverslips were examined for each experimental condition. The resulting index of cellular fusion was calculated as a function of nuclei number per syncytium.

3.2.3.5 Luciferase assay

A 1092 bp and 606 pb DNA fragment respectively containing the Syncytin-1 and Syncytin-2 promoter regions were PCR amplified from human 293T genomic DNA with Syncytin-1 forward 5'-TTCAACATCCATTCCAACACCACC -3' and reverse 5'- CTGAGTCTTAAGTCCGGTGGCCT-3' primers and Syncytin 2 forward 5'-AGCGAGGCCTGTCTCCAAAA-3' and reverse 5'-CACTAGGGAAGGTATCCGAGTC-3' primers. The amplified fragments were then cloned into pGL3-Basic (Promega) at the SmaI site. After confirmation of the proper promoter sequence, pGL3-Syncytin-1prom and pGL3-Syncytin-2prom (vs pGL3-

Basic used as a control) (0,1 µg) were co-transfected with the β-gal-expressing vector, pRc-Actin-LacZ (0,1 µg) (normalisation) in BeWo cells (2×10^5 cells) using the FuGENE 6 transfection reagent according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Corporation, Indianapolis IN). Forty-eight hours post transfection, cells were washed once with fresh medium and treated with 50 µM forskolin, 10 µM bpV[pic] or their combination for 8 hours. Transfected cells were lysed in a lysis buffer (25 mM Tris phosphate, pH 7.8, 2 mM DTT, 1% Triton X-100, 10% glycerol) and luciferase activity read-out was performed with the MLX Microplate Luminometer apparatus (Dynex Technologies) following a single injection of a luciferase buffer (20 mM tricine, 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 220 µM Coenzyme A, 4.7 µM D-Luciferin potassium salt, 530 µM ATP, 33.3 mM DTT). The β-galactosidase activity was measured using the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to manufacturer's instructions. Luciferase activity were calculated in terms of Relative Light Units (RLU) and represent the mean ± S.D. of three transfected samples normalized by the measured β-galactosidase activity. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's t-test with StatGraphics. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3.2.3.6 Western blot analysis

Cells were transfected or not with pCDNAzeo vs pCDNAzeo-HERV/FED, and, in a other hand stimulated or not for 48 hours in the presence of forskolin (50 µM) and bpV[pic] (10 µM). Cells were then transferred on ice and, after several washes with PBS, were scrapped in 1 ml PBS. Pelleted cells were next resuspended in 500 µl of RIPA buffer consisting of 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Na deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,1% SDS and 1 mM PMSF to which was added a Protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis IN). After 20 minutes of incubation, the supernatant was recovered and quantified for

protein content by the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford IL). Protein extracts (10 µg) were migrated on a 8.5% SDS PAGE and transferred on a nitrocellulose membrane. The resulting membrane was blocked with 3% BSA and incubated with an anti-Syncytin-1 (Orbigen) (1/300) or the polyclonal anti-Syncytin-2 antibody (1/7000). Following incubation with an Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1/20000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), signals were detected by the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche) and membranes were subsequently exposed on an ECL High Performance Chemiluminescence film (Amersham Biosciences).

3.2.3.7 Confocal microscopy experiments

Cellular localisation of both Syncytin-1 and Syncytin-2 was performed by confocal microscopy in BeWo cells. First, polyclonal antibodies against Syncytin-2 were prepared through synthesis of a KLH-conjugated peptide containing amino acid 232 to 246 of the deduced HERV-FRD envelope amino acid sequence followed by rabbit immunization (Sigma-Genosys, The Woodlands TX). Several production bleeds were tested and optimal samples were used for subsequent experiments. Cells were first stimulated for 36 hours with 50 µM forskolin and 10 µM bpV[pic] before fixing and staining. Cells were incubated with two different polyclonal anti-Syncytin-1 antibodies (rabbit, Orbigen, San Diego, CA; goat K12, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA) (1/500) or our polyclonal anti-HERV-FRD (1/800) for 1½ hour at room temperature. After several washes, Alexa Fluor 568-conjugated rabbit anti-goat IgG or goat anti-rabbit IgG (1/1000) were then incubated for 2 hour at room temperature. After 3 washes in PBS, cells were analysed by confocal microscopy as described above. In certain experiments, primary antibodies were preincubated overnight at 4°C with their specific peptide prior to cell incubation on fixed cells.

3.2.3.7 siRNA transfection

BeWo cells plated in 24-well plates (1.5×10^5 cells) were stimulated with 50 μ M forskolin and 10 μ M bpV[pic] and transfected after 16-24 hours of stimulation, using Hiperfect (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) in the presence of 37.5 ng of siRNA duplexes corresponding to two different regions of the Syncytin-1 and Syncytin-2 transcript (Table 1). All siRNA were chemically synthesized by Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA). The sequence of sense and nonsense siRNA was blasted using the Ensembl blast algorithm and no significant homologies with cDNA or genomic sequences were detected. After 36 hours of transfection, efficiency/specificity of each siRNA was analysed by RT-PCR and Real Time RT-PCR while effect on morphological changes were assessed by the assay for cell fusion (see above).

3.2.4 Results

Previous studies had suggested that Syncytin-1 is the major determinant in the fusion process characterizing differentiation of cytotrophoblast cells in syncytiotrophoblast (Blond et al., 1999b; Frendo et al., 2003; Mi et al., 2000). Based on concerns, which were raised with respect to the important role in cell fusion attributed to a single HERV Env protein i.e. Syncytin-1 (Potgens et al., 2004; Potgens et al., 2002), a more thorough investigation on the possible role of the more recently discovered HERV Env protein termed Syncytin-2 was thus needed.

3.2.4.1 Characterization of the human Syncytin-2 transcript.

To explore and compare the functional relevance of Syncytin-2 (versus Syncytin-1) in trophoblast cell fusion, its transcript was first fully characterized. These analyses were performed in BeWo cells, a well-known trophoblastic cell line model, which differentiates and fuses upon treatment with agents such as forskolin and protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitors (Vargas et al., 2007). RNA from forskolin-stimulated BeWo cells was thus used to precisely map the borders of the transcript by 5' and 3' RACE analyses. To perform these analyses, primers were designed either from the upstream region next to the Syncytin-2 coding segment (for 5' RACE) or in the 3' LTR region (for 3' RACE) based upon the previously defined retrovirus DNA structure embedding the Syncytin-2 ORF (see Fig. 3.1C). As depicted in Fig. 3.1 (panels A,B), both RACE experiments generated a single specific signal. All sequenced 5'RACE-amplified signals mapped to a single transcription initiation site, which was nearby an upstream TATA box (Fig. 3.1C). Sequencing of these PCR products further revealed the expected singly spliced form of the transcript, which is typical of retroviral *env* gene transcripts. Splicing was also confirmed by the presence of splice donor and splice acceptor consensus sequences present in the HERV DNA sequence of the 5' LTR and upstream of the *env* ORF region, respectively (Fig. 3.1C). The 3' RACE experiment also lead to the

identification of a single polyadenylation signal in the expected region of the 3' LTR. Cleavage occurred in the dinucleotide TA and was positioned downstream of the typical AATAAA polyadenylation signal.

These results hence demonstrated that the Syncytin-2 transcript was expressed as a typical singly spliced transcript and that transcription initiation was likely dependent on a TATA box.

3.2.4.2 Expression of Syncytin-1 and Syncytin-2 in human primary trophoblast cells.

In order to assess the importance of Syncytin-2 in trophoblast cell fusion, we first wanted to determine how the expression of this gene compared to that of Syncytin-1 in human primary trophoblast cells. After isolation and culturing, these cells undergo spontaneous differentiation (as judged by secretion of hormones such as hCG and hPL) (Daoud et al., 2005; Daoud et al., 2006) and present morphological changes such as extensive cell fusion, which peaks at day 4. These fusion events are depicted in Fig. 3.2A in which primary cells at different time points were stained for the cell surface desmoplakin and the nucleus. Results indeed showed the presence of numerous multinucleated giant cells at day 4, while fusion events were more limited at early time points (days 1-2). Next, RT-PCR analyses were conducted on RNA from these primary cells cultured at different time points. Primers were chosen in the coding segment of both HERV *env* genes. RT-PCR controls included PCR amplification of RNA samples (with no RT step) and showed the absence of any specific bands (data not shown). As demonstrated in Fig. 3.2B, Syncytin-1 and Syncytin-2 expression were both present throughout the time course and showed little alteration although Syncytin-1 expression was more important than Syncytin-2 levels.

We next looked at the expression of both of these genes in BeWo cells (inducible for cell fusion and differentiation) in order to better estimate the possible relevance of each HERV Env proteins in trophoblast fusion. Levels of β -actin mRNA were used as a reference for qualitative comparison of their expression. BeWo cells

were either left unstimulated or stimulated for 24 and 48 hours. Combination of both inducing agents were also included and showed a very potent fusion-inducing activity in BeWo cells, while similarly treated non-fusogenic JEG-3 and Jar trophoblastic cell lines remained morphologically unaffected (Fig. 3.3A-C). RT-PCR analysis on unstimulated and stimulated BeWo cells revealed high expression levels of Syncytin-1 with a modest (yet reproducible) increase in levels upon stimulation (mainly with forskolin or the combination of stimulating agents) at 48 hour post-stimulation, as we had previously observed (Vargas et al., 2007). The 24 hour time point however revealed no significant changes in Syncytin-1 mRNA levels. Interestingly, Syncytin-2 showed a marked augmentation of expression at both 24 and 48 hours after stimulation while unstimulated cells indicated poor expression (Fig. 3.3D,E). The increase upon bpV stimulation was modest at 48 hours but remained reproducible and a slight augmentation was apparent in Syncytin-2 level when comparing forskolin versus forskolin-bpV[pic]-stimulated BeWo cells.

To provide a better quantitative analysis of these modulations of Syncytin-1 and Syncytin-2 expression, real-time RT-PCR was performed on RNA samples from similarly treated BeWo cells. As presented in Fig. 3.3F, the expression of Syncytin-1 was again significantly modulated by all activators with the forskolin/bpV[pic] treatment leading to the most important induction (39 folds). Confirming the results from the RT-PCR analyses, Syncytin-2 showed a more important upregulation of its expression upon stimulation. Even in the presence of bpV[pic] alone, Syncytin-2 expression was upregulated 8,3 folds (versus 2,2 folds for Syncytin-1) while combination of both agents culminated into a dramatic 362,5 fold induction.

These results thereby indicated that, although both Syncytin-1 and Syncytin-2 were constantly expressed in primary trophoblast cells, both genes were modulated in BeWo cells upon stimulation although Syncytin-2 expression showed a more pronounced response to these same activators.

3.2.4.3 Promoter activities of Syncytin-1 and Syncytin-2 in stimulated BeWo cells.

In order to confirm and to better address the differences in response of the Syncytin-1 and Syncytin-2 gene in stimulated BeWo cells, promoter constructs with the 5' LTR region were generated and contained the luciferase reporter gene. Promoters were amplified from human genomic DNA and regions were delimited by the transcribed region next to the exon 1 splice donor site up to 374 and 561 bp upstream from the deduced CAP sites for Syncytin-1 and Syncytin-2, respectively. Upon transfection of these constructs with the lacZ-encoding vector (for normalisation), BeWo cells were activated for differentiation and cell fusion and compared in terms of normalized luciferase activity to unstimulated transfected cells. Our results first demonstrated that luciferase activity in unstimulated BeWo cells was very low for Syncytin-2 when compared to Syncytin-1, which was in line with the strength of the RT-PCR signal obtained in Fig. 3.3. Upon stimulation, a modest but reproducible increase in luciferase activity driven by the Syncytin-1 promoter was noted with forskolin (+/- bpV[μ M]) (Fig. 3.4A). However, importantly, Syncytin-2 promoter activity was more induced in the presence of the stimulators as judged by the fold increase in luciferase activity of transfected BeWo cells (Fig. 3.4B).

Our data agree with a transcriptional mechanism for the increase in mRNA level mediated by the added stimulating agents to BeWo cells. These results also confirm that Syncytin-2 expression is more importantly increased in stimulated BeWo cells in comparison to that of Syncytin-1.

3.2.4.4 Cellular localisation of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cells.

In order to assess the distribution of both Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cells, confocal microscopy experiments were next performed in the presence or absence of inducing agents. As Syncytin-2 antibodies were not commercially available, polyclonal antibodies were thus produced from rabbits separately injected

with a peptide region located in the extracellular region of the Syncytin-2 protein. Western blot analysis revealed the specificity of these antibodies presenting a signal of approximately 75 kDa (as previously published (Malassine et al., 2006)) and further demonstrated the increase in Syncytin-2 protein levels in stimulated or transfected BeWo cells versus unstimulated or untransfected cells thereby confirming our RT-PCR and promoter studies (see Fig. 3.S1 in supplementary material). Sera from the injected rabbits, which demonstrated the most efficient detection of Syncytin-2, were thereby further used for confocal analyses.

Using two different sources of Syncytin-1 antibodies, one specific toward the COOH end and the other specific for the amino extracellular segment, we first determined the cellular localisation of this HERV Env protein in BeWo cells. Invariably with all tested antibodies, Syncytin-1 could be detected in a punctual structure (1 per cell), often in close proximity to the nucleus. However, in cells extending pseudopods in situation of cell contact, the punctuated signal appeared to displace itself in the pseudopod in the direction of the cell contact point (Fig. 3.5D,F,G,H). Interestingly Fig. 3.5H depicts a positive signal at the tip of two pseudopods extending from contacting BeWo cells. Other positive structures for Syncytin-1 were also observed where cell-to-cell contact was more extensive than by single pseudopod. These signals were not observed in cells incubated only in the presence of the second antibody (Fig. 3.5A) and were blocked in experiments where anti-Syncytin-1 antibodies were pre-incubated with its specific peptide (to which they were derived) before incubation with the cells (data not shown). These results were taken from BeWo cells stimulated with bpV[pic] and forskolin but comparable results were obtained when observations for the signal specific for Syncytin-1 were performed in all condition including unstimulated cells (data not shown).

Comparison of the signals of Syncytin-1 with that of Syncytin-2 revealed important differences. Indeed, in stimulated cells, signals were more dispersed and diverse. Most signals occurred at the membrane and were in fact in proximity of cell-to-cell contact (Fig. 3.5L-N). A dense cytoplasmic membrane signal was in fact very

clearly spotted at localized cell-to-cell contact. The occurrence of this signal to the cytoplasmic membrane was further confirmed by confocal microscopy (using the same antibodies) on paraformaldehyde (non-permeabilized) stimulated BeWo cells (see Fig. 3.S2 in supplementary material). In addition, a clear signal was often found in the form of networks extending toward the cytoplasmic membrane (Fig. 3.5J,K). Very importantly, none of these signals were seen in unstimulated BeWo cells, which is reminiscent of the absence of the RT-PCR signal for Syncytin-2 expression in these cells (data not shown). Furthermore, no specific signals were apparent in stimulated control cells (no added primary antibody; Fig. 3.5I) or when stimulated BeWo cells were similarly analysed with peptide-preincubated polyclonal anti-Syncytin-2 antibodies (data not shown).

These data hence suggested that both Syncytin-1 and Syncytin-2 have different pattern of cellular distribution of which only Syncytin-2 seems truly inducible. However, both signals were often found in proximity to region of cell-to-cell contact.

3.2.4.5 Specific targeting of Syncytin-1 and Syncytin-2 siRNAs in BeWo cells.

The above results demonstrated that Syncytin-2 expression adequately paralleled the observed induced BeWo cell fusion and could thereby play an important role in the fusion process, perhaps even to a greater extent than Syncytin-1. To compare the functional importance of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cell fusion, we designed two different sets of siRNAs against Syncytin-1 and Syncytin-2. All 4 siRNAs were tested in parallel with similar mutated versions of these siRNAs with a predicted inefficient siRNA activity against the corresponding HERV *env* transcript. BeWo cells were thus first transfected with these various siRNAs and then stimulated by forskolin. RT-PCR analyses were conducted on these transfected cells for the expression of both HERV *env* genes with β -actin serving as a control. Results indeed showed the expected repression of Syncytin-1 and Syncytin-2 by targeted

siRNAs in transfected BeWo cells, while mutated controls demonstrated a normal level of expression of both Syncytin-1 and Syncytin-2 upon stimulation (Fig. 3.6A). Furthermore, Western blot analysis confirmed the RT-PCR data in that severe reduction of Syncytin-1 and Syncytin-2 proteins levels were revealed upon transfection of their specific siRNA (Fig. 3.6B). A more accurate and quantitative evaluation of the effect of our siRNAs in BeWo cells was determined by real-time RT-PCR. RNA from siRNA-transfected BeWo cells was thus again amplified and measured accordingly. As demonstrated in Fig. 3.6C,D siRNA against Syncytin-1 specifically diminished mRNA levels with no or limited impact on the levels of Syncytin-2 mRNA (levels of 90 to 95% reduction). With Syncytin-2 siRNA, reduction of Syncytin-2 mRNA was observed to be 70 and 95% with the two tested siRNA again with limited impact on the level of Syncytin-1 transcripts. In these transfection experiments, all tested mutated control siRNAs were shown to have limited effect on either Syncytin genes.

Hence, in BeWo cells, we observed that siRNAs can effectively and specifically diminish Syncytin-1 and Syncytin-2 expression and could be used to determine the function of their targets in trophoblast cell fusion.

