

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DES PROTÉINES D'ENVELOPPE D'HERVs DANS LE  
DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA : UTILISATION POTENTIELLE COMME  
BIOMARQUEURS DE LA PRÉ-ÉCLAMPSIE

THÈSE PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
AMANDINE VARGAS

AVRIL 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.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.»

*Je dédie ma thèse à mes grands parents, yaya, yayo, papi et mami.*

*Vous êtes partis tellement vite que je n'ai pas eu le temps de vous dire à quel point je vous aime.*

*Vous me manquez terriblement...*

## REMERCIEMENTS

Jamais je n'aurais cru un jour venir m'installer au Canada. Si ce stage de Master I n'avait pas eu lieu d'être, je ne serais probablement pas au Québec aujourd'hui et, encore moins à la fin de mes études de doctorat.

Je tiens d'abord à remercier sincèrement Dr Benoit Barbeau qui m'a accueillie en 2007 et qui m'a offert la chance de poursuivre mes études dans son laboratoire. Je lui dois énormément et je ne saurais comment le remercier si ce n'est qu'en lui écrivant ces quelques mots de remerciement. J'ai beaucoup appris et grandi avec vous, et comme vous le savez, c'est pour être dans votre laboratoire, au sein de votre équipe et, donc sous votre supervision, que j'ai décidé de compléter ce doctorat. Je vous remercie infiniment pour toute votre aide, votre confiance, vos conseils et surtout vos encouragements. J'ai adopté l'un de vos sujets de recherche et je n'ai jamais cessé de croire en l'avenir de notre étude. Je crois que c'est un sujet avec beaucoup d'avenir et dont les perspectives sont plus qu'excitantes.

Je remercie également tous mes anciens collègues de laboratoire, Julie Moreau, Marylène Halin et Chirine Toufaily pour leur aide et leur encouragement.

Un gros merci à mon mentor Dr Sébastien Landry qui, sans le savoir peut-être, était et restera un modèle pour moi.

Je souhaite remercier infiniment le Dre Julie Lafond, pour m'avoir laissée la chance « d'emprunter » son laboratoire, son matériel, et surtout pour tout son support et sa grande gentillesse.

C'est avec grande amitié que je remercie Maude Ethier Chiasson, qui en plus d'être mon amie fidèle, m'a accompagnée durant toutes ces années et a su m'encourager à chaque instant de ma vie. J'ai adoré nos moments ensemble au laboratoire et je ne pourrai jamais oublier à quel point tu as été disponible pour moi, toujours prête à me rendre service et toujours là pour moi simplement.

Je remercie sincèrement ma collègue, ma complice, mon amie, ma sœur de coeur Émilie Larocque. Je ne pourrais exprimer en quelques mots à quel point tu as été indispensable pour moi, une source de motivation, une conscience et un soutien quotidien.

Je voudrais remercier de tout mon cœur ma famille et mes amis qui ont cru en moi et m'ont encouragée durant toutes ces années.

Un immense merci à ma maman et mon papa ainsi qu'à mes deux sœurs pour tout, tout simplement. Merci d'être là pour moi, de prendre soin de moi, même si vous êtes loin je vous ai avec moi chaque jour. Je vous dois tout.

Finalement, je remercie mon conjoint, mon partenaire de vie Dominick pour tout son amour et pour tout l'enthousiasme que je perçois lorsque je l'entends parler de moi et de mes études de doctorat. Je te remercie de m'avoir supportée dans les moments difficiles, mes multiples et infinissables doutes. Je suis heureuse que la vie m'ait menée jusqu'à toi.

Enfin, je remercie la vie de m'avoir donnée mon bébé, mon souffle de vie, mon inspiration. C'est grâce à toi que très souvent j'ai trouvé force et motivation, afin de toujours dépasser mes limites, pour donner le meilleur de moi-même. Car c'est ce que je veux être pour toi et avec toi. À jamais ce sera toi qui occuperas la place la plus importante dans mon cœur.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES TABLEAUX .....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xiii
LISTE DES SYMBOLES .....	xvii
RÉSUMÉ .....	xviii
CHAPITRE I	
ÉTATS DES CONNAISSANCES .....	1
1.1 Les rétrovirus.....	1
1.1.1 Structure des rétrovirus .....	1
1.1.2 Organisation génomique.....	4
1.1.3 Cycle de réplication.....	6
1.2 Les rétrovirus endogènes .....	8
1.2.1 Leur origine .....	8
1.2.2 Organisation génomique des rétrovirus endogènes.....	9
1.2.3 Expression des rétrovirus endogènes .....	10
1.3 HERVs et placenta.....	13
1.2.2 Fonctions placentaires .....	14
1.2.3 Développement du placenta .....	17
1.2.4 Syncytine 1 et syncytialisation.....	21
1.3.4 Rôles et fonctions controversés de la Syncytine 1 .....	23
1.3.5 La Syncytine 2.....	25
1.3.6 Rôle immunosuppresseur des Syncytines .....	25

1.3.7	Interactions de la Syncytine 1 et 2 et systèmes de transport .....	26
1.3.8	Autres protéines d'enveloppe d'HERVs .....	27
1.3.9	HERVs et Pré-éclampsie .....	28
1.4	Les exosomes .....	31
1.4.1	Découverte des exosomes .....	31
1.4.2	Biogenèse des exosomes .....	31
1.4.3	Libérations des exosomes.....	38
1.4.4	Les marqueurs des compartiments endosomaux.....	39
1.4.5	Type de vésicules .....	40
1.4.6	Composition des exosomes .....	41
1.4.7	Rôle des exosomes .....	45
1.5	Problématique.....	51
1.6	Hypothèses et objectifs.....	53
 CHAPITRE II		
ARTICLE 1	.....	55
2.1	Contributions .....	55
2.2	Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts .....	56
2.2.1	Abstract .....	57
2.2.2	Introduction .....	58
2.2.3	Results .....	59
2.2.4	Discussion .....	65
2.2.5	Conclusions .....	68
2.2.6	Materials and methods.....	68
2.2.7	Figure legends .....	75
2.2.8	Figures .....	78
2.2.9	Figures legends (supplementary material) .....	85

2.2.10	Supplementary material.....	86
2.2.11	Acknowledgements .....	87
CHAPITRE III		
ARTICLE 2	.....	88
3.1	Contributions .....	88
3.2	Reduced expression of both Syncytin-1 and Syncytin-2 correlates with severity of pre-eclampsia .....	89
3.2.1	Abstract .....	90
3.2.2	Introduction .....	91
3.2.3	Results .....	92
3.2.4	Discussion .....	93
3.2.5	Conclusions .....	94
3.2.6	Materials and methods.....	95
3.2.7	Figure legends .....	99
3.2.8	Figures.....	101
3.2.9	Table.....	104
3.2.10	Acknowledgements .....	104
CHAPITRE IV		
ARTICLE 3 :	.....	105
4.1	Contributions .....	105
4.2	HERV envelopes incorporated in placenta-derived retroviral-like exosomes are important for cell uptake and are potential preeclampsia biomarkers.....	106
4.2.1	Abstract .....	107
4.2.2	Introduction .....	108
4.2.3	Results .....	110
4.2.4	Discussion .....	114
4.2.5	Materials and methods.....	115



4.2.6	Figure legends .....	122
4.2.7	Figures .....	126
4.2.8	Figures legends (supplementary material) .....	138
4.2.9	Supplementary material.....	142
4.2.10	Acknowledgements .....	152
CHAPITRE V		
DISCUSSION.....		153
5.1	Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre II.....	153
5.1.1	Modulation de l'expression des deux nouvelles protéines d'enveloppe .....	153
5.1.2	Rôle dans la fusion des cytotrophoblastes humains .....	156
5.1.3	Autre rôle des HERVs: l'immunosuppression .....	158
5.2	Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre III .....	159
5.2.1	Défaut fusogénique des CT primaires/PE .....	159
5.2.2	Rôle des HERVs dans ce défaut fusogénique .....	161
5.2.3	Altération de l'activité immunosuppressive des HERVs dans la PE ...	162
5.3	Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre du IV .....	163
5.3.1	Communication exosomes/CT: entrée par fusion cellulaire .....	164
5.3.2	Communication exosomes/CT: entrée par internalisation .....	165
5.3.3	Communication exosomes/cellules immunitaires: immunosuppression.....	168
5.3.4	Exosomes et biomarqueurs de la PE .....	169
5.3.5	Un nouvel outil : les exosomes associés à la Syncytine 2.....	170
CONCLUSION GÉNÉRALE .....		171
ANNEXE I		

LISTE DES PROTEINES IDENTIFIEES DANS LES EXOSOMES PLACENTAIRES.....	175
ANNEXE 2 INHIBITION DE L'ACTIVATION DES CELLULES T PAR LES HERVS .....	179
ANNEXE 3 ARTICLE PUBLIÉ DANS LE JOURNAL REPRODUCTIVES SCIENCES.....	180
RÉFÉRENCES .....	210

## LISTE DES FIGURES

Figure.....	Page
<b>1.1</b> Représentation schématique de la structure d'un rétrovirus.....	21
<b>1.2</b> Représentation schématique de la glycoprotéine de surface (SU) associée à la protéine transmembranaire (TM).....	22
<b>1.3</b> Schéma de la structure de l'ARN transcrit d'un rétrovirus.....	23
<b>1.4</b> Représentation des étapes d'infection, d'intégration et de réplication d'un rétrovirus dans une cellule.....	26
<b>1.5</b> Représentation schématique d'un placenta à terme.....	33
<b>1.6</b> Représentation des deux voies de différenciation du cytotrophoblaste humain....	37
<b>1.7</b> Représentation schématique des villosités choriales ancrées dans l'endomètre....	38
<b>1.8</b> Représentation schématique de la structure d'une protéine d'enveloppe rétrovirale.....	42
<b>1.9</b> Physiopathologie de la pré-éclampsie.....	48
<b>1.10</b> Représentation des différentes étapes de l'endocytose clathrine-dépendante....	52
<b>1.11</b> Représentation des différentes voies de l'endocytose.....	53
<b>1.12</b> Représentation des différentes étapes de la formation du MVB et recrutement de la machinerie ESCRT .....	56
<b>1.13</b> Représentation des différentes étapes de la biogenèse des exosomes.....	58
<b>1.14</b> Composition protéique des exosomes.....	62
<b>1.15</b> Composition protéique des exosomes placentaires.....	64
<b>2.1</b> Characterization of EnvP(b) and EnvV transcripts in human trophoblasts.....	97
<b>2.2</b> Expression pattern of EnvP(b) and EnvV in human trophoblasts.....	98
<b>2.3</b> Activation of EnvP(b) and EnvV promoters by forskolin.....	99
<b>2.4</b> Fusogenicity of the HERV env proteins.....	100-102
<b>2.5</b> Repression of EnvP(b) expression has no impact on BeWo cell fusion.....	103-104
<b>2.S1</b> EnvV mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas.....	105
<b>3.1</b> Fusion of human primary trophoblast cells isolated from normal and pre-eclamptic placentas.....	120

<b>3.2</b> Syncytin-1 and Syncytin-2 mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas. ....	121
<b>3.3</b> Syncytin-1 and Syncytin-2 protein levels in normal and pre-eclamptic placentas.....	122
<b>4.1</b> Exosomes from cultured primary trophoblasts harbour Syncytin-1 and Syncytin-2 at their surface.....	145-146
<b>4.2</b> Uptake and intracellular trafficking of CT exosomes .....	147-151
<b>4.3</b> Uptake of trophoblast exosomes involves both Syncytin-1 and Syncytin-2.....	152-153
<b>4.4</b> Analyses of exosomes isolated from serum samples or trophoblasts of normal vs. PE pregnant women .....	154-156
<b>4.S1</b> Detection of Syncytin-2 at the surface of trophoblast-derived exosomes by confocal microscopy.....	161
<b>4.S2</b> Uptake of exosomes from cultured primary trophoblasts in primary culture .....	162
<b>4.S3</b> EM analyses of exosome uptake by BeWo cells.....	63
<b>4.S4</b> Flow cytometry analyses of exosome uptake in BeWo cells .....	164
<b>4.S5</b> Optimized sandwich ELISA assay for detection of Syncytin-2 at the surface of serum-derived exosomes.....	165
<b>4.S6</b> Western blot analyses of serum-derived normal vs. PE exosomes for Syncytin-2.....	166
<b>4.S7</b> Dose-dependent detection of Syncytin-2 on serum-derived exosomes by a direct Syncytin-2 ELISA assay.....	167
<b>4.S8</b> Procedure for exosome isolation.....	168-169

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau.....	Page
<b>1.1</b> Caractéristiques physicochimiques des différents types de vésicules sécrétées.....	59
<b>3.1</b> Clinical characteristics of controls and patients with pre-eclampsia.....	123
<b>4.S1</b> Summary of nanosizer analyses of purified exosomes purified by modified method for exosome precipitation using ExoQuick.....	170
<b>4.S2</b> Summary of clinical characteristics of normal pregnant women and patients with preeclampsia.....	171

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A	Adénine
AChE	Acétylcholine esterase
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 des acides aminés neutres
bpV[pic]	Bis-peroxovanadium [pic], inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase
C	Cytosine
CA	Capside
CASPASE	<i>Cysteine-dependent aspartate-cleaving proteases</i>
CMH I/II	Complexe majeur d'histocompatibilité I/II
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagle medium</i>
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate

dUTP	Déoxyuridine triphosphate
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Env	Enveloppe
ERV	Rétrovirus endogène
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i> , Complexe de tri cellulaire requis pour le transport
forsk	Forskoline
G	Guanosine
gag	Antigène de groupe
GCM-1	<i>Glial Cell Missing-1</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GST	<i>Glutathione-S-transferase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
hCG	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
HELLP	<i>Hemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelet count</i>
HHV	<i>Human Herpes virus</i> , Virus de l'herpès humain
hPL	Hormone placentaire lactogène humaine
HERV	Rétrovirus endogène humain
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
IL	Interleukine
IN	Intégrase
Kda	Kilodalton

L	<i>Leader</i>
LBPA	Acides lysobisphosphatidiques
LINE	<i>Long interspersed element</i>
LT	Lymphocytes T
LTCD8	Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup>
LTCD4	Lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molaire
MA	Matrice protéique
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MVB	<i>Multivesicular bodies</i> , corps multivésiculaires
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NC	Nucléocapside
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS	Site de liaison de l'ARNt utilisé par la transcriptase inverse
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Pré-éclampsie
Pol	<i>Polymerase</i>



PPT	<i>PolyPurine Tract</i>
PR	Protéase
PVDF	Membranes de polyvinylidènefluoride
R	Région unique répétée
RDR	Récepteur rétroviral mammifère de type D
RT	Rétro-transcriptase
SiRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SU	Glycoprotéine de surface
SV40	Virus simien 40
T	Thymidine
T <sub>m</sub>	<i>Temperature melting point</i>
TM	Glycoprotéine transmembranaire
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U3 / U5	Séquences uniques répétées
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humain

## LISTE DES SYMBOLES

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Degrés celsius
h	Heure
kb	Kilobase
kg	Kilogramme
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Milimolaire
$\mu$	Micro, $10^{-6}$
n	Nano, $10^{-9}$
sec	Seconde
U	Unité
$\mu\text{g}$	Microgramme
$\mu\text{l}$	Microlitre
$\zeta$	Zeta

## RÉSUMÉ

Près de 8% du génome humain est constitué de séquences d'origine rétrovirale. Ces séquences HERVs représentent des vestiges d'intégrations rétrovirales ancestrales et 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. La présence des HERVs dans le génome humain est associée à divers phénomènes biologiques. En effet, il a été démontré que deux protéines d'enveloppe appartenant à des séquences d'HERV, soit la Syncytine 1 et Syncytine 2, participent au développement du placenta, en provoquant des événements de fusion cellulaire entre les cellules cytotrophoblastiques du placenta, permettant la formation du syncytiotrophoblaste. Cependant, deux autres protéines d'enveloppe d'HERVs ont été récemment identifiées et suscitent un intérêt particulier. Il s'agit de EnvP(b), une protéine fusogénique mais ubiquitaire et, EnvV, dont l'expression est spécifique au placenta. La présente étude visait d'abord à caractériser les transcrits de ces protéines et approfondir notre connaissance du rôle suggéré dans les événements fusogéniques des cellules trophoblastiques. Nos travaux ont démontré que, bien que possédant chacune un transcrit et une régulation transcriptionnelle similaires aux deux Syncytines 1 et 2, EnvP(b) et EnvV ne semblent pas être indispensables lors des événements fusogéniques des cytotrophoblastes. La Syncytine 1 et 2 restent alors les deux seules protéines d'enveloppe d'HERVs connues à ce jour, impliquées dans ce processus. Ainsi, dans un second volet, nous voulions vérifier si une altération de l'expression de ces deux gènes *env* corrélait avec un défaut de fusion des trophoblastes humains et qui plus est, avec les symptômes de la pré-éclampsie (PE). Nos résultats ont démontré hors de tout doute, que l'expression de la Syncytine 1 et 2 est altérée suivant la condition PE, induisant probablement la diminution de la fusion cellulaire des cytotrophoblastes, laquelle est observée dans des cas de pré-éclampsie. Cette altération fusogénique, dont les conséquences conduiraient à un dysfonctionnement du placenta et donc à la condition « pré-éclampsie » aurait donc pour origine un défaut en terme d'expression de ces deux protéines d'enveloppe. Complétant un dernier volet, nous voulions étudier et élucider les mécanismes faisant intervenir les exosomes cytotrophoblastiques. L'abondance des protéines d'enveloppe Syncytine 1 et 2 au sein de ces exosomes, a pour la première fois clairement été mise en évidence et, un rôle dans l'adressage et le transfert d'information visant une cellule cible de la couche syncytiale leur a été fortement suggéré. Finalement, l'étude de la composition de ces exosomes dans la circulation maternelle de patientes pré-éclampsiques nous a permis de mettre en évidence une déficience pour la Syncytine 2. Cette association exosome/Syncytine 2 devient alors un excellent biomarqueur de la condition pré-éclampsie.

### Mots clés :

Rétrovirus Endogène Humain (HERV), Syncytine 1, Syncytine 2, EnvP(b), EnvV, cytotrophoblaste, placenta, syncytialisation, pré-éclampsie, exosomes, biomarqueur.

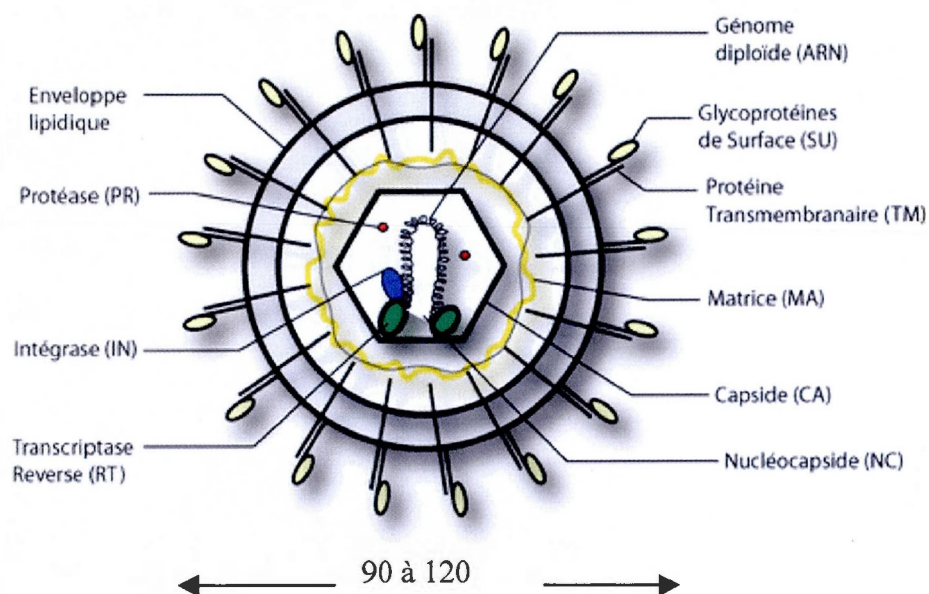
# CHAPITRE I

## ÉTATS DES CONNAISSANCES

### **1.1 Les rétrovirus**

#### **1.1.1 Structure des rétrovirus**

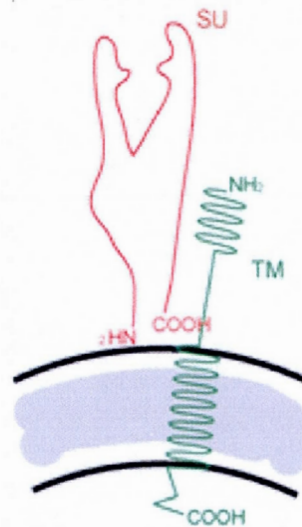
« Les virus sont des entités biologiques caractérisées par une structure nucléoprotéique simple et des propriétés fonctionnelles particulières. Le génome de ces agents est constitué d'un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN), associé à une structure protéique protectrice, la capsid et parfois l'enveloppe 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 provenant 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 capside. 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) 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) traverse l'enveloppe virale et correspond 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).



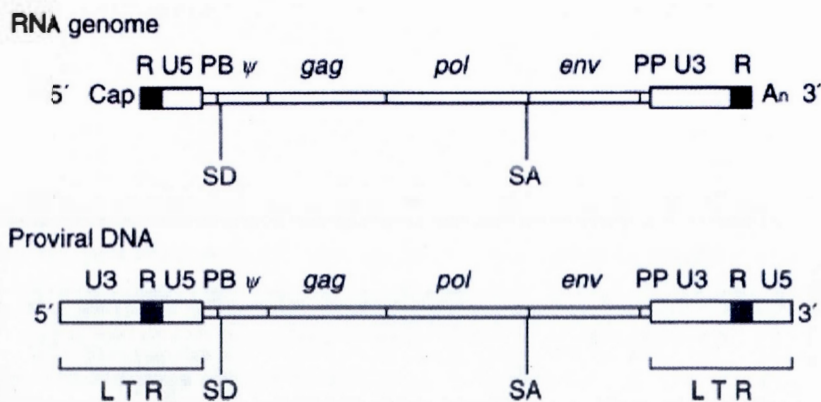
**Figure 1.2 :** Représentation schématique de la glycoprotéine de surface (SU) associée à la protéine transmembranaire (TM). Image tirée du livre « Principles of Molecular Virology » de Alan Cann.

À l'intérieur de l'enveloppe se trouve le *core* viral ainsi entouré, comprenant deux molécules d'ARN identiques, des enzymes virales et trois autres protéines structurales : on retrouve la matrice protéique (MA), codée par le gène *gag* et constituant la frontière intérieure de l'enveloppe et, 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 adopte une conformation géométrique qui, selon les virus, est soit tubulaire, soit polyédrique. Également présente, la nucléocapsid (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*. La protéase (PR) est généralement 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. 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, l'intégrase (IN) est codée par le gène *pol* et elle est essentielle à l'intégration du génome viral au génome cellulaire.

### 1.1.2 Organisation génomique

Le génome des rétrovirus non déficients ayant une longueur d'environ 7-11 Kb est flanqué de chaque côté par des séquences répétitives et deux unités promotrices identiques appelées LTRs (*Long Terminal Repeat*). Comme évoqué précédemment, il est aussi composé de trois gènes de base, soit *gag*, *pol* et *env*. Dans la capsid des rétrovirus, on retrouve les deux molécules d'ARN simple brin (+), liées entre elles par des ponts hydrogènes. Ces dernières possèdent une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' (Figure 1.3). Le génome des rétrovirus est caractérisé par plusieurs critères : 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. 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'ADN proviral et de l'ARN génomique d'un rétrovirus. Tirée de (Kageyama et al., 2003). Les génomes des rétrovirus contiennent les gènes *gag*, *pol*, et *env* encadrés par deux LTRs constitués des régions U3, R et U5.

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

- 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' et, ii) un deuxième type de signal contrôlant la transcription du provirus qui sera utilisé dans l'ADN proviral.

- 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 nt 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 le 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 (sous-famille du rétrovirus), 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'encapsidation des ARN viraux via le signal psi (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 tels que le VIH-1 et HTLV-1 possèdent des gènes additionnels tels que *rev* et *tat* (ou *tax* pour HTLV-1).

- 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 utilisée dans l'ADN proviral.



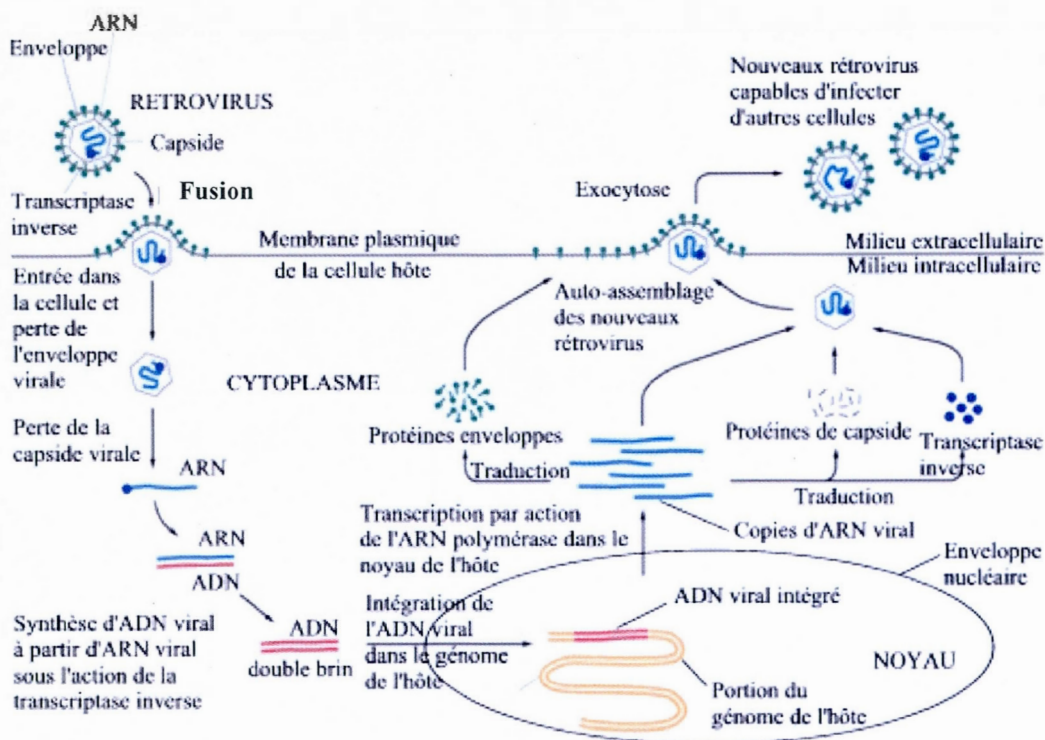
La numérotation des nucléotides du LTR (U3-R-U5) situé en 5' se fait de façon négative à partir du premier nucléotide de la séquence R (noté, lui, +1 et qui correspond au site d'initiation de transcription) selon le sens utilisé lors de transcription de l'ADN. Dans le LTR 3' (U3-R-U5), on retrouve le signal de polyadénylation AATAAA situé dans la séquence R de celui-ci (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. Après décapsidation, le « core viral » est alors libéré. Une des particularités des rétrovirus est l'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. Il s'en suit 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 rétrovirus, sous leur forme intégrée sont alors nommés provirus. Les rétrovirus persistent dans l'organisme de l'hôte malgré l'existence d'une réponse immunitaire spécifique. Les séquences régulatrices présentes dans les LTRs viraux, notamment dans la région U3, permettront l'initiation de la transcription et la traduction du matériel nécessaire à l'assemblage de particules virales. Finalement, après bourgeonnement des virions à l'extérieur de la cellule, les nouveaux rétrovirus seront à leur tour capables d'infecter de nouvelles cellules.

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. Après fusion des membranes, 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, utilisant la machinerie de synthèse de la cellule hôte. De nouvelles particules virales sont alors produites, lesquelles pourront ainsi aller infecter d'autres cellules et répéter le cycle de réplication.

## 1.2 Les rétrovirus endogènes

### 1.2.1 Leur origine

Les rétrovirus ont 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 soit, 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, transmises 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), les transposons, et, qu'environ 8% de la totalité de notre génome est constitué de séquences ayant des homologues avec des rétrovirus infectieux. Fait intéressant, les HERVs anciens ont accumulé de très nombreuses mutations et/ou des délétions dans leurs régions codantes ou régulatrices et les sites d'insertion se retrouvent souvent conservés d'une espèce à l'autre (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. De plus, les rétrovirus endogènes modernes

n'ont pas été identifiés chez toutes les espèces de vertébrés, 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

Depuis peu, les rétrovirus endogènes sont classés selon l'homologie de séquence du gène *pol* entre les HERVs et les différents genres de rétrovirus exogènes. Ainsi, cette classification a permis de diviser les HERVs en trois classes bien distinctes (I, II, III). Chaque classe comprend plusieurs sous-groupes nommés selon la nomenclature basée sur le type d'ARNt utilisé. Les copies rétrovirales endogènes, organisées de la même façon que les provirus exogènes, possèdent donc des gènes de structure et des gènes codant pour des enzymes bordés 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). Fait intéressant, une équipe française a réussi à produire un rétrovirus infectieux et répliquatif, alors appelé « Phoenix », à partir de différents fragments du rétrovirus endogène HERV-K dérivés de différentes copies (Dewannieux et al., 2006).

Sauf exception, le génome des rétrovirus endogènes possède alors une organisation générale de l'ARN viral comme suit R-U5-gag-pro-pol-env-U3-R. (Benit et al., 2001). Cependant, la plupart des rétrovirus endogènes présentent des mutations et/ou des délétions, les rendant incompétents pour la répllication ou transcriptionnellement inactifs. En effet, il semble qu'aucun HERV ne soit capable de compléter un cycle répliquatif. 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 (Griffiths, 2001). Ainsi, de nombreux promoteurs appartenant à des séquences HERVs sont retrouvés dans environ 25% de toutes les régions promotrices

de gènes humains (Jordan et al., 2003). Dans la majorité des cas, le promoteur d'origine rétroviral ne semble pas avoir d'impact délétère. En effet, il a été démontré que le LTR de HERV-L est le promoteur dominant du gène codant pour l'enzyme galactosyltransférase dans le colon et l'intestin grêle humain. Citons également les gènes codant pour le récepteur à l'endothéline B et l'apolipoprotéine C-I qui sont directement sous le contrôle du LTR issu de HERV-E (Medstrand et al., 2001).

Cependant, d'autres LTRs peuvent avoir un rôle dans la transcription de gènes reliés à des pathologies humaines ou des cancers. En effet, l'insertion du LTR de HERV-E au niveau de la région 5' non transcrite du gène de la pléiotrophine (PTN), un facteur de croissance, a été reliée au phénotype invasif des trophoblastes dans des cas de choriocarcinome (Schulte et al., 1996). On retrouve de nombreux LTRs impliqués dans le contrôle de gènes dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Kim et al., 2001; Sin et al., 2006) ou encore associés aux leucémies (Lamprecht et al., 2010).

D'autres LTRs 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 (Jordan et al., 2003; Landry et al., 2002).

### **1.2.3 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).

Une des associations les plus importantes entre les protéines HERV et les maladies humaines implique la protéine d'enveloppe Syncytine 1. Cette dernière, appartenant à une séquence de la famille des HERV-W est produite de façon importante dans le cerveau d'individus atteints de sclérose en plaque et dans un type cellulaire, les oligodendrocytes impliqués 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 fortes concentrations 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 est apparu que son expression soutenue dans les lésions provoque un stress au sein des cellules gliales induisant ainsi une remyélinisation (Antony et al., 2004). D'autre part, il semble aussi que cette protéine d'enveloppe soit exprimée de façon spécifique et restreinte dans les macrophages lors de lésions précoces de sclérose en plaque (Perron et al., 2005). De ce fait, la transcription de la protéine Env de HERV-W semble être modulée dans la sclérose multiple et elle pourrait avoir une action antagoniste. Une équipe de recherche du Centre National de la Recherche Scientifique bioMérieux fait état de particules de MSR/V (*Multiple Sclerosis-associated RetroVirus* représentant 75 % d'homologie avec la séquence rétrovirale endogène ERV9 qui appartient à la famille des HERV-W) produites à partir de monocytes en culture ou de plasma et de sérum provenant de patients atteints de sclérose en plaque (Perron et al., 1997).

L'implication pathologique potentielle des HERVs est aussi illustrée à travers l'expression de la super-famille HERV-K dans les cancers ou certaines pathologies comme le diabète de type I ou encore l'arthrite rhumatoïde (Freimanis et al., 2010; Marguerat et al., 2004). Illustrant son implication dans des cas de cancers, des chercheurs soulignent l'association entre la protéine de régulation Rec codée par HERV-K (HML-2) et le processus de tumorigenèse testiculaire. 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 ce même type de cancer (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 (Armbruster 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 » issues de HERV-K (Seifarth et al., 1995), des études effectuées *in vitro* ont démontré que l'expression de HERV-K pouvait être induite par des glucocorticoïdes. Cette induction représente un indicateur de l'action efficace de la corticothérapie (propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives) (Ono et al., 1987).

Finalement, toutes ces observations et ainsi la mise en évidence de l'expression protéique des HERVs au sein de nombreux tissus « malades » nous laissent croire que certains HERVs ont un rôle dans certaines pathologies telles que des cancers ou encore des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Kurth, 1986). Cependant, 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 (de Parseval and Heidmann,

2005). 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 existence au sein des génomes. En effet, il est pertinent de penser que les protéines d'enveloppe d'HERVs, de par leurs propriétés et caractéristiques pourraient potentiellement jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, ou encore posséder des propriétés immunosuppressives. Enfin, elles pourraient aussi avoir une action protectrice face aux infections de rétrovirus exogènes dans certains tissus par un mécanisme d'interférence de récepteurs.

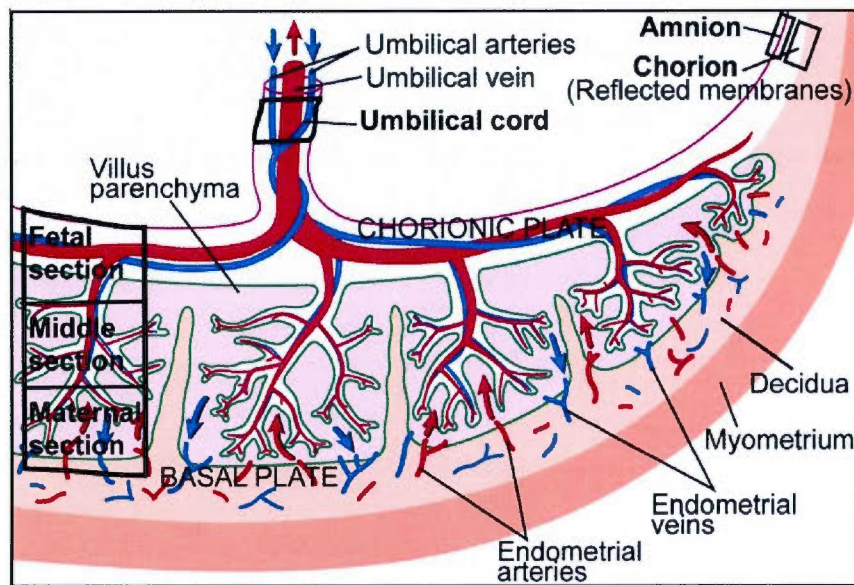
Fait intéressant, les protéines des rétrovirus endogènes sont pour certaines exprimées dans de nombreux tissus alors que, pour d'autres, l'expression est tissu-spécifique (Ahn and Kim, 2009; Blaise et al., 2005a; Peng et al., 2007). L'expression des rétrovirus endogènes dans l'appareil génital et le 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 initialement 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).

### **1.3 HERVs et placenta**

Dérivé du trophoblaste, tous les mammifères développent un placenta ; un organe fascinant, transitoire et surtout indispensable au maintien d'une grossesse et au développement du fœtus. Se présentant sous la forme d'un disque (environ 20 cm de diamètre), il est constitué d'une face fœtale ou chorale (appelée également plaque fœtale) et de la plaque basale rattachée à la paroi utérine avec entre les deux, la chambre intervillieuse et les villosités chorales (Figure 1.5). Les villosités chorales



provenant de la plaque chorale se divisent en six types de villosités (crampons ou libres dans la chambre intervillieuse), offrant ainsi une richesse de division des villosités et permettant une importante surface d'échange. Ainsi, l'arborisation des pédicules villositaires va constituer l'unité vasculaire fonctionnelle appelée le cotylédon foetal. Finalement, entre les deux plaques (basales et choriales), on retrouve la chambre intervillieuse qui est ouverte au flux sanguin maternel et où baignent les villosités.



**Figure 1.5 :** Représentation schématique d'un placenta à terme. Tirée de (Sood et al., 2006). Le placenta humain s'organise selon deux entités, soit la partie foétale (plaque chorale avec les villosités choriales, l'espace intervillieux, du mésenchyme extra-embryonnaire, l'amnios et la coque cytotrophoblastique) et la plaque basale (tissu embryonnaire et tissu maternel).

### 1.2.2 Fonctions placentaires

Considérant les multiples fonctions du placenta, celui-ci est donc plus qu'une simple barrière. En effet, il assure des fonctions : respiratoire, nutritive, excrétrice, immunologique et enfin endocrine.

### **1.2.2.1 Fonction respiratoire**

Le placenta possède une importante surface d'échange permettant l'apport d'oxygène au fœtus (affinité élevée de l'hémoglobine fœtale) et l'évacuation du dioxyde de carbone (transport passif ou diffusion). Le sang fœtal oxygéné emprunte la veine ombilicale jusqu'au fœtus tandis que le sang maternel désaturé retourne dans la circulation maternelle par les artères utérines.

### **1.2.2.2 Fonctions nutritive/excrétoire**

Les besoins énergétiques et la croissance du fœtus sont assurés par un apport nutritif maternel et les nutriments sont transportés vers la circulation fœtale. On retrouve : l'eau et les électrolytes (diffusion simple selon un gradient d'osmolarité), le calcium ainsi que le fer maternels (transport actif), le glucose (transport facilité), les phospholipides et le cholestérol (arrêtés par la barrière placentaire, transformés, stockés puis utilisés au besoin), les acides gras essentiels pour le développement du système nerveux central (transport facilité), les vitamines (diffusion), les protéines (arrêtées par la barrière placentaire, transformées en acides aminés ou peptides, stockés puis utilisés au besoin pour sa propre synthèse protéique). Faisant exception, les immunoglobulines G (IgG) ne subissent aucune dégradation et pénètrent par micro-endocytose dans le cytoplasme du syncytiotrophoblaste (John and Hemberger, 2012).

### **1.2.2.3 Fonctions immunologiques**

La tolérance du fœtus et donc de cette greffe « semi-allogénique » par la mère, est le résultat d'un environnement de « tolérance » reposant d'une part sur l'antigénicité de l'embryon ainsi que du placenta et, d'autre part sur de nombreuses modifications du système immunitaire maternel.

Les tissus fœtaux et, plus particulièrement, le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste, n'expriment à leur surface aucun antigène d'histocompatibilité (HLA A, B ou C), ce qui les rend inaptes à déclencher un signal pour le système

immunitaire. Notons que seuls les antigènes d'histocompatibilités monomorphes soit de type HLA-G sont retrouvés à la surface des cytotrophoblastes. Les macrophages ainsi que les cellules NK (« natural killer »), normalement destructrices envers les cellules dépourvues de marqueurs HLA, possèdent un système de reconnaissance du marqueur HLA-G, inhibant ainsi toute action cytolytique (Colbern and Main, 1991; John and Hemberger, 2012; Kumpel and Manoussaka, 2012).

Concernant l'immunité maternelle, l'immunité humorale reste inchangée mais l'immunité cellulaire se retrouve diminuée : diminution de l'activité et de la présence des NK et du chimiotactisme des cellules phagocytaires.

#### 1.2.2.4 Fonctions endocrines

En tant que glande endocrine, le placenta produit une quantité importante d'hormones peptidiques et stéroïdiennes nécessaires au maintien de la grossesse (Plotz, 1965; Troen, 1956).

- Pour les hormones polypeptidiques, on retrouve entre autres : **hCG**, **hPL** et **GH**.

**hCG** (hormone gonadotrophine chorionique) est sécrétée par le syncytiotrophoblaste dès le 7<sup>ème</sup> jour suivant la fécondation. Cette hormone permet de maintenir le corps jaune (corps cyclique devenant gravidique) et la sécrétion de progestérone ovarienne (jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine de grossesse) et d'assurer un rôle dans la différenciation du cytotrophoblaste (mécanisme autocrine et paracrine).

**hPL** (hormone lactogène placentaire) est également sécrétée par le syncytiotrophoblaste dès la 3<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Mal connu, le rôle de cette hormone semble être d'aider au développement, par le biais d'un effet somatotrope maternel en plus d'avoir un effet mammatrope.

**GH placentaire** (hormone de croissance) est synthétisée par le syncytiotrophoblaste. D'origine hypophysaire et sécrétée de façon non pulsative, sa détection est nulle dès la 20<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Également peu élucidé, son

rôle, de par son activité somatotrope, serait de favoriser l'apport nutritionnel au fœtus au détriment de la mère.

- Pour les hormones stéroïdiennes, on retrouve la **progestérone** et les **œstrogènes**.

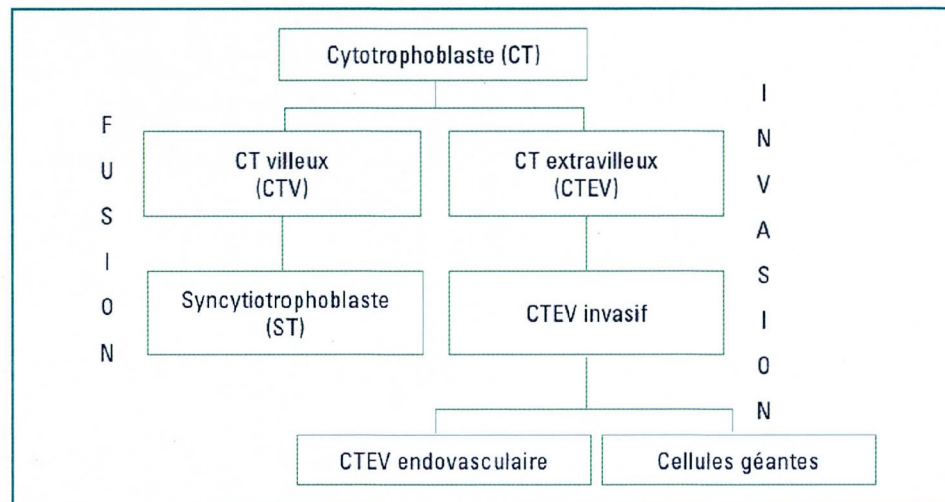
La **progestérone** est initialement sécrétée par le corps jaune puis rapidement par les cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes (à partir du cholestérol en circulation). Le premier rôle attribué à cette hormone est celui de maintenir la muqueuse utérine destinée à accueillir l'embryon lors de la nidation. Elle assure également une réduction du tonus du corps utérin et une hypertonicité du col, en plus d'induire la différenciation des glandes mammaires tout en inhibant l'action de la prolactine jusqu'à l'accouchement.

Les **œstrogènes** sont quant à eux sécrétés dès la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse par le tissu placentaire et, plus spécifiquement par le syncytiotrophoblaste. Les précurseurs, soit les « sulfates de déhydroepiandrosterone » (produits par les glandes surrénales autant maternelles que fœtales) sont à l'origine de l'œstrone, de l'œstradiol et du 17β-œstradiol. Ces hormones participent au développement et à la croissance du fœtus mais aussi du placenta (prolifération de l'endomètre et inducteurs de croissance utérine). Enfin, elles possèdent également un effet inhibiteur sur la lactation.

### 1.2.3 Développement du placenta

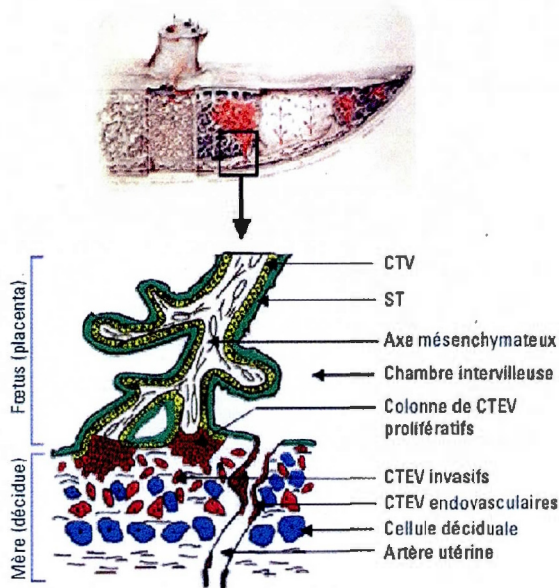
Durant les neuf mois de grossesse, vont s'orchestrer et se dérouler croissance, différenciation et vieillissement. Dès le 8<sup>ème</sup> jour après la fécondation et, à partir du trophoctoderme (épuisement du blastocyste), le placenta commence à se développer. Le placenta humain présente des spécificités uniques à l'espèce : il possède comme nous l'avons vu, des fonctions endocrines accrues, mais est également caractérisé par une importante invasion de la paroi utérine, une large et efficace surface d'échange et enfin un remodelage des vaisseaux utérins. La villosité choriale constitue l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. En première loge dans la chambre

intervilleuse, les villosités baignent dans le sang maternel provenant des artères utérines. Situées au site d'implantation, celles-ci s'ancrent dans l'endomètre constituant les « villosités crampons». Le constituant essentiel des villosités choriales est le trophoblaste, dont l'apparition succède aux étapes précoces de la nidation. Celui-ci se différencie suivant deux voies : le cytotrophoblaste vilieux et le cytotrophoblaste extravilleux (Figure 1.6).



**Figure 1.6 :** Représentation des deux voies de différenciation du cytotrophoblaste humain (Tsatsaris et al., 2008). On retrouve le cytotrophoblaste vilieux ou CTV qui, après un processus de fusion cellulaire, donne naissance au syncytiotrophoblaste (ST). D'autre part, le cytotrophoblaste extravilleux (CTEV) quant à lui prolifère et devient invasif, puis migre dans la décidue et le myomètre. Il colonisera les vaisseaux maternels (CTEV endovasculaire) ou se différenciera en cellules géantes plurinucléées.

### 1.2.3.1 Le cytotrophoblaste villex CTV



**Figure 1.7 :** Représentation schématique des villosités chorales ancrées dans l'endomètre (Tsatsaris et al., 2008). On retrouve le ST: syncytiotrophoblaste; le CTV: cytotrophoblaste villex; le CTEV prolifératifs, invasifs et endovasculaires

Le cytotrophoblaste CTV assure les échanges materno-fœtales ainsi que les fonctions endocrines du placenta. L'axe mésochymateux, constitué de vaisseaux sanguins et de cellules immunitaires est recouvert par le cytotrophoblaste (Figure 1.7). Celui-ci consiste en une couche irrégulière de précurseurs cellulaires ovoïdes mononucléés et possède l'importante caractéristique de fusionner pour former le syncytiotrophoblaste SCT (Kaufmann and Stegner, 1972), une masse protoplasmique multinucléée dont les limites cellulaires sont absentes et appelée syncytium. Ce processus de fusion cellulaire, s'établissant également *in vitro* est continu au cours de la grossesse et les syncytiotrophoblastes entrant en apoptose sont renouvelés par la couche cytotrophoblastique sous-jacente. Comprendre les mécanismes de fusion cellulaire impliqués demeure un défi pour de nombreux scientifiques. La possibilité d'isoler, de purifier et de mettre en culture les CT amène de nombreuses réponses quant à l'établissement et le maintien de cette couche syncytiale. *In vitro*, la fusion

des CT nécessite plusieurs facteurs : des facteurs solubles (des facteurs de croissance (Morrish et al., 1998)), des cytokines (Morrish et al., 1991), l'œstradiol, une pression partielle en oxygène élevée (Alsat et al., 1996), la présence de jonctions communicantes (connexine 3 (Cronier et al., 2001)) ou encore la présence de protéines d'origine rétrovirale, soit la Syncytine 1 et la Syncytine 2 (Chen et al., 2008; Frendo et al., 2003; Mi et al., 2000; Vargas et al., 2009).

### **1.2.3.2 Le cytotrophoblaste extravilleux CTEV**

Le cytotrophoblaste extravilleux est invasif et il est indispensable à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins. Un processus clé de la formation du placenta réside dans l'invasion des CTEV dans l'endomètre utérin (Figures 1.6 et 1.7). Les CTEV pénètrent en profondeur la muqueuse utérine. En fait, au niveau des villosités crampons, les CTEV se retrouvent polarisés et s'organisent en colonne le long d'une lame basale. Progressivement, ces cellules perdent leur pouvoir prolifératif et deviennent invasives. Elles migrent alors jusqu'à la décidue et le myomètre et se différencient en cellules géantes plurinucléées ou colonisent les vaisseaux sanguins formant ainsi le CTEV endovasculaire en contact direct avec le sang maternel. Cette invasion des artères spiralées est un processus physiologique indispensable à la croissance et au développement du fœtus puisqu'il favorise l'apport de sang dans l'espace intervilleux. De façon importante, ces cellules interagissent avec les cellules déciduales mais aussi avec les macrophages, les lymphocytes T ou encore les uNK (*uterine natural killer*) et jouent ainsi un rôle important dans le non-rejet de l'unité fœtus-placenta.

Parmi les nombreuses protéines impliquées dans la formation du placenta, et tel qu'évoqué précédemment, on retrouve certaines protéines Env appartenant à des séquences d'HERVs. Ces dernières ont été caractérisées comme étant indispensables

à la formation du placenta ainsi qu'au maintien de la couche syncytiale. Il s'agit de la Syncytine 1 et de la Syncytine 2.

#### 1.2.4 Syncytine 1 et syncytialisation

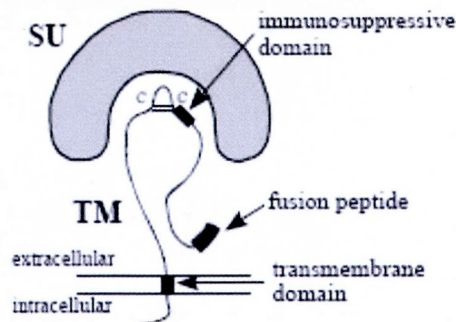
La famille HERV-W est constituée d'un nombre imposant de membres et, en moyenne, ils font partie du génome des primates depuis 25 millions d'années. En 2000, Mi *et al* ont identifié un membre de la famille HERV-W à un locus baptisé ERVWE1 qui codait pour une protéine de 60 kDa : la Syncytine 1 (Blond *et al.*, 1999b; Mi *et al.*, 2000). Cette protéine d'origine rétrovirale est composée de différents domaines, d'une glycoprotéine de surface et d'une région transmembranaire, où se trouve notamment la région du peptide fusion (Figure 1.8). La Syncytine 1 contient également un domaine immunosuppresseur qui pourrait aussi jouer un rôle dans la protection du fœtus face à la réponse immune maternelle (Cheynet *et al.*, 2005; Costas, 2002). Une équipe dans le Massachusetts a démontré que l'expression du gène de la Syncytine 1 chez l'Humain était limitée (sur 23 tissus étudiés) aux testicules 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.*, 1999b). Dans le génome humain, indépendamment de multiples séquences d'ADN retrouvées dans divers chromosomes, il semble que ce gène *env* de HERV-W 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 des 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 fusogénique de la Syncytine 1 a été étudié initialement dans des cellules COS-7 en culture. La transfection de ces cellules entraîne la formation de grands syncytia



(cellules multinucléées) par fusion des cellules. Il y a maintenant plus d'une dizaine d'années et pour la première fois, l'action fusogénique directe de la Syncytine 1 a ainsi été mise en lumière. Par la suite, des cellules COS-7 transfectées avec un vecteur d'expression de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) ont été mises en coculture 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). Tel qu'attendu, d'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 trophoblastique BeWo, il avait été démontré que l'addition de la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) a pour effet d'engendrer des événements de fusion cellulaire (Lyden et al., 1993). De façon intéressante et, en réponse à cette addition de la forskoline, il a été observé 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 la transcription de la Syncytine 2 n'a été observée. Finalement, *in vitro*, le niveau d'expression transcriptionnelle 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, par ces nombreuses évidences, la protéine codée par ce gène *env* de HERV-W a été suggérée comme étant responsable de la fusion des cellules cytotrophoblastiques, un processus clé dans la formation et le maintien de 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 de fusion, C-C : représente des ponts disulfures. Image tirée de Parseval N. *et al.*, 2005 (de Parseval and Heidmann, 2005).

#### 1.3.4 Rôles et fonctions controversés de la Syncytine 1

Tel que vu précédemment, de nombreuses évidences concernant l'implication de la Syncytine 1 dans la fusion des trophoblastes ont été révélées, mais sa fonction et surtout sa localisation dans le placenta humain restent encore 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 a détecté 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 l'ont détectée cette fois dans la partie apicale du syncytiotrophoblaste (Lee *et al.*, 2001), alors que Potgens *et al.* ont publié que la protéine est uniformément localisée dans le cytotrophoblaste dans des placentas pré-

éclampsiques à terme et avant terme (Potgens et al., 2004a). Utilisant des techniques comme l'immunobuvardage et l'immunohistochimie, Smallwood et ses collègues ont montré un plus haut niveau d'expression de la Syncytine 1, principalement détectable au niveau du trophoblaste extravilleux 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. Aussi, 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 entre autres par sa localisation cellulaire, ne semble pas être approprié quant au rôle à remplir : celui d'assurer les événements de fusion des cytotrophoblastes (Blond et al., 2000; Huppertz et al., 2006; Knerr et al., 2004; Lavillette et al., 2002; Potgens et al., 2004b). Au cours des dernières années, notre équipe a clairement démontré qu'une autre protéine d'enveloppe d'HERVs, nommée Syncytine 2 joue un rôle déterminant dans ces événements fusogéniques et ce, de façon plus importante que la Syncytine 1. De plus, lors de ces travaux, la localisation cellulaire de la Syncytine 1, contrairement à la Syncytine 2, n'est pas apparue membranaire comme attendue. La Syncytine 1 semble être localisée et se déplacer le long de filopodes ou extensions membranaires. Un rôle dans le rapprochement ou le contact entre deux ou plusieurs cellules lui semblerait plus approprié que celui dans la fusion proprement dite. Un fait important a été de noter que la régulation transcriptionnelle ainsi que la localisation cellulaire de la Syncytine 2 corrélerent parfaitement avec les événements fusogéniques des cytotrophoblastes (Vargas et al., 2009).

### 1.3.5 La Syncytine 2

La Syncytine 2, protéine fusogénique appartenant à une autre séquence d'HERV, a d'abord été décrite comme pouvant potentiellement avoir un rôle physiologique dans la placentation humaine (Blaise et al., 2003). Codée par le gène *env* de la famille HERV-FRD, elle fait suite à un événement d'intégration qui a eu lieu il y a environ 40 millions d'années (Renard et al., 2005). De façon intéressante, cette protéine de 75 kDa est exprimée spécifiquement au niveau du placenta (Blaise et al., 2003). Elle 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 dans 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. Notre équipe a caractérisé le transcript correspondant à la Syncytine 2 et ses patrons d'expression ont été établis, et ce, dans différentes lignées cellulaires trophoblastiques ainsi qu'au sein de cytotrophoblastes humains en cours de différenciation. De façon intéressante, la localisation membranaire ainsi que le caractère fusogénique de la Syncytine 2 prépondérant à celui de la Syncytine 1 ont été clairement mis en évidence (Chen et al., 2008; Renard et al., 2005; Vargas et al., 2009). Enfin, des analyses de séquence de cette protéine d'enveloppe d'HERVs suggéraient qu'elle possède également un domaine immunosuppresseur (Renard et al., 2005).

### 1.3.6 Rôle immunosuppresseur des Syncytines

Tout comme les rétrovirus infectieux, les protéines d'enveloppe Syncytine 1 et Syncytine 2 possèdent un domaine immunosuppresseur ou ISD, situé au niveau de la sous-unité transmembranaire de l'enveloppe (Figure 1.8). Ce domaine consiste en une région dont la séquence conservée code pour le peptide 17-mer CKS17: LQNRRGLDLLFLKEGGL (Sugimoto and Schust, 2009). L'immunosuppression est

une propriété essentielle à la propagation virale et les enveloppes pourraient donc avoir conservé cette propriété. L'équipe du Dr Heidmann a démontré dans des tests *in vivo* utilisant un modèle murin, que la Syncytine 2 avait des propriétés immunosuppressives induisant ainsi le non-rejet de la tumeur (Mangeny et al., 2007b). Concernant la Syncytine 1, des évidences concernant la modulation de la réponse immunitaire via des particules véhiculant la Syncytine 1 et sécrétés par les tissus placentaires ont été récemment démontrées (Holder et al., 2012b; Tolosa et al., 2012a). Ainsi, les Syncytines pourraient avoir une place dans l'établissement de la tolérance immunologique de la mère face à l'unité foeto-placentaire.

La théorie de cette équipe française mise en avant est qu'il y a plus d'une centaine de millions d'années « un placenta prototype chez un vertébré ovipare a bénéficié de la capture d'une enveloppe rétrovirale fondatrice dotée des capacités immunosuppressives de son ancêtre viral et, qui aurait permis la prise de greffe des tissus fœtaux dans l'organisme maternel ». Ainsi, au cours de l'évolution, et à travers de nouvelles infections rétrovirales, les enveloppes capturées ont progressivement été remplacées donnant naissance aux différentes Syncytines connues aujourd'hui (Dupressoir and Heidmann, 2011).

### **1.3.7 Interactions de la Syncytine 1 et 2 et systèmes 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 également 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. De plus, Hayward *et al* ont mis en

évidence leur localisation majoritairement située au niveau du cytotrophoblaste (Hayward et al., 2007).

Récemment, l'équipe du Dr Heidmann a identifié le récepteur de la Syncytine 2. Bien distinct de celui utilisé par la Syncytine 1, le récepteur MFSD2a pour « Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a », fait partie de la famille des transporteurs d'hydrates de carbone comprenant 10 à 12 domaines d'ancrage à la membrane. Conservé au cours de l'évolution, le gène codant pour le récepteur MFSD2a est localisé sur la position chromosomale 1p34.2 (Esnault et al., 2008). De façon intéressante, notons que le récepteur spécifique de la Syncytine 2 a été démontré comme étant localisé strictement au niveau du syncytiotrophoblaste révélant indiscutablement l'implication de ce complexe dans les événements fusogéniques des cytotrophoblastes (Esnault et al., 2008).

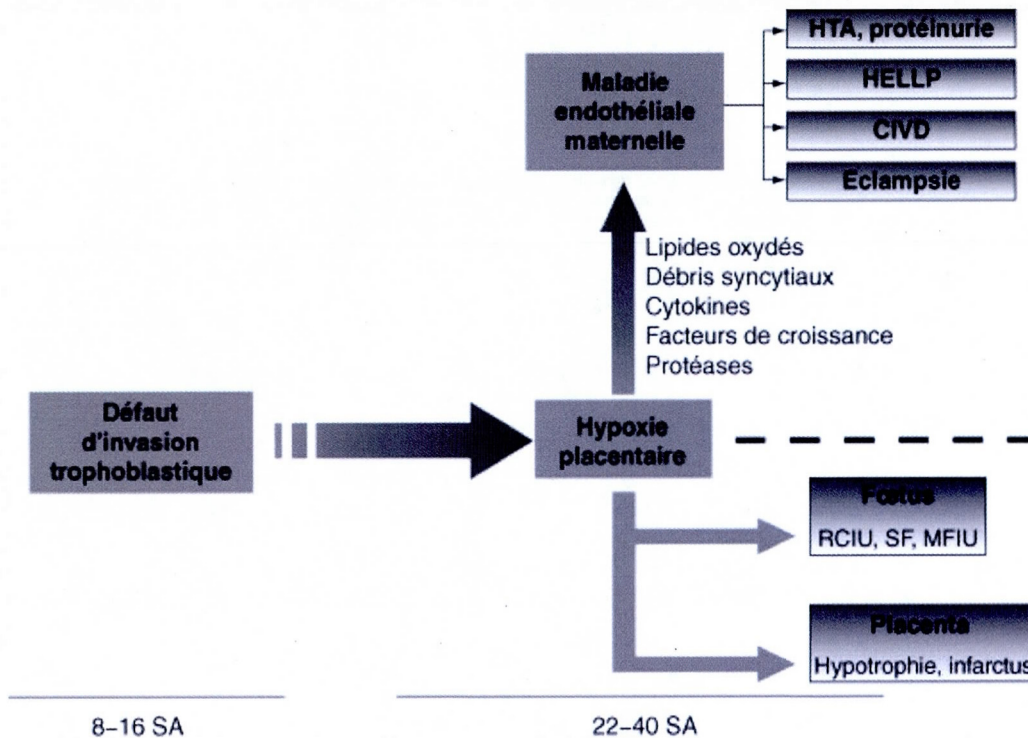
### 1.3.8 Autres protéines d'enveloppe d'HERVs

Récemment, d'autres protéines d'enveloppe ont été identifiées et ont suscité un intérêt aussi particulier que celui porté envers la Syncytine 1 et la Syncytine 2 (Kjeldbjerg et al., 2008b; Villesen et al., 2004a, b). Il s'agit notamment d'EnvP(b), s'apparentant au gène *env* d'un provirus de l'espèce *Danio rerio* (oisson zèbre) et ainsi appartenant à la famille ZFERV. Quelques-unes des caractéristiques intéressantes d'EnvP(b) sont i) qu'elle est ubiquitaire, notamment exprimée dans le placenta, ii) qu'elle possède un puissant pouvoir fusogénique et enfin iii) qu'elle renferme un domaine immunosuppresseur (Blaise et al., 2005a). 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, elle possède un domaine immunosuppresseur et son expression est placenta spécifique (Blaise et al., 2005a).

Ces deux protéines d'enveloppe rétrovirale pourraient intervenir à différents niveaux dans l'établissement et le maintien des fonctions placentaires : 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. Les étudier est primordial afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la placentation.

### 1.3.9 HERVs et Pré-éclampsie

L'étude de l'ensemble de ces gènes d'HERVs devient essentielle quant à la compréhension des mécanismes de fusion cellulaire des cytotrophoblastes. Aussi, leurs études conduiront à élucider les phénomènes à l'origine des pathologies liées à un dysfonctionnement du placenta comme la pré-éclampsie (Lee *et al.*, 2001 ; Knerr *et al.*, 2004.). Cette maladie, caractérisée par une hypertension artérielle ( $\geq 14/9$  cm Hg), associée à une protéinurie ( $\geq 0,30$ g/24h) dès la 20<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (Wilson *et al.*, 2003) et une prise de poids avec œdèmes, est fréquente en cas de grossesse gémellaire et de première grossesse (3-5% des grossesses (Maynard *et al.*, 2008)). Même si aucun marqueur précoce n'est aujourd'hui connu, les données moléculaires basées sur des études anatomo-pathologiques prédisent l'origine du désordre comme étant un défaut initial de la placentation. Les différentes étapes seraient d'abord i) un défaut de remodelage vasculaire utérin en lien avec un défaut d'invasion trophoblastique à l'origine d'une hypo-perfusion de la chambre intervillieuse, ii) une hypoxie placentaire ainsi qu'un stress oxydant menant à un dysfonctionnement généralisé du syncytiotrophoblaste et enfin, iii) un dysfonctionnement de l'endothélium maternel dû à une libération par le placenta de diverses substances telles que des radicaux libres, des lipides oxydés, des cytokines et sVEGFR qui eux sont à l'origine des signes cliniques de la maladie (problèmes rénales et cardiovasculaires) (Figure 1.9) (Tsatsaris *et al.*, 2010).



**Figure 1.9 :** Physiopathologie de la pré-éclampsie. Tirée de (Tsatsaris et al., 2010). CIVD : coagulopathie intravasculaire disséminée ; HTA : hypertension artérielle ; HELLP : Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count ; MFIU : mort fœtale *in utero* ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; SF : souffrance fœtale.

Aussi, l'identification de deux protéines anti-angiogéniques, la « soluble-fms-like tyrosine kinase-1 » et l'endogline soluble, produites en excès par le placenta au cours de la pré-éclampsie, permet de relier l'anomalie placentaire au dysfonctionnement endothélial. Leur production excessive entraîne un dysfonctionnement endothélial en bloquant l'action vasculaire des facteurs pro-angiogéniques circulants comme le « placental growth factor », le « vascular endothelial growth factor » et le « transforming growth factor-beta ». (Chaiworapongsa et al., 2004; Hertig et al., 2004; Levine et al., 2006; Maynard et al., 2003; McKeeman et al., 2004; Venkatesha et al., 2006). De nombreux facteurs placentaires ont ainsi déjà été mis en évidence, mais aucun n'a clairement démontré sa capacité à reproduire les lésions typiques de la pré-éclampsie. De façon intéressante,



la couche syncytiotrophoblastique du placenta semble contribuer au relargage abondant de ces facteurs solubles régulant la réponse inflammatoire (Hedlund et al., 2009). Il apparaît donc essentiel d'étudier les processus d'établissement et de maintien de cette couche syncytiotrophoblastique en vue d'élucider une nouvelle approche thérapeutique potentielle de ce syndrome maternel. Comme énoncé précédemment, certains rétrovirus endogènes, comme la Syncytine 1 et la Syncytine 2, se retrouvent à la surface de syncytiotrophoblastes qui constituent la couche syncytiotrophoblastique proprement dite. Les HERVs, dont certains sont dotés d'un peptide fusion ainsi que d'un domaine immunosuppresseur, pourraient ainsi trouver une place dans le processus conduisant à ces défauts placentaires, que sont le maintien de la couche syncytiotrophoblastique et la réponse d'immunosuppression materno-fœtal. De récentes études ont noté une certaine altération de l'expression de la Syncytine 1 et 2 dans le tissu placentaire dans le cas de patientes présentant les symptômes d'une pré-éclampsie (Chen et al., 2006; Keith et al., 2002; Knerr et al., 2002; Knerr et al., 2004 ; Kudaka et al., 2008 ; Langbein et al., 2007 ; Lee et al., 2001 (Chen et al., 2008).

Enfin, de récentes études ont démontré que comparativement à celui de patientes « saines », le placenta de patientes présentant les symptômes d'une pré-éclampsie, semblait en plus des déchets, relarguer dans la circulation sanguine une quantité plus importante de vésicules ou particules membranaires (Chen et al., 2012; Gardiner et al., 2011; Goswami et al., 2006; Knight et al., 1998; Redman et al., 2012).

## **1.4 Les exosomes**

### **1.4.1 Découverte des exosomes**

L'étymologie du mot exosome vient du grec *exô-* qui signifie hors de, et de *sôma*, signifiant corps. Découverts il y a une vingtaine d'année, les exosomes sont de petites vésicules membranaires d'environ 50 à 100 nm, adoptant en microscopie électronique une forme de coupelle. De façon intéressante, ils sont sécrétés par diverses cellules comme les réticulocytes et les cellules présentatrices d'antigène (Sabapatha et al., 2006). Longtemps considérés comme un artéfact expérimental et après de multiples recherches, ce n'est qu'au début des années 80 qu'une équipe montréalaise a clairement révélé l'existence des exosomes et identifié un nouveau processus de relargage de vésicules indépendant de celui du bourgeonnement de la membrane plasmique (Johnstone et al., 1984; Pan et al., 1983; Pan and Johnstone, 1984; Pan and Johnstone, 1983; Pan et al., 1985).

### **1.4.2 Biogenèse des exosomes**

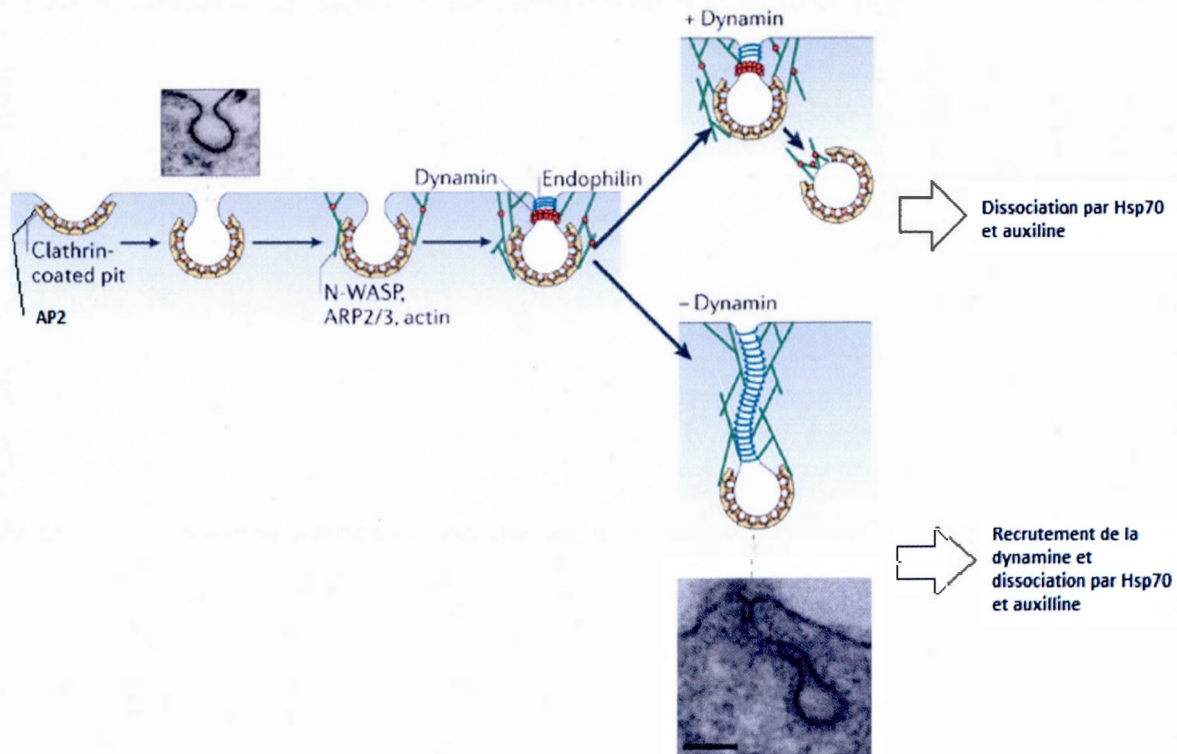
#### **1.4.2.1 Endocytose**

L'entrée d'une protéine, d'une particule ou encore le trafic de la plupart des récepteurs membranaires est un mécanisme faisant intervenir deux voies distinctes: la voie dépendante et indépendante de la clathrine.

#### **-Voie d'endocytose dépendante de la clathrine**

Des études en microscopie électronique conduites en 1964 ont illustré une structure dense aux électrons ayant la forme d'un puits et l'allure d'une vésicule recouverte d'un manteau (Roth and Porter, 1964). Ce n'est qu'une dizaine d'années

plus tard que la clathrine a été clairement identifiée (Pearse, 1975). Cette dernière consiste en un hétérodimère avec une chaîne lourde (180 kDa) et une chaîne légère (30k Da). On la retrouve dans le cytosol sous la forme d'un triskelion, où 3 trimères de chaînes lourdes (chacune associée à une chaîne légère) sont associés entre eux. L'association de plusieurs triskelions permet la formation de « cages » capables d'entourer une vésicule. Ce processus requiert le recrutement de protéines du complexe hétérotétramérique, soit les AP pour « Adaptor Protein » (Pearse and Robinson, 1984). Une fois le manteau de clathrine formé, la membrane plasmique subit une invagination puis une fission requérant la dynamine, une GTPase s'associant en multimères et formant un anneau autour du col de la membrane plasmique (De Camilli et al., 1995). Suivant une étape d'hydrolyse du GTP, il y a alors un changement de conformation conduisant à la séparation des deux unités (la membrane plasmique et la vésicule endocytée). Dans la majorité des cas, la vésicule libérée perd son manteau de clathrine. Cette dissociation requiert l'activité ATPase d'Hsc70, active en présence de l'auxiline (Ungewickell et al., 1995). La vésicule endocytée peut alors fusionner avec un endosome précoce.



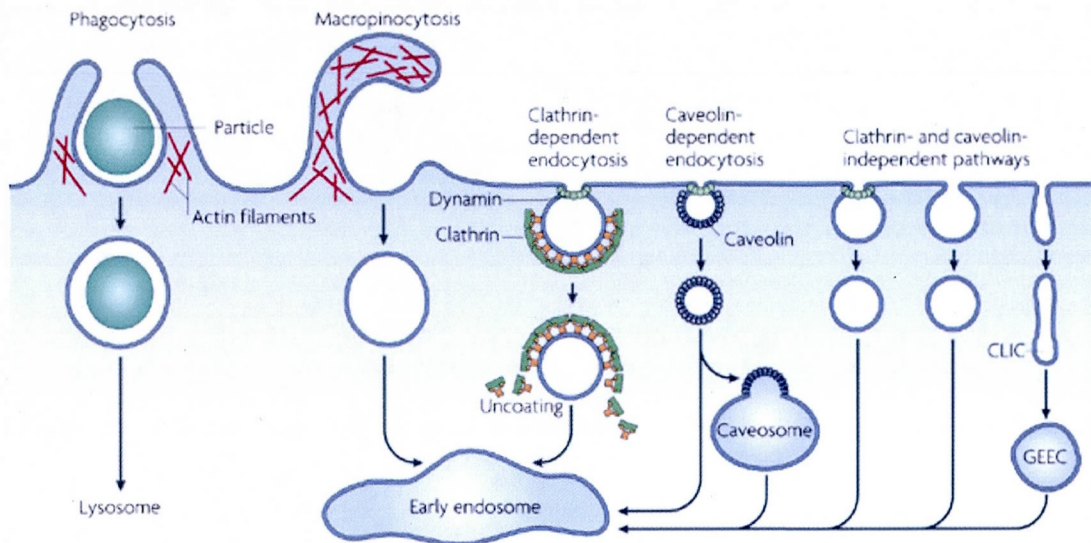
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 1.10 :** Représentation des différentes étapes de l'endocytose clathrine-dépendante. Adaptée de (Ferguson and De Camilli, 2012). L'association de plusieurs triskelions de clathrine permet la formation de « cages » capables d'entourer une vésicule. Le complexe AP2 est alors recruté à la membrane plasmique permettant ainsi la formation d'un manteau de clathrine. La membrane plasmique subit une invagination puis une fission requérant la dynamine, une GTPase s'associant en multimères et formant un anneau autour du col de la membrane plasmique, induisant le relargage de la vésicule recouverte de clathrine.