3.2.4.5 Impact of the blocking of Syncytin-1 and Syncytin-2 expression on BeWo cell fusion.

We then evaluated the impact of our siRNA on cell fusion of activated BeWo cells. BeWo cells were first left untreated or stimulated with forskolin or forskolin/bpV[pic] and subsequently transfected with the various siRNAs. The extent of fusion was evaluated by desmoplakin and nuclear staining of the cells and measurement of cellular fusion index. Experiments in BeWo cells first indicated that control siRNA for both Syncytin-1 and Syncytin-2 had no impact on the cell fusion of stimulated cell (Fig. 3.7 A,C). However, siRNA against Syncytin-1 showed moderate but reproducible lowering of cell fusion (Fig. 3.7B). Measurements of the cell fusion

index indeed clearly demonstrated the reduction mediated by Syncytin-1 repression on cell fusion (an average of 40% reduction; Fig. 3.7E). However, when BeWo cells were transfected with Syncytin-2-specific siRNAs, a more drastic effect on cell fusion was noted. Indeed, in both stimulation conditions, cell fusion was often rare (Fig. 3.7D). These results are better expressed in our cell fusion index figure, in which evaluation of cell fusion showed an 80 to 95% decrease in cell fusion (Fig. 3.7F). Similar results were also observed when using the other specific siRNAs (versus their mutated version) (data not shown).

Our data thus illustrate the importance of Syncytin-2 in the process of cell fusion, although Syncytin-1 also demonstrated a positive modularity role in this process. These results thereby indicate that more one than on HERV Env protein acts upon trophoblast cell fusion.

3.2.5 Discussion

The differentiation process of trophoblast is complex and includes important morphological changes, of which cellular fusion is probably its most important hallmark. Recent studies had demonstrated that Syncytin-1 had a major role in this fusion process (Blond et al., 1999b; Frenzo et al., 2003; Mi et al., 2000), although the involvement of other cellular factors (including other HERV Env proteins) was proposed (Potgens et al., 2004). In light of these facts and based on studies on the new Syncytin-2 protein (Blaise et al., 2003), our aim was to assess the role of both HERV Env proteins in BeWo cell fusion. We clearly demonstrate for the first time a prominent role played by Syncytin-2 in this process.

Our first experiments were designed to precisely map the 5' and 3' borders of the Syncytin-2 transcript. We showed that Syncytin-2 is transcribed as a typical singly spliced *env* mRNA starting in the 5' LTR region and terminating in the 3' LTR. Syncytin-1 has also demonstrated a similar structure, although other possible alternative splicing events from the proviral DNA have also been proposed (Blond et

al., 1999b). However, unlike the TATAless Syncytin-1 promoter (Blond et al., 1999b; Cheng et al., 2004), Syncytin-2 promoter produced a single transcription initiation site and this site was located downstream of a putative TATA box. Furthermore, after sequence comparison, we have also observed the presence of *gag*- and *pol*-like genes in the HERV proviral DNA structure (A. Vargas and B. Barbeau, unpublished). Although we have not clearly determined whether these remnant retroviral genes might lead to the synthesis of proteins with former viral-associated functions, it is likely that, as for most of the HERV Env proteins, these proteins have not conserved these features.

With this information on the transcript of Syncytin-2, by RT-PCR analyses, we have then compared HERV *env* gene expression in isolated primary cytotrophoblast cells at different time post-isolation. Our result supported the potential involvement of both Syncytin-1 and Syncytin-2 genes in fusion as both were expressed throughout cell culturing, albeit at different strength. In addition, a slight but reproducible decrease in both Syncytin-1 and Syncytin-2 mRNA levels were observed in a time-dependent fashion, which agrees with a previous reports on Syncytin-2 (Malassine et al., 2006). Although it might have been expected that HERV *env* genes would have been present only at day 2 and optimal at day 3-4 at a time point when fusion is at its climax, this might be a consequence of cell dispersion and stress caused by the isolation procedure, which causes a lag before onset of fusion can be assessed. Unpublished results relating to induction of both Syncytin-1 and Syncytin-2 in primary cells following stimulation.

We turned to the classical BeWo cell line to inquire about the expression of both Syncytin genes. In BeWo cells, incubation with inducing agents indeed was paralleled by an increase in the level of expression of both Syncytin-1 and Syncytin-2 although Syncytin-2 was very poorly expressed in non-stimulated cells and presented a more drastic increment in its expression upon stimulation. Interestingly, at 48 hours, our PTP inhibitor had lost most of its induction capacity, which might be reminiscent of its highly transient action on signalling pathways (Barbeau et al.,

1997; Fortin et al., 2001b; Ouellet et al., 1999). Our results however further confirmed other studies with respect to the more modest fluctuation of Syncytin-1 expression in BeWo cells upon stimulation (Kudo and Boyd, 2002; Kudo et al., 2003) and thereby made Syncytin-2 an interesting candidate as a major determinant of BeWo cell fusion. In parallel to these analyses, similar experiments were conducted in non-fusing JEG-3 and Jar cells. Unpublished results (A. Vargas and B. Barbeau) have demonstrated that both Syncytin-1 and Syncytin-2 are expressed in these cell lines although no variation in expression could be observed in these cells upon stimulation. It is tempting to speculate that these cell lines do not express these fusogenic HERV Env proteins to high levels in order to be maintainable in cell culture. One might then consider that Syncytin-1 and/or Syncytin-2 might be mutated and affect their function in these cells. Alternatively, their respective receptors (or other participating cellular factors) might be in cause to affect fusion. Experiments are presently underway to address these various possibilities.

To determine if the augmentation of Syncytin-2 mRNA was attributed to an increase in its promoter activity, we have tested Syncytin-1 and Syncytin-2 promoters in BeWo cells and have indeed shown that promoter activity correlated with the RT-PCR results. Furthermore, basal level promoter activity concurred with our RT-PCR results in that Syncytin-1 promoter activity was more important in untreated BeWo cells in comparison to Syncytin-2 which was very low. These results hence suggested that, like Syncytin-1 (Prudhomme et al., 2004), Syncytin-2 also bears a forskolin (and perhaps bpV[pic])-responsive region in its promoter. In fact, we have recently generated deletion mutants of the promoter of Syncytin-2 and have narrowed this region down to 50 bp. Further experiments are underway to provide a more thorough characterization of this element.

We have determined the cellular localisation of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cells. Our data have demonstrated that Syncytin-2 detection was most prominent in induced cells and that one of the specific signals was part of a network (reminiscent of the migration of membrane proteins to the cell surface). In addition,

signals were apparent at the membrane at the point of cell contact, and might reproduce a phenomenon of capping with its specific receptors. These signals were found to be specific and these localisations were expected based on the potential function of Syncytin-2 in BeWo cell fusion. Few studies have previously addressed localisation of this protein at the cellular level. A previous study had however analysed the localisation of Syncytin-2 in isolated villous trophoblasts by immunocytochemistry and suggested membrane and cytoplasmic localisation of the protein (Malassine et al., 2006). The Syncytin-1 signal was however more peculiar, showing punctuated signals with a tendency to be present in pseudopod and close to region of cell-to cell contact. Again, this localisation reasonably might favour its involvement in cell fusion although these structures tended to be present equally (in abundance and intensity) in unstimulated and stimulated cells (which might be expected from our RT-PCR data). A previous study had presented data on the possible cellular localisation of Syncytin-1 in breast cancer cells (Bjerregaard et al., 2006). Signals were not as strong as ours and were more homogeneous. The tested cell type likely contributed to the differences in signal and might explain the diverse distribution of Syncytin-1 in these various cell contexts. We are not certain of the nature of the cellular structure which harbours the Syncytin-1 signal but its reproducibility and localisation makes us confident that this signal is specific and could contribute to the implication of Syncytin-1 in cell fusion of BeWo cells.

Experiments on the study of the function of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cell fusion were based on the use of two different targeted siRNA for each transcript. In our RT-PCR analyses, we have determined that the transfection approach was sufficiently optimal to strongly and specifically reduce the expression of the gene of interest. Through this approach, our analyses undoubtedly demonstrated the important effect of the reduction of Syncytin-2 expression on activator-induced BeWo cell fusion. This effect was observed in the different tested activator combination and was assessed both quantitatively and qualitatively. Studies of these natures with antisense oligonucleotides derived from the Syncytin-1

sequence have been previously undertaken and showed a reduction in cell fusion in primary trophoblast cells, when Syncytin-1 expression was reduced (Frendo et al., 2003). Our studies have not included primary trophoblast cells, although our results concur with these data as siRNA against Syncytin-1 reduced the efficiency of cell fusion. Whether Syncytin-2 also imparts an equivalent and important fusogenic activity to primary trophoblast cells remains to be determined although we are confident that this might be the case as Syncytin-2 expression is also expressed steadily in these cells. However, further studies will be needed to clearly assess the role of both proteins in primary cytotrophoblast fusion.

Based on the body of data that were obtained in this study, we would speculate (at least for BeWo cells) that cell fusion of trophoblast cells necessitate at least two HERV Env proteins, of which Syncytin-2 plays an essential role in mediating fusion. Syncytin-1 might be implicated in an exclusive early phase of recognition through possible pseudopods, while Syncytin-2 might contribute more extensively at all stages by strongly mediating cell fusion through its more important expression at the cell surface. Whether these reflect different steps in the mechanisms of general trophoblast cell fusion or particular fusion events in different context in the placenta needs to be further defined. In fact, current experiments are underway to determine whether a similar signal can be observed in primary trophoblast cells and if blocking of Syncytin-2 has an equal impact on cell fusion.

3.2.6 Acknowledgments

We are very thankful toward Dr. Denis Flipo for his excellent technical assistance in confocal microscopy experiments. This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (BB). FLB holds a Strategic Training Initiative in Research in Reproductive Health Sciences post-doctoral fellowship. BB holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2).

3.2.7 Figure legends

Figure 3.1. Characterization of syncytin-2 mRNA by 5'/3'RACE analysis. (A) Total RNA samples from forskolin-stimulated BeWo cells were analysed by 5'RACE and PCR-amplified products were then run on a 2% agarose gel (lane 1). (B) With the same RNA sample, 3' RACE analysis was also performed. The presented amplified products result from a first PCR round (outer primer) with an additional PCR round (inner primer) (lanes 1 and 2, respectively) M = 100 bp marker (the asterisk indicates the 600 bp band). (C) Amplicons from both 5' and 3' RACE analyses were sequenced. Positioning of the transcription start site (arrow), a putative TATA box (in a box), splice donor (SD) and splice acceptor (SA) sites, polyadenylation signal (pA) and the polyA cleavage site (arrow) are indicated. The presence of *gag/pol*-like sequences as well as the Syncytin-2 ORF are depicted in the figure in addition to both 5' and 3' LTR regions bordering the HERV proviral DNA.

Figure 3.2. Syncytin-1 and Syncytin-2 expression in cultured primary human trophoblast cells. (A) Primary human trophoblasts were cultured between 24 and 96 hours, stained with an anti-desmoplakin antibody (green) and propidium iodide (nucleus; red) and observed by confocal microscopy at a 40X magnification (scale bars, 100 μ m) (arrows=syncytia). (B) Total RNA from these primary human trophoblast cells was extracted at the different time points using Trizol reagent and samples were analysed by RT-PCR for Syncytin-1, Syncytin-2 and β -actin mRNA levels.

Figure 3.3. Syncytin-1 and Syncytin-2 expression in trophoblastic cells lines following activation. JEG-3 (A), Jar (B) and BeWo (C) cells were stimulated for 48 h with 50 μ M forskolin and 10 μ M bpV[pic], stained with an anti-desmoplakin antibody (green) and propidium iodide (nucleus; red) and observed by confocal microscopy at a 40X magnification (scale bars, 100 μ m) (arrows=syncytia). (D-F)

BeWo cell lines were stimulated for 24 (**D**) or 48 hours (**E**) with forskolin (50 μ M), bpV[pic] (10 μ M), or forskolin (50 μ M)/bpV[pic] (10 μ M). Total RNA was extracted using Trizol and samples were analysed by RT-PCR for Syncytin-1, Syncytin-2 and β -actin mRNA levels. Real-time RT-PCR analyses (**F**) were also conducted on these RNA samples and resulting quantification is expressed after normalisation with the HPRT-1 mRNA levels. Relative expression of Syncytin-1 (dark columns) and Syncytin-2 (shaded columns) are presented on a log scale. All of the measured mRNA levels were significantly higher when compared to unstimulated cells.

Figure 3.4. Syncytin-1 and Syncytin-2 promoter activity following stimulation of BeWo cells. BeWo cells were transfected using the FuGENE 6 reagent with 0,1 μ g pGL3-Syncytin-1prom (**A**) or pGL3-Syncytin-2prom (**B**) and 0,1 μ g of the pRc-Actin-LacZ vector. Following a 48 hour incubation, cells were left untreated or stimulated with forskolin (50 μ M), bpV[pic] (10 μ M), forskolin (50 μ M)/bpV[pic] (10 μ M) and lysed after 8 hours of stimulation. Measured luciferase activities were expressed as a normalized average luciferase activity (+/- S.D.) and are represented as fold increases of treated samples over untreated samples. These results are representative of 3 independent experiments (* $p < 0,05$).

Figure 3.5. Cellular localisation of Syncytin-1 and Syncytin-2 in BeWo cells upon stimulation. BeWo cells were stimulated for 36 hours with 50 μ M forskolin and 10 μ M bpV[pic]. Cells were incubated with two different sources of anti-Syncytin-1 antibodies (**A, D-H**; Orbigen, **B,C** Santa Cruz) or anti-Syncytin-2 (**I-N**) antibodies followed by the addition of an Alexa 568-conjugated anti-rabbit (or anti-goat) IgG antibody and analysed by confocal microscopy. Controls consisted of stimulated BeWo cells incubated with the secondary antibody alone (**A** for Syncytin-1) or with the addition of a rabbit pre-immune serum and the secondary antibody (**I** for Syncytin-2). Confocal microscopy observations were made at 40X magnification (scale bars, 100 μ m) (arrows= contact zone between two cells). In panel H

(observation at 400X), a phase contrast image is depicted and the corresponding fluorescent image is added as an inset.

Figure 3.6. Efficiency and specificity of Syncytin-1 and Syncytin-2 siRNA in transfected BeWo cells. BeWo cells were stimulated with 50 μ M forskolin and 10 μ M bpV[pic] and transfected 24 hours later, using Hiperfect reagent in the presence of 37,5 ng of the different siRNA duplexes. Efficiency of each siRNA was analysed by RT-PCR (**A**), Western blot analysis (**B**) and Real Time RT-PCR (**C,D**) 36 hours post transfection for both Syncytin-1, Syncytin-2 and β -actin mRNA/proteinS levels. Syncytin-1 siRNA (Si-1#1 and Si-1#2 versus their respective control CTL Si-1#1 and CTL Si-1#2) were evaluated in terms of mRNA percentage reduction in **C** while Syncytin-2 siRNA (Si-2#1 and Si-2#2 versus their respective control CTL Si-2#1 and CTL Si-2#2) were similarly analyzed in **D**. In both panels, a control (CTL) consisting of mock-transfected cells were also quantified and represent the 100% value for the specific targeted gene. These results are representative of 2 independent experiments (* $p < 0,05$).

Figure 3.7. BeWo cell fusion following RNA interference of Syncytin-1 and Syncytin-2 expression. BeWo cells were left untreated or stimulated for 16 hours with 50 μ M forskolin in the presence or absence of 10 μ M bpV[pic] and transfected using Hiperfect reagent with 37,5 ng of the different siRNA duplexes: CTL siRNA Syncytin-1 (**A**), siRNA Syncytin-1 (**B**), CTL siRNA Syncytin-2 (**C**) and siRNA Syncytin-2 (**D**). Cells were then stained 36 hour post transfection with an anti-desmoplakin antibody (green) and propidium iodide (nucleus; red) and observed by confocal microscopy at a 40X magnification (scale bars, 100 μ m). (**E-F**) Fusion index was determined in cells transfected with Syncytin-1 and Syncytin-2 siRNAs as follow: a total of 200 nuclei were counted and a percentage was calculated for the number of nuclei comprised in syncytia. Five coverslips incubated in separate wells of a six-well microplate were counted through this protocol for each incubation

condition. Results are depicted in terms of percentage (means and S.E.M.) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.2.8 Table

Table 3.1. Sequences of the tested siRNAs in BeWo cell transfection

Gene	Name	SiRNA sequence*
Syncytin-1	Si-Sync-1#1	5'-rGrCrArGrCrGUrCrCrCrGrGrArArAUrAUUd(TT)-3'
	Si-Sync-1#1-Control	5'-rGrCrA <u>U</u> rGrCr <u>C</u> r <u>G</u> rCr <u>A</u> rGr <u>A</u> rA <u>U</u> r <u>G</u> r <u>C</u> rAUU d(TT)--3'
	Si-Sync-1#2	5'-rCUrGrGUrArArGrCrCUrAUUUrArAUU d(TT)--3'
	Si-Sync-1#2-Control	5'-rCUr <u>A</u> r <u>A</u> Ur <u>C</u> r <u>C</u> r <u>G</u> Ur <u>A</u> <u>U</u> Ur <u>G</u> r <u>G</u> rArAUU d(TT)--3'
Syncytin-2	Si-Sync-2#1	5'-rGrCUrCrCUrGrCUrGrGUUrCUrCrAUU d(TT)--3'
	Si-Sync-2#1-Control	5'-rGrCU <u>U</u> rCr <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> UrGrGr <u>C</u> UrCr <u>C</u> rCrAUU d(TT)--3'
	Si-Sync-2#2	5'-rCrCUrArCrCrGrCrCrAUrCrCUrGrAUUU d(TT)--3'
	Si-Sync-2#2-Control	5'-rCrCUr <u>C</u> rCr <u>G</u> r <u>C</u> rCr <u>C</u> U <u>r</u> <u>A</u> r <u>A</u> r <u>G</u> Ur <u>C</u> rAUUU d(TT)--3'

*The sequence of a single strand is presented. Underlined nucleotides represent mutations in the control siRNA from the active siRNA.