#### -Voies d'endocytose indépendantes de la clathrine

On retrouve 4 voies distinctes d'endocytose indépendantes de la clathrine: soit la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la cavéoline et

enfin l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Figure 1.11) (Mayor and Pagano, 2007).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 1.11** : Représentation des différentes voies de l'endocytose. Tirée de (Mayor and Pagano, 2007). Formant d'importantes vésicules, la macropinocytose (entrée de fluides) et la phagocytose (grosses particules) sont deux processus requérant le remodelage de l'actine. Outre les mécanismes dépendants de la clathrine, d'autres mécanismes nécessitent la présence de la dynamine, à savoir l'endocytose dépendante de la cavéoline ou encore les voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline ou intermédiaire tubulaire CLIC (*clathrin and dynamin independent carriers*) (vésicules issues de la membrane plasmique).

Brièvement, la phagocytose est un procédé adopté par certaines cellules (monocytes, neutrophiles et macrophages) visant à capturer et éliminer des particules, bactéries ou cellules mortes. La macropinocytose est le résultat d'une invagination de la membrane cytoplasmique, requérant une dynamique du réseau d'actine et une modification de la bicouche lipidique avec une production active du PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). La voie dépendante des cavéoles est commune aux cellules endothéliales et épithéliales (Rothberg et al., 1992). Les

cavéoles enrichies en cholestérols et glycosphingolipides sont utilisées pour l'entrée de certains virus comme SV40 (Norkin and Kuksin, 2005) ou de bactéries. Finalement, ce processus peut également être mis en place en réponse à l'agrégation de protéines « glypiées » (Kurzchalia and Parton, 1999). Enfin, la dernière voie (endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline) fait intervenir les rafts ou radeaux lipidiques riches en cholestérols, sphingolipides et sphingomyélines mais pauvres en DHA (Acide DocosaHexaénoïque). C'est un processus commun et efficace pour le recyclage de certains lipides ou récepteurs.

#### 1.4.2.2 Les différents endosomes

Une fois endocytées, les vésicules libérées vont emprunter la voie endosomale. On distingue ensuite l'endosome précoce, l'endosome tardif, le lysosome et le corps multivésiculaire ou MVB.

##### - Endosome Précoce

Après endocytose, on retrouve en premier lieu l'endosome de tri. Étant acide (pH 6,5), celui-ci permet la dissociation des interactions récepteurs/ligands (Johnson et al., 1993). Les récepteurs ou ligands sont alors triés et transportés vers la voie de recyclage (dans l'endosome de recyclage), directement vers la membrane plasmique ou vers une voie de dégradation. Notons que la voie de recyclage requiert le réseau d'actine et les myosines type I et type II.

##### - Endosome Tardif

Issu directement de l'endosome de tri, l'endosome tardif est enrichi en protéines de l'endosome précoce, mais également en protéines de la voie de néosynthèse. La maturation de l'endosome tardif implique plusieurs modifications, dont une

acidification (pH 5,5) (activité de l'ATPase vacuolaire) mais aussi un enrichissement ou un appauvrissement pour certaines protéines. Ces endosomes adoptent une morphologie multilamellaire ou multivésiculaire tout en se mobilisant de la périphérie cellulaire vers la région périnucléaire. Les différents compartiments multivésiculaires ainsi générés peuvent, soit fusionner entre eux ou encore fusionner avec le lysosome (Antonin et al., 2000; Luzio et al., 2000). Notons que l'endosome tardif peut également représenter un réservoir pour certaines protéines en attente de triage (Kleijmeer et al., 2001).

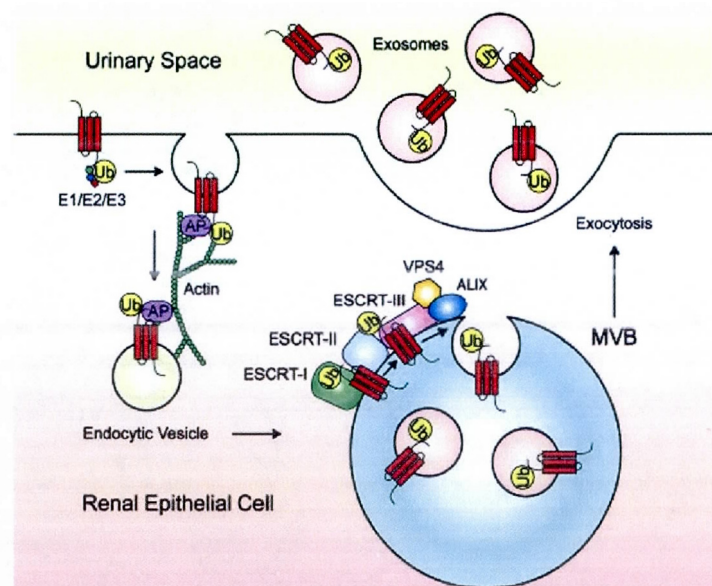
#### - Lysosome

Il s'agit de l'étape finale de la voie de dégradation. Le lysosome se distingue de l'endosome tardif par l'absence de récepteur pour le mannose-6-phosphate et par l'augmentation de la concentration de nombreuses autres protéines (la famille des LAMP), le rendant plus dense. Plus acide (pH 4,5) et possédant ainsi une grande activité dégradative, le lysosome est dépourvu de membrane interne. Ainsi, sous l'action des enzymes lysosomales (hydrolases acides), les protéines et lipides contenus dans la vésicule sont dégradés (Luzio et al., 2000). Le lysosome est aussi le lieu de dégradation des vésicules d'autophagie et de phagocytose (Funato et al., 1997; Lawrence and Brown, 1992).

#### - MVB

Les MVB sont au centre d'un important trafic intracellulaire. En effet, une multitude de protéines ou de lipides destinés à la libération ou encore à la dégradation passe par le MVB (Luzio et al., 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, l'endosome tardif peut également fusionner avec d'autres compartiments multivésiculaires et ne pas emprunter la voie lysosomale. Les signaux correspondant à cette issue sont dits dépendants ou indépendants de l'ubiquitine.

De nombreuses protéines transmembranaires possèdent un signal pour l'ubiquitilation (Levkowitz et al., 1998) et l'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine est suffisante pour la reconnaissance par Tsg101 et les protéines du complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) qui sont responsables du tri vers le domaine ILV (*IntraLuminal Vesicles*) via des interactions protéiques et lipidiques (Figure 1.12 et 1.13). La machinerie ESCRT est composée de quatre complexes protéiques, incluant les membres ESCRT-0, I, II, III et des facteurs comme Alix et VSP4 (une ATPase). ESCRT-0 et I (incluant Tsg101) joue un rôle dans la reconnaissance et le recrutement des protéines monoubiquitilées aux endosomes, tandis que ESCRT-II, ESCRT III et Alix jouent un rôle dans le remodelage de la membrane endosomale. Ce processus est réalisé par le biais d'interactions protéine/protéine et protéine/lipide médiant l'invagination de la membrane endosomale. Finalement, l'enzyme Doa4 s'associe à ESCRT III et déubiquitine les cargos qui se retrouvent alors dans les invaginations formant ainsi des vésicules. VSP4 se rajoutant à ce dernier complexe désassemble les complexes et permet le recyclage de ceux-ci.



**Figure 1.12 :** Représentation des différentes étapes de la formation du MVB et recrutement de la machinerie ESCRT. Tirée de (Pisitkun et al., 2004). La machinerie



ESCRT composée des membres ESCRT-0 et ESCRT-I, assure la reconnaissance et le recrutement des protéines monoubiquitinées aux endosomes et ESCRT-II, ESCRT III et Alix jouent un rôle dans le remodelage de la membrane endosomale. Doa4 s'associe à ESCRT III et déubiquitine les cargos se retrouvant dans les invaginations formant des vésicules. VSP4 s'associe au complexe, désassemble les complexes et permet leur recyclage.

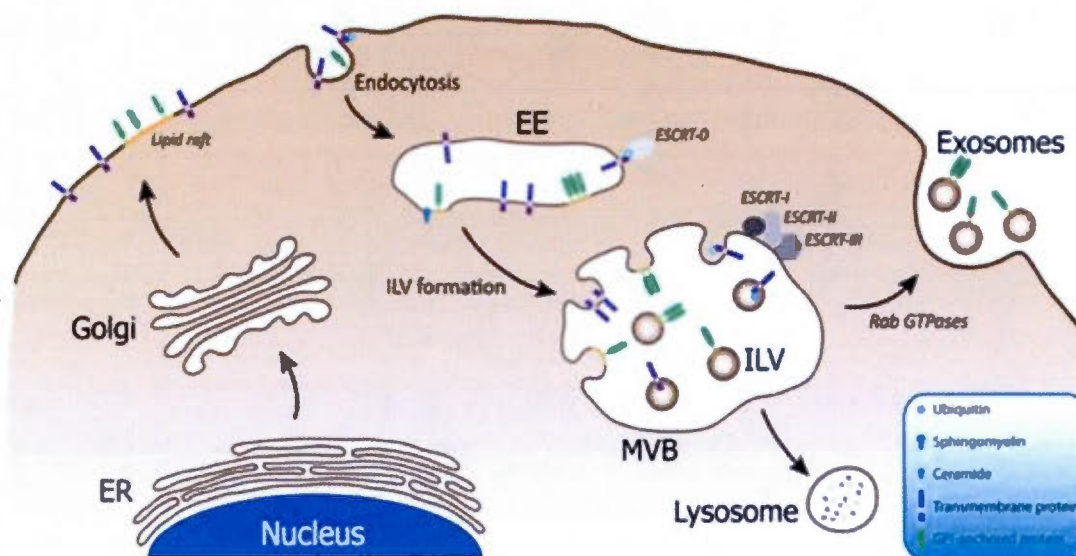
D'autres signaux indépendants de l'ubiquitine mais recrutant la même machinerie cellulaire (ESCRT) semblent coexister. Initialement, dans un modèle de levure, il a été démontré que la protéine membranaire Sna3 était capable de recruter les membres du complexe ESCRT indépendamment des signaux ubiquitines et ce via une séquence N-terminale contenant une tyrosine et un motif PPAY reconnu par l'ubiquitine ligase Rsp5. Aussi, lors de la maturation du réticulocyte humain, il a été démontré que le tri du récepteur de la transferrine est assuré via une reconnaissance du motif tyrosine (YTRF) par la protéine Alix capable d'interagir avec les membres de la famille ESCRT (Blanc and Vidal, 2010).

Indépendamment du complexe ESCRT, d'autres acteurs peuvent aussi être mis en jeu : les céramides (Trajkovic et al., 2008), les protéines annexines (White et al., 2006) ou encore les lysobisphosphatidiques (Matsuo et al., 2004). Finalement, un dernier mécanisme a été suggéré et ferait intervenir des processus d'oligomérisation à haut degré (Fang et al., 2007).

### 1.4.3 Libérations des exosomes

Les MVB peuvent servir de compartiment intermédiaire mais possèdent également la capacité de fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu, les exosomes, dans le milieu extracellulaire (Figure 1.12 et 1.13). Ce phénomène de fusion nécessite l'intervention de Rab27 (une GTPase) couplée à Sl4-a (une protéine effectrice). De façon générale, les membres de la famille Rab sont au

cœur du trafic intracellulaire et contrôlent celui-ci en recrutant plusieurs protéines effectrices ou en médiant la migration de vésicules vers la surface de la cellule.



**Figure 1.13** : Représentation des différentes étapes de la biogenèse des exosomes. Tirée de [biochemistry.unimelb.edu.au](http://biochemistry.unimelb.edu.au). Issu d'un processus d'endocytose, l'endosome précoce continue sa maturation et subit de nombreuses invaginations (*ILV formation*), donnant naissance au corps multivésiculaire (MVB). Ce dernier migre vers la membrane plasmique et fusionne avec celle-ci, libérant ainsi les exosomes dans le milieu extracellulaire.

#### 1.4.4 Les marqueurs des compartiments endosomaux

Outre la variation de l'acidité, différents marqueurs connus aujourd'hui nous permettent de discriminer les différents compartiments endosomaux et les lysosomes. Les endosomes précoces sont représentés par certains membres de la famille Rab, à savoir Rab4, Rab5 et Rab11 ainsi que par la protéine EEA1 (une protéine de liaison aux phosphoinositides médiant la fusion entre la vésicule endocytée et l'endosome précoce). Pour ce qui a trait aux endosomes tardifs, ceux-ci sont associés à Rab7 et Rab9. Les lysosomes pour leur part sont enrichis en LAMP, une glycoprotéine

retrouvée spécifiquement à la membrane lysosomale. Il existe également des « lysosensors » ou lysocapteurs acidotropiques (commerciallement disponibles) qui s'accumulent dans les organelles acides.

### 1.4.5 Type de vésicules

Aujourd'hui, nous connaissons plusieurs types de vésicules, se différenciant par leur taille, leur forme et leur composition lipidique et protéique. On retrouve ainsi les exosomes, les microvésicules, les ectosomes, les particules membranaires, les exosomes-like particules et enfin, les vésicules apoptotiques. Le tableau suivant en résume les différentes caractéristiques.

Feature*	Exosomes	Microvesicles	Ectosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–100 nm	100–1,000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density in sucrose	1.13–1.19 g/ml	ND	ND	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Appearance by electron microscopy†	Cup shape	Irregular shape and electron-dense	Bilamellar round structures	Round	Irregular shape	Heterogeneous
Sedimentation	100,000 g	10,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g, 10,000 g or 100,000 g
Lipid composition	Enriched in cholesterol, sphingomyelin and ceramide; contain lipid rafts; expose phosphatidylserine	Expose phosphatidylserine	Enriched in cholesterol and diacylglycerol; expose phosphatidylserine	ND	Do not contain lipid rafts	ND
Main protein markers	Tetraspanins (CD63, CD9), Alix and TSg101	Integrins, selectins and CD40 ligand	CR1 and proteolytic enzymes; no CD63	CD133; no CD63	TNFR1	Histones
Intracellular origin	Internal compartments (endosomes)	Plasma membrane	Plasma membrane	Plasma membrane	Internal compartments?	ND

**Tableau 1.1** : Caractéristiques physicochimiques des différents types de vésicules sécrétées. Tiré de (Thery et al., 2009).

#### 1.4.6 Composition des exosomes

Les exosomes sont reconnus pour être libérés par une variété de types cellulaires. Citons notamment les cellules hématopoïétiques, les cellules tumorales ou encore les cellules épithéliales. De façon intéressante, on les retrouve également dans divers fluides biologiques comme le sang, le plasma (Caby et al., 2005), les urines (Keller et al., 2007; Pisitkun et al., 2004), la salive (Michael et al., 2010) ou encore le liquide amniotique (Asea et al., 2008).

Dépendamment du type cellulaire dont ils sont originaires, mais aussi des signaux extracellulaires, leur composition varie (Figure 1.14).

##### -Protéines ubiquitaires

De façon ubiquitaire, on retrouve les protéines du cytosquelette, telles que l'actine, la tubuline et la moésine (Thery et al., 1999). Celles-ci ne semblent cependant avoir aucun rôle dans la biogenèse des exosomes.

Citons également la famille des tétraspanines dont, CD63, CD81, CD9 et CD82. Ces glycoprotéines possédant quatre domaines transmembranaires vont s'associer entre elles ou avec d'autres protéines, telles que les intégrines, ou encore avec des molécules de cholestérols et former des réseaux au sein des membranes et ainsi un complexe d'adhésion (Hemler, 2003).

De nombreuses protéines ancrées dans les membranes endosomales par un glycoposphatidylinositol (GPI) se retrouvent enrichies dans les exosomes, telles que l'acétylcholinestérase (AChE), CD55 et CD59 (Johnstone et al., 1987; Rabesandratana et al., 1998).

La plupart des exosomes sont également composés de protéines chaperones comme Hsc70 et Hsp90. Leur rôle dans la biogenèse des exosomes reste peu élucidé, mais des études leur attribuent une implication dans la charge des peptides

antigéniques sur les molécules du CMH et ainsi dans l'activation de la réponse immunitaire (Chaput et al., 2004).

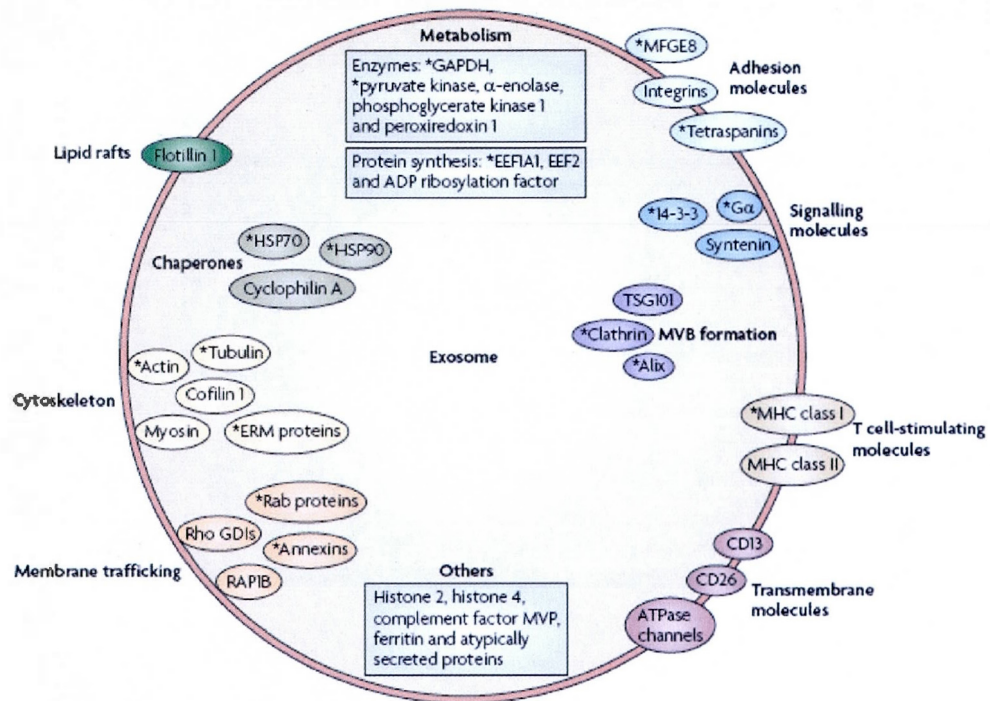
Enfin, et comme évoqué précédemment, on retrouve également les différents acteurs intervenant dans la biogenèse des exosomes: les GTPase (la famille des Rab), les annexines, les différentes protéines des complexes ESCRT et la protéine adaptatrice Alix capable de recruter VAMP4, une sous-unité du complexe ESCRT-III.

#### -Lipides

À l'heure actuelle, peu d'information existe quant à la composition et l'enrichissement lipidique des exosomes. Cependant, on semble retrouver un ratio phospholipide/cholestérol similaire à celui de la membrane plasmique mais avec un enrichissement en cholestérol (Vidal et al., 1989; Wubbolts et al., 2003).

#### -Les acides ribonucléiques

Les exosomes sont connus pour renfermer de nombreuses molécules de miARN et d'ARNm (Mathivanan et al., 2010; Simons and Raposo, 2009). Leur spécificité dépendra du type cellulaire concerné et de l'état de différenciation/d'activation de la cellule dont les exosomes sont issus (Valadi et al., 2007).



**Figure 1.14 :** Composition protéique des exosomes (analyse comparative de 15 études protéomiques différentes). Tirée de (They et al., 2009).

### -Protéines spécifiques

Bien que les études sur les exosomes se multiplient, la composition protéique détaillée de tous les types cellulaires sécréteurs d'exosome est encore peu connue. Des plus étudiées, nous avons les exosomes de cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les exosomes de réticulocytes.

Les exosomes issus des CPA dont les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les mastocytes ainsi que les cellules épithéliales intestinales, se retrouvent enrichis en molécules du CMH soit, CMH-I et CMH-II ainsi qu'en la molécule de costimulation CD86 (They et al., 1999; van Niel et al., 2001).

Concernant les exosomes de réticulocytes, le RTf en est le marqueur par excellence. Les exosomes de réticulocytes peuvent également contenir à leur surface

des transporteurs de nucléosides, de glucoses et d'acides aminés (Johnstone, 1992; Johnstone and Ahn, 1990; Johnstone et al., 1989). Ils renferment finalement la phospholipase A2 et D (Bette-Bobillo and Vidal, 1995; Laulagnier et al., 2004).

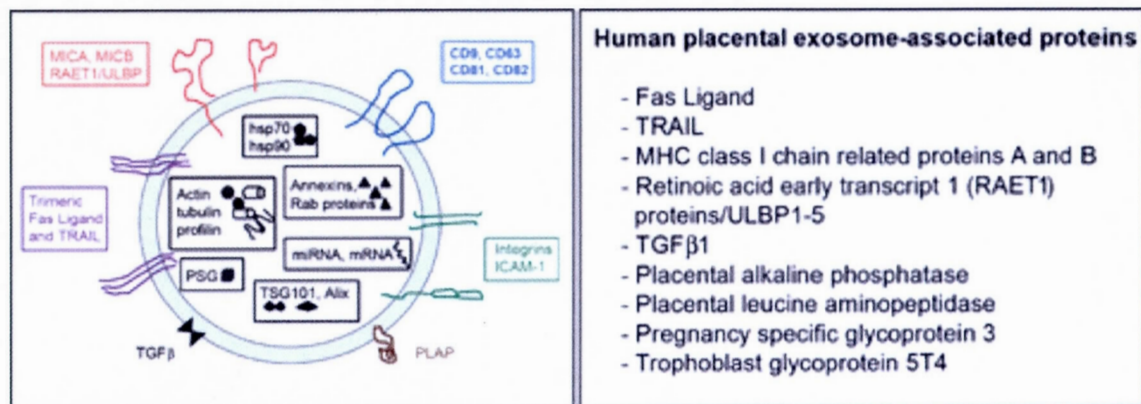
Enfin, ce sont les exosomes placentaires qui ont suscité notre intérêt. Peu de choses sont connues à l'heure actuelle et leur composition reste encore à découvrir. Les seules informations disponibles dans la littérature concernent les exosomes i) issus du sang périphérique de femmes enceintes (Sabapatha et al., 2006; Taylor et al., 2006), ii) isolés de cultures de trophoblastes et d'explants de placentas prélevés au premier trimestre (Frangsmyr et al., 2005; Hedlund et al., 2009; Reddy et al., 2009) et enfin, iii) isolés de cultures de trophoblastes extravilleux ou invasifs (Atay et al., 2011a). Notons qu'aucune information concernant les exosomes de cytotrophoblastes extravilleux issus de placentas à terme n'est encore disponible.

En plus des protéines communément retrouvées dans les exosomes, les exosomes d'origine placentaire renferment de façon intéressante l'enzyme phosphatase alcaline placenta-spécifique PLAP. Contrairement aux autres types d'exosomes (par exemple ceux issus de cellules immunitaires), ils ne contiennent pas de molécules du CMH. Cela dit, on retrouvera des ligands du récepteur NKG2D (activateur de cellules NK) soit les molécules MICA/B (associées au CMH-I) et RAET1 /ULBP1-5. De plus, les exosomes placentaires contiennent les molécules pro-apoptotiques FasL et TRAIL (Abrahams et al., 2004; Frangsmyr et al., 2005; Sabapatha et al., 2006; Taylor et al., 2006).

Une grande majorité des protéines associées à ce type d'exosomes sont d'origine cytosolique, telles que la profiline-1, la spectrine, la symplekine, la taline, la gelsoline ou encore des protéines transmembranaires incluant ICAM-1 et la Mucine-4, les protéines, de types 2 et 3 du canal anionique VDAC (*voltage-dependent anion channel*), la protéine-1 des canaux chlorures ou encore le transporteur d'acides aminés neutres B(0) (Atay et al., 2011a).

Comme évoqué précédemment, une des caractéristiques intéressantes et communes aux exosomes est la présence de molécules d'ARNm et de microARN. En effet, une récente étude identifie des microARN placentaires-spécifiques (regroupés sur le chromosome 19), régulés à la hausse au cours de la grossesse (Luo et al., 2009). Ce sont les microARN mir-517A et mir-21 (régulation de  $TNF\alpha$ ) qui sont mis en lumière et font l'objet d'un intérêt particulier.

La figure 1.15 résume la composition « typique » des exosomes placentaires. Pour une liste complète des protéines associées, se référer à l'annexe 1.



**Figure 1.15** : Composition protéique des exosomes placentaires. Tirée de (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010).

#### 1.4.7 Rôle des exosomes

Pendant longtemps, les exosomes ont été décrits comme étant potentiellement un complexe protéique capable de dégrader différentes molécules devenues inutiles pour la cellule (ARN, protéines, lipides, etc,...) (Pan et al., 1985). Ce n'est qu'en 2005 que naissent les premières réponses quant aux réels rôles joués par ceux-ci. Plusieurs équipes mettent en lumière une nouvelle voie de communication cellule/cellule : la voie des exosomes (Couzin, 2005). Les mécanismes de communication cellulaire alors impliqués pourraient être : la fusion avec la membrane plasmique (exemple :



l'annexine I et II), l'internalisation après une étape d'attachement spécifique à la surface membranaire, ou encore une simple interaction avec des protéines membranaires spécifiques (exemple : CD9, CD81 et  $\alpha V\beta 3$  Intégrine). En effet, il a été rapporté que les exosomes étaient capables : i) de délivrer diverses protéines et ligands (Kim et al., 2005a), ii) de reprogrammation épigénétique (Bruno et al., 2009; Deregibus et al., 2007) et, iii) de stimuler directement une cellule en induisant une cascade signalitique (Baj-Krzyworzeka et al., 2002). Citons par exemple les exosomes issus des cellules EPC (*endothelial progenitor cells*) capables d'activer l'angiogénèse des cellules endothéliales via leur contenu en microARN associés à la voie de signalisation PI3K/AKT. On retrouve aussi chez les cellules souches mésenchymateuses, des mécanismes de transfert horizontal (ARNm) capables d'induire la prolifération et la survie des cellules tubulaires (Bruno et al., 2009; Deregibus et al., 2007).

#### -Rôle dans le système immunitaire

Depuis peu, il a été mis en évidence la sécrétion d'exosomes par les cellules présentatrices d'antigène, une voie potentiellement utilisée pour médier une réponse immunitaire via les molécules du CMH I et II liées à des peptides antigéniques ou d'autres facteurs de co-stimulation. Ceci aboutirait à l'activation des lymphocytes T (They et al., 2009; They et al., 2002). Le transfert d'information médié par les exosomes entraînerait donc une amplification de la réponse immune et ce, via une augmentation du nombre de cellules présentant les complexes CMHII/peptides. Aussi, ces dernières années, un rôle dans l'immunotolérance orale associée aux molécules du CMH-II a été décrit et corrèle avec la présence d'exosome (Karlsson et al., 2001; Wolfers et al., 2001). Cette capacité des exosomes à induire une tolérance immunologique est actuellement exploitée dans la recherche reliée à la transplantation (Peché et al., 2006).

### -Rôle dans la thérapie antitumorale

Plusieurs équipes ont illustré le rôle des exosomes dans le rejet tumoral (Zitvogel et al., 1999). Des exosomes issus de cellules d'une lignée humaine cancéreuse issue d'un mélanome (Zitvogel et al., 1998) ont été injectés dans un modèle murin développant un adénocarcinome du colon. De façon intéressante, cette injection a eu pour effet une suppression efficace de la tumeur. Similairement, des exosomes issus de cellules dendritiques prélevées, isolées puis mises en contact avec un antigène tumoral suffisent également à éradiquer la tumeur en augmentant le nombre de CPA. Ici, les exosomes contenant l'antigène tumoral/CMHI/II semblent être internalisés par d'autres cellules dendritiques ou CPA (Zitvogel et al., 1998).

### -Rôle dans la vaccination

Ces dernières années, la recherche sur l'immunothérapie vaccinale utilisant les exosomes est très active. En effet, plusieurs équipes s'intéressent à leur utilisation contre le cancer de la peau (Escudier et al., 2005). Des exosomes de cellules dendritiques de plusieurs patients atteints d'un mélanome ont été mis en contact avec un antigène spécifique puis re-injectés par voie intraveineuse. Les résultats étaient surprenants : en plus de mettre en évidence la sécurité de la méthode utilisée, ils démontraient une diminution et parfois une éradication totale de la tumeur (Escudier et al., 2005). D'autres études similaires conduites cette fois chez la souris ont démontré le pouvoir immunisateur des exosomes contre les parasites *Leishmania* et *Toxoplasma gondii* (Aline et al., 2004; Schnitzer et al., 2010).

### -Rôle dans l'inflammation

L'effet anti-inflammatoire des exosomes a été démontré dans le cas de l'arthrite rhumatoïde. Dans un modèle d'arthrite de souris DTH (*delayed-type*

*hypersensitivity*), des exosomes isolés de cellules dendritiques sont préalablement transduits avec un vecteur adénoviral véhiculant une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) ou la protéine FasL. Ils observèrent alors, après injection intra-articulaire des exosomes, une suppression de la réponse inflammatoire (Kim et al., 2006; Kim et al., 2005b).

#### -Rôle dans la pathogenèse virale

Les exosomes ont également été associés à plusieurs pathogenèses virales. Citons notamment les prions (Fevrier et al., 2004; Temme et al., 2010), le virus VHC (virus de l'hépatite C) (Masciopinto et al., 2004), le virus CMV (cytomégalovirus) (Walker et al., 2009), le rétrovirus VIH-1 (Izquierdo-Useros et al., 2010) ou encore le virus HHV-6 (virus herpétique type 6) (Mori et al., 2008) (Temme et al., 2010). De façon intéressante, notons que plusieurs virus, en plus d'interagir dans la biogenèse des exosomes, parviennent à intégrer ceux-ci. Tel est le cas pour les glycoprotéines virales gB et gM des virus HHV-1 et HHV-6 ainsi que la gB du CMV. Durant la maturation du MVB, ces glycoprotéines virales s'infiltrèrent dans les exosomes via une liaison avec les molécules du CMH-II et génèrent de ce fait une réponse immunitaire adaptative en présentant les antigènes viraux (Mori et al., 2008).

#### -Rôle dans la placentation

De récentes études ont révélé l'existence d'une sécrétion active de microvésicules incluant les exosomes au sein du placenta, conduisant à des évidences concernant leur fonction dans les phénomènes d'immunotolérance materno-fœtal (Frangsmyr et al., 2005 ; Hedlund et al., 2009 ; Taylor et al., 2006). De plus, cette sécrétion microvésiculaire est augmentée au cours de la grossesse (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010).

Seulement quelques études sont rapportées et présentent quelques informations quant à la fonction jouée par les exosomes d'origine placentaire (Abrahams et al., 2004; Frangsmyr et al., 2005; Hedlund et al., 2009; Sabapatha et al., 2006). Ces différentes études proposent que les exosomes placentaires sont impliqués dans le contrôle des mécanismes critiques de l'immunité, en altérant la signalisation cellulaire des cellules T, ainsi que la cytotoxicité en inhibant des récepteurs des cellules NK, soit NKG2D et enfin, en modifiant l'activité apoptotique via les facteurs FasL, TRAIL et PD-L1.

L'observation d'une diminution de l'expression de CD3- $\zeta$  et Janus Kinase 3 (JAK3), et d'une activation de la protéine caspase 3 dans des lymphocytes T mis en contact avec des exosomes placentaires suggère fortement une dérégulation dans la réponse médiée par ces lymphocytes et supporte la théorie d'une déviation de la réponse immune vers un profil Th2. Une corrélation entre la diminution de la CD3- $\zeta$  et la présence sur les exosomes des ligands FasL et PD-L1 semble s'établir et peut s'expliquer par l'induction spécifique de l'apoptose (Sabapatha et al., 2006).

Aussi, il a été démontré que la présence des ligands des récepteurs NKG2D sur les exosomes issus de cultures d'explants placentaires était capable de réguler à la baisse la cytotoxicité médiée par ces récepteurs. Ces événements affectent donc directement l'activité lytique des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Reddy et al., 2009).

De façon intéressante, une récente étude a mis en lumière l'existence d'une association de la Syncytine 1 avec les microvésicules issues d'explants placentaires obtenus à partir de placentas prélevés au premier trimestre et à terme (Holder et al., 2012b). Aussi, de récents travaux menés en collaboration avec une équipe en Australie ont précisé cette alliance avec les exosomes d'explants placentaires (Tolosa et al., 2012a). Ces deux études s'accordent pour proposer un rôle d'inhibition de la réponse aux cytokines induites par le LPS ou le PHA des cellules mononucléaires circulant dans le sang.

Finalement, les exosomes d'origine placentaire semblent être caractérisés par des fonctions inhibitrices/suppressives promouvant la tolérance immunitaire maternelle à l'allogreffe fœtale.

## **1.5 Problématique**

À l'heure actuelle, environ 8 % du génome humain est composé de séquences rétrovirales endogènes (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 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 de tumeurs ou d'autres pathologies et de caractériser les gènes rétroviraux impliqués.

Par ailleurs, ces gènes d'origine rétrovirale semblent intervenir aussi dans la biologie placentaire humaine. Ils pourraient favoriser les échanges materno-fœtaux dans le placenta et possiblement contrôler l'invasion de la déciduale et du myomètre (couche musculaire interne de la paroi utérine), processus soigneusement orchestré au cours des grossesses auxquelles peuvent être associées certaines insuffisances comme la pré-éclampsie. Afin de lutter contre cette pathologie, il devient important d'identifier et de caractériser les différents acteurs intervenant dans cette biologie. La biologie placentaire fait intervenir le cytotrophoblaste, qui apparaît comme l'élément clé du placenta humain puisque directement impliqué dans plusieurs processus biologiques qui sont indispensables au bon déroulement d'une grossesse (établissement, maintien et développement de celle-ci). En effet, le cytotrophoblaste assure des processus importants tels que l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, la tolérance immunitaire de l'allogreffe, ainsi que le développement et la

croissance fœto-placentaire. Il devient donc fondamental de comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans les diverses activités du cytotrophoblaste au cours de ces événements impliquant prolifération, migration, invasion, différenciation par fusion cellulaire et finalement coopérativité intercellulaire.

Pour certains rétrovirus endogènes, un rôle physiologique a pu être mis en évidence. En effet, mes travaux de maîtrise ont démontré que la Syncytine 1 et la Syncytine 2, deux protéines d'enveloppe d'HERVs, sont responsables de la formation du syncytiotrophoblaste placentaire (cytotrophoblastes ayant fusionné) (Blond et al., 2000; Lavillette et al., 2002; Potgens et al., 2004b; Vargas et al., 2009). Aussi, l'altération de l'expression des deux Syncytines dans certaines anomalies liées à la grossesse, notamment à un dysfonctionnement du placenta, a été démontrée. D'autres études ont révélé l'existence de nouvelles protéines fusogéniques appartenant à des séquences d'HERVs et fortement exprimées dans le placenta. Ainsi, deux autres protéines d'enveloppe ont été identifiées et suscitent un intérêt tout aussi particulier que celui porté pour la Syncytine 1 et 2. Il s'agit de EnvP(b), protéine fusogénique mais ubiquitaire et EnvV, qui ne semble pas posséder de caractère fusogénique mais dont l'expression est spécifiquement placentaire. Les mécanismes de fusion cellulaire faisant intervenir toutes ces protéines d'enveloppe d'HERVs ainsi que leur implication dans la première complication liée à un défaut de la placentation, soit la pré-éclampsie touchant 3 à 5% des grossesses au Canada, sont encore peu connus.

Dans le cadre du projet, il devient intéressant d'élargir la connaissance des rôles physiologiques de ces protéines d'enveloppe d'HERVs, soit au cours des événements de fusion des cellules trophoblastiques humaines.

## **1.6 Hypothèses et objectifs**

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 relie les rétrovirus endogènes au placenta.

L'une des hypothèses sur laquelle est basé le projet 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 2, soit EnvP(b) et EnvV. Ainsi, le projet a visé à étudier l'implication de ces deux protéines d'enveloppe d'HERVs dans le processus de fusion des trophoblastes humains.

Dans un second axe, nous pensons que l'étude de l'ensemble de ces gènes d'enveloppe est devenue importante afin de mieux comprendre le développement du placenta et surtout les pathologies liées à un dysfonctionnement de ce dernier. Ainsi, la seconde hypothèse est basée sur le fait que l'expression de certaines protéines d'enveloppe d'HERVs peut être altérée, induisant ainsi une diminution de la fusion cellulaire des cytotrophoblastes. Cette altération aurait pour conséquence un dysfonctionnement du placenta conduisant à l'une des premières complications de la grossesse, la pré-éclampsie (PE). Nous avons donc comme objectif ici de vérifier si, dans la condition PE, une altération de l'expression de certains gènes *env* d'HERVs pouvait s'avérer corrélée à un défaut de fusion des trophoblastes humains et qui plus est avec la sévérité des symptômes de la maladie.

Complétant un troisième volet, nous croyons que les mécanismes de fusion cellulaire des cytotrophoblastes n'impliquent pas seulement un contact direct entre les cellules trophoblastiques, mais que des petites vésicules relarguées dans le milieu extracellulaire par celles-ci, soit les exosomes, agissent comme messagers et circulent à travers la couche syncytiotrophoblastique. Ainsi, le projet a visé à caractériser ces



exosomes dont la surface pourrait être recouverte d'une ou plusieurs protéines d'enveloppe d'HERVs, permettant ainsi un transfert d'information sélectif visant une cellule cible de la couche syncytiale, et dont une déficience serait à l'origine de la pré-éclampsie.

Pour vérifier ces hypothèses, diverses techniques et approches de biologie cellulaire et moléculaire ont été employées. La prochaine section détaille sous la forme d'articles scientifiques, l'ensemble des résultats obtenus ainsi que les différentes techniques et élabore sur le rôle des rétrovirus endogènes dans le développement normal et pathologique du placenta.

## CHAPITRE II

### ARTICLE 1 :

#### **2.1 Contributions**

**Titre de l'article :**

***Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts***

**Auteure principale:** Amandine Vargas

**Collaborateurs :** Maxime Thiery 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. Les expériences ainsi que les tests statistiques en découlant ont aussi été réalisés par moi-même, excepté les constructions LTR5'-EnvP(b) réalisées par Maxime Thierry sous ma supervision. Les accouchements ont eu lieu 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.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant la mise en forme. Cependant, la version soumise et publiée dans la revue *Virology* (Mars 2012) a été modifiée selon les exigences du journal.

## **2.2 Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts**

**Amandine Vargas, Maxime Thiery, Julie Lafond and Benoit Barbeau\***

*Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, 2080 St-Urbain, Montréal, Québec, Canada, H2X 3X8*

E-MAIL address: [amandine.vargas@voila.fr](mailto:amandine.vargas@voila.fr); [thiery.maxime@courrier.uqam.ca](mailto:thiery.maxime@courrier.uqam.ca);  
[lafond.julie@uqam.ca](mailto:lafond.julie@uqam.ca)

\*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](mailto:barbeau.benoit@uqam.ca)

### 2.2.1 Abstract

HERV (Human Endogenous Retrovirus)-encoded envelope proteins are implicated in the development of the placenta. Indeed, Syncytin-1 and -2 play a crucial role in the fusion of human trophoblasts, a key step in placentation. Other studies have identified two other HERV env proteins, namely EnvP(b) and EnvV, both expressed in the placenta. In this study, we have fully characterized both env transcripts and their expression pattern and have assessed their implication in trophoblast fusion. Through RACE analyses, standard spliced transcripts were detected, while EnvV transcripts demonstrated alternative splicing at its 3' end. Promoter activity and expression of both genes were induced in forskolin-stimulated BeWo cells and in primary trophoblasts. Although we have confirmed the fusogenic activity of EnvP(b), overexpression or silencing experiments revealed no impact of this protein on trophoblast fusion. Our results demonstrate that both env genes are expressed in human trophoblasts but are not required for syncytialisation.

Keywords: Human Endogenous Retroviruses, EnvP(b), EnvV, trophoblast, placenta, promoter activity, syncytialisation.

### 2.2.2 Introduction

Most Human Endogenous Retroviruses (HERVs) have invaded our genome at least 25 million years ago upon infection of germ cell lines. They represent retroviral ancestral sequences and their loci are generally non-functional due to the accumulation of deleterious mutations or deletion events having occurred during evolution. Furthermore, the majority of HERV sequences are solitary LTRs, having resulted from recombination between the two LTRs present in former proviral DNA (Boeke and Stoye, 1997; Lander et al., 2001).

Intact HERV-derived open reading frames have been identified and characterized (de Parseval et al., 2003; Villesen et al., 2004a). A few of them, and in particular, former envelope (*env*) genes, have been suggested to be implicated in various biological processes. In fact, two HERV *env* proteins termed Syncytin-1 and Syncytin-2, which have retained their fusogenic capacity (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000; Mi et al., 2000), have been clearly implicated in a crucial step occurring during placenta formation, more precisely in the process of fusion of villous cytotrophoblasts (a phenomenon also known as syncytialisation) (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000; Mi et al., 2000; Vargas et al., 2009). These fusion events lead to the formation of the syncytiotrophoblast layer, which is renewed by continuous fusion of underlying cytotrophoblast and plays a fundamental role in allowing the adequate exchange of nutrients and hormones as well as other components between the mother and the foetus (Castellucci et al., 2000; Kingdom et al., 2000; Midgley et al., 1963).

The implication of Syncytin-1 and Syncytin-2 in the formation of the syncytiotrophoblast is further supported by the fact that their expression is high in the placenta and can be induced in the BeWo choriocarcinoma cell line following the addition of fusion-stimulating agents (Blaise et al., 2003; Kudo and Boyd, 2002; Prudhomme et al., 2004; Vargas et al., 2009; Vargas et al., 2008). Receptors of both Syncytin-1 and Syncytin-2, namely ASCT2 and MFSD2, respectively, have also been

identified and strongly suggested to be involved in the fusion process (Blond et al., 2000; Esnault et al., 2008; Lavillette et al., 2002). In recent reports, an association between decreased expression levels of Syncytin-1 and Syncytin-2 and a decrease in trophoblast fusion has been demonstrated in samples from pre-eclampsia (PE) patients (Chen et al., 2008; Chen et al., 2006; Keith et al., 2002; Knerr et al., 2002; Kudaka et al., 2008; Langbein et al., 2008; Lee et al., 2001; Vargas et al., 2011).

Recently, two HERV env genes named EnvP(b) and EnvV have been identified (Aagaard et al., 2005; Kjeldbjerg et al., 2008a; Villesen et al., 2004a). The EnvP(b) gene is ubiquitously expressed and encodes a 664 amino acid protein, which has retained its fusogenic capacity when tested in cell lines such as HeLa and COS cells, while EnvV is expressed in a more placenta-specific manner, but its encoded protein has not been shown to have maintained a fusogenic potential (Blaise et al., 2005b). A more recent study has demonstrated that two almost identical EnvV genes, termed EnvV1 and EnvV2, are separated by approximately 30 kbp on chromosome 19q13.41. The 536 amino acid envV2-encoded protein has been strongly preserved during primate evolution (Kjeldbjerg et al., 2008a).

Due to the conserved nature of both EnvP(b) and EnvV2 genes, alike previous studies, we speculated that both env proteins could intervene in placenta development. Both of these proteins have been evaluated for their fusogenic potential in various cell lines although no trophoblastic cell models were included in this assay (Blaise et al., 2005b). It was thus important to make a clearer assessment of their potential implication in trophoblast fusion. In this work, we have characterized both EnvP(b) and EnvV transcripts, have detailed their expression pattern and have tested for their potential role in trophoblast fusion. Overall, our results demonstrate that these envelope proteins are not required in trophoblast syncytialisation.

### **2.2.3 Results**

Through RNA interference experiments, we have previously reported that

both Syncytin-1 and Syncytin-2 were involved in the process of trophoblast fusion (Vargas et al., 2009). A former report has presented data indicating that EnvP(b) had maintained its fusogenic potential, unlike EnvV (Blaise et al., 2005b). However, this study has not conducted similar assays in trophoblast cell models. Consequently, we speculated that both EnvP(b) and EnvV proteins might potentially be implicated in trophoblast fusion. The EnvV2 gene was selected in this study as it showed conservation during the evolution in all simian species, unlike EnvV1 (Kjeldbjerg et al., 2008a).

#### 2.2.4.1 Characterization of the human EnvP(b) and EnvV transcripts.

To explore and compare the functional relevance of EnvP(b) and EnvV2 (for clarity, EnvV2 will now be referred to EnvV for the rest of the manuscript) versus Syncytin-1 and Syncytin-2 in trophoblast fusion, their transcripts were first characterized. These analyses were performed in order to determine if different splicing patterns and transcription initiation sites could be detected, potentially leading to alternative HERV Env isoforms. For these experiments, we used primary cytotrophoblasts, which differentiate and fuse spontaneously after 48h of culture (Vargas et al., 2008). After 72 h, RNA from these cells was isolated and served to identify 5' and 3' ends of both transcripts by 5' and 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) analyses. To perform these analyses, primers were designed either from the upstream region next to the EnvP(b) and EnvV coding segment (for 5' RACE) or in the 3' region (for 3' RACE) based on the previously described proviral DNA structure (see (Blaise et al., 2005b; Kjeldbjerg et al., 2008a)). As depicted in **Figure 1A** and **B**, both RACE experiments generated a number of amplified products. However, all sequenced 5' RACE signals, which were specific to the HERV env transcripts, mapped to a single transcription initiation site, which was near an upstream putative TATA-like box for both transcripts in addition to a CAAT box for EnvP(b). The TATA box sequences were based on previously reported TATA variants based on the Gene Promoter Miner software

(<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/help.php>). Sequencing of these PCR products further revealed the expected singly spliced form of the two transcripts. Splice donor and splice acceptor consensus sequences were also present in the HERV DNA sequence at the border of the splice junction in the 5' LTR and upstream of the *env* ORF region, respectively. For EnvP(b), 3' RACE analyses also led to the identification of a single polyadenylation addition site adjacent to a poly A signal AAUAAA in the 3' LTR, which is typical of retroviral *env* gene transcripts. However, for EnvV, two different 3'ends were sequenced, one of which presented characteristics similar to the EnvP(b) transcripts (**Figure 1B**). However, another more abundant transcript presented an additional spliced event in the 3' untranslated regions joining a third exon at a 920 bb distance. Moreover, in this multiply spliced transcript, two cleavage sites were sequenced and were present at nearby multiple and superimposed poly A signals. However, none of these alternative spliced transcripts were predicted to produce EnvV proteins with variation in their amino acid sequences.

These results hence demonstrated that the EnvP(b) transcript was expressed as a typical singly spliced transcript and that the transcription initiation was likely dependent on a CAAT box. For EnvV, results demonstrated alternative splicing of the transcript, which led to a typical form and a multiply spliced transcript with resulting multiple poly A addition sites.

#### 2.2.4.2 Expression of EnvP(b) and EnvV in BeWo cells and primary trophoblasts.

No studies have yet tested the expression pattern of EnvP(b) and EnvV genes in primary trophoblasts or in the BeWo cell line model. Since Syncytin-1 and Syncytin-2 gene expression has been shown to be induced in the choriocarcinoma BeWo cell line upon induction of fusion, we first wanted to determine if EnvV and EnvP(b) expression also correlated with fusion. To characterize the expression of each HERV *env* gene, we thus analyzed their expression in BeWo cells treated or not



with Forskolin, a very potent fusion-inducing agent. Similarly treated non-fusogenic JEG-3 and Jar trophoblastic cell lines (Al-Nasiry et al., 2006; Vargas et al., 2008) were also analyzed in parallel. RT-PCR analyses conducted on BeWo cells showed an increase of both EnvP(b) and EnvV expression in stimulated conditions whereas their expression remained either unchanged (EnvP(b)) or absent (EnvV) in JEG-3 and Jar cells (**Figure 2A**). Additionally, real-time PCR analysis revealed high induction of mRNA levels for both genes upon 48 h of stimulation of BeWo cells (**Figure 2B and C**).

We next measured mRNA levels in freshly isolated primary cytotrophoblasts. In culture conditions, primary human cytotrophoblasts undergo spontaneous differentiation (as judged by secretion of hormones such as hCG and hPL (Daoud et al., 2006; Daoud et al., 2005) and extensive cell fusion, which peaks at day 4 (Vargas et al., 2009). By RT-PCR, we thus examined the expression level of EnvP(b) and EnvV at different time points (**Figure 2D and E**). As negative controls, PCR amplification was carried out in the absence of the RT step and, upon gel migration, showed no specific bands (data not shown). As demonstrated in **Figure 2D**, a significant increase in EnvP(b) mRNA levels was noted, which importantly dropped at 96 h. In contrast, the level of EnvV mRNA peaked at 48 h after onset of culture and then drastically declined (**Figure. 2E**).

These results demonstrated that both Env P(b) and EnvV are strongly stimulated following stimulation of BeWo cells and upon culturing of primary trophoblasts, although in these latter cells, induced expression was transient for both analysed transcripts.

#### 2.2.4.3 Promoter activities of EnvP(b) and EnvV in stimulated BeWo cells

To further analyse the transcriptional activation of both env genes in BeWo cells, promoter constructs consisting of the 5' LTR region positioned upstream from the luciferase reporter gene were generated and transfected in BeWo cells prior to

stimulation (**Figure 3**). Upon transfection of these constructs with the lacZ-encoding vector (for normalisation), BeWo cells were induced for cell fusion and compared to unstimulated transfected cells in terms of normalized luciferase activity (**Figure 3A and B**). Our results first demonstrated that basal luciferase activity in unstimulated BeWo cells was very low for both promoters (data not shown), which was compatible with our RT-PCR and real-time PCR results (**Figure 2A-C**). Upon forskolin stimulation, a reproducible increase (2,5 fold) in luciferase activity driven by the two promoters was noted.

Our data thereby confirmed the RT-PCR experiments and suggested that the increase in mRNA levels of EnvP(b) and EnvV in stimulated BeWo cells was occurring at the transcriptional level.

#### 2.2.4.4 Overexpression of EnvP(b) or EnvV in BeWo cells does not induce fusion

Previous studies have demonstrated that EnvP(b) had retained its fusogenic potential. However, none of the tested cell lines in this report had included trophoblasts or cell line model, such as BeWo cells (Blaise et al., 2005b). In order to determine if EnvP(b) and EnvV could induce BeWo cell fusion, the previously described fusion assay was first tested in 293T and COS-7 cells (Blaise et al., 2005b) (**Figure 4A and B**). Both cell lines were transfected with plasmids encoding different HERV-derived envelope proteins: EnvP(b), EnvV, Syncytin-1 and Syncytin-2, with phCMV1 used as a negative control. Forty eight hours post-transfection, cells were examined for fusion events under a confocal microscope after staining of the cytoplasm and the nucleus. As previously described (Blaise et al., 2003), Syncytin-1- and Syncytin-2-expressing vectors led to fusion of 293T and COS-7 cells, while EnvV expression had no similar capacity (**Figure 4A and B**). As opposed to the previous report by Blaise *et al.* (Blaise et al., 2005b), in our hands, moderate but significant fusion was noted in EnvP(b)-expressing 293T cells in addition to expected fusion events observed in COS-7 cells. Importantly, no fusion was observed in

EnvP(b)- or EnvV-expressing BeWo cells (**Figure 4C**). As expected, cell fusion was noted in Syncytin-1- and Syncytin-2-expressing BeWo cells. In this experiment, two different EnvP(b) and EnvV expression vectors were tested and no impact on cell fusion was observed in BeWo cells (data not shown).

These data thereby suggested that only Syncytin-1 and Syncytin-2 induce fusion of BeWo cells while overexpression of either EnvP(b) or EnvV in the context of this latter cell line did not induce fusion.

#### 2.2.4.5 Repression of EnvP(b) expression does not alter forskolin-induced BeWo cell fusion

As EnvP(b) has retained its fusogenic properties as determined in different cell lines (Blaise et al., 2005b) (see **Figure 4A**), the above result was unexpected. However, these results could be explained by the fact that the specific receptor for EnvP(b) is only expressed in stimulated BeWo cell. In order to clearly rule out this possibility, we were thus interested in confirming the above results using a RNA interference approach.

We thus compared the impact of previously tested Syncytin-2-specific siRNAs (Vargas et al., 2009) to two different sets of siRNAs designed against EnvP(b). Control siRNAs representing mutated version of Syncytin-2-specific siRNA were used as negative controls in these analyses. BeWo cells were first stimulated by forskolin and then transfected with the various siRNAs. Expression of both HERV env genes was analysed by RT-PCR and compared to mRNA levels of  $\beta$ -actin. Results showed the expected repression of EnvP(b) and Syncytin-2 when BeWo cells were transfected with specific siRNAs, while BeWo cells transfected with control siRNAs demonstrated a normal level of expression of both HERV env genes in unstimulated and stimulated conditions (**Figure 5A**).

We next evaluated the impact of our siRNAs on cell fusion in activated BeWo cells (**Figure 5B**). As we have previously reported, siRNAs specific to Syncytin-2 had a drastic inhibitory effect on cell fusion. When BeWo cells were transfected

with the EnvP(b)-specific siRNAs, no effect on the extent of cell fusion was noted, regardless of the tested siRNA. These results were better illustrated by comparison of the cell fusion index measured in different BeWo cell population transfected with different siRNAs (**Figure 5C**). In all of these experiments, our analyses indicated that control siRNAs had no impact on cell fusion.

Our data thus demonstrated that, in the context of stimulated BeWo cells, EnvP(b) is not required for cell fusion, unlike both Syncytin-1 and Syncytin-2 as we have previously reported (Vargas et al., 2009).

#### 2.2.4 Discussion

During placentation, trophoblasts differentiate and undergo fusion, a complex process, which implicates several morphological changes. We and others had previously shown that Syncytin-1 and Syncytin-2 play a crucial role in this cellular fusion process, more precisely during syncytialisation of villous cytotrophoblasts (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000; Frendo et al., 2003; Mi et al., 2000; Rote et al., 2004). However, other cellular factors including HERV env proteins such as EnvP(b) and EnvV were proposed to be candidates involved in this process (Blaise et al., 2005b). In this study, our aim was to characterize EnvP(b) and EnvV transcripts, to determine their expression pattern and to assess their potential role in trophoblast fusion. Based on our results, we clearly demonstrate that these two HERV env genes, although induced in stimulated BeWo cells, do not play a significant role in trophoblast fusion.

We first mapped the 5' and 3' ends of the two transcripts. We showed that both EnvP(b) and EnvV are transcribed as typical spliced *env* mRNA starting in the 5' LTR region and terminating in the 3' LTR. Transcription of both HERV env genes initiated from a single transcription initiation site, which was closely located downstream of a putative CAAT box for EnvP(b) and a TATA-like box for both EnvP(b) and EnvV. Interestingly, for EnvV, an additional spliced transcript was

characterized, which led to the splicing of a third untranslated exon into the 3'untranslated region of exon 2. Such a multispliced pattern for endogenous retroviral *env* transcripts has also been reported for mouse ERV syncytin-A and syncytin-B genes (Dupressoir et al., 2005). Several interesting features characterized this alternatively spliced EnvV transcript. First, although the alternative spliced 3' end was detected in several sequenced clones, a non consensus splice donor site was present next to the spliced junction in the proviral DNA. Secondly, two sites of poly A addition were identified and depended on five potential superimposed poly A signal. For the moment, we cannot determine to which extent this new splicing event and this new poly A site are contributing to the expression of EnvV and further experiments will thereby be needed.

We then compared HERV *env* gene mRNA expression in different cell lines and in isolated primary cytotrophoblasts at different time points after isolation. In non-fusing JEG-3 and Jar cells, only EnvP(b) mRNA was detected, although no variation in its expression could be observed upon stimulation. In the fusogenic BeWo cell line, we observed an important increase in the level of EnvP(b) and EnvV mRNAs upon stimulation with forskolin. In agreement with these results, promoter studies for both genes highlighted a poor activity in non-stimulated BeWo cells with a significant increment upon stimulation. In primary isolated cytotrophoblasts, expression did increase in culture condition but dropped drastically before peak fusion. Although this pattern of expression is reminiscent of Syncytin-2, differences are nonetheless noticeable in that Syncytin-2 demonstrated a more sustained expression level up to day 4 of culture (Vargas et al., 2009).

In order to fully assess the possible involvement of the fusogenic EnvP(b) protein (and perhaps the EnvV protein) in trophoblast fusion, we first overexpressed HERV *env* genes in BeWo cells. No induction of fusion events was observed in EnvP(b)- or EnvV-expressing BeWo cells, in contrast to Syncytin-2-expressing cells. To confirm our observations, siRNA transfection experiments were conducted in stimulated BeWo cells and, unlike Syncytin-2-specific siRNAs, which culminated

into a drastic reduction in fusion (as we had initially reported (Vargas et al., 2009)), repression of EnvP(b) expression is not required for cell fusion.

Based on data obtained in the present study, trophoblast fusion does not require expression of EnvP(b) or EnvV. Although we have not directly tested the implication of these proteins in primary trophoblasts, pattern of expression of EnvP(b) and EnvV genes in comparison to peak cell fusion might argue that these HERV proteins are not involved in fusion of these primary cells. In BeWo cells, we assume that the receptor for EnvP(b) is absent in unstimulated and stimulated cells thereby abrogating the capacity of this HERV Env protein to mediate fusion. In parallel, it is interesting to note that Syncytin-2 did induce fusion in BeWo cells and thereby suggest that low but sufficient amount of the MFSD2 receptor is present at the surface of these cells for fusion to occur. Alternatively, it could be suggested that, in overexpression condition, Syncytin-2 uses a second unknown receptor. However, it also remains possible that none of the tested models herein are optimal for the study of the implication of EnvP(b) in fusion events. Indeed, there are different steps in placentation and, during this complex process, numerous fusion events occur. The BeWo choriocarcinoma cell line and primary cytotrophoblasts are reliable models for the study of fusion but might not account for all types of fusion events occurring in the placenta.

In a recent report, a putative immunosuppressive domain present in both envelope proteins has been shown to have maintained a suppressive effect on the immune response (Mangeney et al., 2007a). It is thereby possible that EnvP(b) and EnvV could potentially be implicated in the state of immunotolerance prevailing during pregnancy. In fact, as previous studies has suggested that pre-eclampsia could be associated with a defect in immunotolerance (Kaaja and Greer, 2005), we have tested placenta tissue from pre-eclamptic patients and our preliminary results indicate that EnvV mRNA expression is reduced in PE placentas (2 fold less) (Supplementary data 1).

Overall, our results thereby indicate that trophoblast fusion likely requires a limited number of HERV Env proteins and that Syncytin-1 and Syncytin-2 might be the only two HERV Env proteins necessary to mediate this biological process. This is expected and allows a more delicate control of the fusion process. Further experiments will however be needed to confirm that EnvP(b) is not playing a role in particular types of fusion occurring in the placenta, which might not have been well represented in our model. Due to its fusogenic-potential in the context of other cell lines such as HeLa, COS-7 and TE671 and its ubiquitary expression pattern, EnvP(b) could be implicated in other fusion processes implicating myoblasts (Taylor, 2000) and preosteoclasts (Ejiri, 1983). We are currently addressing these different possibilities.

### **2.2.5 Conclusions**

EnvP(b) is a fusogenic protein, which was initially suggested to have a potential role in trophoblast fusion. Our results have indicated that neither EnvP(b) nor the non-fusogenic EnvV proteins are required in the fusion process of trophoblast. Other possible role for these proteins need to be further addressed such as a possible implication in immunotolerance during pregnancy or for EnvP(b), a role in other types of fusion processes.

### **2.2.6 Materials and methods**

#### **2.2.6.1 Cell Culture**

Human cell lines BeWo, JEG-3 and Jar were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Ham's F-12, MEM and RPMI medium, respectively (Wisent, Montreal, Canada) supplemented

with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada) and 2mM L-glutamine (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Canada) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 293T and COS-7 cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 2mM L-glutamine. Human placental tissues were provided by pregnant women after informed consents and approval was issued by the Ethic Committee from the Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Placental villi were cut and thoroughly washed to remove blood. Thereafter, they were incubated four times in a digestion medium composed of Hanks' balanced salt solution containing trypsin (from  $9.6 \times 10^5$  to  $1.8 \times 10^6$  U per digestion) and DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis IN) (from 19 to 37.5 mg per digestion) for 30 min at 37 °C in a water bath with continuous shaking. The dispersed cells were layered on top of a discontinuous 5–70% Percoll gradient and centrifuged for 25 min at 507g. The intermediate layers (density between 1.048 and 1.062) containing cytotrophoblast cells were removed and washed extensively, and cell viability was determined by trypan blue exclusion. Following trophoblast isolation, cells were seeded at a density of approximately  $1.5 \times 10^6$  cells per well in a 24-well plate. After 16 h, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) 1× and fresh medium was subsequently added. Culture medium consisting of DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose), 2 mM glutamine, 10% FBS, and PSN (penicillin/streptomycin/neomycin) (1×) (Invitrogen), was refreshed daily and trophoblasts were maintained for a maximum of four days in culture. The purity of each preparation of cytotrophoblasts was evaluated by flow cytometry using FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin-7 (Millipore, Mississauga, Canada), a specific trophoblast marker. Only preparations with a minimum of 96% of cytotrophoblasts were further used for experiments. All experiments with isolated primary trophoblasts were conducted in triplicate under normoxia conditions. Experiments were repeated three times, in each case with a different placenta donor.



### 2.2.6.2 Plasmids

DNA fragments containing the expected EnvP(b) and EnvV promoter regions were PCR-amplified from human primary cytotrophoblast genomic DNA with EnvP(b)-specific forward 5'-ATCTCGAGCTATCTCCACTGTGCC-3' and reverse 5'-CTGGGAGATGACCAGAGACC-3' primers and EnvV-specific forward 5'-AGCCTGGGCGACAGAGTGAGA-3' and reverse 5'-TGGATAACCAGGCGAGGTAACC-3' primers. The amplified fragments were then cloned into pGL3-Basic (Promega, Madison, WI) at the SacI/SmaI site for the EnvP(b) promoter and into SmaI for the EnvV promoter. Resulting plasmids were termed envP(b)LTR-luc and envVLTR-luc. The coding regions of EnvP(b) and EnvV were PCR-amplified from cytotrophoblast genomic DNA with the primers 5'-GAGGGACCATATCTAGTGCTCCT -3' (forward) and 5'-GGAGGGCTGATAGATGAATGGGTAT-3' (reverse) for EnvP(b) and 5'-CACTAAACACTCCATCGAACCA-3' (forward) and 5'-AAAAGCAAAAGGCTGTTCTAGGATGG-3' (reverse) for EnvV. Amplified products were subsequently cloned in the pDrive vector and confirmed by sequencing. Both cDNAs were then excised by XhoI/KpnI and cloned into the phCMV1 vector (Genlantis, San Diego CA) using the same restriction enzymes (phCMV1-envP(b) and phCMV1-envV). Expression vectors phCMV-Syncytin-1 and phCMV1-Syncytin-2 have been described before (Vargas et al., 2009). The pRc-Actin-lacZ vector contains the  $\beta$ -galactosidase gene under the control of the  $\beta$ -actin promoter.

### 2.2.6.3 RT-PCR and RACE analysis

Total RNA was isolated from cell lines or human primary trophoblasts using the RNeasy Kit following manufacturer's instructions (Qiagen, Mississauga, Canada). RNA (0.5  $\mu$ g) was then incubated in the presence of oligo(dT) (25 ng/ $\mu$ l), 10 mM DTT, 100  $\mu$ M dNTP (deoxynucleotide triphosphate), SuperScript II reverse

transcriptase (10 U) (Invitrogen Canada Inc), and SUPERase-In (20 U) at 42°C for 50 min. Aliquots from the RT reactions were then PCR-amplified in the presence of 2 U Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering, Canada), 1× ThermoPol buffer, 100 µM dNTP and 15 µM of each primer. For standard RT-PCR analyses, primers used for EnvP(b) cDNA amplification were 5'-CTCTCCCTTGCCTCTGCTTT-3' (forward) and 5'-CGTTGCGCTAAGAGACCTT-3' (reverse), while, for EnvV cDNA amplification, primers were 5'-GGTTACCTCGCCTGGTTATCCA-3' (forward) and 5'-AAGGAATTTCTCTGTCATAGCT-3' (reverse). For amplification of β-actin cDNA, primers 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3' (forward) and 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTT-3' (reverse) were used. PCR conditions were as follow: a first step of denaturation at 94 °C for 4 min followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 30 s), annealing (58 °C for 30 s), and extension (72 °C for 30 s). Both 5' and 3' ends of EnvP(b) and EnvV RNAs were determined using total RNA isolated from primary cytotrophoblasts with the FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) according to manufacturer's instructions. Briefly, cDNAs were synthesized in the presence of random decamers and 5' ends were amplified by two PCR rounds using outer and inner RACE primers and EnvP(b)/EnvV-specific reverse outer primers (5'-CAAGGGCTAGAGATTGGGACC-3' and 5'-GGGTGAGTCTGATCTAGTTACGT-3') followed by reverse inner primers (5'-CAAGAACCAGAGGACTTCCACAC-3' and 5'-TCAGGCGCTGAATTCTGTTGTTCCCT-3'), all being positioned at the 5' end of coding regions. For the 3' RACE protocol, cDNA synthesis was performed in the presence of the supplied 3' RACE adapter. PCR amplification was achieved through the use of outer and inner 3' RACE primers and two EnvP(b)/EnvV-specific forward primers derived from the sequence downstream of the stop codon (5'-GCATCGAAGGTAATGGTCTGGGG-3' and 5'-CTCGAGGGGCGGTGCTTTCTTGACTCGGG-3' for EnvP(b), and 5'-GATATCAGCTATCTGTCATTGGAG-3' and 5'-

ATCTCGAGTCTCCATCTCTTGAGGAGGGAA-3' for EnvV). Amplified products were subsequently cloned into pBlueScript KS<sup>+</sup> and sequenced.

#### 2.2.6.4 Real-time RT-PCR

RNA was isolated from unstimulated or forskolin-stimulated BeWo cells and from human primary trophoblasts using the RNeasy kit. Real-time RT-PCR reactions were then performed in the presence of each specific primer. Briefly, PCR reactions were initiated in a final volume of 10  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of cDNA, 0.5  $\mu$ M of each primer, and 1 $\times$  reaction mix, including the TaqDNA polymerase, the reaction buffer, and SYBR green (SYBR® Premix Ex Taq™: Perfect Real Time). All primer sequences were generated using the Light Cycler Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and verified for specificity using GenBank Blast analysis. The EnvP(b) primers were 5'-CAAGGGCTAGAGATTGGGACC-3' (reverse) and 5'-GGGTGAGTCTGATCTAGTTACGT-3' (forward). For EnvV, the reverse and forward primers designed for these experiments were 5'-CAAGAACCAGAGGACTTCCACAC' and 5'-CAGGCGCTGAATTCTGTTGTTCCCTT-3', respectively. In all PCR reactions, negative controls consisting of an 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 s, followed by 50 cycles (denaturation at 94 °C for 3 s, 57 °C for annealing during 15 s, and elongation at 72 °C for 12 s). 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 a reference for normalization. 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.

#### 2.2.6.5 Luciferase assay

BeWo cells ( $2 \times 10^5$ ) were co-transfected with envP(b)LTR-luc, envVLTR-luc or pGL3-Basic (0.1  $\mu$ g) and pRc-Actin-LacZ (0.1  $\mu$ g) using the FuGENE 6 transfection reagent according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Forty-eight hours after transfection, cells were washed once with fresh medium and treated with 50  $\mu$ M forskolin for 8 h. Transfected cells were lysed in 25 mM Tris phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 1% Triton X-100, and 10% glycerol, and luciferase activity was measured 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  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 220  $\mu$ M coenzyme A, 4.7  $\mu$ M D-luciferin potassium salt, 530  $\mu$ M ATP, 33.3 mM DTT]. The  $\beta$ -galactosidase activity was measured using the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MA) according to manufacturer's instructions. Luciferase activity was calculated in terms of relative light units (RLU) and was adjusted in their values based on the values of measured  $\beta$ -galactosidase activities for each transfected samples. Luciferase activities thus represent mean values  $\pm$  SD of three transfected samples normalized for  $\beta$ -galactosidase activity. Fold inductions were calculated by dividing the values of activated samples by values of non-stimulated sample. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t* test with StatGraphics. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

#### 2.2.6.6 siRNA transfection

All siRNAs were synthesized by Qiagen (Mississauga, Canada). Sequences of sense and nonsense siRNA were blasted using the Ensembl blast algorithm and no significant homologies with cDNA or genomic sequences (other than the intended targeted genes) were detected. BeWo cells ( $1.5 \times 10^5$  cells) were first plated in 24-well plates, stimulated with 50  $\mu$ M forskolin and transfected after 16 h of stimulation using Hiperfect (Qiagen) in the presence of 37.5 ng of siRNA duplexes corresponding to two different regions of Syncytin-2 or EnvP(b) transcripts (Table 1). After 36 h of transfection, the efficiency/specificity of each siRNA was analysed by RT-PCR analyses, while the impact on cell fusion was addressed by cell fusion assay.

#### 2.2.6.7 Cell fusion assay

BeWo cells ( $1 \times 10^5$ ) were plated in 24 well plates and, after 16 h, were transfected with phCMV1-Syncytin-1, phCMV-Syncytin-2, phCMV-EnvP(b) and phCMV-EnvV (0.2  $\mu$ g) using the FuGENE 6 reagent according to manufacturer's instructions or with siRNAs using Hiperfect reagent (Qiagen). BeWo cells transfected with siRNAs ( $1 \times 10^5$  cells) were plated in 24-well plates and stimulated or not with forskolin (50  $\mu$ M). Cells were then fixed in cold methanol for 30 min and incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 30 min to eliminate non-specific binding. Cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse monoclonal anti-desmoplakin antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada cat. no. D-1286; 1/700) in PBS containing 0.2% bovine serum albumin for 1½ h at room temperature, washed three times with PBS, and incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen ; 1/1000) for 1 h at room temperature. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (Sigma-Aldrich) (PI; 50  $\mu$ g/ml) for an additional 30 min at room temperature and washed three times with PBS. Fusion assay for 293T and COS-7 cells were conducted as follow. Cells ( $1 \times 10^5$ ) were transfected in 24-well plates with 0.8  $\mu$ g of phCMV-env expression vectors using the

Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 48 h, cells were incubated with the *CellMask*<sup>TM</sup> Plasma Membrane dye (5  $\mu$ g/ml) diluted in supplemented medium at 37°C for 5 min, rinsed three times with PBS and subsequently incubated with the SYTO® 13 live-cell nucleic acid fluorescent dye (5  $\mu$ M) diluted in supplemented medium (Invitrogen) for 5 min. BeWo, COS-7 and 293T cell preparations were visualised under a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, Hercules, CA) at a final magnification of 400X. A syncytium was defined as an agglomeration of two or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface membrane staining. Five wells were examined per experimental condition. Cellular fusion index was determined as follows: three fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei in syncytia. In general, a total of 200 nuclei were counted per field and, thus, nearly 600 nuclei were counted in each well. Three replicate wells were examined per experimental condition from which a final cellular fusion index (mean  $\pm$  SEM) is presented and represents the final average of the three percentage values. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t* test with StatGraphics. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant. Results are representative of three independent experiments.

### 2.2.7 Figure legends

#### **Figure 2.1: Characterization of EnvP(b) and EnvV transcripts in human trophoblasts.**

Total RNA extracted from isolated primary cytotrophoblasts was used for 5' and 3' RACE analyses of EnvP(b) (A) and EnvV (B) mRNA. Sequencing of amplified products confirmed the spliced nature of the transcript and revealed a single transcription initiation site for each transcript. A single poly A addition site is depicted for EnvP(b) transcripts, while multiple poly A signals were noted for EnvV

transcripts, which originated from two alternatively spliced 3'ends. On the left side of each panel, outer and inner PCR amplification products from 5'RACE and 3' RACE analyses are presented after migration on an agarose gel. (M= 100 bp ladder). Position of the primer-binding site (PBS), transcription start sites (broken arrow), putative TATA and CAAT boxes (in a box), splice donor (SD) and splice acceptor (SA) sites (underlined), polyadenylation signals (pA) (underlined), and poly A cleavage sites (arrow) are all indicated. Gag/pol-like sequences as well as the envelope ORFs are depicted in addition to both 5' and 3' LTR regions bordering the HERV proviral DNA. An additional MER51 retroelement sequence has also been identified next to the 5' LTR of the EnvP(b)-expressing proviral DNA (Blaise et al., 2005). Nucleotide positioning is based on the +1 position of the transcription initiation site and subsequent numbers relate to the cDNA. The length of introns is also indicated.