3.3.9 Figure legends (Supplementary material)

Figure 3.S1. Detection of Syncytin-2 by an anti-Syncytin-2 polyclonal antibodies.

Extracts from 293T cells transfected with the Syncytin-2 expression vector (or the pcDNAZeo empty vector) (10 μ g) (**A**) and non-stimulated (NS) or forskolin (50 μ M) /bpV[pic] (10 μ M)-stimulated (S) BeWo cells (**B**) were migrated on SDS-PAGE and analysed by Western blot using rabbit polyclonal antibodies derived against amino acid 232 to 246 of Syncytin-2 and an HRP-coupled anti-rabbit IgG. Signals are indicated by an arrow. Molecular weight markers are also indicated on the left side of the panels.

Figure 3.S2. Detection of Syncytin-2 on paraformaldehyde-fixed BeWo cells.

BeWo cells were either left untreated (**B**) or stimulated for 36 hours with 50 μ M forskolin and 10 μ M bpV[pic] (**A,C-K**). Unstimulated or stimulated cells were incubated with anti-Syncytin-2 (**B-K**) antibodies followed by the addition of an Alexa 568-conjugated anti-rabbit (or anti-goat) IgG antibody and analysed by confocal microscopy. Controls consisted of stimulated BeWo cells first incubated with the preimmune serum (**A**) or peptide-anti-Syncytin-2 antibody complex (**K**) before the addition of the secondary antibody. Confocal microscopy observations were made at 40X magnification (scale bars, 100 μ m).

3.3.10 Figures

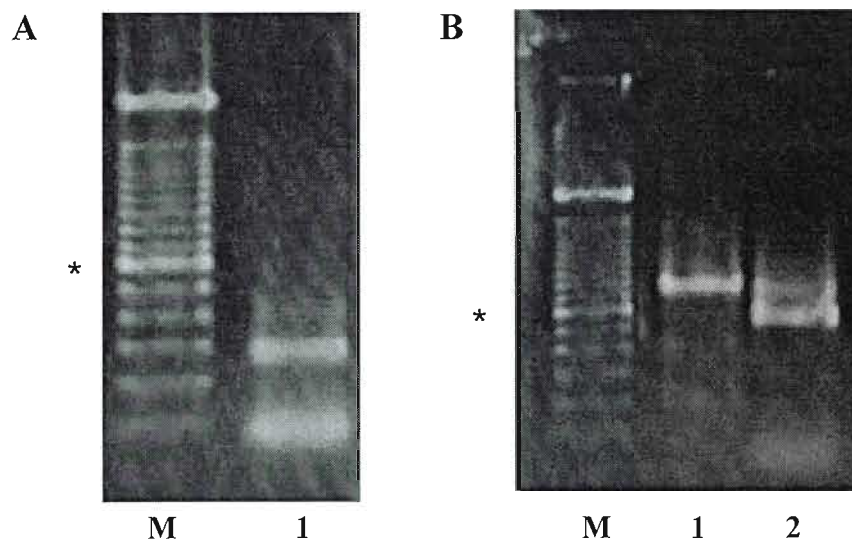


Figure 3.1

C

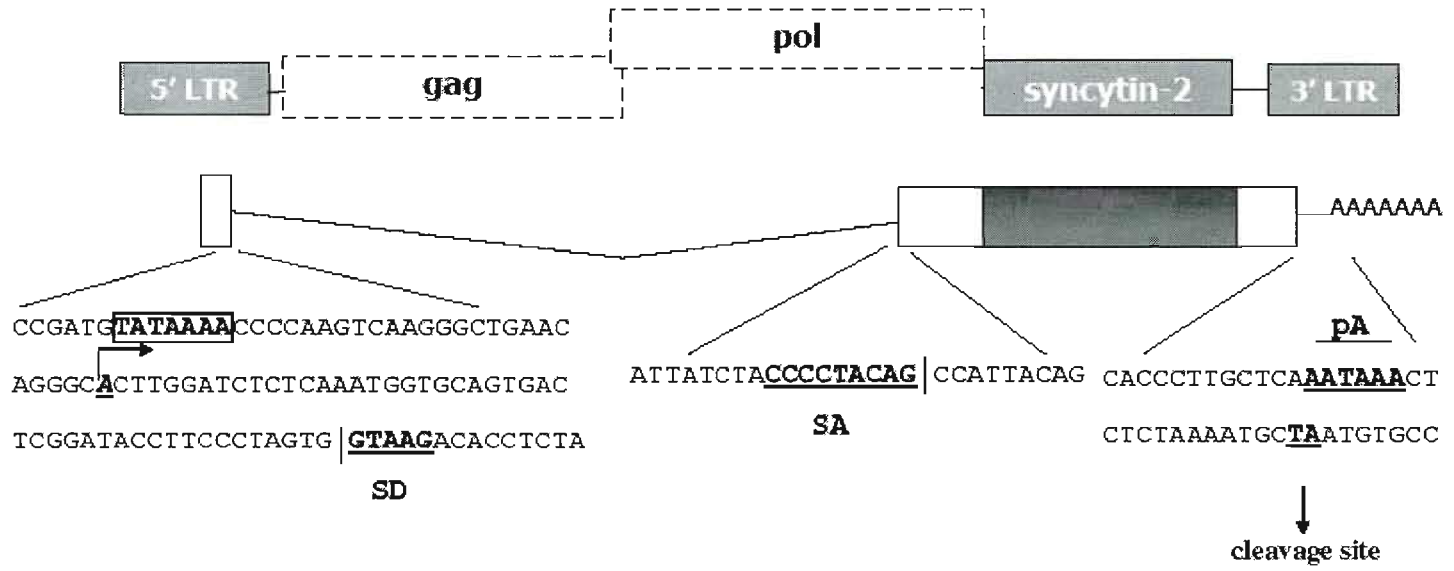


Figure 3.1

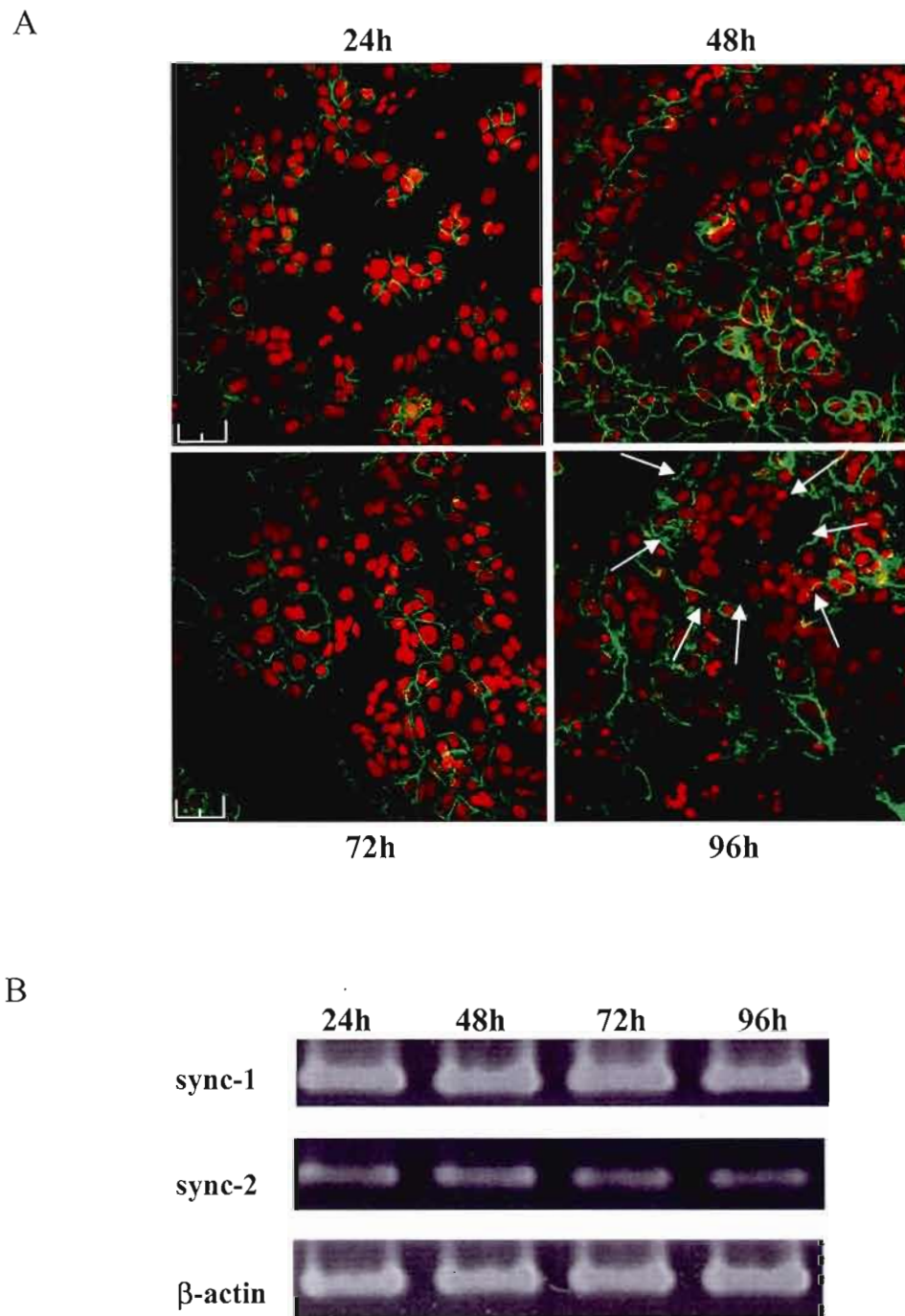


Figure 3.2

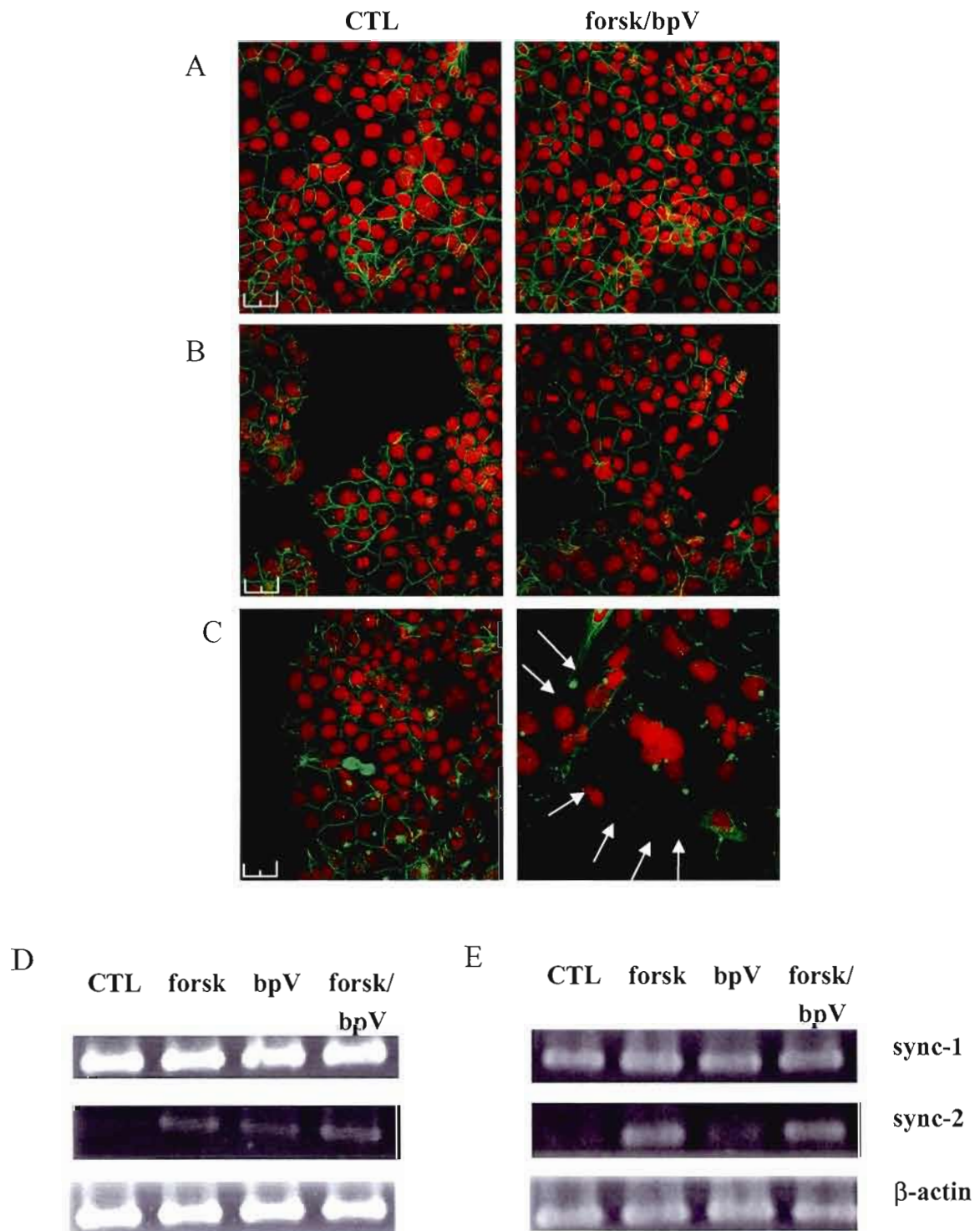


Figure 3.3

F

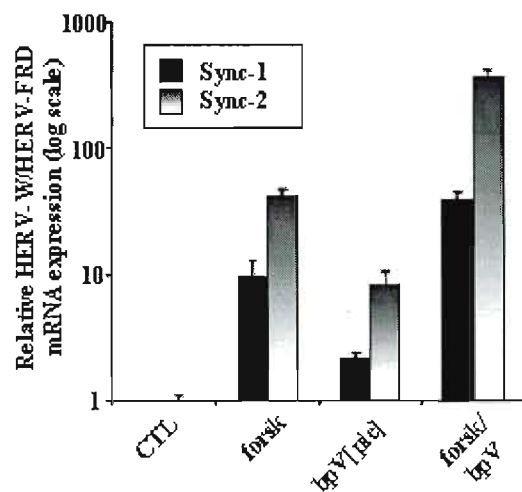
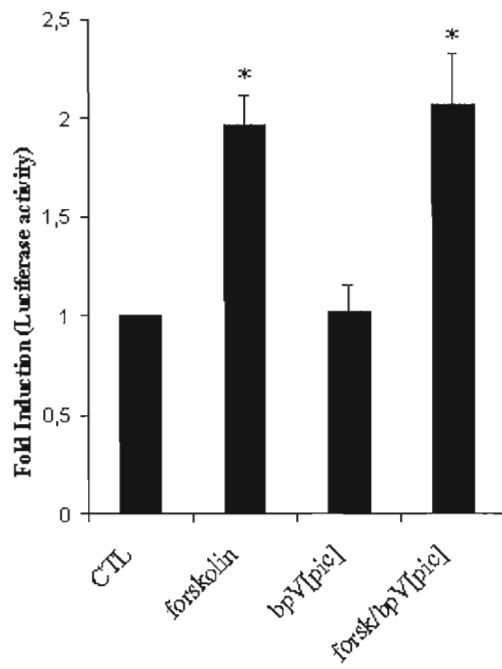