**Figure 2.2: Expression pattern of EnvP(b) and EnvV in human trophoblasts.**

Total RNA was extracted from BeWo, JEG-3, Jar cells left untreated or treated with 50 $\mu$ M Forskolin (A-C) and from primary trophoblasts cultured up to 4 days (D-E). EnvP(b) and EnvV expression was either analysed by RT-PCR (compared to the internal control,  $\beta$ -Actin) (A) or by real-time PCR (B-E). For panels D and E, normalized relative expression levels represent the mean values  $\pm$  S.E.M. of quantified mRNA levels from three experiments performed with trophoblasts isolated from four different normal placentas.

**Figure 2.3: Activation of EnvP(b) and EnvV promoters by forskolin.**

Luciferase reporter constructs carrying the complete 5'LTR amplified from proviral DNA containing HERVs Env(P(b) and EnvV genes (vs. the empty vector pGL3 basic) were co-transfected with pRcActin-LacZ in BeWo cells. At 24 hr post-transfection, cells were stimulated with 50  $\mu$ M forskolin in triplicates. Resulting

luciferase activity was normalized against  $\beta$ -galactosidase activity. Results are shown as fold induction and compared to fold induction measured in pGL3basic-transfected BeWo cells used as a negative control (\*  $p < 0.05$ ).

**Figure 2.4: Fusogenicity of the HERV env proteins.**

Expression vectors pCMV-Syncytin-1, pCMV-Syncytin-2, pCMV-envP(b) and pCMV-envV (vs. the empty vector phCMV1) were transfected in 293T (A), COS-7 (B) or BeWo cells (C) and cell fusion was assessed after 48 hours. BeWo cells were fixed in methanol and stained using propidium iodide and a monoclonal anti-desmoplakin antibody, while 293T and COS-7 cells were stained with *CellMask*<sup>TM</sup> Plasma Membrane and SYTO® 13 live-cell nucleic acid fluorescent dyes. Cell lines were visualised by confocal microscopy at a 400 $\times$  magnification (scale bars, 100  $\mu$ m). Results are representative of four independent experiments. Syncytia are indicated by white arrows.

**Figure 2.5: Repression of EnvP(b) expression has no impact on BeWo cell fusion.**

BeWo cells were left untreated or stimulated for 16 h with 50  $\mu$ M forskolin and transfected with 37.5 ng of the different siRNA duplexes: si-envP(b)#1, si-envP(b)#2 siSync-2 and CTL-si using the Hiperfect reagent. (A) At 36 h after transfection, total RNA was isolated and EnvP(b) and Syncytin-2 mRNA levels were analysed by RT-PCR. (B) Cell samples were also stained with an anti-desmoplakin antibody (green) and PI (nucleus; red) and observed by confocal microscopy at a magnification of 400 $\times$ . Scale bars represent 100  $\mu$ m. (C) Cellular fusion index was determined as follow: three fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei comprised in syncytia.



## 2.2.8 Figures

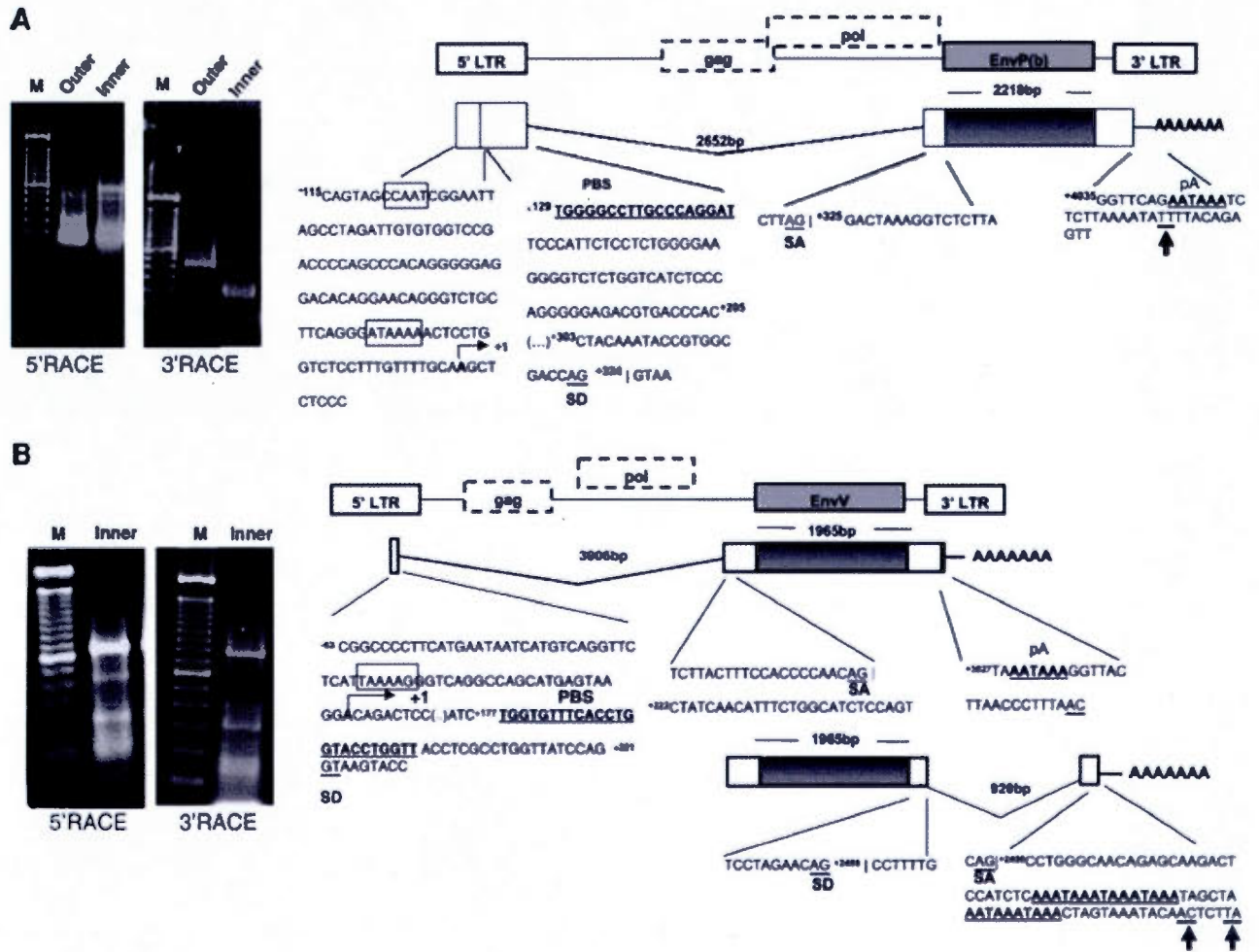
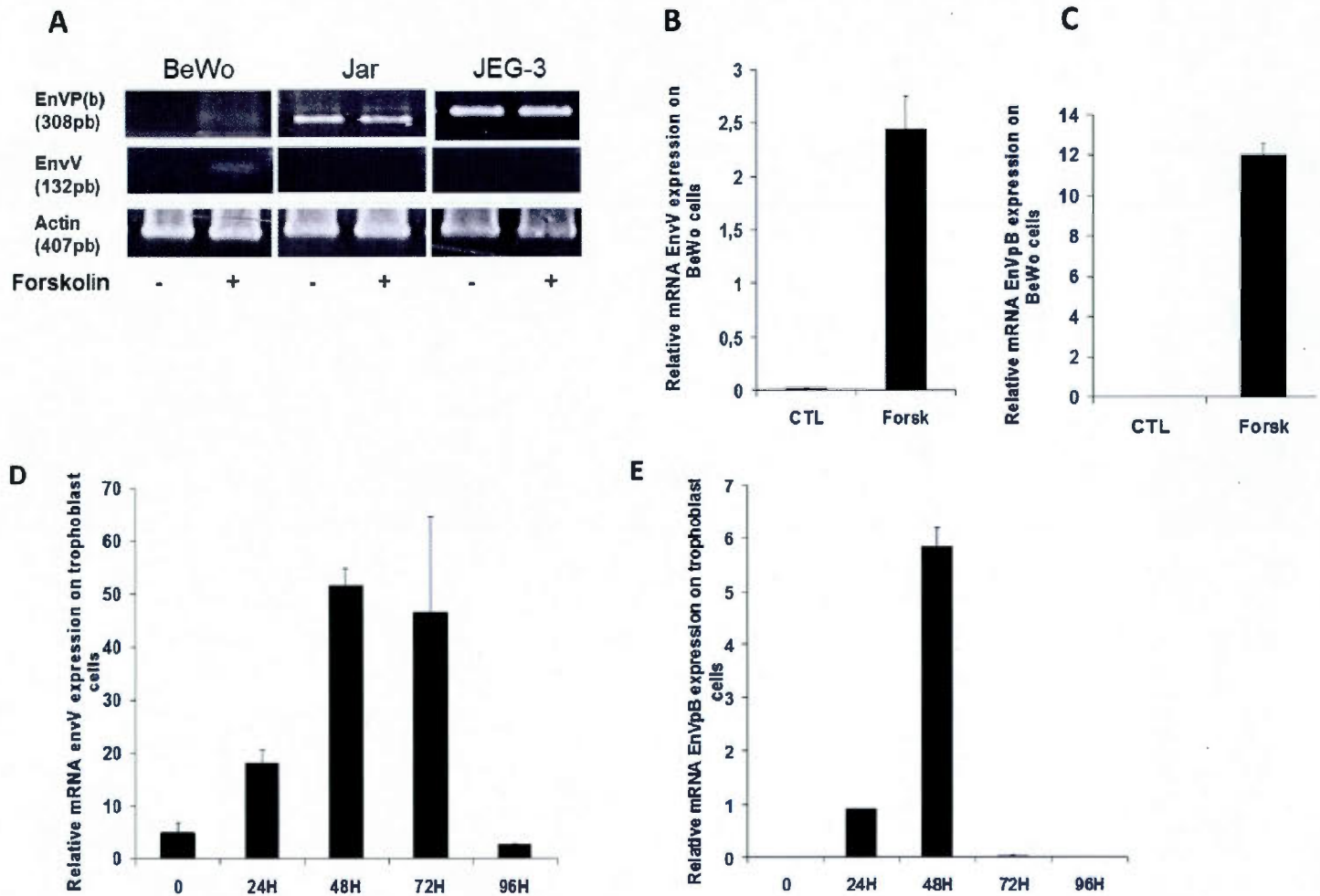
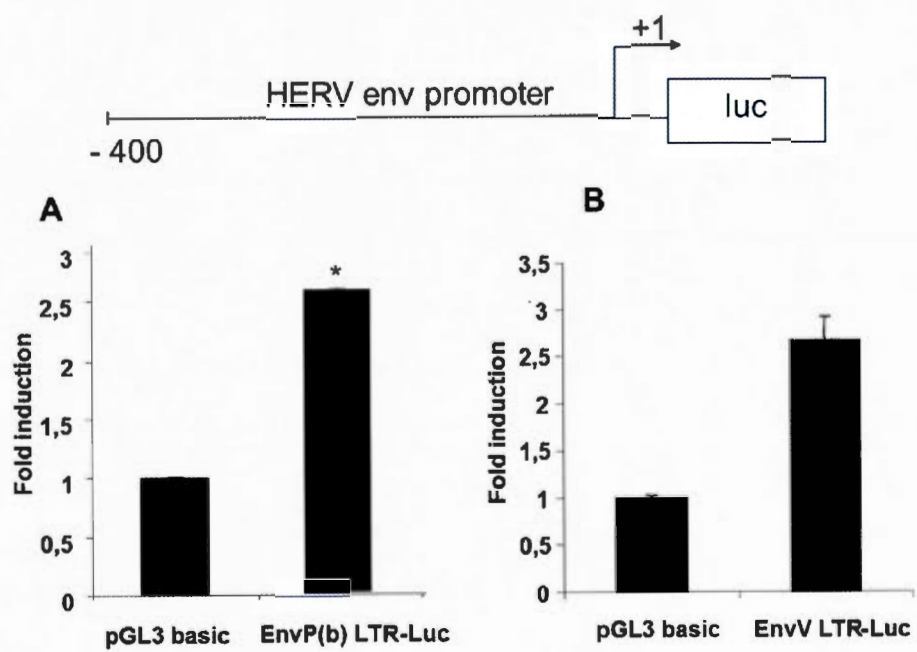


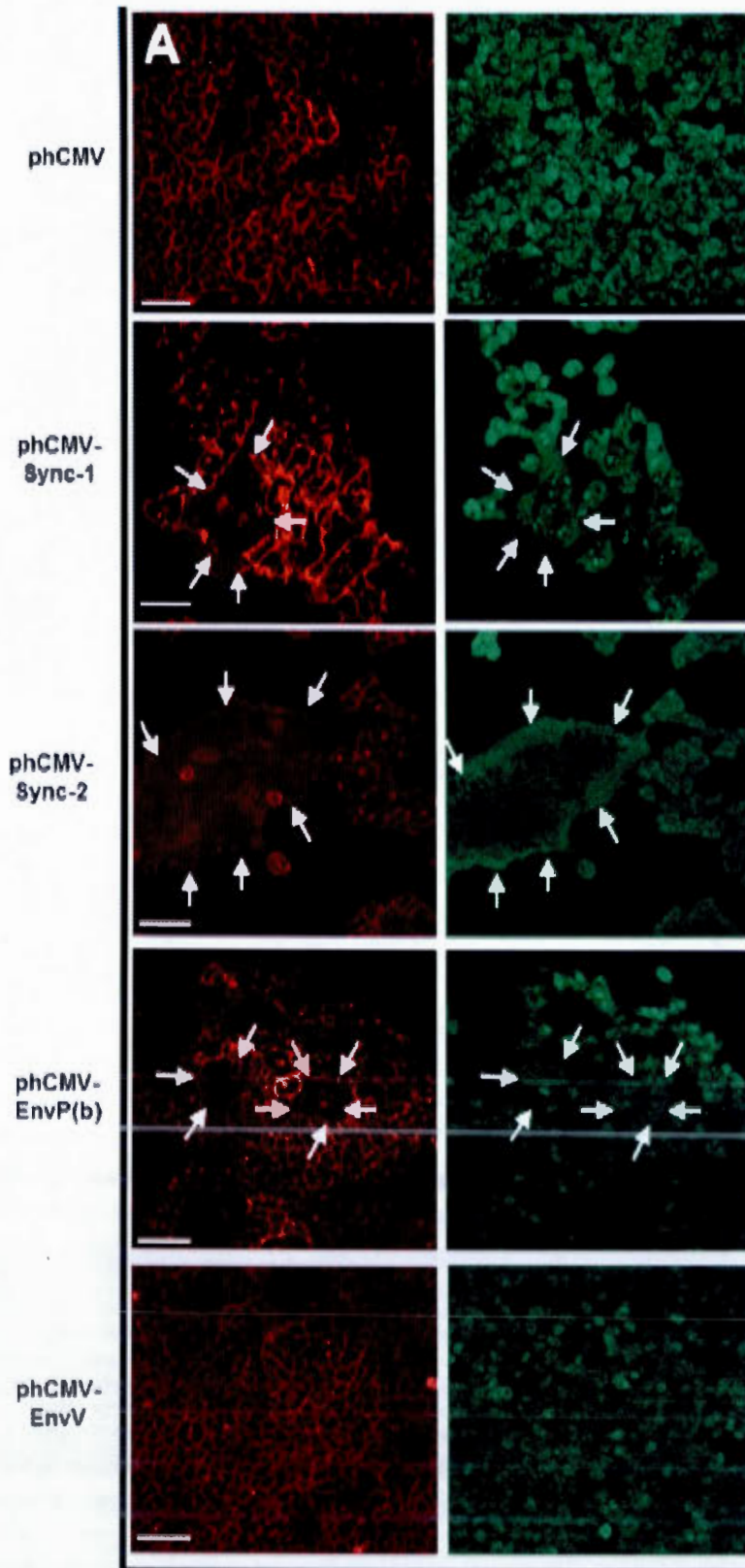
Figure 2.1: Characterization of EnvP(b) and EnvV transcripts in human trophoblasts



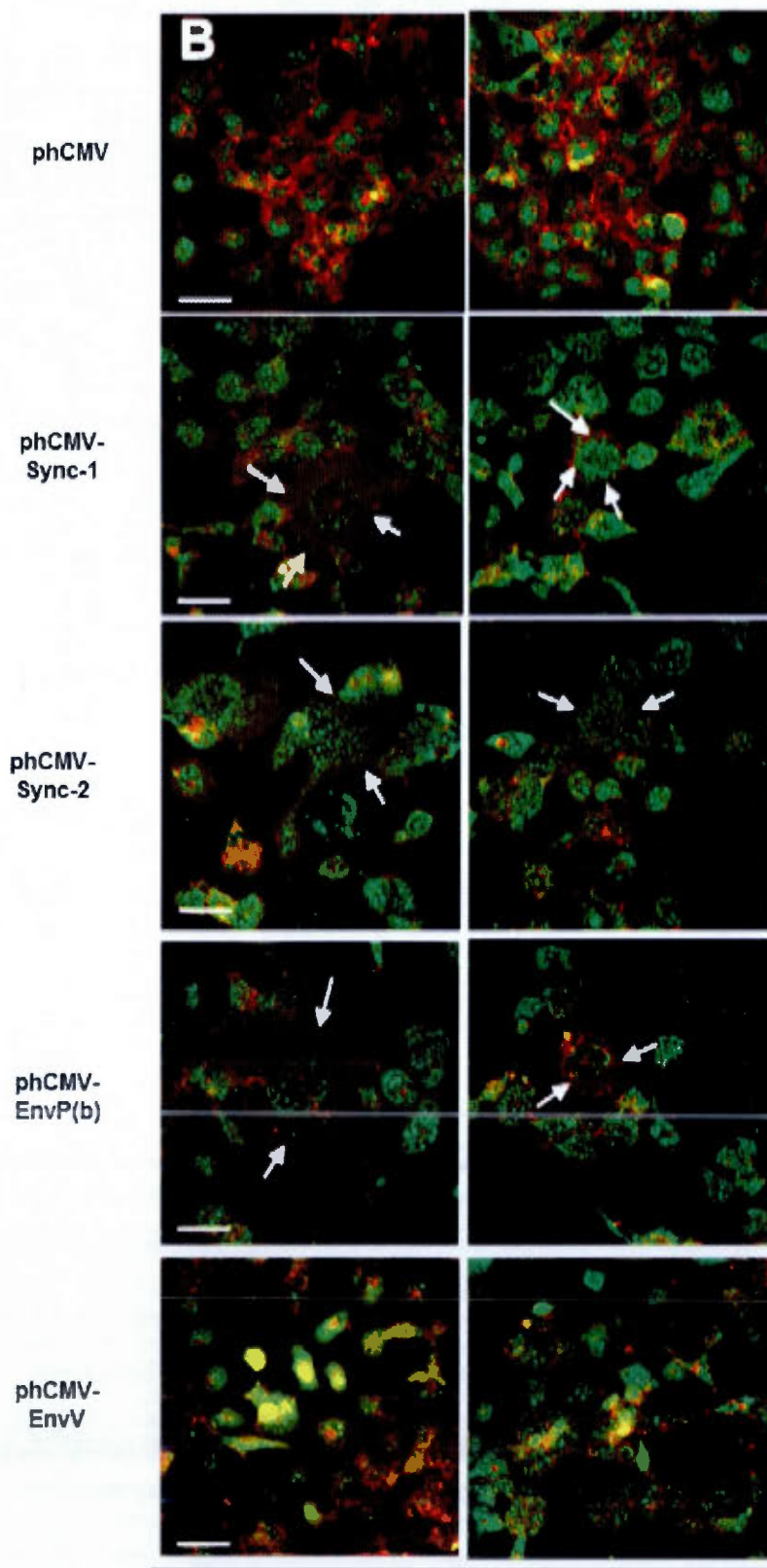
**Figure 2.2:** Expression pattern of EnvP(b) and EnvV in human trophoblasts



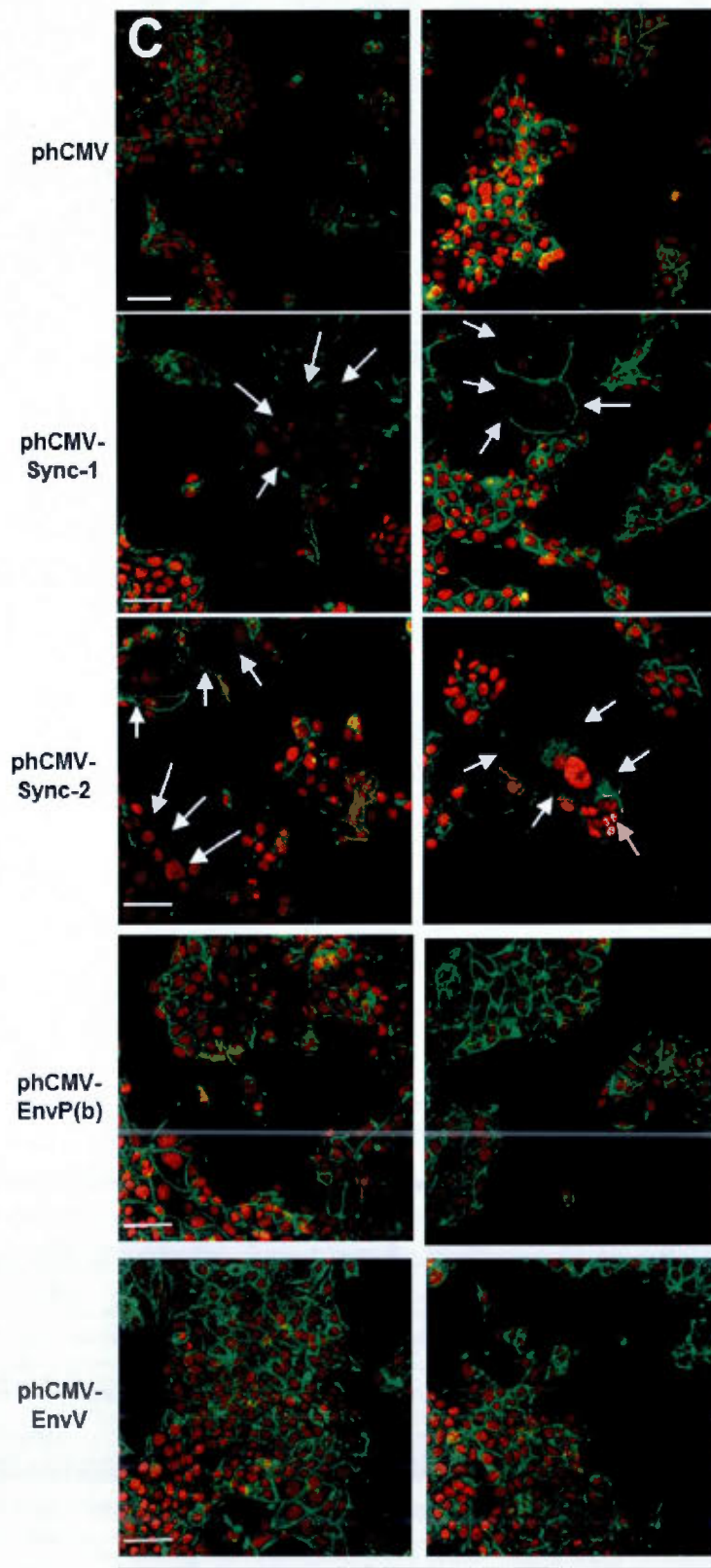
**Figure 2.3** Activation of EnvP(b) and EnvV promoters by forskolin



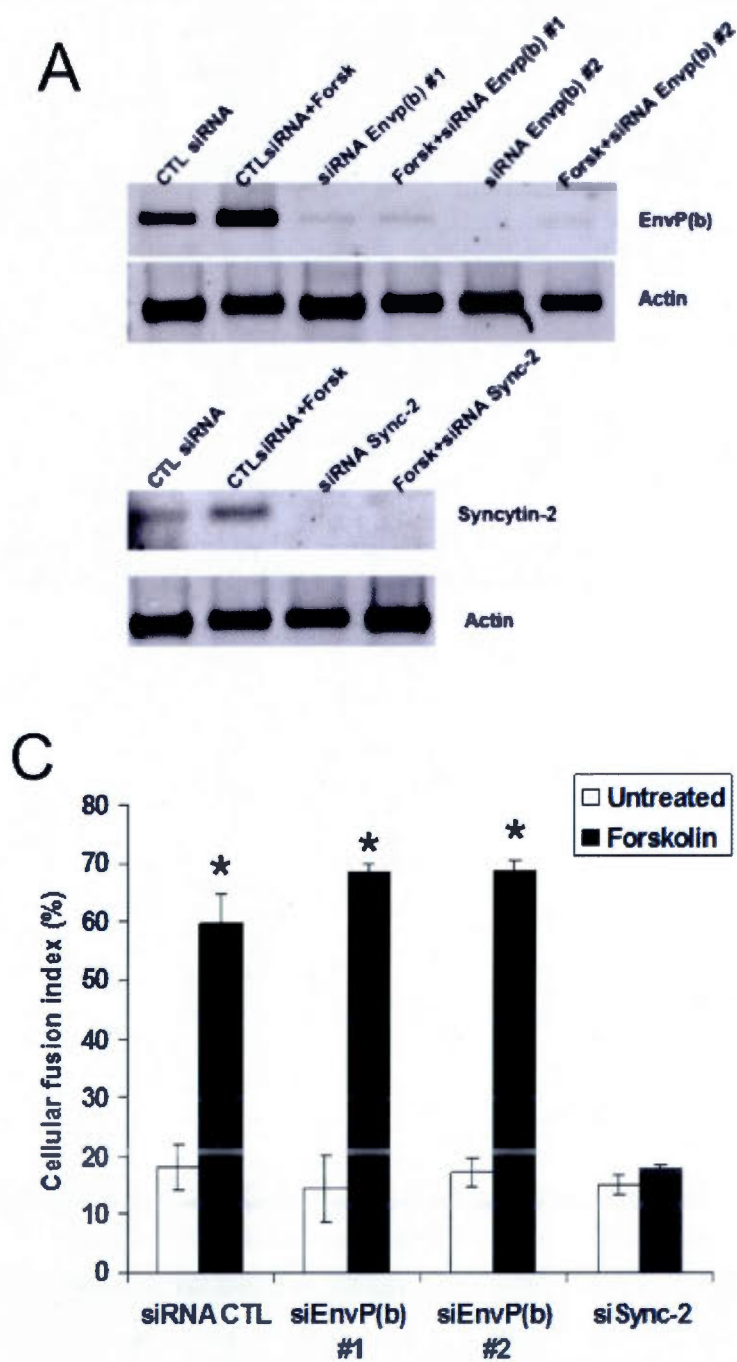
**Figure 2.4 :** Fusogenicity of the HERV env protein



**Figure 2.4 :** Fusogenicity of the HERV env protein

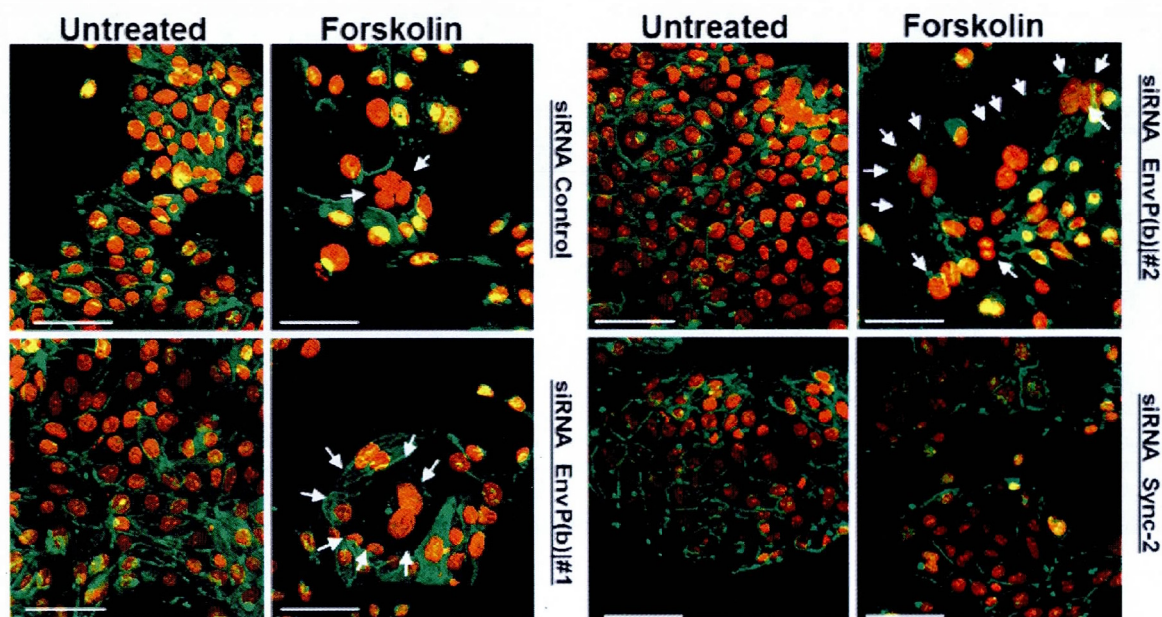


**Figure 2.4** : Fusogenicity of the HERV env protein



**Figure 2.5:** Repression of EnvP(b) expression has no impact on BeWo cell fusion

B



**Figure 2.5:** Repression of EnvP(b) expression has no impact on BeWo cell fusion

### 2.2.9 Figures legends (supplementary material)

#### **Figure 2.S1: EnvV mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas.**

Expression of envV mRNA was measured and compared by real-time RT-PCR between placentas from either 5 normal (CTL), 5 moderate (PEL) or 3 severe pre-eclamptic (PES) patients. Normalized relative expression levels represent the mean values  $\pm$  S.E.M. of quantified mRNA levels from normal, moderate and severe pre-eclamptic placentas (\*  $p < 0.05$ ).



### 2.2.10 Supplementary material

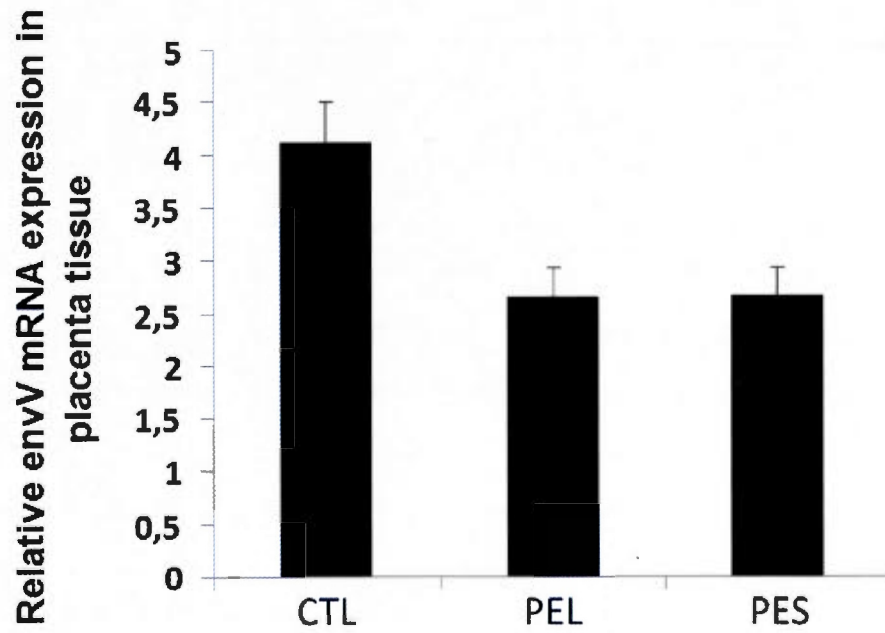


Figure 2.S1: EnvV mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas

### **2.2.11 Acknowledgements**

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (B.B.). A.V. holds an Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). B.B. holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2). We thank Denis Flipo for his excellent technical assistance in the confocal microscopy experiments.

## CHAPITRE III

### ARTICLE 2 :

#### **3.1 Contributions**

**Titre de l'article :**

***Reduced expression of both Syncytin-1 and Syncytin-2 correlates with severity of pre-eclampsia***

**Auteure principale:** Amandine Vargas

**Collaborateurs :** Chirine Toufaïly, Frédérique LeBellego, Éric Rassart 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. Les expériences ont aussi été réalisées par moi-même. Les tests statistiques découlant des expériences ont été réalisés par Chirine Toufaïly sous ma supervision. Les accouchements ont eu lieu 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 du Dre Frédérique Le Bellego.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant la mise en forme. Cependant, la version soumise et publiée dans la revue ***Reproductive Sciences*** (Novembre 2011) a été modifiée selon les exigences du journal.

**3.2 Reduced expression of both Syncytin-1 and Syncytin-2 correlates with severity of pre-eclampsia**

**Amandine Vargas, Chirine Toufaily, Frédérique LeBellego, Éric Rassart, Julie Lafond and Benoit Barbeau\***

*Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, 2080 St-Urbain, Montréal, Québec, Canada, H2X 3X8*

E-MAIL address: [amandine.vargas@voila.fr](mailto:amandine.vargas@voila.fr); [toufailychirine@hotmail.com](mailto:toufailychirine@hotmail.com); [fredlebelleg@hotmail.com](mailto:fredlebelleg@hotmail.com); [rassart.eric@uqam.ca](mailto:rassart.eric@uqam.ca); [lafond.julie@uqam.ca](mailto:lafond.julie@uqam.ca)

\*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](mailto:barbeau.benoit@uqam.ca)

### 3.2.1 Abstract

Human endogenous retroviruses (HERVs) represent up to 8% of the human genome and express several of its genes in the placenta. Studies have demonstrated that HERV envelope proteins syncytins 1 and 2 play a crucial role in trophoblast fusion and placenta development. Here, we compared the levels of placental expression of syncytins with the severity of preeclampsia (PE) symptoms. Confocal microscopy experiments indicated a pronounced deficiency in cellular fusion in trophoblast cells from patients with PE when compared to controls. As determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot analyses, syncytin mRNA and protein levels were decreased in PE placentas versus controls. Interestingly, syncytin 2 levels were more importantly impaired than syncytin 1. Our results further highlighted the existence of a correlation between the extent of the decrease in the expression levels of both fusogenic proteins and the degree of severity of PE symptoms. These HERV proteins could thereby be used as potential markers for the early diagnosis of PE.

**KEYWORDS :** HERV, Syncytin, cytotrophoblasts, fusion, pre-eclampsia

### 3.2.2 Introduction

Human endogenous retroviruses (HERVs) are stably inherited retroviral sequences thought to have entered human germ cell lines several million years ago. Human endogenous retroviruses are dispersed throughout the genome and are estimated to represent up to 8% of the entire human genome (Larsson and Andersson, 1998; Löwer et al., 1996). A majority of HERVs are defective due to various alterations such as point mutations, insertions, deletions, or recombination events. However, a few HERV sequences have conserved intact open reading frames coding for functional proteins. Their conservation during the evolution and their important distribution in the human genome suggest that they play important roles. Such an example comes from the human placenta, which actively expresses several envelope (Env) proteins encoded by HERVs (Aagaard et al., 2005; Blaise et al., 2003; Mi et al., 2000). In fact, early evidence has suggested the importance of 2 specific HERV envelope proteins, syncytin 1 and syncytin 2, during placenta development (Mi et al., 2000; Blaise et al., 2003; (Chen et al., 2006; Taylor et al., 2006). More precisely, these fusogenic proteins are thought to mediate cell fusion of placental cytotrophoblast cells to form the functionally essential multinuclear syncytiotrophoblast layer. Furthermore, a number of studies have highlighted a direct correlation between reduced syncytin 1 expression and pregnancy-related disorders (Chaiworapongsa et al., 2004; Chen et al., 2006; Keith et al., 2002; Keller et al., 2007; Knerr et al., 2002; Langbein et al., 2008).

Preeclampsia (PE) is a placental pathology related to pregnancy specific to the human species. Preeclampsia occurs in 2% to 7% of pregnant women being responsible for maternal and perinatal morbidity (Acien et al., 1990). Identification of PE in pregnant women is based on clinical symptoms such as arterial hypertension and a significant increase in urinary protein excretion in the 20th week of amenorrhea (Wilson et al., 2003). Based on early findings related to syncytin 1 and PE development (Keith et al., 2002; Langbein et al., 2008; Knerr et al., 2002; ; Chen et al., 2006; (Chaiworapongsa

et al., 2004) the aim of this study was to assess the expression levels of both syncytin 1 and syncytin 2 in relation to the severity of PE symptoms.

### 3.2.3 Results

To assess cell fusion in primary trophoblasts, cells were first isolated from human placentas of uncomplicated term pregnancies or from placentas derived from severe PE patients as previously described (Kliman et al., 1986). After 72 and 96 hours of culture, we first noted a significant reduction in cell fusion in trophoblast cells isolated from PE placentas when compared to trophoblast cells obtained from normal pregnant women (**Figure 1A**). Quantification of the cell fusion index by confocal microscopy showed that this value was less than 40% in primary trophoblasts obtained from patients with PE in comparison to 73% in normal trophoblast cells after 4 days of culture (**Figure 1B**). Reduction in cytotrophoblast cell fusion was apparent for all of the tested samples taken from patients with PE having moderate and severe symptoms in comparison to normal placenta-derived cytotrophoblast cells.

As syncytin 1 and syncytin 2 are likely the important mediators of cell fusion, we next analyzed their messenger RNA (mRNA) and protein levels in normal and in moderate-to-severe PE placentas. Real-time RT-PCR analyses were thus conducted. Our real-time RT-PCR analyses revealed lower expression levels of syncytin 1 in patients with moderate PE placentas when compared to normal controls (**Figure 2A**). A more pronounced decrease in syncytin 1 mRNA levels was however noted in patients with severe PE placentas (**Figure 2B**). For syncytin 2, a similar decrease in mRNA levels was observed, although this downregulation was more evident in both moderate and severe patients with PE when compared to the decrease in the level of syncytin 1 mRNA in corresponding placenta samples (**Figure 2C, D**).

Western blot analyses confirmed the real-time RT-PCR data, showing important reduction of both syncytin 1 and syncytin 2 protein levels in PE samples (**Figure 3A, B**). Interestingly, quantification of the band intensity revealed that differences in syncytin 1 expression were modest and nonsignificant in patients with moderate PE placentas compared to normal placentas (**Figure 3C**). On the other hand, syncytin 2 protein levels in patients with PE showed a dramatic reduction in both PE manifestations (**Figure 3D**), strongly highlighting a poor placental abundance of syncytin 2 proteins in patients with PE having severe symptoms. In these experiments, GAPDH was used as a loading control. We have also confirmed equal loading of the various samples through amido black staining of the membranes (data not shown).

#### **3.2.4 Discussion**

Previous studies had shown that PE was associated with a defect in placenta development (Genbacev et al., 1996; Redline and Patterson, 1995). Given the importance of HERV syncytin 1 and syncytin 2 in trophoblast fusion that we and others have demonstrated (Mi et al., 2000; Blaise et al., 2003; Blond et al., 1999; (Chen et al., 2008; Frendo et al., 2003; Malassine et al., 2006; Vargas et al., 2009), we were interested in determining to what extent the expression level of these proteins was altered and how these alterations correlated with disease severity.

These results are in agreement with a previously published report, which had also highlighted reduced fusion of trophoblast cells isolated from PE placentas (Langbein et al., 2008). In addition, earlier reports have also demonstrated that PE-mimicking hypoxia condition also led to reduced cell fusion of both BeWo and primary human trophoblast cells (Kudo et al., 2003; Wich et al., 2009).

An important link between PE and syncytin 1 expression has been demonstrated in previous studies, ( Keith et al., 2002; Knerr et al., 2002; Langbein et al., 2008; Chen et al., 2006; Lee et al., 2001), and recent reports also hinted toward a reduction in



syncytin 2 expression in placenta derived from patients with PE (Chen et al., 2008; Kudaka et al., 2008). Our results provide the first comparison of syncytin 1 and syncytin 2 expression levels in relation to symptom severity in patients with PE. Our results have revealed an important and significant decrease in the expression of both HERV *env* genes in PE placentas compared with gestational age-matched controls. However, a more important reduction in syncytin 2 mRNA and protein levels was noted and might suggest that this HERV Env protein has a more important impact on the reduced fusion of cytotrophoblast cells, as we have recently demonstrated in both BeWo and human primary trophoblast cells through the testing of small interfering RNAs (siRNAs) (Vargas et al., 2009). In addition, syncytin 2 expression increases considerably during the second trimester of gestation, which is concomitant with the appearance of the first symptoms of PE (Chen et al., 2008). Furthermore, we have demonstrated that its expression is considerably increased during fusion events in primary trophoblasts (Vargas et al., 2009). Based on our results, we are thus suggesting that the reduction of the syncytin 2 protein in patients with PE has an important effect on primary trophoblast fusion and contribute importantly to the known symptoms of this disease.

### 3.2.5 Conclusions

In summary, our results are thus demonstrating that the reduced expression of HERV syncytin 1 and syncytin 2 in PE likely results in the observed decrease in cell fusion of human primary trophoblasts *in vitro*. In addition, decreased expression of these *HERV* genes (more importantly for syncytin 2) correlates with the severity of PE. These HERV-derived proteins might thereby serve as markers to evaluate women at risk of developing PE during pregnancy.

### 3.2.6 Materials and methods

#### 3.2.6.1 Patients

Defined criteria used in this study for the diagnosis of PE were based on recommendation from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy, the Canadian Hypertension Society, and the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. The severity of PE during pregnancy was based on the following criteria. First, patients with PE ( $n = 9$ ) without adverse outcomes were termed moderated PE (MPE) and were defined by sustained hypertension or diastolic BP exceeding 90 mm Hg or more and with proteinuria  $\geq 0.3$  g/d (in 24-hour harvest) for more than 4 hours. Patients with PE showing adverse outcomes were named severe PE (SPE) and had a diastolic BP measurement exceeding 110 mm Hg on at least 2 different readings within a 4-hour period, with the following characteristics:  $>3$  g/d proteinuria (in 24-hour harvest), low platelet counts ( $<100\ 000$ ), and/or elevated liver enzymes (alanine transaminase [ALT]  $>35$   $\mu\text{L}$ , aspartate aminotransferase [AST]  $>30$   $\mu\text{L}$ , and/or lactate dehydrogenase [LDH]  $>670$   $\mu\text{L}$ ). This last group included 7 patients. A control group was also used in this study and counted 8 normal pregnant women (see **Table 1**). Human placental tissues were provided by pregnant women after informed consents and approval was issued by the Ethic Committee from the Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

#### 3.2.6.2 Cell culture

Placental villi were cut and thoroughly washed to remove blood. Thereafter, they were incubated 4 times in a digestion medium composed of Hanks balanced salt solution containing trypsin (from  $9.6 \times 10^5$  to  $1.8 \times 10^6$  U per digestion) and DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis Indiana; from 19 to 37.5 mg per digestion) for 30 minutes at  $37^\circ\text{C}$  in a water bath with continuous shaking. The dispersed cells were

layered on top of a discontinuous 5% to 70% Percoll gradient and centrifuged for 25 minutes at 507g. The intermediate layers (density between 1.048 and 1.062) containing cytotrophoblast cells were removed and washed extensively, and cell viability was determined by trypan blue exclusion. Following trophoblast isolation, cells were seeded at a density of approximately  $1.5 \times 10^6$  cells per well in a 24-well plate. After 16 hours, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) 1× and fresh medium was subsequently added. The complete culture medium, consisting of Dulbecco modified Eagle medium with high glucose (DMEM-HG), 2 mmol/L glutamine (Invitrogen Canada Inc, Burlington, Canada), 10% fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories Inc, Toronto, Canada), and penicillin/streptomycin/neomycin (PSN, 1×; Invitrogen), was refreshed daily and trophoblast cells were maintained for a maximum of 4 days in culture. The purity of each preparation of cytotrophoblast cells was evaluated by flow cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin 7 (Millipore, Mississauga, Canada), a specific marker of trophoblast cells. Only preparations with a minimum of 96% of cytotrophoblast cells were used in this work. All experiments with isolated primary trophoblast cells were conducted in triplicate under normoxia conditions. Experiments were repeated 3 times, in each case with a different placenta donor.

#### 3.2.6.3 Cell fusion assay

Isolated primary trophoblast cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were cultured up to day 4. Cells were then fixed in methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes and incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 30 minutes to eliminate nonspecific binding. Cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse monoclonal anti-desmoplakin antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, cat no. D-1286; 1/700) in PBS containing 0.2% bovine serum albumin for 1½ hours at room temperature, washed 3 times with PBS, and incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin

G ([IgG] Invitrogen; 1/1000) for 1 hour at room temperature. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide ([PI] Sigma-Aldrich; 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, Hercules, California). All observations were performed at a final magnification of 400×. A syncytium was defined as an agglomeration of 2 or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane staining. Cellular fusion index was determined as follows: five fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei in syncytia. In general, a total of 200 nuclei were counted per field and, thus, nearly 1000 nuclei were counted in each well. Three replicate wells were examined per experimental condition (3 normal placentas and 3 PE placentas, each at 2 different times) from which a final cellular fusion index (mean ± standard error of the mean [SEM]) is presented and represents the final average of the 3 percentage values.

#### 3.2.6.4 Real time RT-PCR

RNA from placental tissue (30 mg) was extracted by the Rneasy<sup>(R)</sup> Plus mini kit (Qiagen, Mississauga, Canada), according to manufacturer's instructions and as previously described (Vargas et al., 2008). Real-time PCR reactions were then performed in the presence of each specific primer generated using the Light Cycler Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnostics) 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, annealing at 57°C for 15 seconds, and elongation at 72°C for 12 seconds). Amplification of the human hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT-1) complementary DNA (cDNA) with sense and antisense primers (5'-AAGCTTGCGACCTTGACC-3' and 5'-GACCAGTCAACAGGGGACATAA-3', respectively) was used as a reference gene for normalization.

#### 3.2.6.5 Western blot analysis

Western blot analyses from total placenta extracts were next performed for an evaluation of syncytin 1 and syncytin 2 protein levels. Maternal and fetal membranes were first removed from the placenta tissue and small pieces from up to 10 cotyledons were collected as previously described (Mayhew, 2008). Tissues were washed with a lymphocyte lysis buffer (1.7 mmol/L Tris-HCl pH 7.3, 1.44 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl and protease inhibitor cocktail in tablets; Roche diagnostics) and proteins were isolated in an extraction buffer (125 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.4% Triton X-100 (v/v) and protease inhibitor cocktail in tablets). Protein concentrations were quantified with the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Thermo Fisher Scientific Inc, Rochester, New York). Extracts were migrated on a 8.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore). Membrane was blocked with 3% Bovine Serum Albumin (BSA) and incubated with our polyclonal anti-syncytin 2 antibody (1/7000) (Vargas et al., 2009), a polyclonal anti-syncytin 1 antibody (Orbigen, San Diego California, 1/300) or a polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1/5000; Santa Cruz, California). Membranes were further incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/20000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), and signals were detected using the BM chemiluminescence blotting substrate (Roche

Diagnostics). Membranes were subsequently exposed on an ECL high-performance chemiluminescence film (Amersham Biosciences). Band intensities were calculated using the Alpha EaseFC Flurochem 8900 software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California).

#### 3.2.6.6 Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicates. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistically analyzed using a 2-tailed Student *t* test for 2-group comparisons, with  $P < .05$  being considered significant.

#### **3.2.7 Figure legends**

##### **Figure 3.1: Fusion of human primary trophoblast cells isolated from normal and pre-eclamptic placentas.**

(A) Primary trophoblast cells isolated from normal (N) and severe pre-eclamptic (PE) placentas were cultured for 72 and 96 hours and stained with an anti-desmoplakin antibody (green) and propidium iodide (nucleus: red). Stained trophoblast cells were visualised by confocal microscopy at a 400X magnification (scale bars, 100  $\mu$ m). (B) Three placentas per group (control vs pre-eclamptic) were evaluated in our fusion assay. Subsequently, three wells for each placenta were then examined at each time point (72h and 96h) and cell fusion events were then counted. The cellular fusion index was determined as follow: five fields were analysed per well and an average index was calculated and expressed as the percentage number of nuclei comprised in syncytia per group.

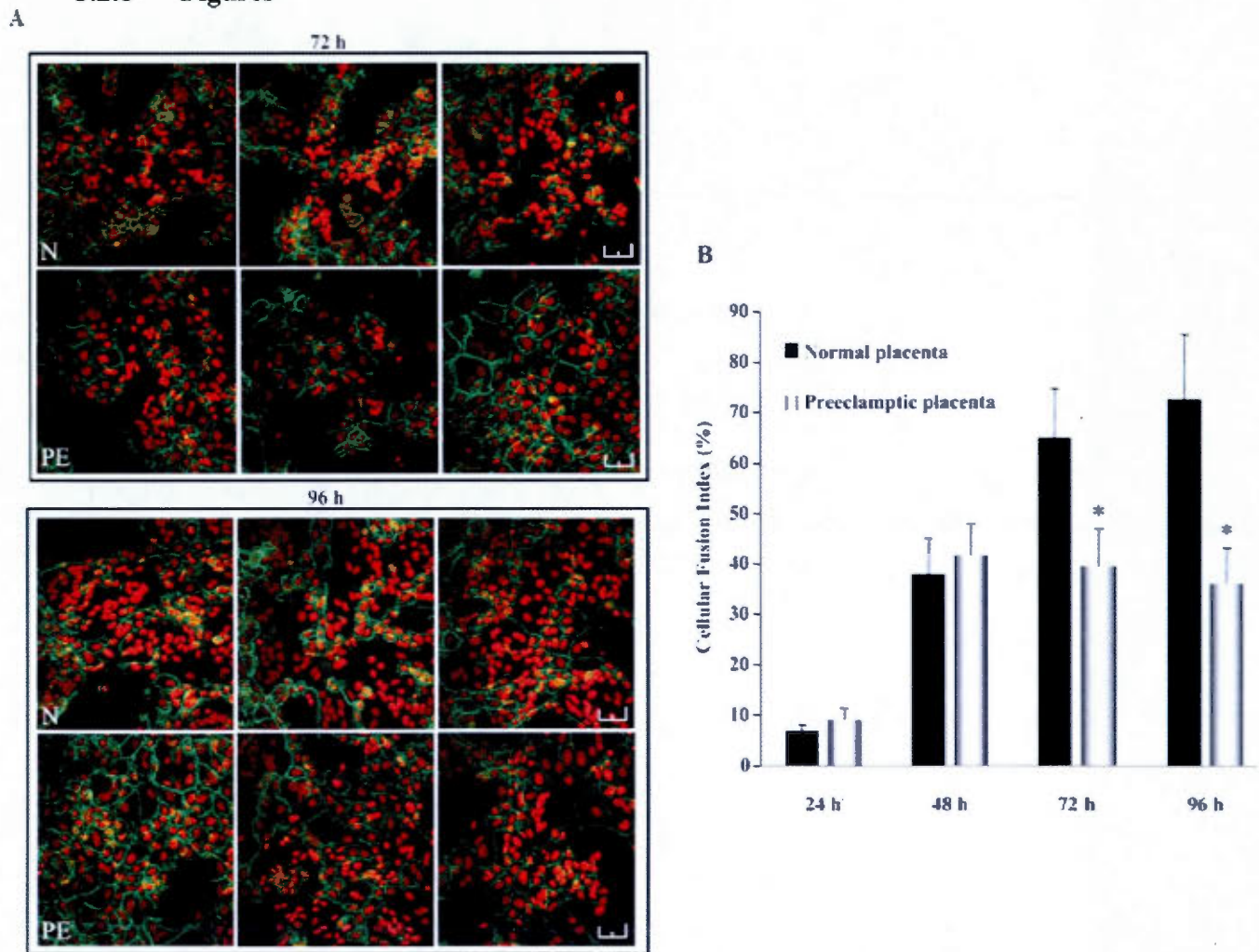
**Figure 3.2: Syncytin-1 and Syncytin-2 mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas.**

Expression of Syncytin-1 (A,B) and Syncytin-2 (C,D) was measured and compared by real-time RT-PCR between placentas from either 8 normal, 9 moderate or 7 severe pre-eclamptic (PE) patients. Normalized relative expression levels represent the mean values +/- S.E.M. of quantified mRNA levels from normal, moderate and severe pre-eclamptic placentas (\*  $p < 0.05$ ). Values are presented as percentage, the 100% level taken from placenta of the control group.

**Figure 3.3: Syncytin-1 and Syncytin-2 protein levels in normal and pre-eclamptic placentas.**

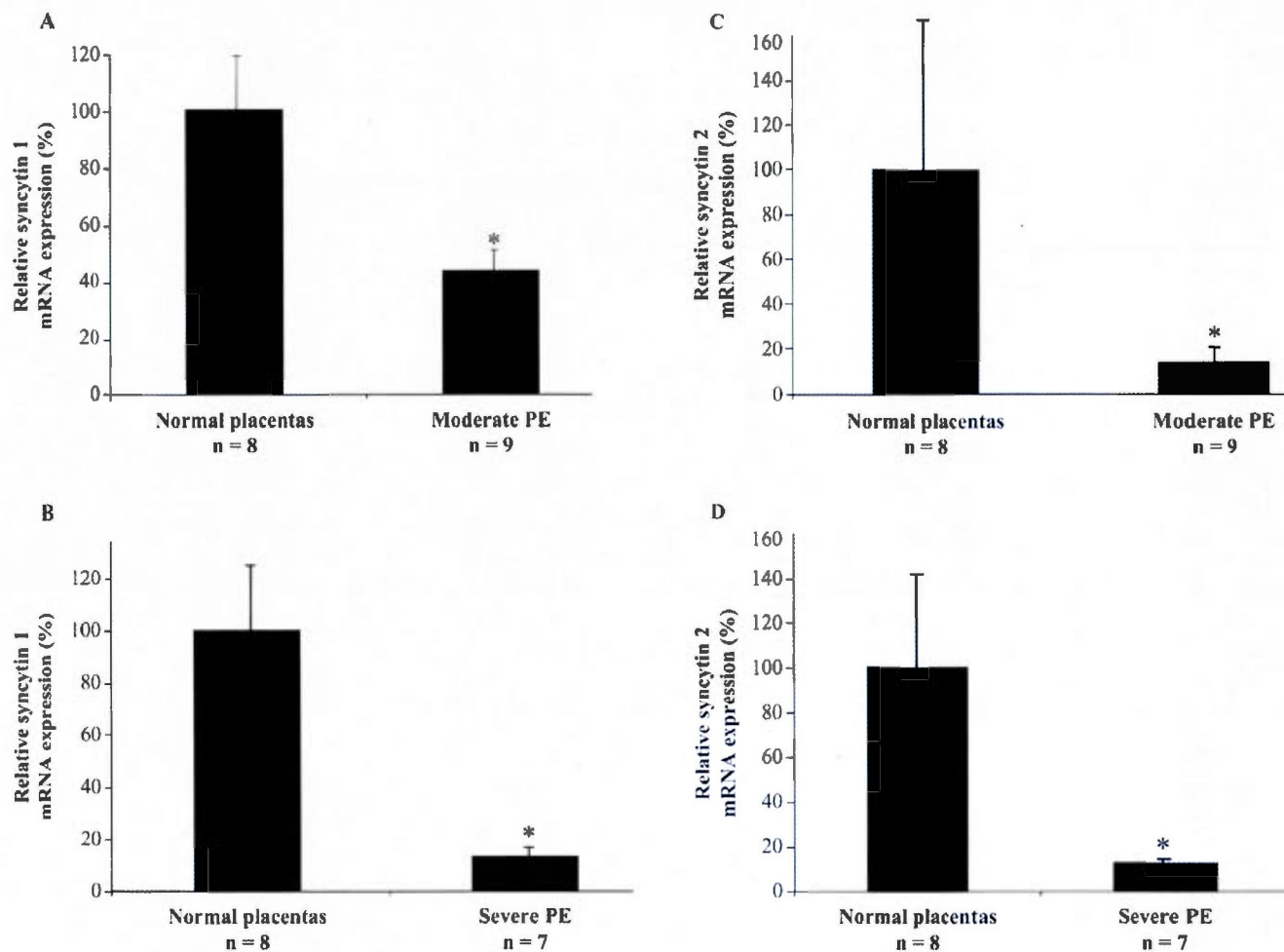
A, B Extracts (100  $\mu$ g) from normal (N) (n=7), moderate pre-eclamptic (MPE) (n=9) and severe pre-eclamptic (SPE) (n=7) placentas were analyzed by Western blot for Syncytin-1 and Syncytin-2 protein levels (GAPDH served as a loading control). C, D Band intensity of signals for Syncytin-1 and Syncytin-2 was measured for each sample and normalised with the corresponding GAPDH signal. The resulting value represents the mean band intensity +/- S.E.M. out of the placentas/condition analyzed in panels A and B ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.8 Figures



**Figure 3.1:** Fusion of human primary trophoblast cells isolated from normal and pre-eclamptic placentas.





**Figure 3.2:** Syncytin-1 and Syncytin-2 mRNA levels in normal and pre-eclamptic placentas.

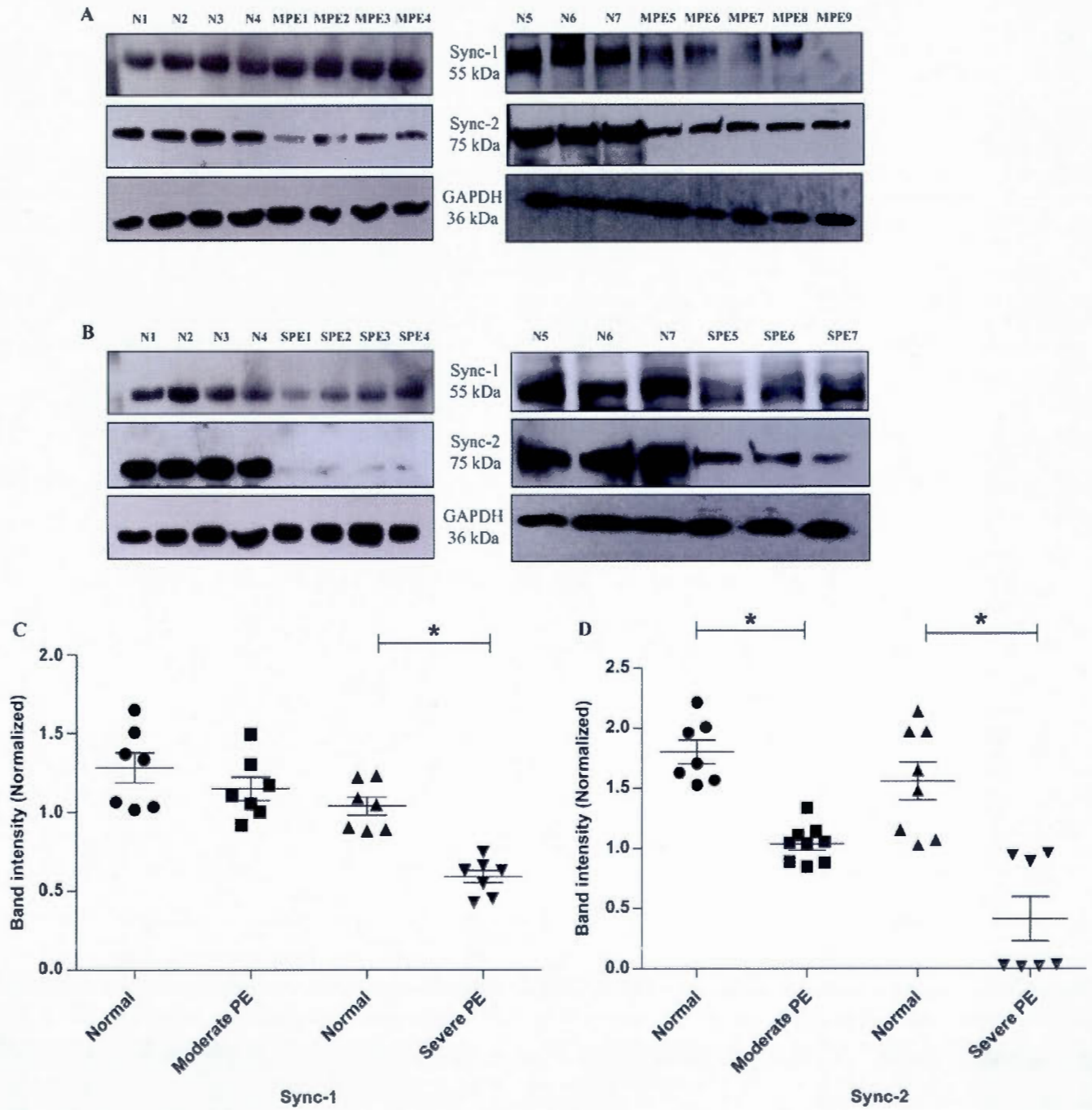


Figure 3.3: Syncytin-1 and Syncytin-2 protein levels in normal and pre-eclamptic placentas.

### 3.2.9 Table

Parameters	Controls n=8	Moderated PE n=9	Severe PE n=7
Age (years)	35.66 ± 1.52	31.75 ± 4.92	32 ± 1.82
Gestational age (weeks)	37.566 ± 2.91	38.32 ± 2.25	38.25 ± 1.70
Diastolic BP (mm Hg)	<90	>90	>110
Proteinuria (g/d) (in a 24-hour collection)	<0.3	≥0.3	>3
Platelets	S/O	S/O	<100 000
Liver enzymes	S/O	S/O	ALT >35 µ/L AST >30 µ/L and/or LDH >670 µ/L

Abbreviations: PE, preeclampsia; BP, blood pressure; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; S/O: not measured.

**Table 3.1:** Clinical characteristics of controls and patients with pre-eclampsia.

### 3.2.10 Acknowledgements

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (B.B.). A.V. holds an Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). FLB was supported by a Strategic Training Initiative in Research in Reproductive Health Sciences post-doctoral fellowship. B.B. holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2). We thank Denis Flipo for his excellent technical assistance in the confocal microscopy experiments.

## CHAPITRE IV

### ARTICLE 3 :

#### **4.1 Contributions**

**Titre de l'article :**

***HERV envelopes incorporated in placenta-derived retroviral-like exosomes are important for cell uptake and are potential preeclampsia biomarkers***

**Auteure principale :** Amandine Vargas

**Collaborateurs :** Maude Ethier-Chiasson, Denis Flipo, Julie Lafond et Caroline Gilbert

**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. Les expériences ont aussi été réalisées par moi-même. L'interprétation des résultats et l'analyse des données obtenues en microscopie confocale ont été guidés par Denis Flipo. Les mesures d'activités AcHE ainsi que les analyses NTA ont été réalisées sous la supervision du Dre Caroline Gilbert. Finalement, les accouchements ont eu lieu 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 Maude Ethier-Chiasson.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant la mise en forme. Cependant, la version soumise à *Nature Medecine* (Novembre 2012) a été modifiée selon les exigences du journal.

**4.2 HERV envelopes incorporated in placenta-derived retroviral-like exosomes are important for cell uptake and are potential preeclampsia biomarkers**

**Amandine Vargas<sup>1</sup>, Maude Ethier-Chiasson<sup>1</sup>, Denis Flipo<sup>1</sup>, Julie Lafond<sup>1</sup>,  
Caroline Gilbert<sup>2</sup> and Benoit Barbeau<sup>1\*</sup>**

*<sup>1</sup>Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, 2080 St-Urbain, Montréal, Québec, Canada, H2X 3X8*

*<sup>2</sup>Laval University, Faculty of Medicine and Centre de Recherche en Infectiologie, 2705 boulevard Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2*

E-MAIL address: [amandine.vargas@voila.fr](mailto:amandine.vargas@voila.fr); [ethier\\_chiasson.maude@uqam.ca](mailto:ethier_chiasson.maude@uqam.ca);  
[lafond.julie@uqam.ca](mailto:lafond.julie@uqam.ca); [flipo.denis@uqam.ca](mailto:flipo.denis@uqam.ca); [Caroline.Gilbert@crchul.ulaval.ca](mailto:Caroline.Gilbert@crchul.ulaval.ca)

\*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](mailto:barbeau.benoit@uqam.ca)

#### 4.2.1 Abstract

Exosomes are small extracellular vesicles derived from luminal membranes of endosomes, representing internal vesicles of multivesicular bodies (MVBs)(Cocucci et al., 2009; They et al., 2002). Upon fusion with the plasma membrane, MVBs subsequently release the exosomes in the extracellular milieu. These vesicles mediate intercellular communication and, through adhesion, uptake and/or fusion to cells, are involved in several biological processes, such as antigen presentation, tumor metastasis, cell signaling,...(Bang and Thum, 2012; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008; They et al., 2009; Valadi et al., 2007). However, little information exists on the mechanism mediating exosome interaction and uptake by surrounding cells. Herein, we demonstrate that Syncytin-1 and Syncytin-2, encoded by two ancestral retroviral envelope (env) genes contained in Human Endogenous Retrovirus sequences, are present at the surface of exosomes derived from primary cytotrophoblasts (CT). Using BeWo cells as target, we further report that CT exosomes are uptaken rapidly through endocytosis, mainly trafficking through early endosomes to the perinuclear region. Importantly, siRNAs transfected in isolated primary cytotrophoblasts indicated that Syncytin-1- or Syncytin-2-deprived exosomes are greatly affected in their capacity to be internalized. Using sera from pregnant women, we further demonstrate that both Syncytin-1 and Syncytin-2 can be detected on the surface of circulating exosomes and that Syncytin-2 levels are reduced in exosomes from women suffering with PE, when compared to serum-derived exosomes from normal pregnant women. These results highlight the retroviral-like nature of placental exosomes through their association with HERV Env proteins providing a form of tropism and indicate that these proteins could be used as new potential PE biomarkers.

#### 4.2.2 Introduction

Exosomes are small extracellular vesicles (30-100nm) derived from the luminal membranes of multivesicular bodies which fuse with the cellular membrane to allow their release (Cocucci et al., 2009; Thery et al., 2002; Valadi et al., 2007; van der Goot and Gruenberg, 2006). Exosomes are recognized as a novel mode of intercellular communication which have been shown to be involved in antigen presentation, tumor metastasis, and transmission of infectious agents (Johnstone, 2006; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008). Their composition is dependent on the tissue or cell type of origin. However, several proteins are often found associated in all types of exosomes, such as heat shock proteins (HSP27, HSP70 and HSP90), signal transduction kinases, members of the ESCRT complex, adhesion molecules (ICAM-I), MHC I and tetraspanins (Mathivanan et al., 2010; Pant et al., 2011; Simons and Raposo, 2009). Some of these proteins are associated with exosomal functions such as adhesion and fusion with adjacent cells, possibly resulting in cell signalling (Couzin, 2005; Fevrier and Raposo, 2004; Fleissner et al.; Sarkar et al., 2009). In fact, exosomes have been reported to deliver ligand and proteins (Kim et al., 2005a; Sarkar et al., 2009), stimulate cells through signaling pathways and transfer genetic information between cells (Deregibus et al., 2007) and, transducing specific miRNAs and resulting in modulation of transcription (Bruno et al., 2009). Other studies have suggested that exosomes have virus-like properties (Belting and Wittrup, 2008; Sarkar et al., 2009; Schlecht-Louf et al., 2010). Exosomes can be detected in several human body fluids such as urine (Pisitkun et al., 2004), amniotic fluid (Keller et al., 2007) or plasma (Caby et al., 2005; Simons and Raposo, 2009) and are released by numerous cell types including platelets, dendritic cells (Thery et al., 1999), tumor cells (Mears et al., 2004), epithelial cells (van Niel et al., 2001) and trophoblasts (Atay et al., 2011a; Atay et al., 2010; Atay et al., 2011b; Luo et al., 2009; Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010).

Trophoblasts are placental cells, which are subdivided according to their differentiation state. The villous cytotrophoblasts (CTs) have the capacity to fuse and form the multinuclear peripheral syncytiotrophoblast layer, which plays a crucial role in assisting proper nutrient and oxygen levels to the developing foetus (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2004; Blond et al., 1999a; Blond et al., 2000; Frendo et al., 2003; Malassine et al., 2006; Malassine et al., 2005; Mi et al., 2000; Vargas et al., 2009). In recent years, several reports have demonstrated that Syncytin-1 and Syncytin-2, two envelope proteins produced by Human Endogenous Retroviruses (HERVs) are important players in syncytiotrophoblast formation (Chang et al., 2004; Chen et al., 2008; Dupressoir and Heidmann, 2011; Heidmann et al., 2009; Huppertz et al., 2006; Vargas et al., 2009). For several million years after their integration in our genome, they have retained their fusogenic ability and are thereby crucial mediators of fusion events during placental development. Furthermore, both proteins have been shown to be importantly downregulated in placenta from pregnant women suffering from pre-eclampsia (PE), a placental pathology specific to the human species, which can culminate in maternal and perinatal morbidity (Acien et al., 1990; Chen et al., 2008; Chen et al., 2006; Keith et al., 2002; Knerr et al., 2002; Lee et al., 2001; Vargas et al., 2011).

We and others have recently demonstrated that Syncytin-1 can be detected in placenta-derived microvesicles and exosomes (Holder et al., 2012b; Tolosa et al., 2012b). Since exosomes are produced by the syncytiotrophoblast layer and cytotrophoblasts at high levels in the blood circulation of pregnant woman (Frangsmyr et al., 2005; Kim et al., 2005a; Messerli et al., 2010; Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010; Redman and Sargent, 2008), we have hypothesized that incorporated HERV Env proteins are important components of placental exosomes and are needed for intercellular communication. Furthermore, we suggest that exosome composition, being representative of the surface composition of the trophoblast of origin, will be altered in placenta anomalies (such as pre-eclampsia)



associated with reduced expression of HERV Env proteins. Herein, we demonstrate that Syncytin-1 and Syncytin-2 are both present at the surface of cytotrophoblast-derived exosomes and mediate exosomes uptake by target cells. Furthermore, Syncytin-2 was importantly reduced in sera-derived placental exosomes from PE patients in comparison to sera from normal pregnancy. These data provide information as to the functional nature of these retroviral proteins, when incorporated into exosomes and validate their use as new potential PE biomarkers.

#### 4.2.3 Results

Exosomes were first purified from the supernatant of freshly isolated cytotrophoblasts through ExoQuick or differential ultracentrifugation steps (Taylor et al., 2011; They et al., 2006) (**Supplementary Fig. 1**). Efficacy of CT exosome purification was based on assessment of size and their cup-shaped nature by EM and Nanosight Nano ZS analyses and measurement of Acetylcholinesterase (AChE) activities (**Fig. 1A-C** and **Supplementary Table I**). We also demonstrated that, regardless of the day of harvest, their number did not vary significantly (**Fig. 1D**). Through Western blot analysis, CT exosomes were first monitored for both Grp78 (ER marker) and TSG101 (exosome marker) to distinguish them from other types of vesicles or from membrane contaminants (Cocucci et al., 2009; Sargent et al., 2003) (**Fig. 1E**). Importantly, both Syncytin-1 and Syncytin-2 were detected in all CT exosome samples in addition to the exosome-associated PLAP placenta marker (De Groote et al., 1983). Detection of Env proteins at the surface of CT exosomes was further confirmed by standard flow cytometry and confocal microscopy analyses of exosome-coated latex beads (**Fig. 1F** and **Supplementary Fig. 2**).

To monitor potential cellular uptake, PKH67-labeled CT exosomes were first tracked by confocal microscopy. As depicted in **Fig. 2A**, fluorescently-labeled CT exosomes presented the expected size. Intracellular trafficking of exosomes were next

determined in BeWo cells, a trophoblast-like cell line model, which differentiate and fuse in a Syncytin-1- and Syncytin-2-dependent fashion upon stimulation (Vargas et al., 2009). Cells incubated with labeled CT exosomes demonstrated early uptake after 30min (~12%) (**Fig. 2B**). Between 2 and 10 h, an increasing number of exosomes were internalized, some of which localized to the perinuclear region (**Fig. 2B-C**). However, a more pronounced rate of uptake was noted between 2 and 4 h. Live cell imaging at 4h further revealed intracellular trafficking of exosomes adopting random, but linear movement, suggestive of microtubule-dependent motion (**Supplementary movie 1**). Comparable entry was also observed upon incubation of labeled CT exosomes with primary cytotrophoblasts (**Supplementary Fig. 3**).

The intracellular distribution of CT exosomes was further studied through endosome/lysosome markers. As shown in **Fig. 2D** and **2E**, a number of CT exosomes co-localized with early endosome markers (EEA1 and Rab5), while only a few localized with the lysosome marker (Lysotracker). Through electron microscopy analyses (**Fig. 2 F-G** and **Supplementary Fig. 4**), electron-dense coated CT exosomes entered via endocytosis through coated vesicles. Exosomes were also often in close proximity to the nucleus and comprised in late endosome-like “megavesicles” (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Raposo et al., 2001). The endosomal membrane was also noted to bear dense segment, possibly resulting from fusion with exosome-containing early coated endosomes described above. Interestingly, when fluorescent signals from confocal microscopy experiments were compared at different time points, an increase in particle size was noted and further suggested final fusion of internalized exosomes to the late endosome membrane (**Fig. 2H**). No similar endosome structures were observed in non-treated BeWo cells, which might in part be due to the reported low exosome-producing characteristic of this cell line (Luo et al., 2009).