Figure 3.3

A



B

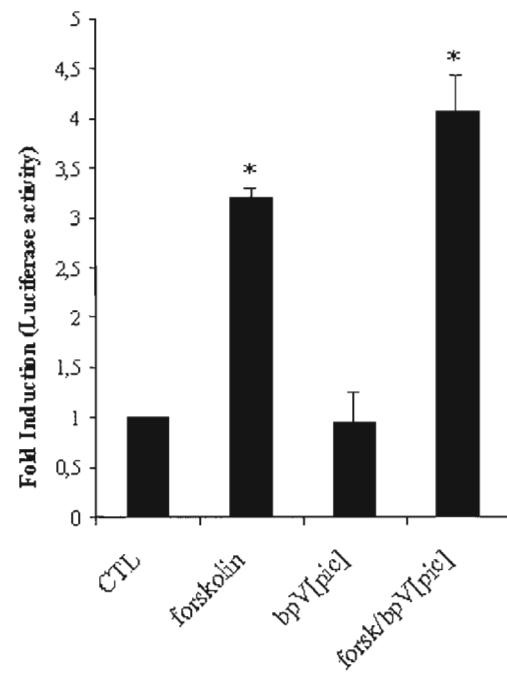


Figure 3.4

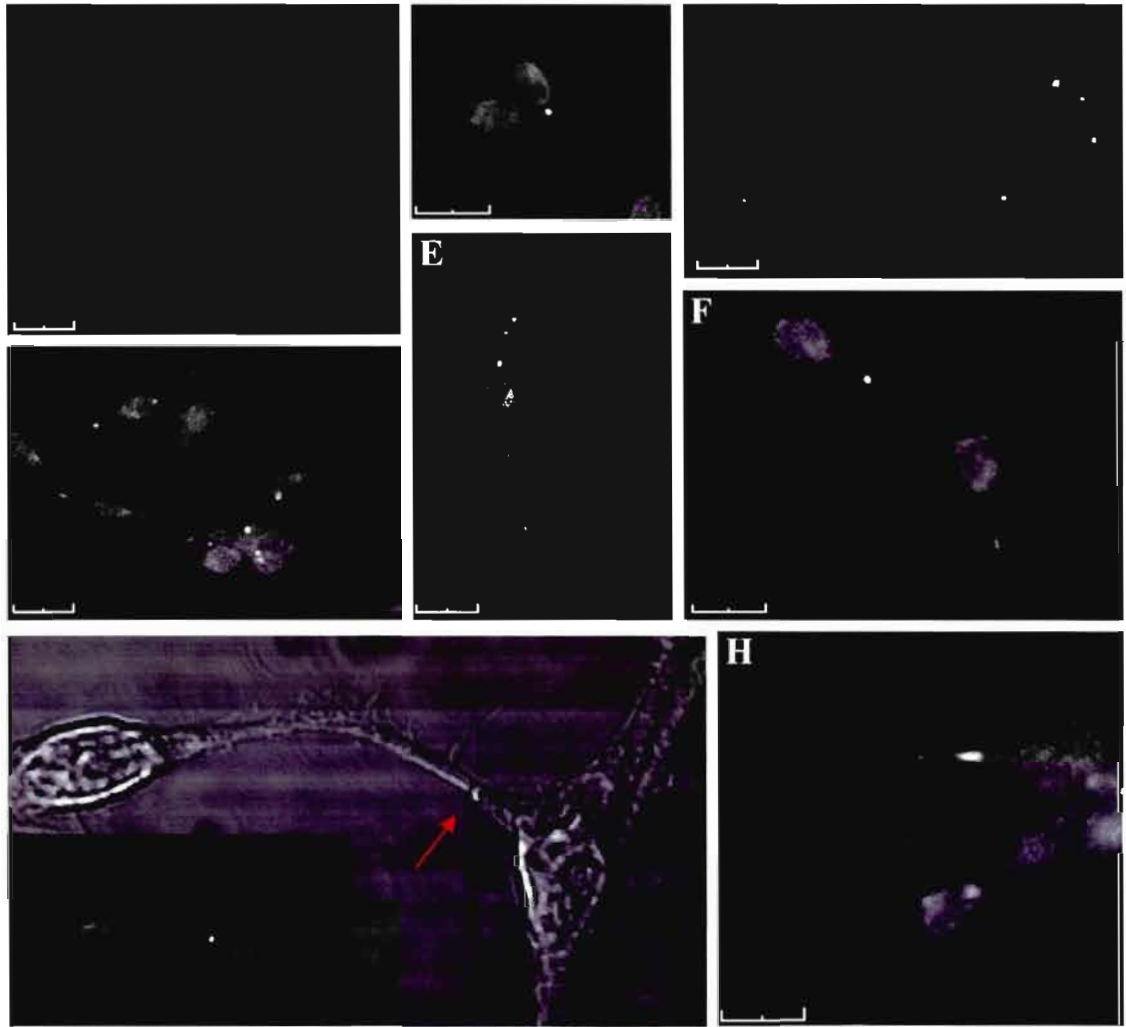


Figure 3.5

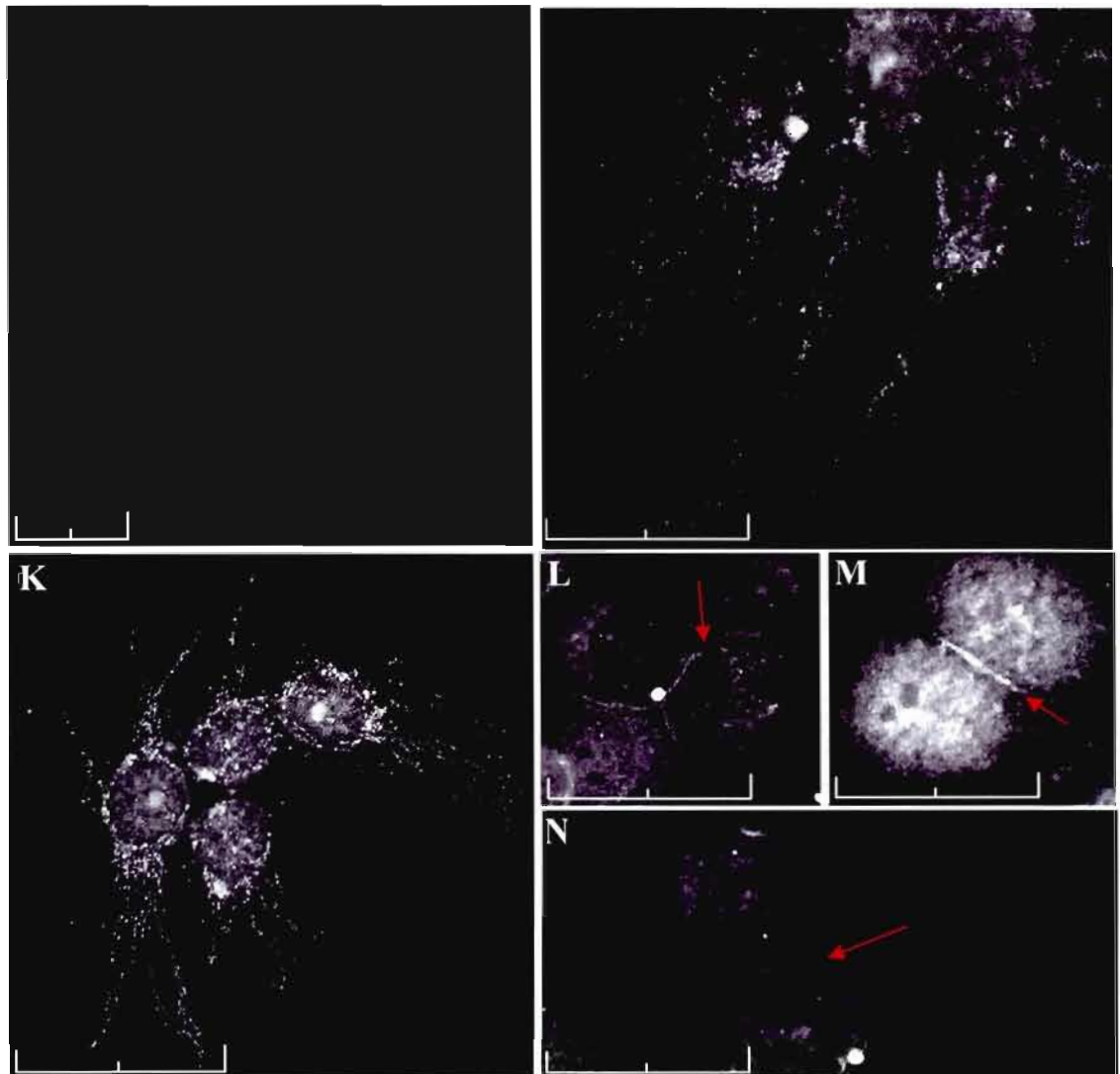


Figure 3.5

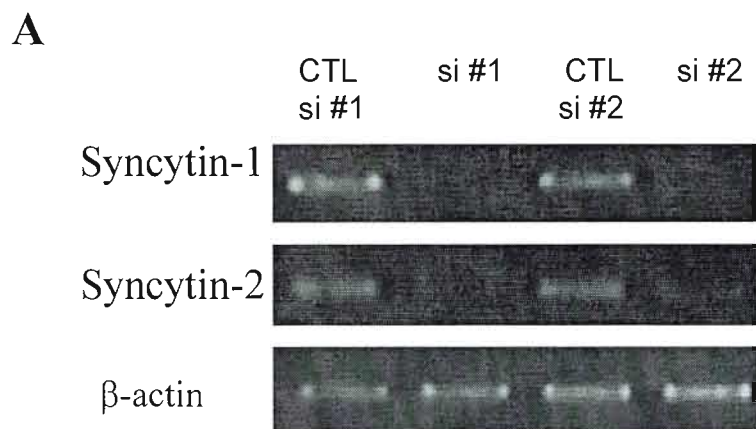
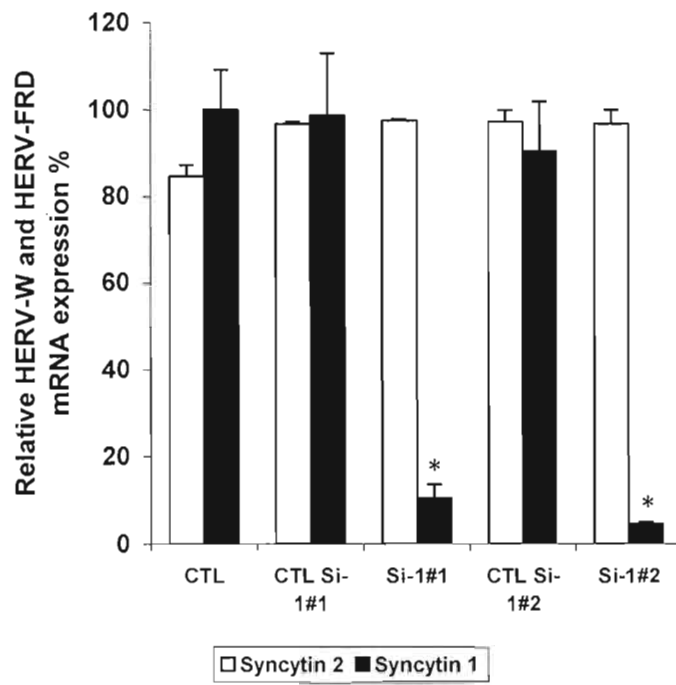


Figure 3.6

B



C

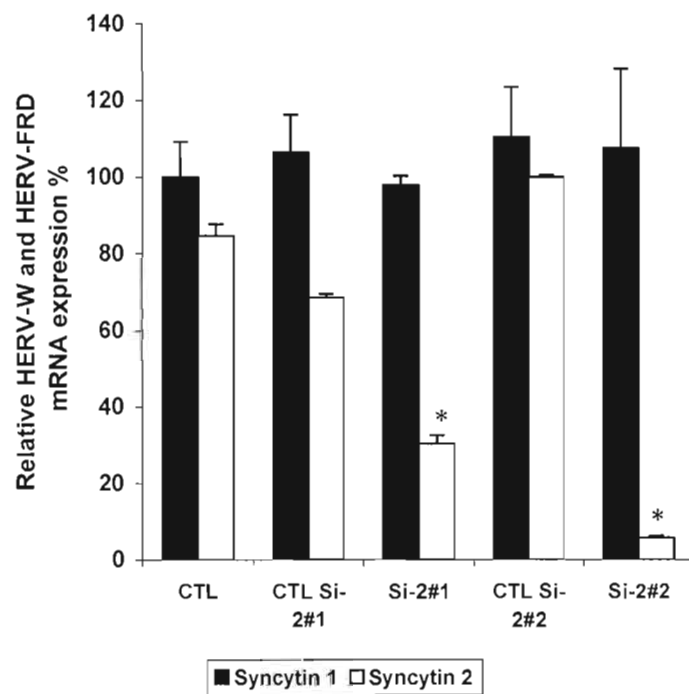


Figure 3.6

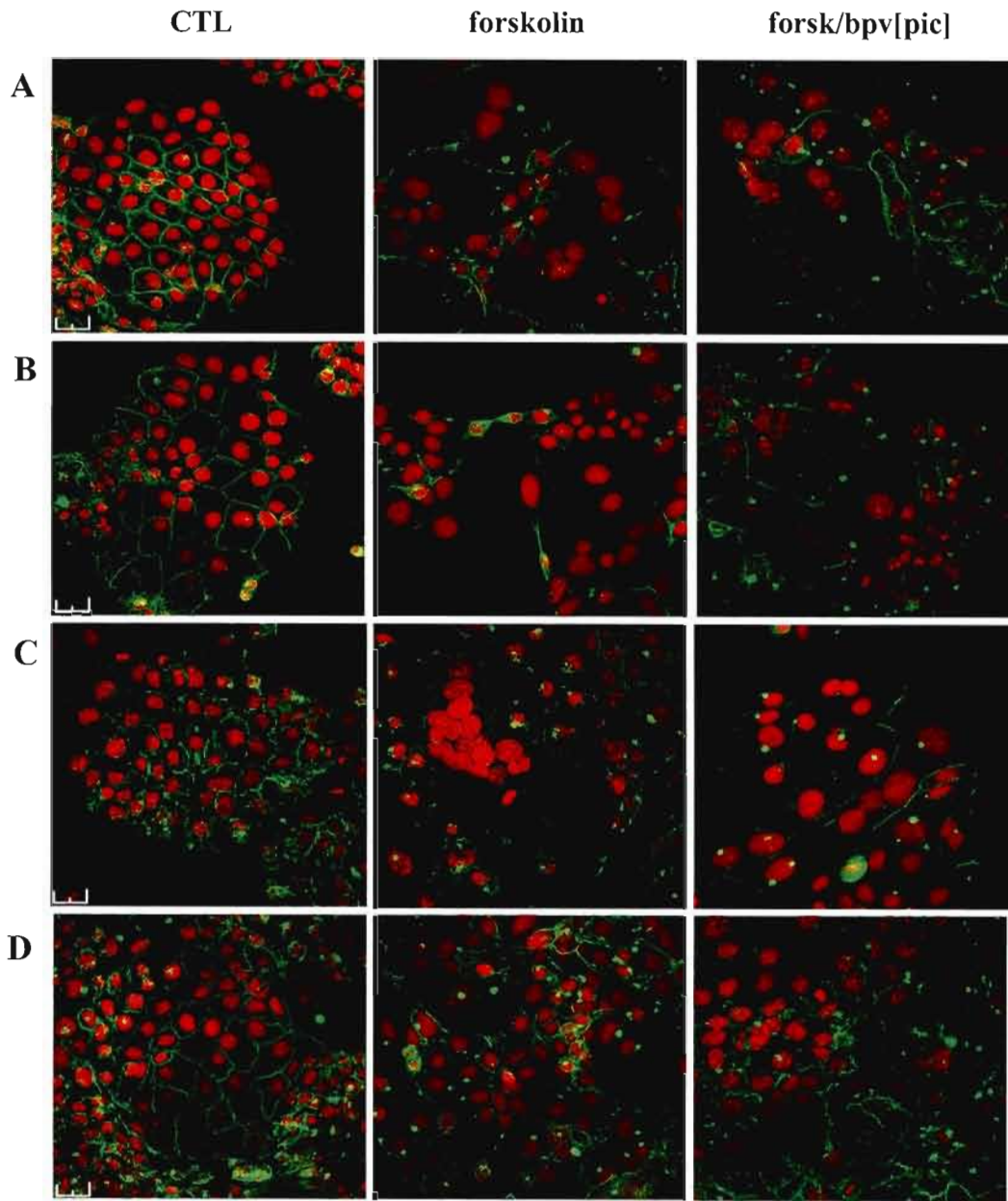
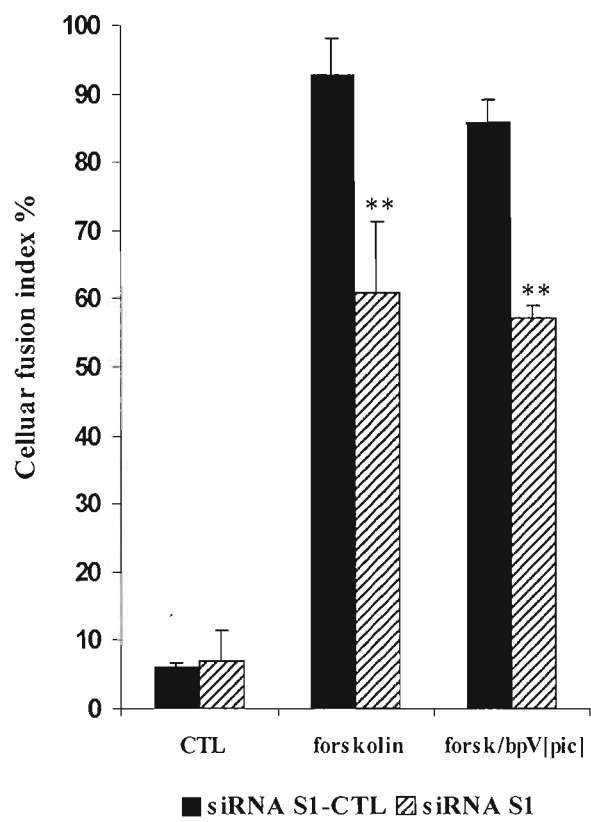