As Syncytin-1 and -2 are incorporated on the surface of CT exosomes, both proteins could thereby provide an increased specificity and efficiency to exosome

uptake by cells positive for their respective receptors, i.e. ASCT1/ASCT1 and MFSD2a(Blond et al., 2000; Esnault et al., 2008). We first monitored uptake of PKH67-labelled CT exosomes by BeWo cells using optimized flow cytometry (**Fig. 3A** and **Supplementary Fig. 5**). As demonstrated in **Fig. 3A**, stimulation of BeWo cells accentuated exosome binding/uptake, as compared to unstimulated cells. These differences were noted only when mean fluorescence intensity (and not percentage of positive cells, **Supplementary Fig. 5**) was considered, which thereby reflected a change in the number of bound and internalized exosomes per cell. To determine if incorporated HERV proteins were important for CT exosome binding, F(ab')<sub>2</sub> fragments of anti-Syncytin-1 or anti-Syncytin-2 antibodies vs. control F(ab')<sub>2</sub> fragments were incubated with exosome-treated BeWo cells (**Fig. 3B**). A reproducible reduction in the mean fluorescence signal was noted in the presence of anti-Syncytin-2 F(ab')<sub>2</sub> fragments. To more appropriately address the importance of exosome-associated HERV Env proteins in cell uptake, exosomes were isolated from cytotrophoblasts transfected with Syncytin-1- or Syncytin-2-specific siRNAs, leading in selective depletion of either HERV Env protein in resulting CT exosomes (**Fig. 3C**). In these experiments, both Syncytin-1- and Syncytin-2-depleted CT exosomes showed a marked decrease in their interaction and/or internalizing capacity with BeWo cells compared to non-depleted exosomes, as determined by flow cytometry and confocal microscopy (**Fig. 3D-E**). When the size of internalized particles was evaluated by live cell imaging, exosomes from HERV env siRNA-transfected cells (si-Sync1 and si-Sync2) were smaller than in control condition at late time points (**Fig. 3F**).

Circulating exosomes in pregnant women are likely to be important for a normal outcome during pregnancy, particularly for the fetomaternal immunotolerance state prevailing during gestation. In fact, previous studies suggested that HERV Env proteins had preserved a functional immunosuppression domain(Mangeney et al., 2007b). We were interested in testing if both HERV proteins could be detected in exosomes isolated from serum samples of pregnant

women using the modified ExoQuick procedure (Taylor et al., 2011) (**Supplementary Fig. 1**). Exosomes from blood samples of normal pregnant women were confirmed to be efficiently purified as determined by their size, EM cup-shaped structure and AChE activity (**Fig. 4A-C** and **Supplementary Table I**). Furthermore, Western blot analyses further revealed the presence of proper exosome markers (TSG101) and the absence of Grp78 (**Fig. 4D**). Importantly, analyses showed the presence of markers of PLAP as well as both Syncytin-1 and Syncytin-2. CD63-positive exosomes were further confirmed to be positive for PLAP, Syncytin-1 and Syncytin-2, as determined by a sandwich ELISA assay (**Supplementary Fig. 6**). As we and others (Chen et al., 2008; Chen et al., 2006; Keith et al., 2002; Vargas et al., 2011) have demonstrated that PE is associated with a diminished expression of Syncytin-1 and Syncytin-2 in placental tissue, we next tested if levels of Syncytin-1 and Syncytin-2 levels were reduced in serum-derived exosomes collected from normal (n=12) and PE (n=10) pregnant women corresponding to different trimesters of pregnancy (see **Supplementary Table II** for clinical characteristics of patients). No apparent differences in Syncytin-1 level were noted between normal and PE exosomes (data not shown). However, when normal and PE exosomes were analyzed by Western blot followed by measurement of densitometry ratios between Syncytin-2 and TSG101 signals (**Supplementary Fig. 7** and **Fig. 4E-G**), PE exosomes isolated from sera of 24<sup>th</sup> and 32<sup>nd</sup> gestational weeks showed a significant decrease in Syncytin-2 levels in comparison to exosomes isolated from normal placentas. Using an optimized Syncytin-2 ELISA assay (**Supplementary Fig. 8**), a significant decrease in Syncytin-2 levels in PE exosomes isolated at the 24<sup>th</sup> and 32<sup>nd</sup> gestational weeks was again observed, when compared to control (**Fig. 4H**).

#### 4.2.4 Discussion

We herein demonstrate that trophoblast-derived exosomes are internalized by target cells through endocytosis and transported to the perinuclear region. This is similar to the previously reported routing of exosome-related pre-melanosomes (Raposo et al., 2001). Very interestingly, this routing also resembles cellular entry of various viruses, such as HIV-1 (Bosch et al., 2008; Fackler and Peterlin, 2000; Miyauchi et al., 2009). Former reports have in fact hypothesized that exosome biogenesis and retrovirus replication might bear common origin (Apodaca, 2001; Chu and Ng, 2004; Izquierdo-Useros et al., 2011; Lakadamyali et al., 2003). Based on our data highlighting the importance of Syncytin-1 and Syncytin-2 for exosome binding and/or internalization in BeWo cells, these HERV proteins could indeed provide a form of tropism to these retroviral-like exosomes, alike envelope proteins on the surface of retroviruses. The fusogenic potential of these proteins could also offer a driving force for exosome fusion to the endosomal membrane, thereby culminating in content delivery and alteration of gene expression and cell viability through delivered proteins, mRNA and/or miRNA. Although we have focused on placenta-derived exosomes, Syncytin-1 and other HERV Env proteins with fusogenic capacity, such as EnvP(b), are expressed in other cell types and tissues (Blaise et al., 2003; Blaise et al., 2005a; Mi et al., 2000) and might therefore again be incorporated in produced exosomes. HERV Env proteins may thus play a broader role in intercellular communication mediated by exosomes through receptor-based interaction and fusion with target cells.

We have further demonstrated that exosomes could represent an interesting source for the use of Syncytin-2 as a new PE biomarker. Such an exosome-associated protein could feasibly lead to a diagnostic avenue if blood samples could be routinely harvested from pregnant women at second trimester visits. As an additional perspective to our data, a deficiency in exosome-associated Syncytin-2 levels could alter their capacity to interact with neighboring cells thereby resulting in abnormal

placental development and altered feto-maternal immunotolerance. Given that a limited quantity of serum is needed to isolate a sufficiently high number of exosomes to conduct our ELISA assay, our studies have strong implication for the identification of a PE diagnostic tool. We are currently assessing how early in pregnancy could variation in Synchronin-2 levels be significantly detected.

#### **4.2.5 Materials and methods**

##### 4.2.5.1 Cell lines and purification of primary cytotrophoblasts

The human BeWo choriocarcinoma cell line was maintained in ultracentrifuged (exosome-free) Ham's F-12 medium (Wisent, Montreal, Canada) supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% FBS (PAA Laboratories Inc, Toronto, Canada). Placentas (from 35 to 41 gestational weeks) were obtained after spontaneous vaginal delivery, in accordance with the established guidelines of the ethic committee of St-Luc Hospital of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (Montréal, Canada) and of Université du Québec à Montréal (Montréal, Canada). All participating women had signed an informed consent form. Primary cytotrophoblasts were isolated from placentas as previously described (Kliman et al., 1986; Vargas et al., 2009). Briefly, placental villi were cut, thoroughly washed and digested in Hanks balanced salt solution containing trypsin (from  $9.6 \times 10^5$  to  $1.8 \times 10^6$  U) and DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana). Dispersed cells were layered on top of a discontinuous Percoll gradient and centrifuged at 507g. Intermediate layers containing cytotrophoblasts were collected and washed extensively. Cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells per well in Dulbecco modified eagle medium (high glucose), 2 mM glutamine, 10% exosome-depleted FBS, and penicillin/streptomycin/neomycin (Invitrogen Canada Inc) and cultured for a maximum of 4 days. The purity of each cytotrophoblast preparation was evaluated by flow cytometry using FITC-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin 7

(Millipore, Mississauga, Canada), a specific marker of trophoblasts. All experiments with primary cytotrophoblasts were conducted in triplicates with three different placenta donors.

#### 4.2.5.2 Patients

PE diagnosis was based on recommendation from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy, the Canadian Hypertension Society, and the Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada. Patients with PE (n =10) showed sustained hypertension or diastolic BP exceeding 90 mm Hg or more and with proteinuria  $\geq 0.3$  g/d (in 24-hour harvest) for more than 4 hours (**Supplementary Table II**). The control group included 12 normal pregnant women. Human peripheral blood samples were obtained at 12, 24 and 36<sup>th</sup> weeks of gestation at St-Luc Hospital of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (Montréal, Canada). Participants had signed an informed consent form for blood donation.

#### 4.2.5.3 Exosome purification and analyses

Supernatants from human cytotrophoblasts were centrifuged at 300g for 10 min and followed by centrifugation at 10,000g for 30 min. Exosomes were next purified by a combination of ExoQuick/filtration steps or alternatively by filtration/ultracentrifugation steps (method modified from (They et al., 2006)) (**Supplementary Fig. 1a**). For the ExoQuick-based method, supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m PVDF membrane and concentrated using a 10 kDa cut-off Microcon centrifugal filter (Millipore, Danvers, MA). Exosomes were then isolated by ExoQuick precipitation (1:5) (System Biosciences, Mountain View, CA). In the ultracentrifugation approach, exosome were isolated at the last ultracentrifugation step at 100,000g for 60 min (They et al., 2006). The exosome pellet was resuspended in 10 ml of PBS and further ultracentrifuged at 100,000g for 60 min. Exosomes were resuspended in PBS (100  $\mu$ l), in lysis buffer or in fixing agents. Circulating exosomes were isolated from human sera using the ExoQuick

protocol following 2 consecutive washes in a 0.1 M sodium phosphate buffer after precipitation and filtration through a 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF membrane (**Supplementary Fig. 1b**). The Nanosight Nano ZS device (Malvern Instruments) was used for measurement of size distribution and average of vesicles.

#### 4.2.5.4 Exosome labelling and uptake assay

Exosomes isolated from human primary cytotrophoblasts were labeled with the hydrophobic dye PKH67 (Sigma, St. Louis, MO) according to a previously described method (Morelli et al., 2004). Exosomes were mixed with 0.5  $\mu\text{M}$  PKH67 and incubated at 37°C for 5 min. The reaction was stopped by addition of ice-cold PBS. After a centrifugation step at 100,000g for 1 h, vesicles were washed twice in fresh PBS and finally harvested after a 1 h centrifugation at 100,000g. The exosome suspension was filtered through a 100 kDa MW cut-off Amicon Ultra Concentrator (Millipore) and the resulting free dye was used as a control. For the uptake assay, BeWo cells were stimulated for 24 h and incubated with PKH67-labeled exosomes (10  $\mu\text{g}$  /  $2 \times 10^5$  cells) in complete medium for a minimum of 4 h. Cells were visualized and analyzed by confocal microscopy and flow cytometry.

#### 4.2.5.5 Live-cell confocal microscopy

Labeled exosomes were incubated with BeWo cells (or primary cytotrophoblasts) cultured in a CELLview™ cell culture dish (Greiner Bio-One North America Inc, Monroe, NA). Pictures were taken every 3 min (for 2 h), 5 min (for 2 h), 10 min (for 3 h) and 15 min (for 3 h). The LysoTracker® fluorescent agent (Invitrogen) was added to cells according to manufacturer's instructions. Cells were observed using an A1R Nikon confocal unit attached to an inverted microscope Eclipse Ti suited for a Plan Apo 60x/1.4 N.A oil objective. A stage top incubator (OKO LAB) controlled temperature control and constant 5 % CO<sub>2</sub> levels. Images were acquired and processed with NIS Element (Nikon) and Image J (National



Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) software. Integrated data were processed using Image J and, the number of internalized particles (mean of fluorescent point/cell in all internal Z plan) and the size of internalized particles was determined. Images were deconvoluted using the Deconvoluting Autoquant X3 software (Mediacybernetics, Rockville, MD, USA).

#### 4.2.5.6 Immunofluorescence

Labeled exosomes were incubated with cultured BeWo cells onto 1.5 mm-thick poly-L-lysine-coated coverslips (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were fixed in the presence of 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min and permeabilized in the presence of PBS 0.5% Triton-X 100 for 5 min. After blocking in 2% FBS diluted in PBS, cells were incubated with anti-EEA1 (1/700, Abcam, ab163) or anti-Rab-5 (1/100, Abcam, ab241) antibodies for 1½ h at room temperature. After several washes, cells were incubated with an Alexa Fluor 568-conjugated rabbit anti-goat IgG antibody (1/1000) for 1½ h at room temperature. After three washes in PBS, coverslips were then mounted in a drop of ProLong Antifade reagent (Invitrogen Canada Inc.). Images were acquired with the A1R Nikon confocal unit.

#### 4.2.5.7 Flow cytometry

CT exosomes (20 µg) were adsorbed onto 4 µm aldehyde/sulfate latex beads (Invitrogen Canada Inc) for 2 h at 4°C in PBS containing FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec at 1:10). After addition of 100 mM glycine followed by three washes, exosome-coated beads were incubated with mouse anti-CD63 (1:500, Abcam, ab8219), rabbit anti-Syncytin-1 (1:500, Abcam, ab4550) or rabbit polyclonal anti-Syncytin-2 (Vargas et al., 2009) antibodies followed by Alexa488- or Alexa568-conjugated anti-IgG antibodies (Invitrogen Canada Inc.). As a control, similarly prepared beads were incubated with secondary antibodies only or preceded with an unrelated primary antibody (anti-Myc). Following three washes, beads were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) with the CellQuest software and

visualized by confocal microscopy, as specified above. For exosome uptake experiments, BeWo cells ( $5 \times 10^5$ ) were stimulated or not with Forskolin (50  $\mu$ M) during 24 h, incubated with PKH67-labeled CT exosomes at different concentrations for 4 h, trypsinized and washed several times. Exosome uptake was measured by mean fluorescence intensity (MFI) or the mean percentage of positive cells (MPC). In certain experiments, exosomes were pre-incubated or not with the F(ab')<sub>2</sub> fragments of anti-Syncytin-1 or anti-Syncytin-2 antibodies or a pre-immune serum. F(ab')<sub>2</sub> fragments were prepared and purified using the F(ab')<sub>2</sub> Micro Preparation Kit following manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA).

#### 4.2.5.8 siRNA transfection

All siRNAs were synthesized by Invitrogen Canada Inc (ID Syncytin1: s26921, ID Syncytin2: s53886 and silencer negative control: 4392420). BeWo cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were first plated in 24-well plates, stimulated with 50  $\mu$ M Forskolin and transfected as previously described (Vargas et al., 2009).

#### 4.2.5.9 Western blot analyses

Exosome and cell extracts were prepared as previously described (Vargas et al., 2009). Extracts (20  $\mu$ g) were migrated onto a 12% SDS-PAGE and transferred on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore). Membranes were blocked with 5% powder milk and incubated with anti-TSG101 (1:400, Abcam, ab83), anti-Syncytin-1 (1:300, Abcam, ab45500), anti-PLAP (1:1000, Abcam, ab133602), anti-Grp78 (1:1000, Abcam, ab21685), anti-Syncytin-2 (Vargas et al., 2009) (1/7500) and anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (1/500; Santa Cruz, sc-137179) antibodies. After several washes, membranes were further incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit/mouse antibodies (1/10000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), and signals were detected using the BM chemiluminescence blotting substrate (Roche Diagnostics). Membranes were scanned with the Fusion FX5 system (Montreal Biotech Inc.) and

band intensity was determined with the Quantity One 4.5.0 image acquisition software. Ratios between TSG101 and either Syncytin-1 or Syncytin-2 were calculated.

#### 4.2.5.10 Electron microscopy of purified exosomes and trophoblasts

CT exosomes were fixed in 2% PFA (w/v) in 200 mM phosphate buffer (pH 7.4), overlaid on a formvar-carbon-coated grid and left drying. After 3 washes in phosphate buffer, exosomes were further fixed in 1% glutaraldehyde for 5 min, washed in distilled water and stained with aqueous uranyl oxalate (pH 7) for 5 min. Exosomes were then stained with saturated aqueous uranyl acetate and samples were embedded in 0.4% uranyl acetate and 1.8% methylcellulose on ice for 10 min. Excess liquid was then absorbed with a Whatman filter. Grids were dried at room temperature for 5 min before analyses. BeWo cells were incubated 4 h with CT exosomes and fixed in 3% glutaraldehyde containing 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  for 2 h. After several washes in phosphate buffer, cells were treated with 1% osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol solution (30–100%) and embedded in Epon (Sigma-Aldrich). Ultrathin sections (50–60 nm) were prepared using an ultracut microtome (Ultracut S, Reichert) and placed on copper grids for analyses. Grids were stained with uranyl acetate and lead citrate. Exosome and BeWo samples were then visualised with the CM100 Philips electron microscope.

#### 4.2.5.11 Acetylcholinesterase Activity Assay

Acetylcholinesterase activity was measured using a previously described procedure (Cantin et al., 2008). Briefly, samples or positive control (FBS-associated exosomes obtained by ultracentrifugation) were incubated with 0.1 mM 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) (Sigma) and 1.25 mM acetylthiocholine chloride (Sigma). Enzymatic activity was next monitored for 20 min at 37°C with a microplate spectrophotometer (ELX808, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT) and  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$

values were recorded. AChE activity are presented in terms of arbitrary units ( $\mu\text{mol}$  hydrolyzed substrate /min) relative to the control.

#### 4.2.5.12 Sandwich ELISA assay

Ninety-six well plates were coated with anti-Syncytin-1 or anti-PLAP antibodies ( $4 \mu\text{g/ml}$  in a volume of  $100 \mu\text{l/well}$  of carbonate buffer (pH 9.6)). Anti-Syncytin-2 or pre-immune sera (control) were also included for but were initially purified with Protein A Chromatography Cartridges (Fisher Canada, Nepean, Ontario). Plates were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  followed by 3 washes in PBS, and blocking of wells in PBS containing 0.5% BSA at room temperature for 1 h. After 3 washes,  $10\text{-}100 \mu\text{g}$  of sera-purified exosomes (pre-incubated 20 min at  $4^\circ\text{C}$  with the FcR blocking reagent (1:10)) were added and incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$ . After 3 washes, a mouse anti-CD63 antibody (Abcam,  $4 \mu\text{g/ml}$  in PBS containing 0.5% BSA) was added and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Plates were washed and incubated with  $100 \mu\text{l}$  of a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1/50,000 in PBS containing 0.5% BSA) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) for 1 h at room temperature. After several washes, HRP enzymatic activity was assessed by the addition of the TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and the absorbance ( $450 \text{ nm}$ ) was measured by a microplate reader after adding  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1M) to stop the reaction.

#### 4.2.5.13 Direct ELISA assay

The CD63 ExoELISA kit (System Biosciences, Mountain View, CA) was used to determine exosome concentration from sera of normal vs. PE patients and was optimized for Syncytin-2 quantification. Briefly,  $200 \mu\text{l}$  of Exosome Binding buffer (System Biosciences) was added to the exosome pellet obtained after ExoQuick precipitation and samples were then vortexed for 15 s. Samples were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min to allow complete lysis and centrifuged at  $1500 \text{ g}$  for 5 min to remove all residual precipitation solution. Ninety-six well plates were

incubated overnight at 37°C with 50 µl of prepared exosome extracts. Plates were washed 3 times in PBS and incubated with anti-CD63 (1/100, System Biosciences) or purified anti-Syncytin-2 (4 µg/ml in blocking solution) antibodies. Bound antibodies were detected with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1/5,000, System Biosciences) added for 1 h at room temperature. Finally, after 3 washes, HRP enzymatic activity was assessed by the addition of the TMB substrate. After adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) to block the reaction, absorbance (450 nm) was measured for each sample using a microplate reader. Syncytin-2/CD63 ratios of absorbance values were calculated.

#### 4.2.5.14 Statistical analysis

Error bars in graphical data represent means ± S.E.M. Data were analyzed by a one-tailed or paired Student *t* test. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software and significance was determined at  $p \leq 0.05$ .

#### **4.2.6 Figure legends**

**Figure 1: Exosomes from primary villous trophoblasts harbor Syncytin-1 and Syncytin-2 at their surface.**

(A) Primary villous trophoblasts were cultured for 4 days, and supernatants were harvested at each day. Exosomes were next purified by combined centrifugation/ExoQuick/filtration steps and visualized by electron microscopy (herein day 3). Scale bars=100 nm (left panels), 50 nm (right panels). (B) Size distribution and average of day 3 exosomes were determined using the Nanosight Nano ZS (Malvern Instruments) (see Table SI). (C) The presence of AChE activity, an enzymatic exosome marker, was analyzed in purified exosome samples using an in house colorimetry assay. Exosome-containing Fetal Bovine Serum (FBS) was used as a positive control. (D) The concentration of exosomes from trophoblast supernatants was determined using the CD63-ExoELISA kit. Concentration is indicated as number

of particles per ml. **(E)** The purity of exosomes purified from day 1 to day 4 supernatants of cultured primary villous trophoblasts was assessed by Western blot analysis using anti-GRP78 (endoplasmic reticulum marker) and anti-TSG101 (exosome marker) antibodies, while HERV Env proteins were detected with anti-Syncytin-1 and anti-Syncytin-2 antibodies. In addition, the placenta PLAP marker was also tested. Cellular extracts from day 4 cultured villous trophoblasts (CE d4) served as control. **(F)** Flow cytometry analyses were performed on trophoblast exosomes coated on aldehyde/sulfate beads using anti-CD63, anti-Syncytin-1 and anti-Syncytin-2 antibodies followed by Alexa488- or Alexa568-coupled anti-IgG antibodies. Control consisted of similar beads incubated with secondary antibodies only (CTL) or with an unrelated primary antibody (CTL anti-myc).

**Figure 2: Uptake and intracellular trafficking of CT exosomes.**

**(A)** 3D topography images of exosomes labeled with PKH67 (green) is presented with a higher magnification image in the inset. Scale bars=500 nm. **(B)** Time-lapse images of BeWo cells incubated in the presence of trophoblast-derived exosomes labeled with PKH67 (green) were acquired during 10 h. Images were taken from an intracellular z plan (bright field in left panels and merge of bright field with wide-field fluorescence in right panels) at 0, 2 and 10 h after the onset of the cell-exosome contact. Arrows indicate fluorescent vesicles located at the perinuclear region. Scale bars=20  $\mu$ m. **(C)** Internalized exosomes were assessed at different time points by counting the number of intracellular fluorescent signals. **(D-E)** Internalized PKH67-labeled exosomes (green) were tested for co-localization with two early endosome markers EEA1 and Rab5 **(D)** or with the LysoTracker agent **(E)** (red) in BeWo cells after 4 h of contact. Merged signals are presented in right side images. Scale bars=20  $\mu$ m. **(F-G)** Exosome uptake (4 h) in BeWo cells was analyzed by electron microscopy (control cells with no exosomes in right side pictures in panel **G**). Endocytosed exosomes have a double membrane layer and electron dense region (indicated by

white arrowheads). Exosome entry can be observed through an endocytosis process occurring at the cell surface through coated pit (black arrows). Typical late endosome structures containing potential exosomes are depicted in panels *F* and have a delimiting membrane with electron-dense regions (white arrow heads). Scale bars=100 nm. (*H*) The size of intracellular fluorescent signals was measured at different time points. The PKH67-free eluate collected during exosome labeling was similarly incubated with BeWo cells as a control. All experiments were performed in triplicates. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. and are representative of three independent experiments.

**Figure 3: Uptake of trophoblast exosomes involves both Syncytin-1 and Syncytin-2.**

(*A*) BeWo cells were stimulated or not with Forskolin (50 $\mu$ M) during 24 h and incubated with different quantities of PKH67-labeled exosomes for 4 h. After trypsinization, exosome uptake was analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensities are presented. BeWo cells cultured in the absence of exosomes were used as controls (CTL(-)). (*B*) Labeled exosomes were pre-incubated with F(ab')<sub>2</sub> fragments from anti-Syncytin-1 or anti-Syncytin-2 antibodies or pre-immune serum for 4 h. Forskolin-stimulated BeWo cells were next assessed for exosome uptake by flow cytometry. (*C*) BeWo cells were transfected with siRNA against Syncytin-1 or Syncytin-2 (vs. control (si-CTL) siRNA). Efficiency of silencing was evaluated by Western blot analyses of total cellular extracts or extracts from exosomes harvested from transfected cells. GAPDH was used for normalization of cellular extracts while the CD63 ELISA assay was used to estimate exosome abundance. (*D-F*) Fluorescently-labeled Syncytin-1 or Syncytin-2-deprived exosomes were incubated in the presence of Forskolin-stimulated BeWo cells and tested for exosome uptake (*D-E*) and changes in size of fluorescent signals (*F*). For panels *D* and *E*, uptake was measured by flow cytometry analyses (mean fluorescence intensity) and confocal microscopy (number of internalized particles), respectively. Data are expressed as the

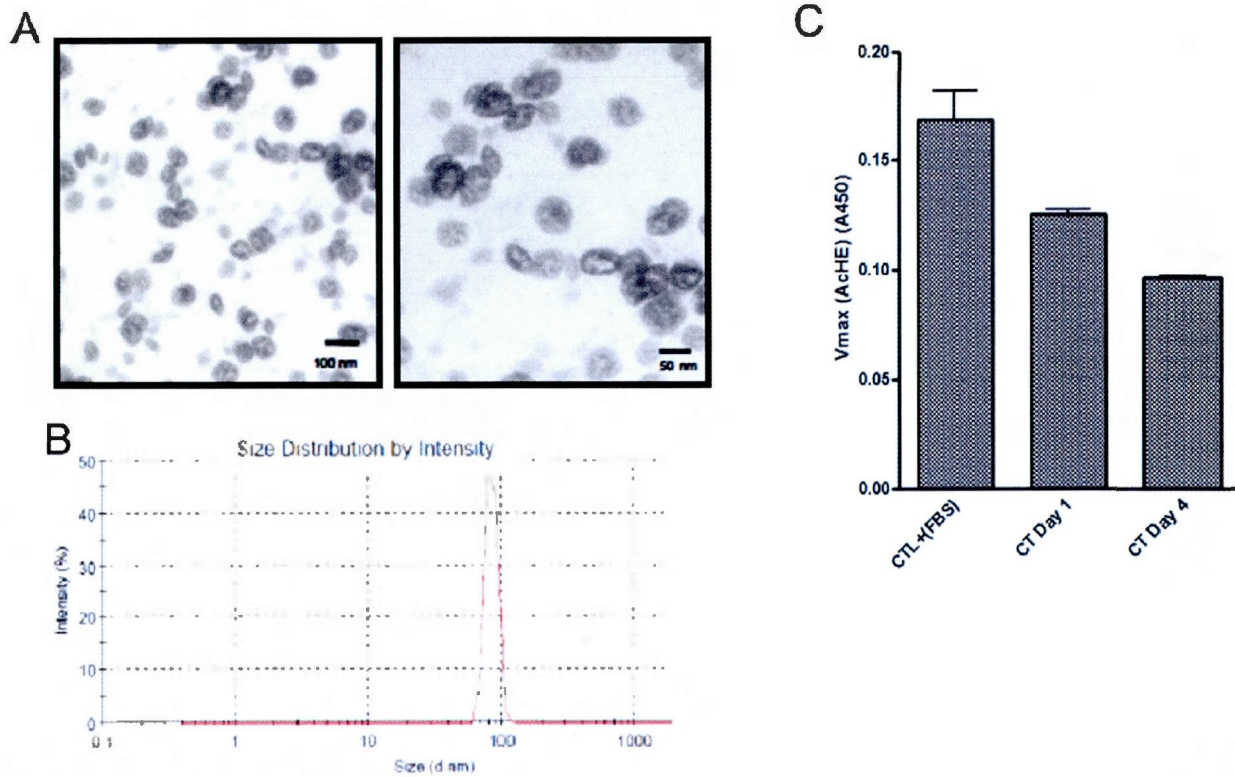
mean  $\pm$  S.E.M. and are representative of three independent experiments (\*\*:  $p \leq 0,01$  and \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ).

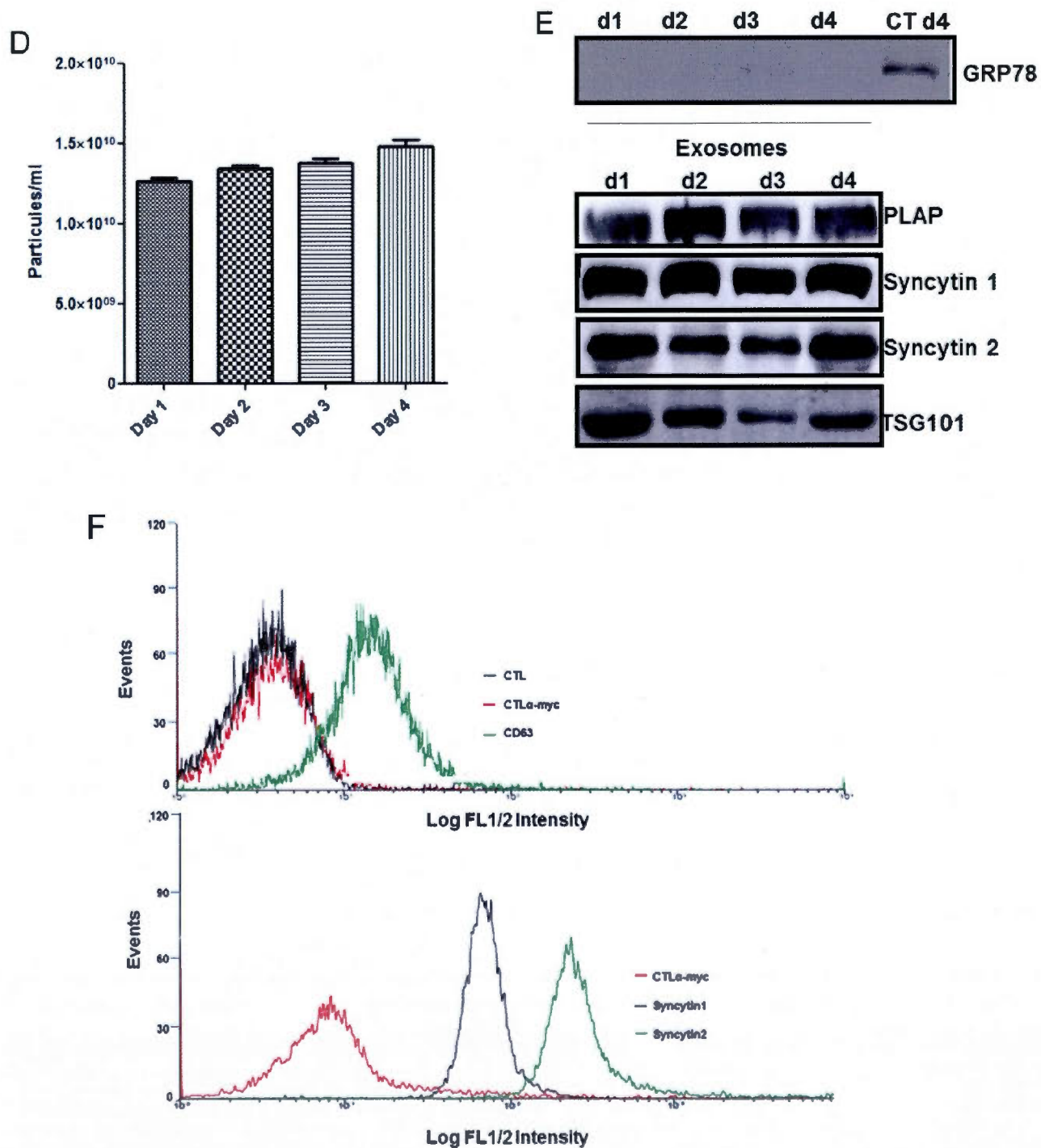
**Figure 4: Analyses of exosomes isolated from serum samples of normal vs. PE pregnant women.**

(A-D) Sera from normal pregnant women collected at different gestational weeks were used for exosome isolation. Purified exosomes were visualized by electron microscopy (A) (scale bars=500 nm) and analyzed for size distribution through Nanosight Nano ZS measurement (B) and AChE activity by ELISA assay (C). Exosome preparations from four different donors were analyzed by Western blot with anti-GRP78 anti-TSG101, anti-PLAP, anti-Syncytin-1 and anti-Syncytin-2 antibodies (D). Trophoblast cellular extracts (CE d4) were used as controls in these analyses. (E-G) Analyses of Syncytin-2 levels in serum-derived exosomes from normal pregnant women or PE patients (at different trimesters of pregnancy) were conducted by Western blot. Band intensities of resulting Syncytin-2 signals were normalized with the TSG101 signal and are presented as band intensity ratios for samples from 12 (E), 24 (F) and 36 (G) weeks of gestation. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. and from three independent experiments. (H) Exosomes collected from sera of normal pregnant women (CTL) vs. PE patients at 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> trimester were quantified for Syncytin-2 levels through a Syncytin-2 ELISA assay and presented as normalized values for CD63. Experiments were performed in triplicates and results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (\*:  $p \leq 0,05$ ).