Figure 3.7

E



F

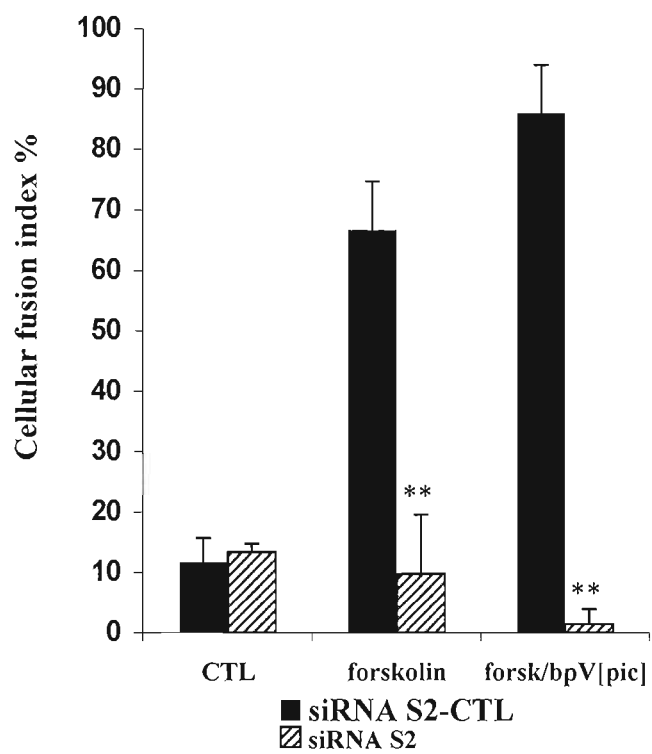
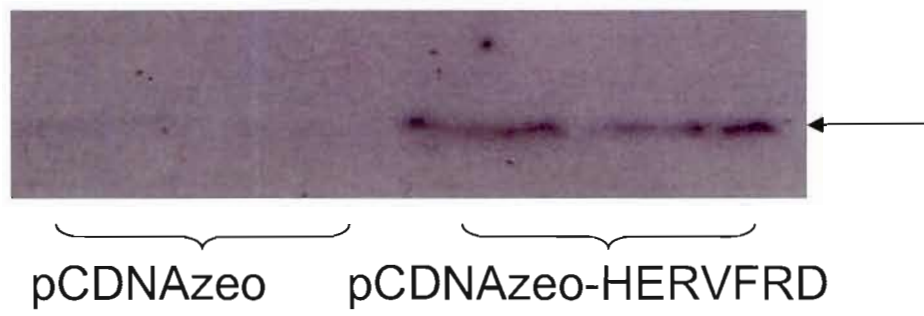


Figure 3.7

3.3.11 Supplementary material

A



B

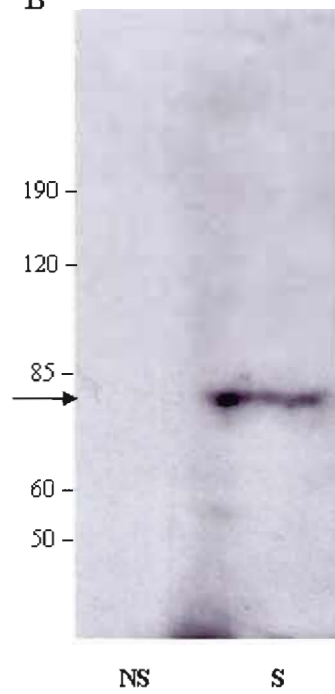


Figure 3.S1

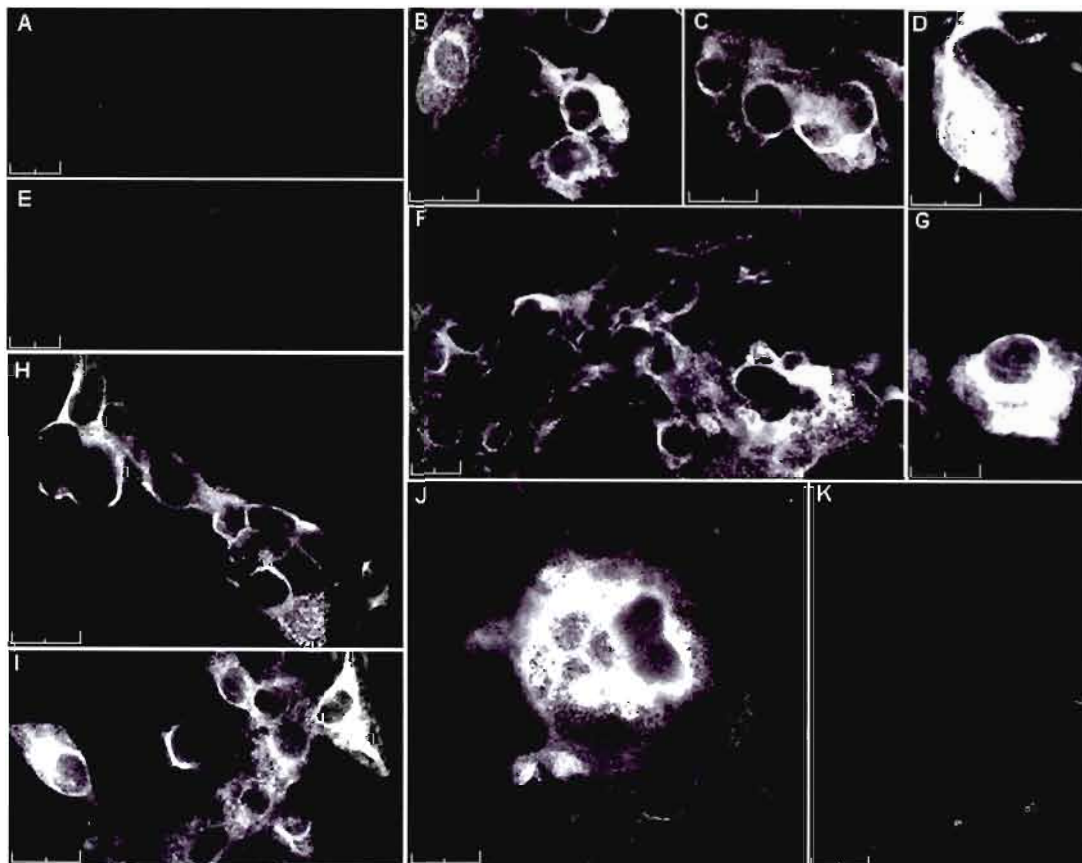


Figure 3.S2

CHAPITRE IV

DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AUX ARTICLES ET CONCLUSION

La présente étude a permis d'approfondir et de présenter des mécanismes possibles de régulation des gènes Syncytine-1 et Syncytine-2 ; la voie de l'AMPC et les PTPs étant largement mise en avant. Après avoir caractérisé les extrémités du transcrit Syncytine-2, l'expression des deux enveloppes rétrovirales a été étudiée dans la lignée BeWo et une modulation de la Syncytine-2 a été soulignée, notamment après l'ajout de l'agent bpV[pic], un inhibiteur des phosphotyrosines phosphatases. Cette modulation a de plus été confirmée par les expériences concernant les activités promotrices. Détectables toutes deux au sein des cellules primaires placentaires humaines et, localisées différemment dans les cellules BeWo stimulées, il semble indiscutable que la Syncytine-2 joue un rôle certain dans la fusion des trophoblastes humains.

4.1 Importance des tyrosines kinases et impact de l'activité des protéines tyrosines phosphatases dans les événements fusogéniques des trophoblastes humains et phénomènes de différenciation cellulaire

Comme attendu, l'agent bpV[pic] a induit des événements de fusion, ce qui amène à considérer l'implication des protéines tyrosines kinases dans la fusion des trophoblastes humains, comme il a déjà été suggéré précédemment (Daoud et al., 2006; Hamlin and Soares, 1995; Kamei et al., 1997; Rebut-Bonneton et al., 1993). De

récentes études ont démontré une activité spécifique phosphotyrosyl-phosphatase lors de la régulation de facteurs nucléaires activant les lymphocytes T (Fortin et al., 2001a), avec un effet positif sur la région LTR-5' du VIH-1. Cet effet impliquerait notamment le substrat SHP-1. Ces faits nous amènent à discuter du ou des substrats impliqués et ciblés par les phosphotyrosines phosphatases dans le cadre de la différenciation et surtout de la fusion cellulaire des trophoblastes humains. Aussi, précédemment il a été démontré que la phosphorylation de la tyrosine médiée par la P53/56lyn protéine kinase était régulée négativement par la présence de phosphotyrosine phosphatase (Kamei et al., 1997). Ainsi, afin de mieux comprendre ces phénomènes de fusion des trophoblastes, il devient important d'identifier ces acteurs impliqués et les voies de signalisation mises en jeu. La protéine kinase A et/ou le facteur de transcription GCM1 seraient-ils impliqués? Pour parvenir à répondre à ces interrogations et ainsi cibler les protéines mises en jeu, des expériences d'immunobuvardage de type *Western Blot* avec des immunoprécipitations pourraient être envisagées, afin de mettre en évidence l'état de phosphorylation de certaines protéines impliquées dans les cascades signalétiques modulées par les protéines tyrosines phosphatases (telles que des molécules adaptatives et différentes kinases comme la PKA ou encore RAP-1, RAS, RAF, ERK...) et autres acteurs potentiels. Il advient aussi intéressant de tester *in vitro* l'effet d'autres inhibiteurs de phosphotyrosines phosphatases tel que le sodium orthovanadate (Milward et al., 2006).

Les événements de fusion cellulaire des trophoblastes s'accompagnent de phénomènes de différenciation cellulaire. Il existe des marqueurs évidents de cette différenciation; il s'agit des hormones hCG et hPL dont les taux sont significativement augmentés pendant les événements de différenciation et de fusion cellulaire des cytotrophoblastes mis en culture (Daoud et al., 2006; Dodeur et al., 1990). Ces hormones jouent un rôle déterminant dans le maintien et le développement d'une grossesse. Des dosages de sécrétion des hormones hCG et hPL pourraient advenir intéressants afin de voir si l'induction de la fusion constatée lors des

expériences de fusion avec l'agent bpV[pic], s'accompagne bien d'une augmentation de la différenciation cellulaire. Des études préliminaires ont démontré que l'ajout d'une combinaison des agents forskoline et bpV[pic] avait, après 24 heures, pour effet d'induire considérablement une augmentation du taux de l'hormone hCG, dont la sécrétion est en corrélation avec la différenciation cellulaire et les événements de fusion (Daoud et al., 2006) (Annexe 1). En revanche, pour l'hormone hPL, les résultats de dosage n'ont pas été concluants, d'autant plus que cette hormone ne suit pas exactement le patron de la différenciation et de la fusion cellulaire (résultats non présentés). Cependant, les rôles de ces deux hormones pourraient expliquer ces résultats préliminaires. La hCG permet, entre autres, le maintien du corps jaune gestationnel en début de grossesse et stimule la différenciation du trophoblaste. Le rôle exact de la hPL, qui est sécrétée à des concentrations très élevées (de l'ordre du g/j, à terme), reste à déterminer (Alsat et al., 1997). Enfin, il ne faut pas omettre le fait que ces dosages ont été réalisés sur le modèle de choriocarcinome BeWo. Il deviendra intéressant par la suite de mesurer ces sécrétions au sein des cellules primaires trophoblastiques humaines mises en culture et stimulées avec ces agents.

4.2 Modulation de l'expression des différentes enveloppes, à court, moyen ou long terme par des agents inducteurs de la fusion cellulaire

Au sein de la lignée trophoblastique BeWo, les différentes enveloppes rétrovirales, Syncytine-1 et Syncytine-2, ont présenté des patrons d'expression différents. Les différents agents chimiques, utilisés comme inducteurs de la différenciation cellulaire, à savoir la forskoline et bpV[pic], ont su moduler l'expression certaine de l'une de ces enveloppes. En effet, l'ajout de la forskoline semble induire l'expression du gène Syncytine-2. Bien que le transcrit correspondant au gène Syncytine-1 soit fortement représenté, il apparaît que la Syncytine-2, soit elle réellement modulée par l'ajout de l'agent chimique concerné. En ce qui concerne

l'agent bpV[pic], son effet semble transitoire. Ce n'est qu'après 24 heures de stimulation qu'il paraît avoir atteint l'effet maximal recherché : l'enveloppe Syncytine-2 induite aussi par la forskoline est clairement détectable après une stimulation de 24 heures avec l'agent bpV[pic], contrairement à une stimulation de 48 heures où l'effet paraît s'estomper. Une des explications plausibles pourrait résider dans le fait que l'agent bpV[pic] n'induit pas, contrairement à la forskoline, une voie ou une cascade de signalisation, permettant ainsi une stimulation de longue durée. Cet agent agit différemment de la forskoline, n'affectant pas les mêmes éléments de la cascade signalétique. La forskoline agit directement sur l'enzyme « Adenylate cyclase » qui est au sommet de la voie de signalisation et ainsi maintient une activité élevée de celle-ci. Aussi, la nature et les propriétés du composé bpV[pic], lui confèrent une action peu ciblée. Cet inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase peut agir sur diverses voies de signalisation autres que celle de l'AMPC, et ainsi contrer sa propre action. Une ultime hypothèse réside dans le fait que cet agent, dès son entrée dans la cellule, perd une certaine activité. En effet l'agent testé lors de cette étude, bpV[pic], apparaît de par ces propriétés chimiques, peu stable. Lorsque le composé pénètre dans la cellule, les groupements peroxydes stabilisant le cœur vanadate sont réduits, conduisant à une forte diminution de la stabilité de la molécule. De ce fait, le groupement actif du complexe bpV[pic] s'en trouve lui aussi diminué et l'oxydation des sites actifs des phosphatases est affectée (Posner et al., 1994).

Finalement, la combinaison des deux agents, agissant en synergie, a pour effet de maintenir, voire d'accroître quelque peu cette voie. Cet effet additionnel peut résider dans le fait que ces deux agents peuvent agir à différents niveaux d'une même cascade signalétique, favorisant ainsi dans la même direction les effets de cette voie. L'enveloppe rétrovirale, Syncytine-2, a de ce fait été induite et peut apparaître alors comme étant un acteur potentiel intervenant dans la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. Enfin, concernant le gène codant pour la Syncytine-1, son expression ne paraît pas être modulée, tant au sein de la lignée BeWo que chez les cellules primaires placentaires humaines. Il est cependant

nécessaire de rappeler que ces résultats de RT-PCR sont qualitatifs. Par conséquent, il serait intéressant de confirmer, voir d'approfondir ces résultats par des tests quantitatifs comme cela pourrait l'être avec des expériences de « Real Time RT-PCR ». Aussi, il est important de noter qu'une absence de modulation d'expression de certaines enveloppes (dont la Syncytine-1), médiée par les différents agents, ne signifie pas que celles-ci ne jouent pas un rôle dans la syncytialisation. En effet, la modulation potentielle de leurs récepteurs devrait être prise en compte.

4.3 Activités promotrices des LTR-5'

D'autre part, et ce afin de mieux comprendre comment tous ces gènes, ou dans le cas présent les deux gènes Syncytine-1 et Syncytine-2, sont régulés au cours de la différenciation des trophoblastes, des expériences concernant la modulation de l'activité promotrice des LTR-5' respectifs ont été menées. Les résultats obtenus concernant les activités promotrices des deux LTR-5' des gènes Syncytine-1 et Syncytine-2, ont confirmé voire éclairé ceux obtenus concernant les expressions endogènes. Les deux promoteurs ainsi clonés semblent être tout deux modulables par un voire deux agents chimiques qui *in fine* permettent une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cette modulation de la régulation de ces deux gènes ne paraît pourtant pas équivalente dans les deux cas. Il apparaît clairement que l'action du ou des facteurs de transcription induits et mis en jeu, aurait plus d'impact sur le gène Syncytine-2, ce fait pouvant possiblement expliquer que l'induction du nombre de transcrit Syncytine-1 n'ait pu être aussi marquée que celle concernant la Syncytine-2. Les facteurs de transcription du gène Syncytine-2 sont encore aujourd'hui méconnus alors que les avancées concernant le promoteur du gène Syncytine-1 sont plus importantes. Ces éléments, répondant à une augmentation de l'AMPc intracellulaire, sont relativement connus concernant le promoteur du gène Syncytine-1 (Cheng et al., 2004). Contrairement à ce qu'on aurait pu prédire, aucun élément de réponse CRE

n'est présent dans la séquence promotrice, suggérant ainsi qu'une autre voie, différente de celle de l'AMPC impliquant la protéine CREB, pourrait être mise en jeu. Toutefois, la région promotrice du gène Syncytine-1 répondant à une stimulation de la voie de l'AMPC est aujourd'hui parfaitement connue et délimitée. Il apparaît en effet que l'élément clé est celui se liant à AP-1, située à 20 nucléotides de la boîte CAAT, proche du site d'initiation de la transcription (Cheng et al., 2004).

D'autres expériences concernant la modulation du LTR-5' du gène Syncytine-2 ont été menées. En effet, des mutants de délétions de la région LTR-5' ont été réalisés et ont mis en évidence l'importance de la région située entre -103 et -49, en amont du site d'initiation de la transcription (Annexe 2). Ainsi, à travers ces expériences de modulation de l'activité promotrice en 5', il advient possible de discriminer entre autres, les éléments de réponse aux agents de stimulation, notamment à la forskoline et bpV[*pic*] et, plus tardivement de déterminer la cascade signalétique mise en jeu. Aussi, il pourrait être envisagé des expériences similaires à celle réalisées précédemment mais où la protéine kinase A, C, ou des protéines kinases appartenant à la famille des Scr kinase telles que Fyn, Lyn ou Scr, seraient inhibées ou au contraire surexprimées. Il s'en suivrait des analyses RT-PCR afin de juger de l'état d'expression des protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2 ou encore des analyses de la modulation des LTR-5' de chaque gène.

4.4 Patron d'expression de nouvelles protéines d'enveloppe retrovirales

Au sein des cellules primaires trophoblastiques, et ce durant les quatre jours de différenciation, les enveloppes Syncytine-1 et Syncytine-2 se sont révélées être pleinement exprimées. Cependant, il existe d'autres gènes d'enveloppe appartenant à ces séquences d'origine rétrovirale, qui sont elles aussi exprimées dans les cellules primaires placentaires humaines. Il s'agit de EnvP(b) et EnvV. En effet, l'enveloppe

EnvP(b) dont le profil d'expression est apparu similaire à celui de la Syncytine-2 au sein de la lignée BeWo stimulée ou non (résultats non présentés), semble avoir un patron d'expression particulier (Annexe 3). Ce n'est qu'à partir du troisième jour de différenciation des cellules primaires trophoblastiques, que le transcrit est clairement détecté. Étonnamment, le profil inverse a été constaté concernant l'enveloppe EnvV (Annexe 3). Bien que cette dernière n'ait pu être révélée au sein de la lignée trophoblastique BeWo (résultats non présentés), faute de sensibilité de détection ou absence totale dans cette lignée, son expression a été clairement mise en évidence chez les cellules primaires placentaires. Alors que son expression paraît maximale durant les deux premiers jours, il n'en est pas de même pour les deux jours suivants où une diminution d'expression est notable. Ainsi, une corrélation entre les expressions de ces deux enveloppes, EnvP(b) et EnvV, pourrait s'établir. La protéine d'enveloppe non fusogénique EnvV pourrait moduler l'action fusogénique d'autres gènes ou enveloppes telles que EnvP(b) ou entrer en compétition avec le ou les récepteurs de liaison de certaines enveloppes rétrovirales impliquées dans la différenciation des cytotrophoblastes. Une ultime hypothèse serait que ce gène d'enveloppe EnvV soit réprimé et qu'inversement, d'autres gènes comme EnvP(b), soient eux induits à leur tour provoquant ainsi des phénomènes de fusion cellulaire.

Ainsi, ces enveloppes EnvP(b) et EnvV, pourraient s'avérer importantes et impliquées dans la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. En d'autres termes, il n'en est pas moins qu'un rôle plausible leur serait conféré au cours des événements de fusion des trophoblastes. Des expériences d'ARN interférence telles que celles réalisées pour la Syncytine-1 et la Syncytine-2 pourraient s'avérer pertinentes quant à la confirmation que la présence de toutes ou certaines de ces enveloppes, notamment EnvP(b) et EnvV sont requises lors de la fusion des cytotrophoblastes humains, un événement crucial intervenant au cours de la placentation.

Préalablement, et ce à l'aide d'expérience de 5' et 3' RACE, les extrémités des transcrits des gènes EnvP(b) et EnvV doivent être caractérisées. Le transcrit du gène

EnvP(b) a déjà été caractérisé (Annexe 4). Ainsi, on connaît le site d'initiation de la transcription, précédé d'une boîte GATA et d'un site CRE, les sites d'épissage, le site de liaison utilisé par l'ARN de transfert (PBS), le signal de polyadénylation et, le site de clivage et d'ajout de la queue polyA. Aussi, il devient notamment possible de discriminer la région LTR-5' de ce gène permettant de réaliser des études de caractérisation des activités promotrices, similaires à celle conduites préalablement pour les gènes Syncytine-1 et Syncytine-2. De plus, advenant que cette protéine ait un rôle potentiel dans la fusion des trophoblastes, et dans l'optique de valider cette hypothèse, il deviendra alors intéressant, après production d'anticorps, de réaliser des expériences de microscopie confocale et de cytométrie en flux.

4.5 Expression des protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2 dans les lignées JEG-3 et Jar

Il est important de rappeler que les lignées JEG-3 et Jar ne semblent pas posséder un caractère fusogénique. En effet, en culture et ce après stimulation à l'aide des agents forskoline et bpV[pic], aucun phénomène de fusion n'a été mis en évidence. Cependant, des analyses RT-PCR conduites dans ces lignées stimulées ou non, ont démontré que les enveloppes Syncytine-1 et Syncytine-2 étaient exprimées (résultats non présentés). Des expériences de complémentation à l'aide de vecteur d'expression renfermant l'ADN complémentaire de la région codante de ces enveloppes rétrovirales pourraient être conduites. En effet, la surexpression de ces enveloppes pourrait amener à une induction d'événements fusogéniques. Ces faits appuieraient l'hypothèse qu'au sein de ces lignées non fusogéniques JEG-3 et Jar, une ou plusieurs mutations dans la partie codante des gènes affectent la ou les protéines d'enveloppes fusogéniques Syncytine-1 et Syncytine-2. Ainsi, la fonction de ces dernières serait déviée voir inhibée. Cette hypothèse est toutefois à interpréter avec précaution. En effet, de nombreuses autres altérations de la cellule pourraient expliquer le caractère non fusogénique des ces lignées. Il se pourrait que les

récepteurs respectifs des ces deux protéines d'enveloppe ne soient pas exprimés ou encore soient mal localisés. Afin de juger de la crédibilité des hypothèses avancées, des analyses de séquences issues de l'ARNm des protéines d'enveloppe et des récepteurs respectifs ainsi que des expériences en microscopie confocale ou électronique pourraient être envisagées.

4.6 Effet de l'inhibition des protéines d'enveloppe sur l'état de la fusion cellulaire

Les expériences de fusion menées en présence des siRNA et au sein des cellules appartenant à la lignée fusogénique BeWo ont démontré un rôle certain de la protéine d'enveloppe Syncytine-2 dans les événements de fusion cellulaire. Bien que les résultats obtenus dans cette lignée cellulaire aient été concluants, il n'en est pas moins que ces cellules appartiennent à une lignée transformée. Ainsi, les effets inhibitoires pourraient s'avérer être quelque peu différents de ce qui, chez les cellules placentaires humaines, pourraient l'être. Ainsi, il devient important d'étendre les résultats obtenus au sein de cellules primaires placentaires humaines. Toutefois, le caractère fusogénique spontané des trophoblastes primaires conduit à une certaine difficulté de transfection. De ce fait, et ce afin de parer à cet obstacle, d'autres moyens pourraient être mis en œuvre tels que des blocages à l'aide d'anticorps spécifiques anti-Syncytine-1 et anti-Syncytine-2 ou encore *via* des protéines de fusion couplées à la GST (Glutathion-S-Transferase). Citons aussi, des blocages de leurs récepteurs respectifs, notamment après avoir identifié celui interagissant avec la Syncytine-2. Néanmoins, des essais de transfection seront tout de même tentés entre autres, faisant notamment appel à des approches plus nouvelles telles que la nucléotransfection (à l'aide du Nuclofactor) ou encore la microporation.

4.7 Système de quantification de la fusion cellulaire

Pour quantifier et juger de l'état de la fusion cellulaire, notamment lors des expériences avec les siRNA, il a été utilisé un moyen semi-quantitatif. Cependant, le laboratoire se propose de mettre au point un système de quantification plus objectif et faisant intervenir une unité de mesure : l'Unité de Lumière Relative (ULR). En effet, plusieurs lignées BeWo stables ont été dérivées. Une population transfectée de façon stable avec un vecteur renfermant la séquence codant pour la protéine Tat et, une autre où le vecteur concerné et transfecté renfermait un fragment contenant le LTR et sa région TAR (reconnue spécifiquement par Tat) du VIH-1 en amont du gène codant pour la luciférase. Il a été démontré dans la littérature que la protéine Tat transactive le LTR du VIH-1 ce qui permet la transcription des gènes situés en aval de ce promoteur (Lotz et al., 1994; Meynard et al., 1992). Ainsi, les deux populations mises en co-culture, stimulées notamment avec l'agent, forskoline et ainsi fusionnant après un délai accordé, conduisent à une augmentation de la luciférase détectable par le système de dosage de l'activité luciférase communément utilisé. La protéine Tat du VIH ainsi synthétisée, transactive le LTR-5' du VIH-1, permettant ainsi la transcription du gène luciférase. Les premiers essais ont ainsi révélé une URL significativement différente lorsque les deux populations sont mises en co-culture et stimulées, en comparaison avec l'expérience où seule la population transfectée stablement avec le vecteur pLTRxluc et stimulée est présente, ainsi que celle mettant en jeu les deux types de population mais en absence de stimulation (Annexe 5). Ainsi, ce système nécessitant une optimisation pourrait demeurer un moyen de quantification fiable et rapide.

4.8 Localisation cellulaire des protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2

Des expériences de microscopie confocale ont été réalisées afin de localiser les protéines d'enveloppe Syncytine-1 et Syncytine-2, précédant, pendant et suivant le phénomène de fusion cellulaire. La Syncytine-1 pourrait être un facteur important dans le rapprochement de deux ou plusieurs cellules. En se déplaçant le long d'un filopode, cette protéine semble être amenée vers une zone ciblée et ainsi être un élément clé dans le rapprochement cellule/cellule. En revanche la Syncytine-2, qui ne paraît pas être détectable au sein des cellules non stimulées, semble être exprimée à la suite d'une stimulation et ainsi pourrait traverser le réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi et enfin être transportée à l'intérieur de vésicules suivant les microtubules jusqu'à atteindre la membrane cellulaire. Elle semble de plus, s'organiser sous la forme d'un réseau membranaire. Ainsi, pour la Syncytine-2 qui semble être inductible, sa détection membranaire lui confère un rôle fusogénique plus important et elle semble intervenir plus tardivement dans ces événements de fusion que la Syncytine-1, initialement fortement exprimée, qui elle paraît avoir un rôle plus précoce, à savoir dans le rapprochement et le contact cellulaire. Des expériences de microscopie confocale à partir de cellules vivantes, notamment conduites au sein des cellules trophoblastiques humaines, pourraient être envisagées afin de localiser avec précision ces protéines d'enveloppe tout au long des phénomènes de différenciation et de fusion cellulaire. Il deviendra alors également possible de réaliser des expériences de co-localisation avec les filaments d'actine, pour ainsi vérifier que la Syncytine-1 se déplace le long d'un filopode. Le modèle de la synapse virologique, établi pour le rétrovirus HTLV-1 pourrait s'appliquer ici (Davis et al., 2003; Igakura et al., 2003) une multimérisation, une polarisation du cytosquelette et une redistribution de protéines telles que la Syncytine-1 vers un point de contact, pourrait avoir lieu pendant ces événements de fusion cellulaire.

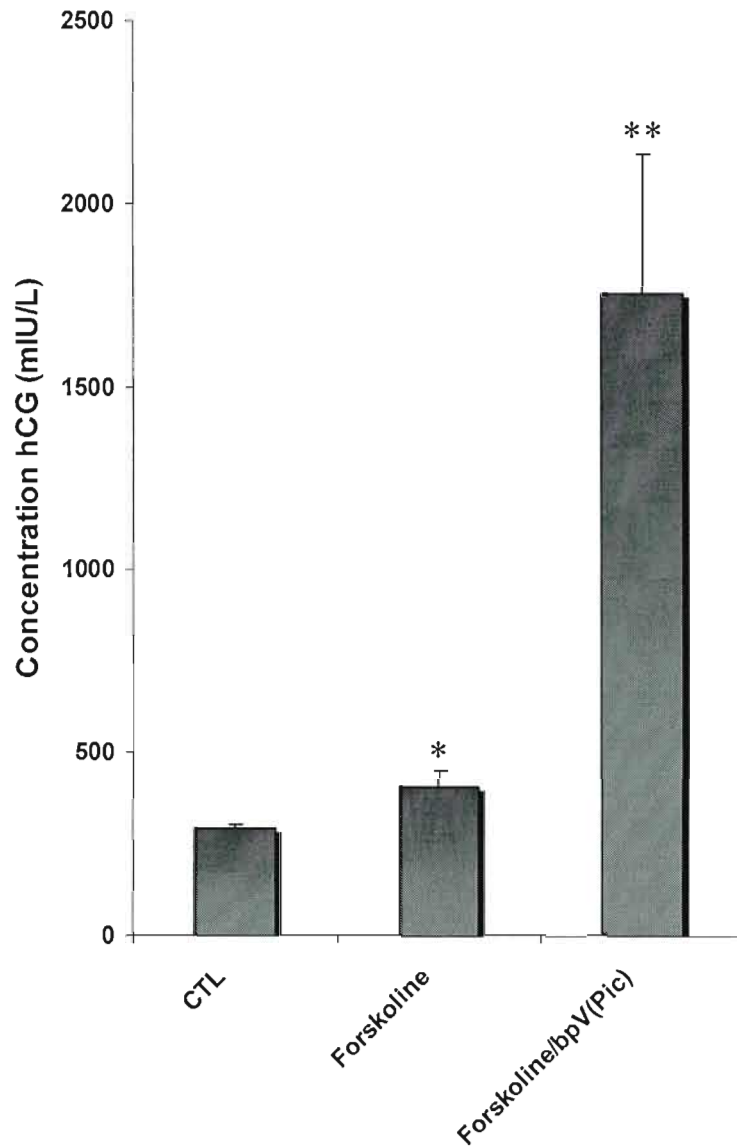
4.9 Conclusion

Rappelons dans un premier temps que la majorité des résultats et conclusions émis s'appuient sur le modèle de choriocarcinome BeWo. La Syncytine-2, suggérée tout d'abord comme potentiellement impliquée dans la fusion des trophoblastes, apparaît alors comme l'une des actrices déterminantes dans ces événements fusogéniques. Cependant, le fait que la Syncytine-1 soit impliquée dans ces événements fusogéniques n'est en aucun cas remis en cause dans cette étude. Seul le fait que son implication pourrait être concurrencée ou améliorée par d'autres protéines d'enveloppe telles que la Syncytine-2 est mis en avant. Son implication synergiste avec la Syncytine-2 est l'un des points véritablement avancé ici. L'un des aspects appuyant cette hypothèse d'alliance réside dans le fait que la Syncytine-2 est exprimée seulement dans le placenta, ce qui pourrait lui conférer un rôle spécifique et ciblé, possiblement plus important que celui de la Syncytine-1 se retrouvant dans de nombreux autres tissus. Ainsi, ces gènes captifs, d'origine rétrovirale, la Syncytine-1 et la Syncytine-2, semblent intervenir dans la biologie placentaire humaine, à savoir dans la syncytialisation des cytotrophoblastes humains.

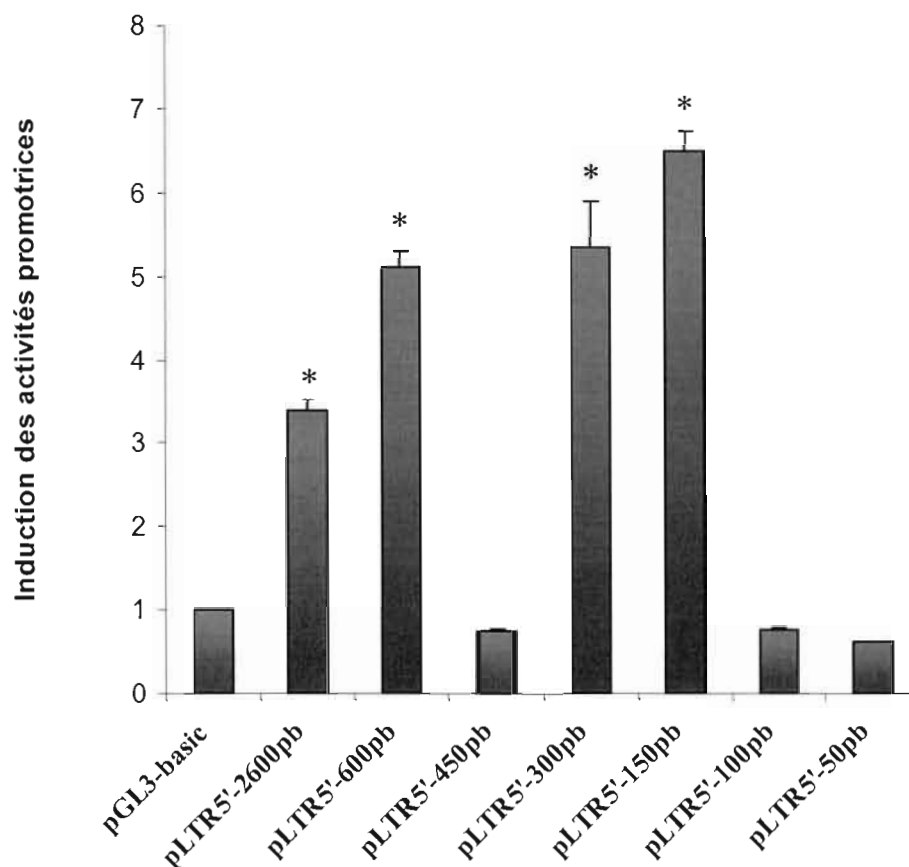
L'étude de l'ensemble de ces gènes d'enveloppe est devenue importante afin de mieux comprendre le développement du placenta et les pathologies liées à un dysfonctionnement de ce dernier. Il est de plus nécessaire de ne pas omettre le fait que certaines autres enveloppes d'HERVs, telles que EnvP(b) et EnvV, pourraient y trouver leur place et ainsi avoir une implication dans la syncytialisation et donc dans la fusion des cytotrophoblastes. Cette intervention d'ordre synergique ou encore compétitive, pourrait mettre en jeu des cascades signalétiques complexes qu'il serait important d'élucider. D'autre part, dans le contexte physiologique exact, à savoir la formation du placenta, des villosités et microvillosités, différents types de fusion cellulaire peuvent intervenir à différents instants et étapes précis. Ainsi, toutes ces

différentes protéines d'enveloppe appartenant à des séquences de rétrovirus endogènes, pourraient à différents temps donnés intervenir dans différents événements fusogéniques des trophoblastes et ainsi à différents stades bien distincts de la placentation. En effet, nous sommes finalement tous amenés à nous demander pourquoi autant de protéines d'enveloppe d'origine rétrovirale sont exprimées dans le placenta. Leur intervention de concert et/ou rythmée et/ou séquentielle pourrait assurer une efficacité de fusion cellulaire des trophoblastes humains, une certaine flexibilité en fonction du contexte précis, de la complexité et des différents états du phénomène de fusion. La placentation est un élément clé de la reproduction chez les mammifères. De ce fait, elle nécessite d'être parfaitement régulée tout comme l'une de ces étapes cruciales, à savoir la fusion des trophoblastes se devant d'être précisément contrôlée.

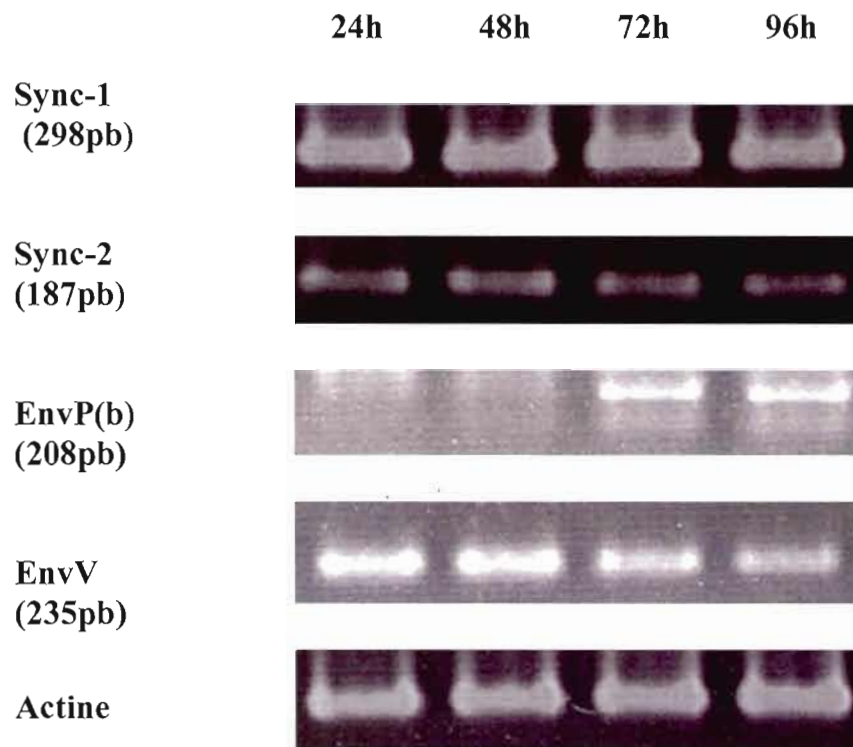
ANNEXES



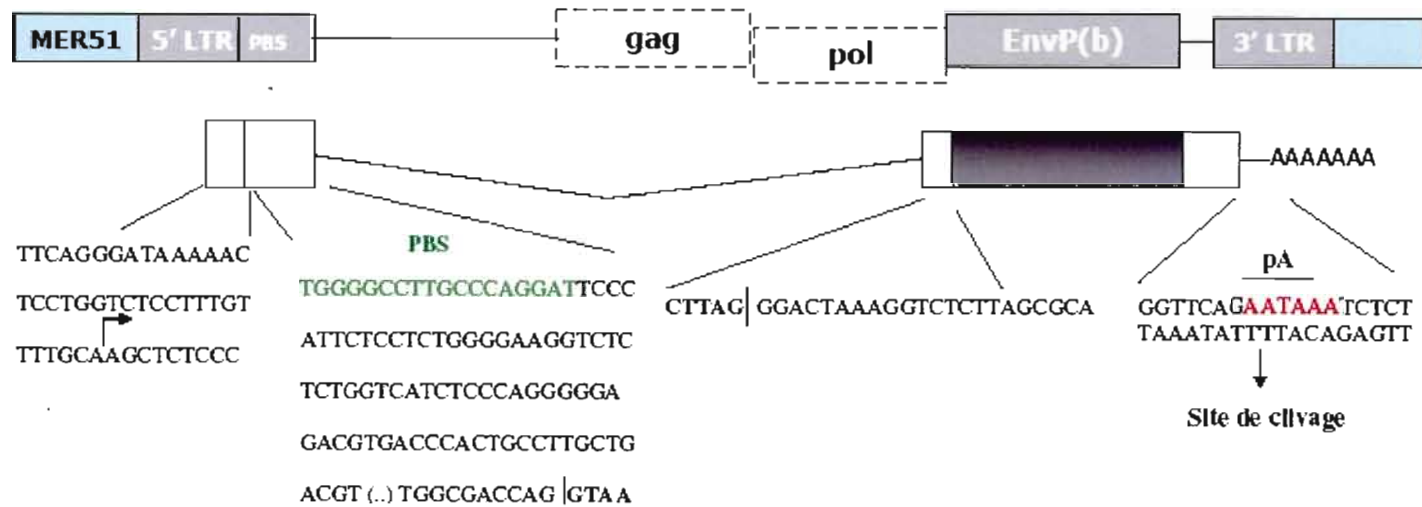
Annexe 1. Sécrétion de la hCG dans des différentes conditions de culture des cellules BeWo. 24 heures après la mise en culture, les cellules sont stimulées ou non avec les agents forskoline (50 μM) ainsi qu'avec une combinaison des agents forskoline/bpV[pic] (respectivement 100 μM et 10 μM). Les résultats sont exprimés en mIU de la hCG par litre de surnageant (moyenne \pm Écart Type, $n = 2$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (comparaisons avec le contrôle CTL).



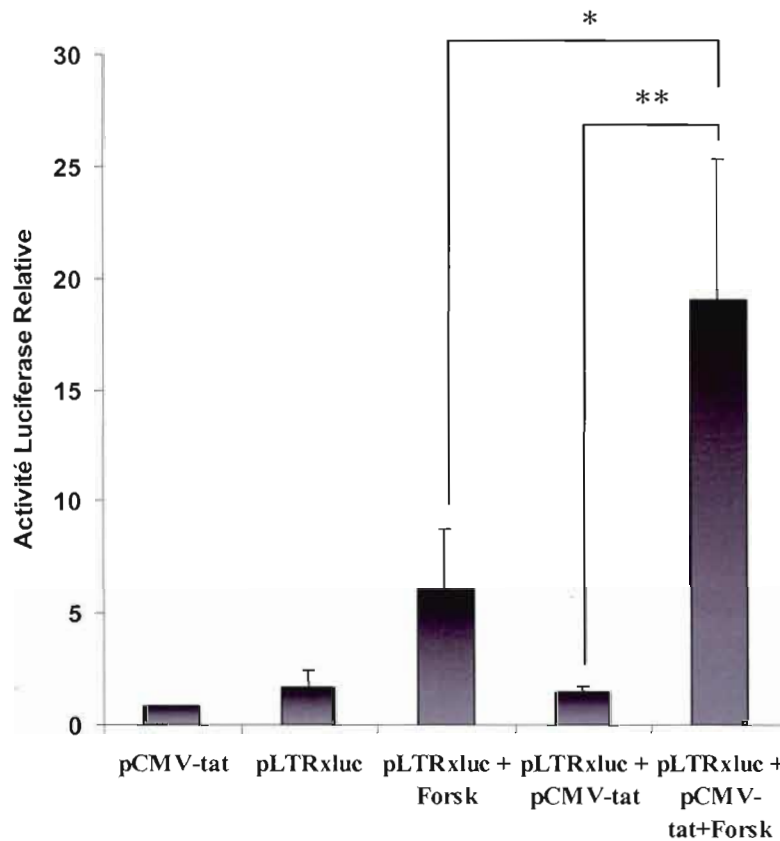
Annexe 2. Induction des activités promotrices de régions LTR-5' du gène Syncytine-2 dans les cellules BeWo stimulées. Les transfections ont été réalisées grâce au produit de transfection FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Les cellules ont été ensemencées à 150 000 cellules par puits dans des plaques de 24 puits, une journée avant la transfection. Les cellules ont été co-transfectées avec 100 ng de chaque vecteur pGL3-Syncytine-2prom ou pGL3-Basic, et 100 ng du vecteur pRc-actine-LacZ (Normalisation). 48 heures post-transfection, les cellules ont été stimulées durant 12 heures, avec une combinaison des agents forskoline/bpV[pic] (respectivement à une concentration de 50 μM et 10 μM). Après avoir lysé les cellules, les activités luciférases ont été mesurées à l'aide d'un luminomètre à plaques MLX Microtiter (Dynex Technologies, Chantilly, VA). Les valeurs obtenues représentent les moyennes d'une expérience réalisée en triplicata, et ont été normalisées par les mesures de la β -galactosidase. Les résultats sont exprimés selon le rapport \bar{x} (pLTR5'-xpb) / \bar{x} (pGL3-basic) (moyenne \pm Écart Type, $n = 3$), après normalisation. * $P < 0.05$ (comparaisons avec le contrôle pGL3-Basic).



Annexe 3. : Expressions endogènes des enveloppes d'origine rétrovirale Syncytine-1, Syncytine-2, EnvP(b) et EnvV (versus Actine) dans les cellules primaires placentaires, mises en culture durant 24 à 96 heures. Les analyses RT-PCR ont été réalisées sur les extraits d'ARN totaux après un traitement DNase, tel que décrit à la section 3.2.3. intitulée « RT-PCR analysis »



Annexe 4. Caractérisation du transcrit *EnvP(b)* par 5'/3' RACE. L'ARN total extrait des cellules BeWo stimulées avec l'agent forskoline a été analysé par les techniques de 5'RACE et 3'RACE à l'aide du Kit RLM-RACE, tel que décrit dans le chapitre 3.2.3.2. intitulé « RT-PCR and 5'/3' RACE analysis », utilisant des amorces spécifiques au gène Syncytine-2. Les deux types d'amplicons correspondant aux deux extrémités du transcrit ont été clonés dans le vecteur pCDNA 3.1 puis séquencés. La position du site d'initiation de la transcription, le site de liaison utilisé par l'ARN de transfert (PBS), le site d'épissage, le signal de polyadénylation, le site de clivage et d'ajout de la queue polyA, sont ainsi représentés. La présence des séquences potentielles *gag* et *pol*, d'une séquence répétée appartenant à la famille MER51, ainsi que les deux régions LTRs (5' et 3') y figurent également.



Annexe 5. Transactivation du LTR5' du VIH-1 par la protéine Tat dans un système quantitatif de fusion. Les cellules BeWo ont été transfectées de façon stable avec soit le vecteur pLTRxluc ou pCMV-Tat, et co-transfectées avec le vecteur de sélection pH β -APr-neo. Les transfections ont été réalisées grâce au produit de transfection FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Les cellules ont étéensemencées à 150 000 cellules par puits dans des plaques une journée avant la transfection. Les cellules ont été transfectées avec 100 ng de chaque vecteur. Afin de conserver les cellules ayant incorporé l'un des deux vecteurs, les cellules sont maintenues et sélectionnées dans un milieu contenant 400 μ g/ml de généticine (G418) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). Après sélection, et ainsi dès lors que les transfections stables ont été réalisées, les deux différentes populations de cellules sont mises en co-culture et stimulées durant 24 heures avec l'agent chimique forskoline à une concentration de 50 μ M. Des contrôles en absence de stimulation ainsi qu'avec seulement l'une des deux populations stimulée ou non, ont été réalisés. Après avoir lysé les cellules, les activités luciférase ont été mesurées à l'aide d'un luminomètre à plaques MLX Microtiter (Dynex Technologies, Chantilly, VA). Les valeurs obtenues représentent les moyennes d'une expérience réalisée en quadruplicata. Les résultats sont exprimés en RLU (moyenne \pm Écart Type, n =4). *P < 0.05 et **P < 0.01 (comparaisons avec les contrôle pLTRxluc stimulées et pLTRxluc +pCMV-tat).

RÉFÉRENCES

- Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C. and Pijnenborg, R.** (2006). Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* **21**, 193-201.
- Alsat, E., Guibourdenche, J., Luton, D., Frankenne, F. and Evain-Brion, D.** (1997). Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* **177**, 1526-34.
- Antony, J. M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D. A., Mallet, F., Yong, V. W., Wallace, J. L., Deacon, R. M., Warren, K. and Power, C.** (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* **7**, 1088-95.
- Armbruster, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K. and Mueller-Lantzsch, N.** (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* **8**, 1800-7.
- Baczyk, D., Satkunaratnam, A., Nait-Oumesmar, B., Huppertz, B., Cross, J. C. and Kingdom, J. C.** (2004). Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta* **25**, 553-9.
- Bannert, N. and Kurth, R.** (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**, 14572-9.
- Barbeau, B., Bernier, R., Dumais, N., Briand, G., Olivier, M., Faure, R., Posner, B. I. and Tremblay, M. J.** (1997). Activation of HIV-1 long terminal repeat transcription and virus replication via NF- κ B-dependent and -independent pathways by potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors, the peroxovanadium compounds. *J. Biol. Chem.* **272**, 12968-12977.
- Belkacemi, L., Gariépy, G., Mounier, C., Simoneau, L. and Lafond, J.** (2003). Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta. *Biol Reprod* **68**, 1943-50.
- Benirschke, K. and Kaufmann, P.** (2000). In *Pathology of the human placenta*, (ed. S. Verlag). New York.
- Benit, L., Dessen, P. and Heidmann, T.** (2001). Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol* **75**, 11709-19.
- Benveniste, R. and Scommegna, A.** (1981). Human chorionic gonadotrophin (HCG) and free alpha subunit secreted by cultured human choriocarcinoma (JEG-3) cells. *Placenta Suppl* **3**, 241-50.
- Bergemann, C., Reimer, T., Muller, H., Hosel, A., Briese, V., Friese, K. and Jeschke, U.** (2003). Stimulation of hCG protein and mRNA levels in trophoblast tumour cells Jeg3 and BeWo by glycodelin A. *Anticancer Res* **23**, 1107-13.

Bernatchez, R., Belkacemi, L., Rassart, E., Daoud, G., Simoneau, L. and Lafond, J. (2003). Differential expression of membrane and soluble adenylyl cyclase isoforms in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblasts of human placenta. *Placenta* **24**, 648-57.

Billington, W. D. (1971). Biology of the trophoblast. *Adv Reprod Physiol* **5**, 27-66.

Bjerregaard, B., Holck, S., Christensen, I. J. and Larsson, L. I. (2006). Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1906-11.

Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L. and Heidmann, T. (2003). Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin-2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13013-8.

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

Blaise, S., Ruggieri, A., Dewannieux, M., Cosset, F. L. and Heidmann, T. (2004). Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *J Virol* **78**, 1050-4.

Blond, J. L., Beseme, F., Duret, L., Bouton, O., Bedin, F., Perron, H., Mandrand, B. and Mallet, F. (1999a). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* **73**, 1175-85.

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

Blond, J. L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F. and 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**, 3321-9.

Boller, K., Frank, H., Lower, J., Lower, R. and Kurth, R. (1983). Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* **64 (Pt 12)**, 2549-59.

Borges, M., Bose, P., Frank, H. G., Kaufmann, P. and Potgens, A. J. (2003). A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta* **24**, 959-64.

Champion-Arnaud, P., Gesnel, M. C., Foulkes, N., Ronsin, C., Sassone-Corsi, P. and Breathnach, R. (1991). Activation of transcription via AP-1 or CREB regulatory sequences is blocked by protein tyrosine phosphatases. *Oncogene* **6**, 1203-1209.

Chen, H. R. and Barker, W. C. (1984). Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions. *Nucleic Acids Res* **12**, 1767-78.

Cheng, Y. H., Richardson, B. D., Hubert, M. A. and Handwerger, S. (2004). Isolation and characterization of the human syncytin gene promoter. *Biol Reprod* **70**, 694-701.

Cheynet, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J. L., Boson, B., Vachot, L., Verrier, B., Cosset, F. L. and Mallet, F. (2005). Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol* **79**, 5585-93.

Clerici, M., Fusi, M. L., Caputo, D., Guerini, F. R., Trabattoni, D., Salvaggio, A., Cazzullo, C. L., Arienti, D., Villa, M. L., Urnovitz, H. B. et al. (1999). Immune responses to antigens of human endogenous retroviruses in patients with acute or stable multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **99**, 173-82.

Collinet, P., Delemer-Lefebvre, M., Dharancy, S., Lucot, J. P., Subtil, D. and Puech, F. (2006). [The HELLP syndrome: diagnosis and therapeutic burden]. *Gynecol Obstet Fertil* **34**, 94-100.

Costas, J. (2002). Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol Biol Evol* **19**, 526-33.

Dallenbach-Hellweg, G. and Nette, G. (1964). Morphological and Histochemical Observations on Trophoblast and Decidua of the Basal Plate of the Human Placenta at Term. *Am J Anat* **115**, 309-26.

Daoud, G., Amyot, M., Rassart, E., Masse, A., Simoneau, L. and Lafond, J. (2005). ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* **566**, 409-23.

Daoud, G., Rassart, E., Masse, A. and Lafond, J. (2006). Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta. *J Physiol* **571**, 537-53.

Darlix, J. L. (1986). Control of Rous sarcoma virus RNA translation and packaging by the 5' and 3' untranslated sequences. *J Mol Biol* **189**, 421-34.

Davis, D. M., Igakura, T., McCann, F. E., Carlin, L. M., Andersson, K., Vanherberghen, B., Sjostrom, A., Bangham, C. R. and Hoglund, P. (2003). The protean immune cell synapse: a supramolecular structure with many functions. *Semin Immunol* **15**, 317-24.

de Parseval, N. and Heidmann, T. (2005). Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res* **110**, 318-32.

de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J. F., Benit, L. and Heidmann, T. (2003). Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol* **77**, 10414-22.

Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G. and Heidmann, T. (2006). Identification of an infectious progenitor for

the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res* **16**, 1548-56.

Dhar, R., McClements, W. L., Enquist, L. W. and Vande Woude, G. F. (1980). Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3937-41.

Dodeur, M., Malassine, A., Bellet, D., Mensier, A. and Evain-Brion, D. (1990). Characterization and differentiation of human first trimester placenta trophoblastic cells in culture. *Reprod Nutr Dev* **30**, 183-92.

Durig, P., Ferrier, C. and Schneider, H. (1999). [Hypertensive disorders in pregnancy]. *Ther Umsch* **56**, 561-71.

Enders, A. C. (1965). Formation of Syncytium from Cytotrophoblast in the Human Placenta. *Obstet Gynecol* **25**, 378-86.

Enders, A. C. (1981). Anatomy of the placenta and its relationship to function. *Mead Johnson Symp Perinat Dev Med*, 3-7.

Feldman, R. D. and Gros, R. (2007). New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: implications in cardiovascular regulation. *Life Sci* **81**, 267-71.

Finn, C. A. (1974). Recent research on implantation in animals. *Proc R Soc Med* **67**, 927-32.

Fortin, J. F., Barbeau, B., Robichaud, G. A., Pare, M. E., Lemieux, A. M. and Tremblay, M. J. (2001a). Regulation of nuclear factor of activated T cells by phosphotyrosyl-specific phosphatase activity: a positive effect on HIV-1 long terminal repeat-driven transcription and a possible implication of SHP-1. *Blood* **97**, 2390-400.

Fortin, J. F., Barbeau, B., Robichaud, G. A., Pare, M.-È., Lemieux, A. M. and Tremblay, M. J. (2001b). Regulation of nuclear factor of activated T cells by phosphotyrosyl-specific phosphatase activity: a positive effect on HIV-1 long terminal repeat-driven transcription and a possible implication of SHP-1. *Blood* **97**, 2390-2400.

Fournier, A., Fievet, P., el Esper, I., el Esper, N., Vaillant, P. and Gondry, J. (1995). [Hypertension and pregnancy. Diagnosis, physiopathology and treatment]. *Schweiz Med Wochenschr* **125**, 2273-98.

Frendo, J. L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J. L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D. and Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 3566-74.

Gordin, D., Hiilesmaa, V., Fagerudd, J., Ronnback, M., Forsblom, C., Kaaja, R., Teramo, K. and Groop, P. H. (2007). Pre-eclampsia but not pregnancy-induced hypertension is a risk factor for diabetic nephropathy in type 1 diabetic women. *Diabetologia*.

Hamlin, G. P. and Soares, M. J. (1995). Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in proliferating and differentiating trophoblast cells: involvement of

transferrin, transforming growth factor-beta, and tyrosine kinases. *Endocrinology* **136**, 322-31.

Haram, K., Bjorge, L. and Guttu, K. (2000a). [HELLP syndrome]. *Tidsskr Nor Laegeforen* **120**, 1433-6.

Haram, K., Bjorge, L., Guttu, K. and Bergsjø, P. (2000b). [Pre-eclampsia--a review]. *Tidsskr Nor Laegeforen* **120**, 1437-42.

Haseltine, W. A., Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 989-93.

Huppertz, B., Bartz, C. and Kokozidou, M. (2006). Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* **37**, 509-17.

Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M. and Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**, 1713-6.

Kamei, T., Hamlin, G. P., Chapman, B. M., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B. and Soares, M. J. (1997). Signaling pathways controlling trophoblast cell differentiation: Src family protein tyrosine kinases in the rat. *Biol Reprod* **57**, 1302-11.

Kaufmann, P. and Stegner, H. E. (1972). [Functional differentiation of the human placental syncytiotrophoblast]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **135**, 361-82.

Kekuda, R., Prasad, P. D., Fei, Y. J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H. and Ganapathy, V. (1996). Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* **271**, 18657-61.

Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M. and Strauss, J. F., 3rd. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* **118**, 1567-82.

Knerr, I., Beinder, E. and Rascher, W. (2002). Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol* **186**, 210-3.

Knerr, I., Huppertz, B., Weigel, C., Dotsch, J., Wich, C., Schild, R. L., Beckmann, M. W. and Rascher, W. (2004). Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Mol Hum Reprod* **10**, 581-8.

Knerr, I., Weigel, C., Linnemann, K., Dotsch, J., Meissner, U., Fusch, C. and Rascher, W. (2003). Transcriptional effects of hypoxia on fusogenic syncytin and its receptor ASCT2 in human cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol* **189**, 583-8.

Knoth, M. and Larsen, J. F. (1972). Ultrastructure of a human implantation site. *Acta Obstet Gynecol Scand* **51**, 385-93.

Kudo, Y. and Boyd, C. A. (2002). Changes in expression and function of syncytin and its receptor, amino acid transport system B(0) (ASCT2), in human placental choriocarcinoma BeWo cells during syncytialization. *Placenta* **23**, 536-41.

Kudo, Y., Boyd, C. A., Sargent, I. L. and Redman, C. W. (2003). Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta* **1638**, 63-71.

Kurth, R. (1986). Endogenous retrovirus in multiple sclerosis? *Nature* **320**, 219-20.

Lander, E. S. Linton, L. M. Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

Landry, J. R., Rouhi, A., Medstrand, P. and Mager, D. L. (2002). The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol Biol Evol* **19**, 1934-42.

Langbein, M., Strick, R., Strissel, P. L., Vogt, N., Parsch, H., Beckmann, M. W. and Schild, R. L. (2007). Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev.*

Larsson, E. and Andersson, G. (1998). Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scand. J. Immunol.* **48**, 329-338.

Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F. L. and Kabat, D. (2002). The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol* **76**, 6442-52.

Lavillette, D., Maurice, M., Roche, C., Russell, S. J., Sitbon, M. and Cosset, F. L. (1998). A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. *J Virol* **72**, 9955-65.

Lee, W. J., Kwun, H. J. and Jang, K. L. (2003). Analysis of transcriptional regulatory sequences in the human endogenous retrovirus W long terminal repeat. *J Gen Virol* **84**, 2229-35.

Lee, X., Keith, J. C., Jr., Stumm, N., Moutsatsos, I., McCoy, J. M., Crum, C. P., Genest, D., Chin, D., Ehrenfels, C., Pijnenborg, R. et al. (2001). Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta* **22**, 808-12.

Lefranc, D., Dubucquoi, S., Almeras, L., De Seze, J., Tourvieille, B., Dussart, P., Aubert, J. P., Vermersch, P. and Prin, L. (2001). Molecular analysis of endogenous retrovirus HRES-1: identification of frameshift mutations in region encoding putative 28-kDa autoantigen. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 437-44.

Lemieux, A.-M., Paré, M.-È., Audet, B., Legault, É., Lefort, S., Boucher, N., Landry, S., van Opijnen, T., Berkhout, B., Naghavi, M. H. et al. (2004). T cell

activation leads to poor activation of HIV-1 clade E LTR and weak association of NF- κ B and NFAT to its enhancer region. *J. Biol. Chem.* **279**, 52949-52960.

Lotz, M., Clark-Lewis, I. and Ganu, V. (1994). HIV-1 transactivator protein Tat induces proliferation and TGF beta expression in human articular chondrocytes. *J Cell Biol* **124**, 365-71.

Löwer, R., Löwer, J. and Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5177-5184.

Lyden, T. W., Ng, A. K. and Rote, N. S. (1993). Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* **14**, 177-86.

Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D. and Heidmann, T. (2006). Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. *Placenta*.

Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D. and Heidmann, T. (2007). Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. *Placenta* **28**, 185-91.

Malassine, A., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Gerbaud, P., Cheynet, V., Oriol, G., Mallet, F. and Evain-Brion, D. (2005). Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta* **26**, 556-62.

Marin, M., Lavillette, D., Kelly, S. M. and Kabat, D. (2003). N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *J Virol* **77**, 2936-45.

Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Muller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K. D. and Meese, E. (2004). Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* **322**, 190-8.

McLaren, A. (1974). Embryogenesis. *Basic Life Sci* **4**, 297-316.

Medstrand, P., Landry, J. R. and Mager, D. L. (2001). Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem* **276**, 1896-903.

Meyaard, L., Otto, S. A., Schuitemaker, H. and Miedema, F. (1992). Effects of HIV-1 Tat protein on human T cell proliferation. *Eur J Immunol* **22**, 2729-32.

Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S. et al. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**, 785-9.

Midgley, A. R., Pierce, G. B., Jr., Deneau, G. A. and Gosling, J. R. (1963). Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* **141**, 349-50.

Milward, A. D., Riba, R., Patel, B., Oberprieler, N. G. and Naseem, K. M. (2006). Sodium orthovanadate induced tyrosine phosphorylation of platelet nitric oxide synthase negatively regulates enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1411-7.

Montell, C., Fisher, E. F., Caruthers, M. H. and Berk, A. J. (1983). Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequence AAUAAA. *Nature* **305**, 600-5.

Morrish, D. W., Bhardwaj, D., Dabbagh, L. K., Marusyk, H. and Siy, O. (1987). Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 1282-90.

Muir, A., Lever, A. and Moffett, A. (2004). Expression and functions of human endogenous retroviruses in the placenta: an update. *Placenta* **25 Suppl A**, S16-25.

Muir, A., Lever, A. M. and Moffett, A. (2006). Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *J Gen Virol* **87**, 2067-71.

Muller, H. M., Widschwendter, M., Mortl, M. G. and Schrocksnadel, H. (1998). [Prediction of preeclampsia: new hypotheses, new approaches]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* **38**, 222-31.

Nishizawa, M., Koyama, T. and Kawai, S. (1985). Unusual features of the leader sequence of Rous sarcoma virus packaging mutant TK15. *J Virol* **55**, 881-5.

Obringer, A. R., Dean, K. W., Channel, S. R. and Rote, N. S. (1997). Aminophospholipid translocase activity in JEG-3; a choriocarcinoma model of cytotrophoblast differentiation. *Placenta* **18**, 421-6.

Ono, M., Kawakami, M. and Ushikubo, H. (1987). Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* **61**, 2059-62.

Ouellet, M., Barbeau, B. and Tremblay, M. J. (1999). p56(lck), ZAP-70, SLP-76, and calcium-regulated effectors are involved in NF-kappaB activation by bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphatase inhibitors in human T cells. *J Biol Chem* **274**, 35029-36.

Patschinsky, T., Schroeder, B. and Bister, K. (1986). Protein product of proto-oncogene c-mil. *Mol Cell Biol* **6**, 739-44.

Perron, H., Garson, J. A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Mallet, F., Tuke, P. W., Voisset, C., Blond, J. L. et al. (1997). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7583-8.

Perron, H., Lazarini, F., Ruprecht, K., Pechoux-Longin, C., Seilhean, D., Sazdovitch, V., Creange, A., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Santoro, L. et al. (2005). Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol* **11**, 23-33.

Polavarapu, N., Bowen, N. J. and McDonald, J. F. (2006). Newly identified families of human endogenous retroviruses. *J Virol* **80**, 4640-2.

Posner, B. I., Faure, R., Burgess, J. W., Bevan, A. P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I. G., Ng, J. B., Hall, D. A., Lum, B. S. et al. (1994). Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem* **269**, 4596-604.

Potgens, A. J., Drewlo, S., Kokozidou, M. and Kaufmann, P. (2004). Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update* **10**, 487-96.

Potgens, A. J., Schmitz, U., Bose, P., Versmold, A., Kaufmann, P. and Frank, H. G. (2002). Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* **23 Suppl A**, S107-13.

Prakash, J., Pandey, L. K., Singh, A. K. and Kar, B. (2006). Hypertension in pregnancy: hospital based study. *J Assoc Physicians India* **54**, 273-8.

Prudhomme, S., Oriol, G. and Mallet, F. (2004). A retroviral promoter and a cellular enhancer define a bipartite element which controls env ERVWE1 placental expression. *J Virol* **78**, 12157-68.

Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R. J., Mazo, I. and Miller, A. D. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2129-34.

Rebut-Bonneton, C., Boutemy-Roulier, S. and Evain-Brion, D. (1993). Modulation of pp60c-src activity and cellular localization during differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**, 629-36.

Renard, M., Varela, P. F., Letzelter, C., Duquerroy, S., Rey, F. A. and Heidmann, T. (2005). Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. *J Mol Biol* **352**, 1029-34.

Rote, N. S. (2005). Intercellular fusion of BeWo. *Placenta* **26**, 686; author reply 687.

Rote, N. S., Chakrabarti, S. and Stetzer, B. P. (2004). The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta* **25**, 673-83.

Roux, C. (1972). [Formation and evolution of the human placenta]. *Rev Prat* **22**, 979-90.

Seifarth, W., Skladny, H., Krieg-Schneider, F., Reichert, A., Hehlmann, R. and Leib-Mosch, C. (1995). Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J Virol* **69**, 6408-16.

Shank, P. R. and Linial, M. (1980). Avian oncovirus mutant (SE21Q1b) deficient in genomic RNA: characterization of a deletion in the provirus. *J Virol* **36**, 450-6.

Smallwood, A., Papageorghiou, A., Nicolaides, K., Alley, M. K., Jim, A., Nargund, G., Ojha, K., Campbell, S. and Banerjee, S. (2003). Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10, and SGCE in human placenta. *Biol Reprod* **69**, 286-93.

Soleymanlou, N., Jurisicova, A., Wu, Y., Chijiwa, M., Ray, J. E., Detmar, J., Todros, T., Zamudio, S., Post, M. and Caniggia, I. (2007). Hypoxic switch in mitochondrial myeloid cell leukemia factor-1/Mtd apoptotic rheostat contributes to human trophoblast cell death in preeclampsia. *Am J Pathol* **171**, 496-506.

Strauss, J. F., 3rd, Kido, S., Sayegh, R., Sakuragi, N. and Gafvels, M. E. (1992). The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* **13**, 389-403.

Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., Takasu, N., Oda, T. and Jinno, Y. (2001). Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* **72**, 137-44.

Urnovitz, H. B. and Murphy, W. H. (1996). Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* **9**, 72-99.

Vargas, A., Moreau, J., Le Bellego, F., Lafond, J. and Barbeau, B. (2007). Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Placenta in press*.

Voisset, C., Bouton, O., Bedin, F., Duret, L., Mandrand, B., Mallet, F. and Paranhos-Baccala, G. (2000). Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 731-40.

Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Jian, B., Epp, L., Lu, D. W. and Johanning, G. L. (2003). Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* **22**, 1528-35.

Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Johanning, G. L., Khazaeli, M. B., LoBuglio, A. F., Shaw, D. R. and Strong, T. V. (2001). Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 1553-60.

Wice, B., Menton, D., Geuze, H. and Schwartz, A. L. (1990). Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res* **186**, 306-16.

Wolf, G., Wenzel, U., Stahl, R. A. and Huneke, B. (2001). [Hypertensive disorders in pregnancy]. *Med Klin (Munich)* **96**, 78-86.

Yamada, K., Ogawa, H., Tamiya, G., Ikeno, M., Morita, M., Asakawa, S., Shimizu, N. and Okazaki, T. (2000). Genomic organization, chromosomal localization, and the complete 22 kb DNA sequence of the human GCMA/GCM1, a

placenta-specific transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 134-9.

Yi, J. M., Kim, H. M. and Kim, H. S. (2004). Expression of the human endogenous retrovirus HERV-W family in various human tissues and cancer cells. *J Gen Virol* **85**, 1203-10.

Yi, J. M. and Kim, H. S. (2004). Expression analysis of endogenous retroviral elements belonging to the HERV-F family from human tissues and cancer cells. *Cancer Lett* **211**, 89-96.

Yu, C., Shen, K., Lin, M., Chen, P., Lin, C., Chang, G. D. and Chen, H. (2002). GCMA regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem* **277**, 50062-8.

Zygmunt, M., Hahn, D., Munstedt, K., Bischof, P. and Lang, U. (1998). Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* **19**, 587-93.