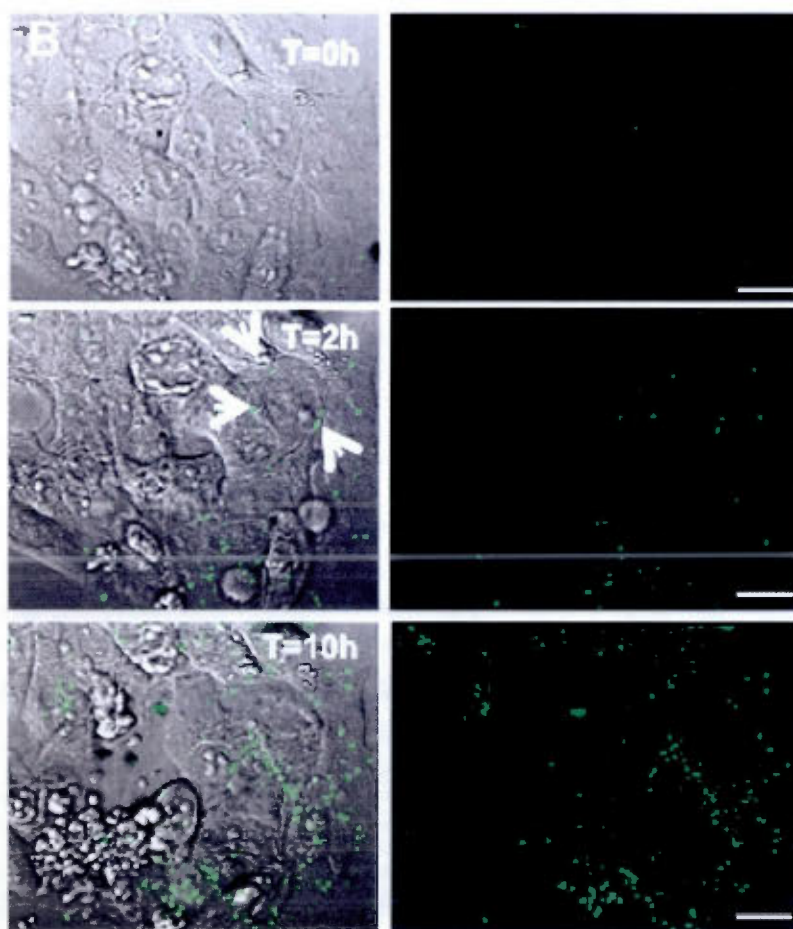
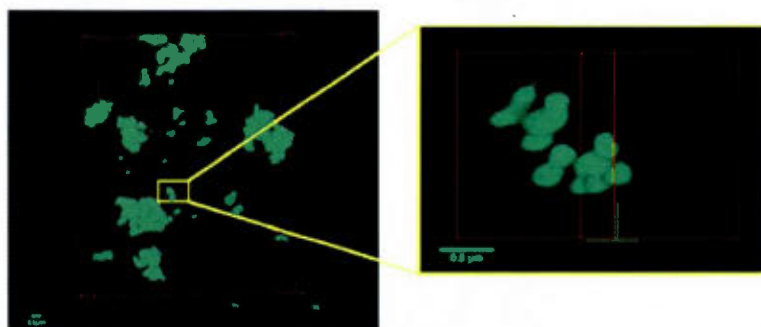


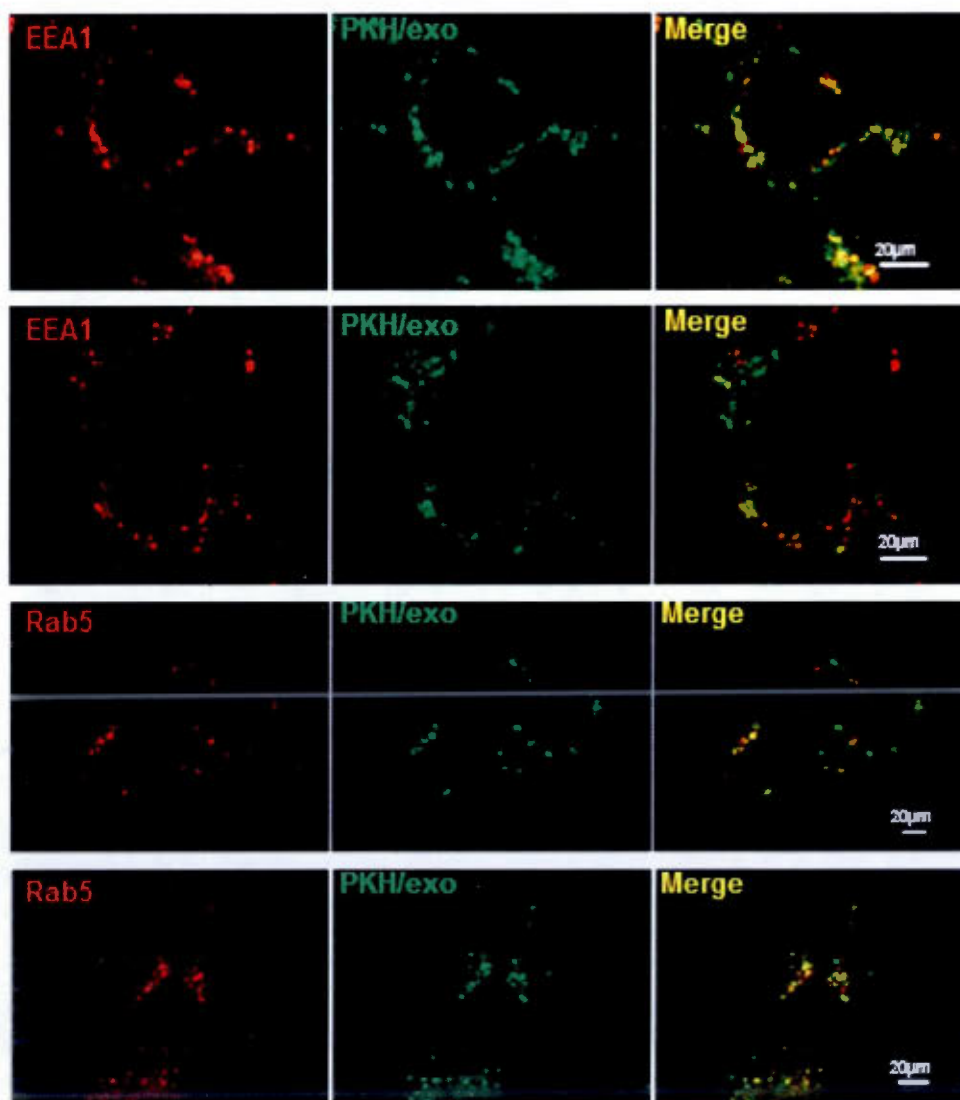
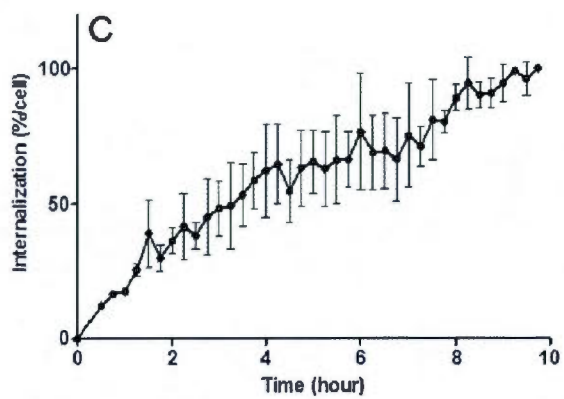
## 4.2.7 Figures



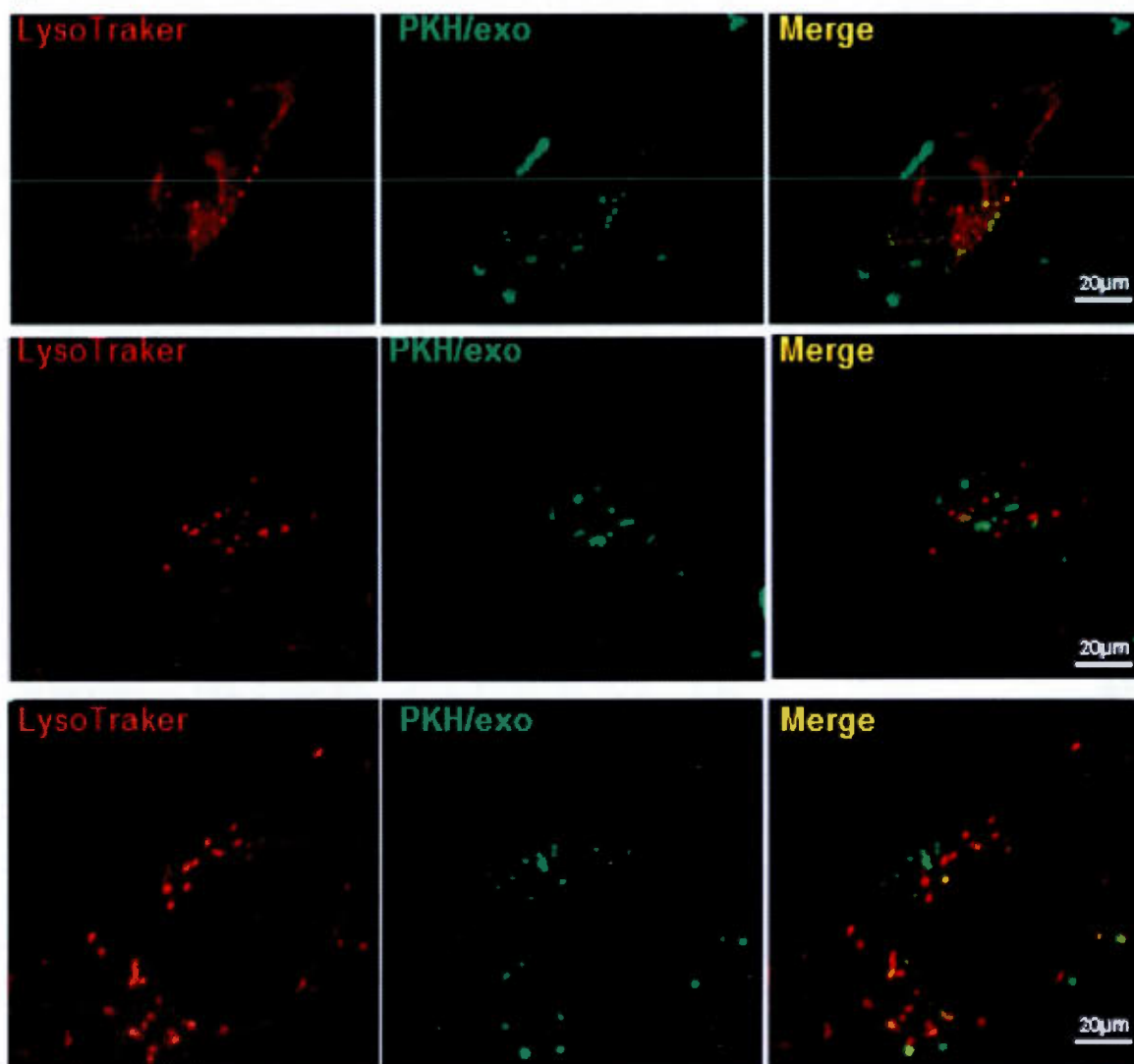


A

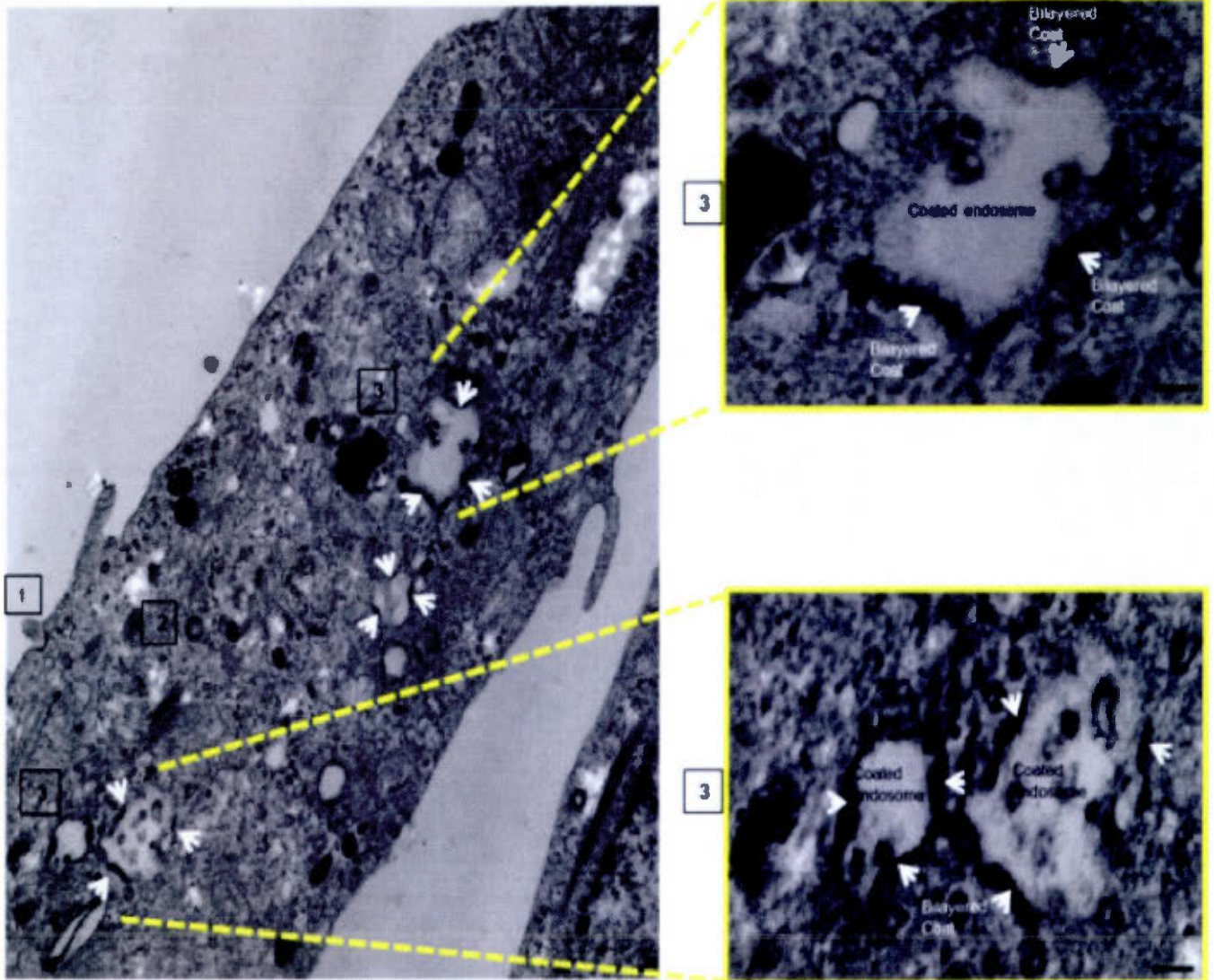




E



F



G

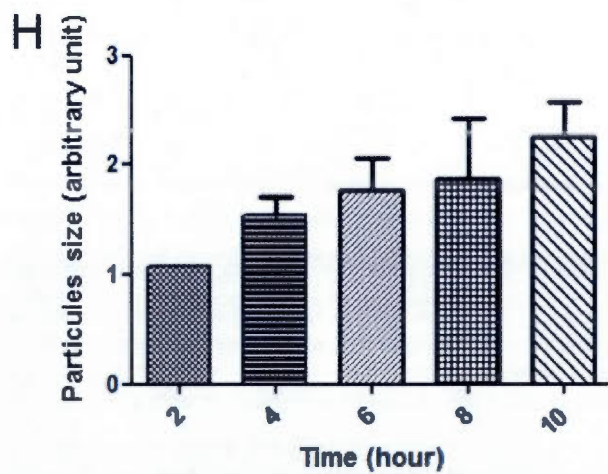
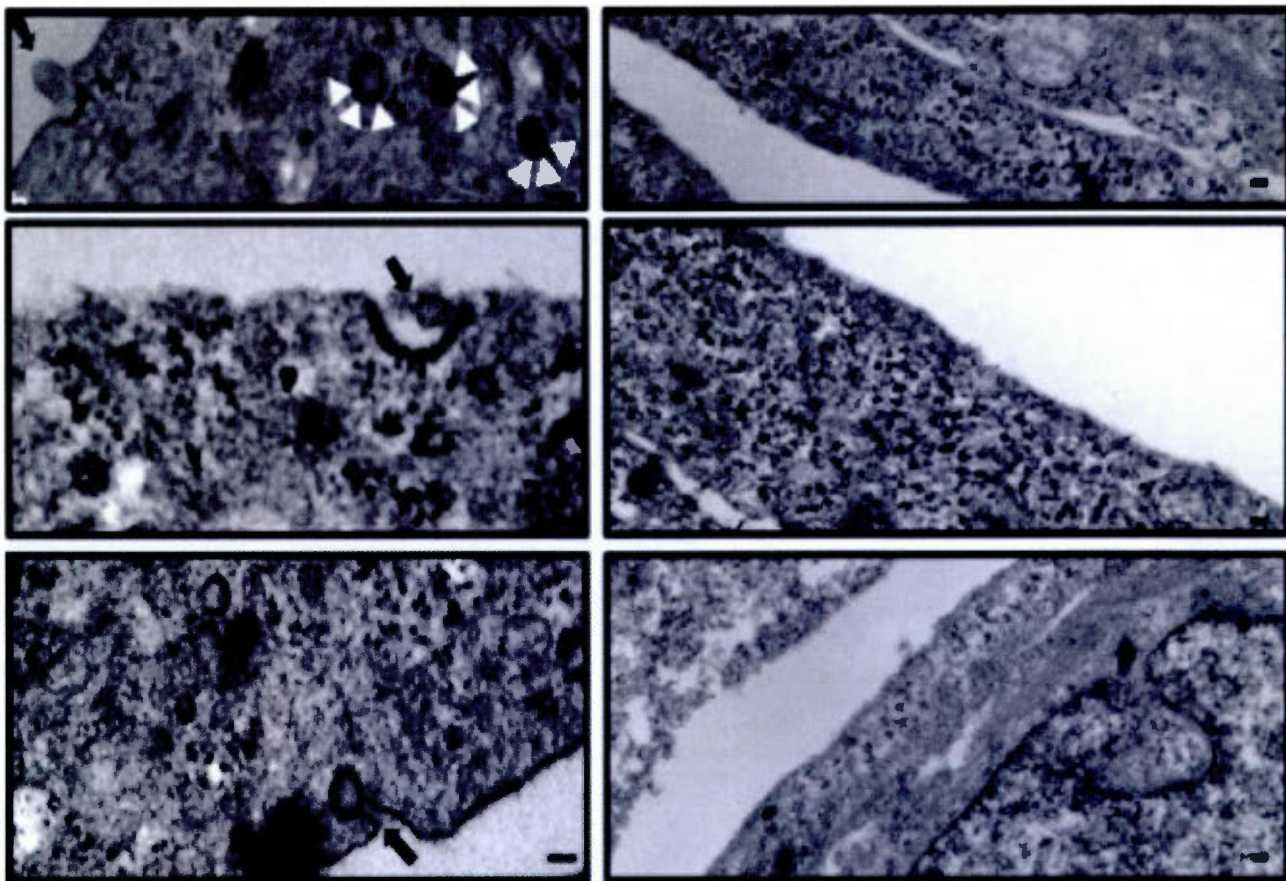
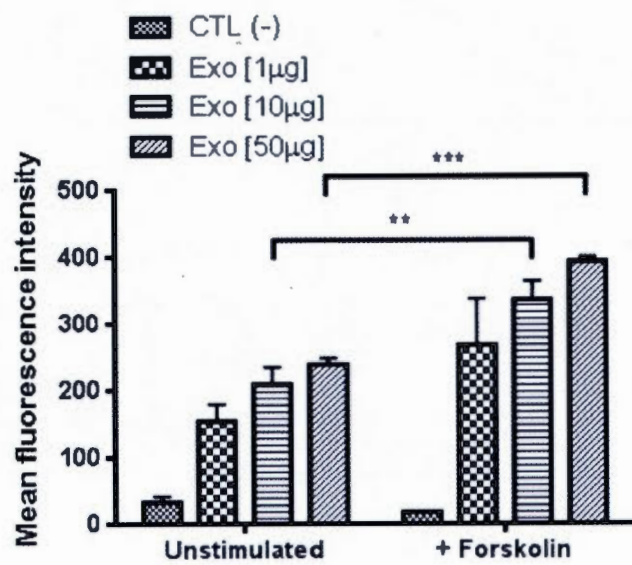
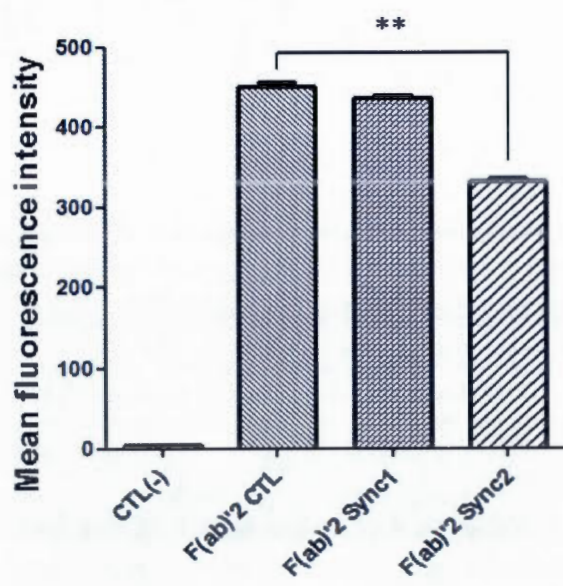


Figure 4.2: Uptake and intracellular trafficking of CT exosomes

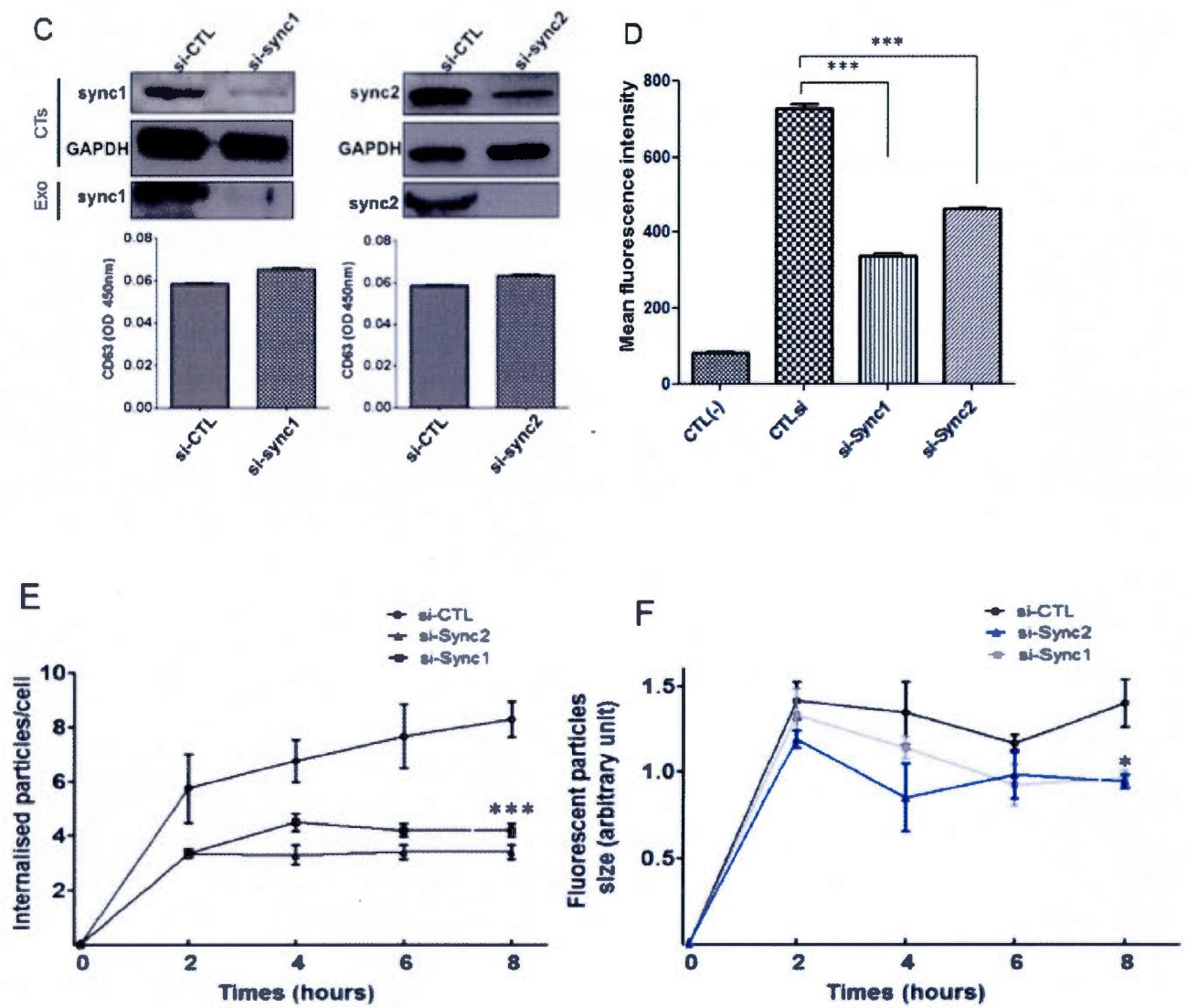
A



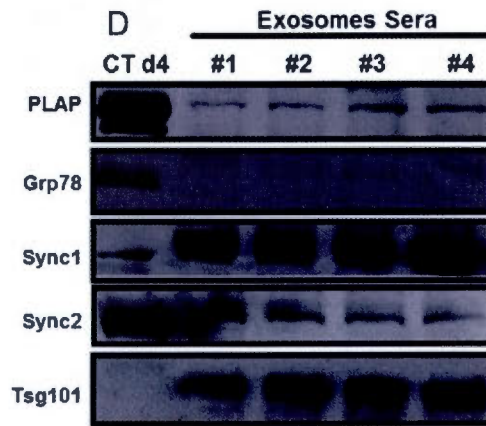
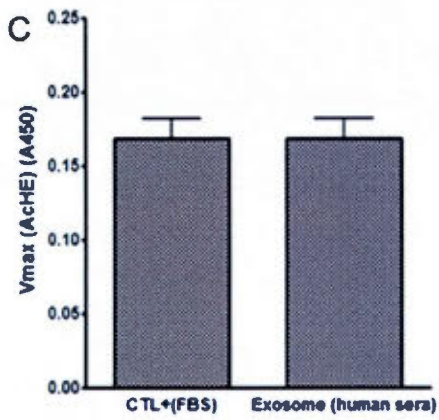
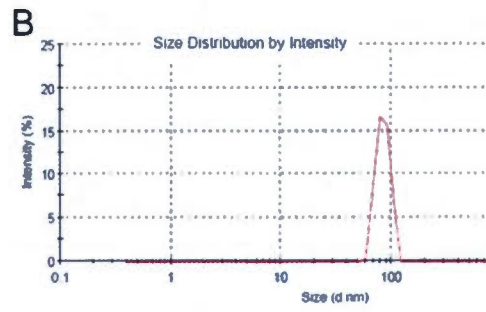
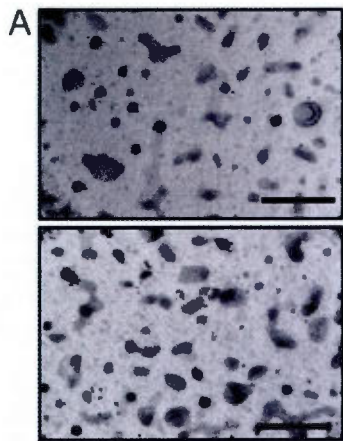
B

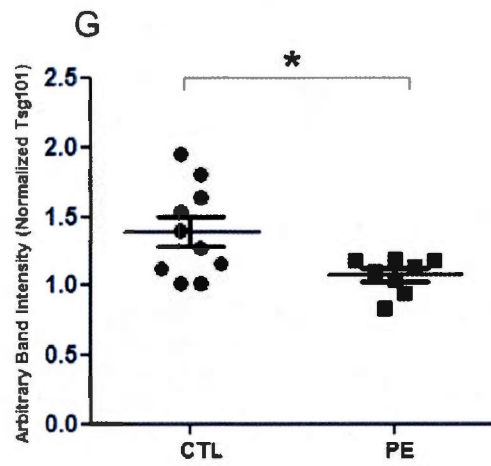
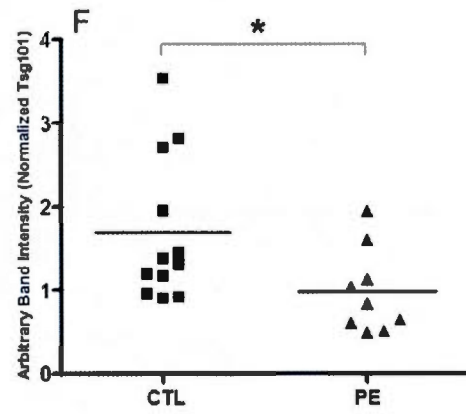
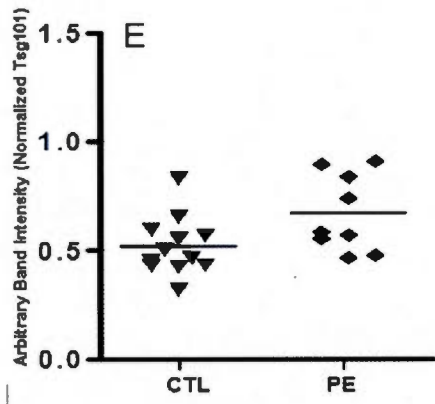


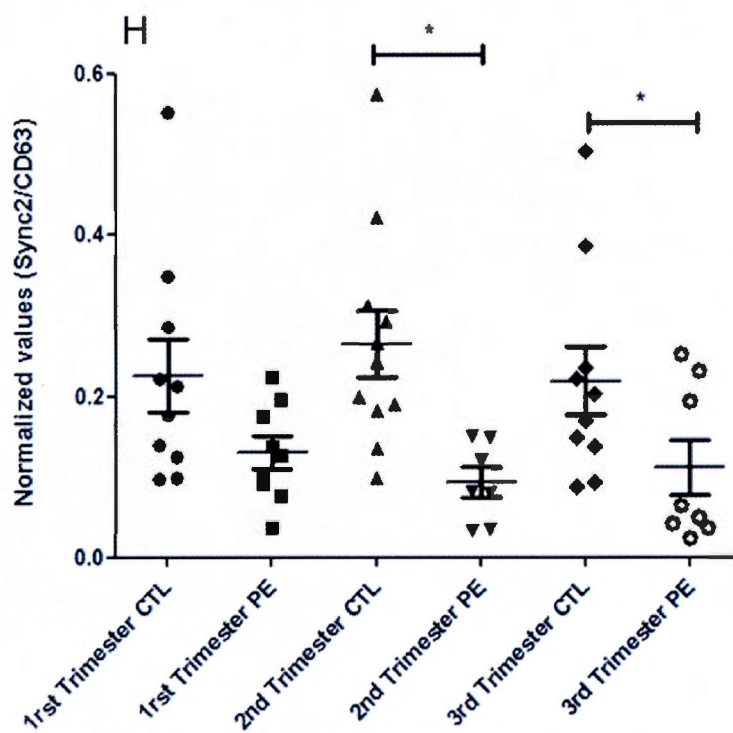




**Figure 4.3:** Uptake of trophoblast exosomes involves both Syncytin-1 and Syncytin-2.







**Figure 4.4:** Analyses of exosomes isolated from serum samples of normal vs. PE pregnant women

#### 4.2.8 Figures legends (supplementary material)

##### **Figure 4.S1: Detection of Syncytin-2 at the surface of trophoblast-derived exosomes by confocal microscopy.**

(A) Latex beads were coated with purified exosomes collected from primary cytotrophoblasts (at day 2) and analyzed with anti-CD63 and anti-Syncytin-2 (Sync2) antibodies in addition to appropriate anti-IgG antibodies coupled to Alexa488 (green; CD63) or Alexa568 (red; Syncytin-2). (B-C) Fluorescent signals were detected by confocal microscopy and are compared to controls (CTL) consisting of similarly prepared beads incubated with an irrelevant primary antibody (anti-myc) or pre-immune (PI) serum. Bright field images of exosome-coated beads are presented in left panels. (D) Higher magnification from results presented in panel C, demonstrates that CD63- and Syncytin-2-specific signals are generally overlapping in these sets of beads. Scale bars=10  $\mu\text{m}$ .

##### **Figure 4.S2: Uptake of villous trophoblast-derived exosomes by cultured primary cytotrophoblasts and BeWo cells.**

(A) Time-lapse images of purified human cytotrophoblasts incubated in the presence of PKH67-labelled exosomes at 0, 2 and 4 h after onset of exosome addition. Images were taken in an intracellular z plan (Z) and fluorescent signals are merged with phase contrast images of cytotrophoblasts (left panels). (B) BeWo cells incubated in the presence of exosome of 4 h were monitored through live cell imaging. A still image is herein presented, which corresponds to the video depicted in Movie S1. Scale bars=20  $\mu\text{m}$ .

##### **Figure 4.S3: EM analyses of exosome uptake by BeWo cells.**

(A-F) Trophoblast-derived exosomes from day 3 cultures were incubated with BeWo cells for 4 h and analyzed by electron microscopy. Exosome entry is presented in

panels *A-C* (black arrows) while later steps such as late endosome are depicted in panels *D-F* (white arrow heads). Control BeWo cells (no added exosomes) are presented in panels *G-J* and indicate no similar vesicle uptake processes and absence of highly active endocytic pathway. Scale bars=100nm (*A-F*), 500nm (*G-J*).

**Figure 4.S4: Flow cytometry analyses of exosome uptake in BeWo cells.**

(*A*) Cells were left untreated (NT) or stimulated with Forskolin (50 $\mu$ M) (Forsk) during 24 h and incubated with PKH67-labeled CT exosomes at different concentrations (1, 10 and 50  $\mu$ g) for 4 h (vs. free PKH67 eluates from the exosome labeling procedure, CTL Exo (-)) and then trypsinized. Cells were analyzed by flow cytometry. (*B*) Exosome uptake is presented as the percentage of positive cells indicated in each graph of panel *A*. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. and are representative of three independent experiments.

**Figure 4.S5: Optimized sandwich ELISA assay for detection of Syncytin-2 at the surface of serum-derived exosomes.**

(*A*) A sandwich ELISA approach was optimized for the detection of HERV Env proteins in serum-derived exosomes from normal pregnant women. Antibodies against PLAP, Syncytin-1, Syncytin-2 or a pre-immune serum were initially coated at the bottom of 96-well plates, to which was added purified exosomes. Bound exosomes were detected using a mouse anti-CD63 antibody and an HRP-coupled anti-mouse IgG secondary antibody. (*B*) Serum-derived exosomes from 24<sup>th</sup> week of gestation were analyzed in this assay for all three proteins. Absorbance is indicated on the y axis. (*C*) A dose response analysis of Syncytin-2 levels was conducted by the sandwich ELISA assay with varying protein concentration of exosomes (from 12,5 to 100  $\mu$ g/ml). All experiments were performed in triplicate. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. and are representative of three independent experiments (\*\*:  $p \leq 0,01$  and \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ).

**Figure 4.S6: Western blot analyses of serum-derived normal vs. PE exosomes for Syncytin-2.**

Exosomes from normal pregnant women (n=12) or PE patients (n=10) were isolated from serum samples collected at all three trimesters (12, 24 and 36<sup>th</sup> weeks of gestation), prepared as extracts and analyzed by Western blot using anti-Syncytin-2 (upper panels) and anti-TSG101 (lower panels) antibodies. Presented data are representative of three independent experiments.

**Figure 4.S7: Dose-dependent detection of Syncytin-2 on serum-derived exosomes by a direct Syncytin-2 ELISA assay.**

Increasing quantity of exosomes (5, 10, 25, 50 and 100 µg) purified from three sera of normal pregnant women was tested in a direct Syncytin-2 ELISA assay using anti-Syncytin-2 antibodies and an HRP-coupled anti-rabbit IgG antibody. Absorbance values are presented as a function of exosome quantity. Data are expressed as the mean ± S.E.M. and are representative of three independent experiments. (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ).

**Figure 4.S8: Procedure for exosome isolation.**

Two different protocols were used for the isolation of exosomes from cultured primary cytotrophoblasts (*A*) and from human sera (*B*).

**Movie S1: Intracellular linear displacement of fluorescently labeled exosomes.**

Dynamic cell imaging was performed using live confocal microscopy on BeWo cells incubated with PKH67-labelled exosomes at 4 h. Bright field images are presented in the left panels. Scale bars=20µm.

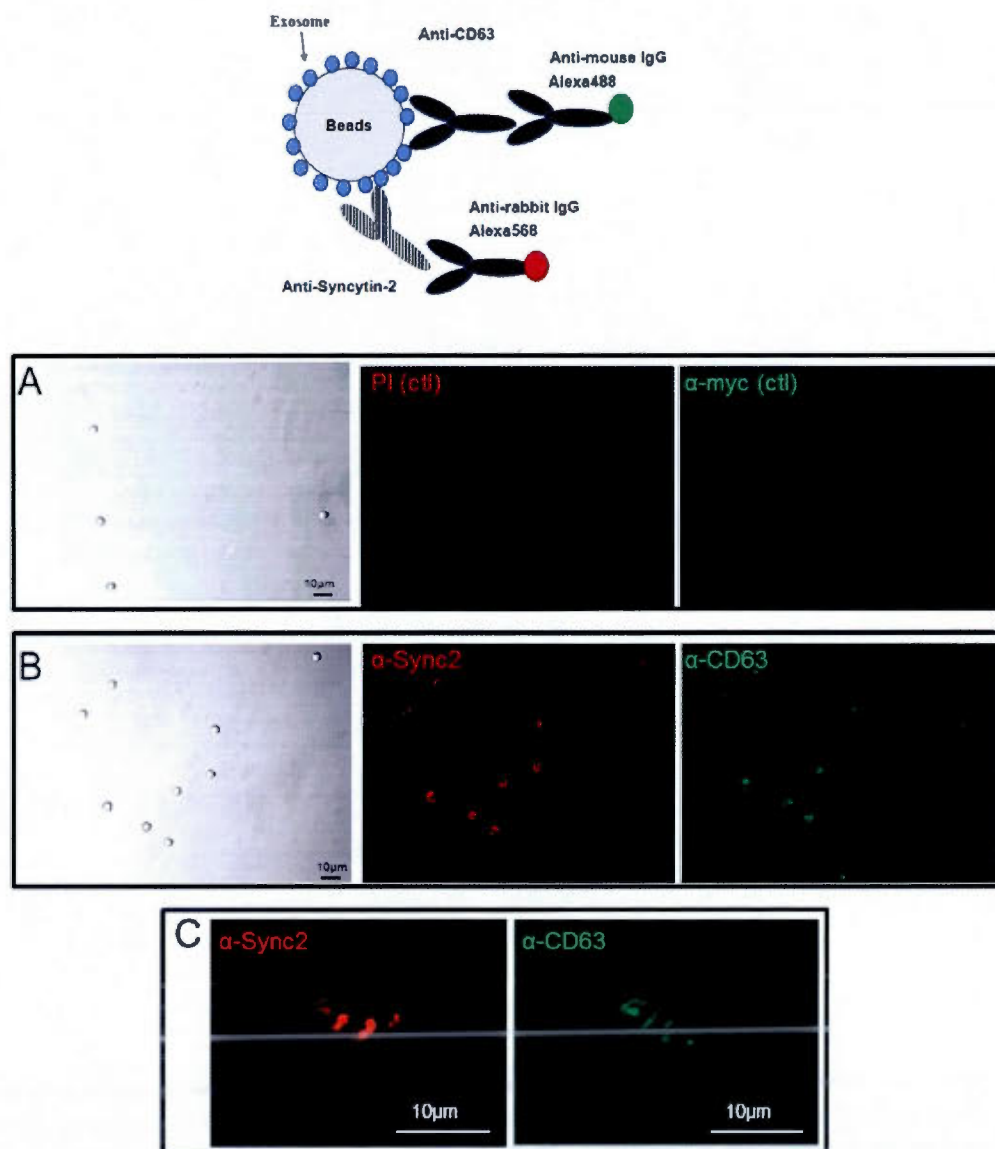
**Table 4.1: Summary of nanosizer analyses of purified exosomes purified by modified method for exosome precipitation using ExoQuick.**

A Characteristics of purified exosomes described in **Figures 1 and 4** are outlined in this table and are derived from analyses conducted on the Nanosight Nano ZS (*Malvern Instruments*). Values are representative of typical size average and distribution of purified exosomes. Values represent the electronegativity of samples (zeta potentials expressed in mV)

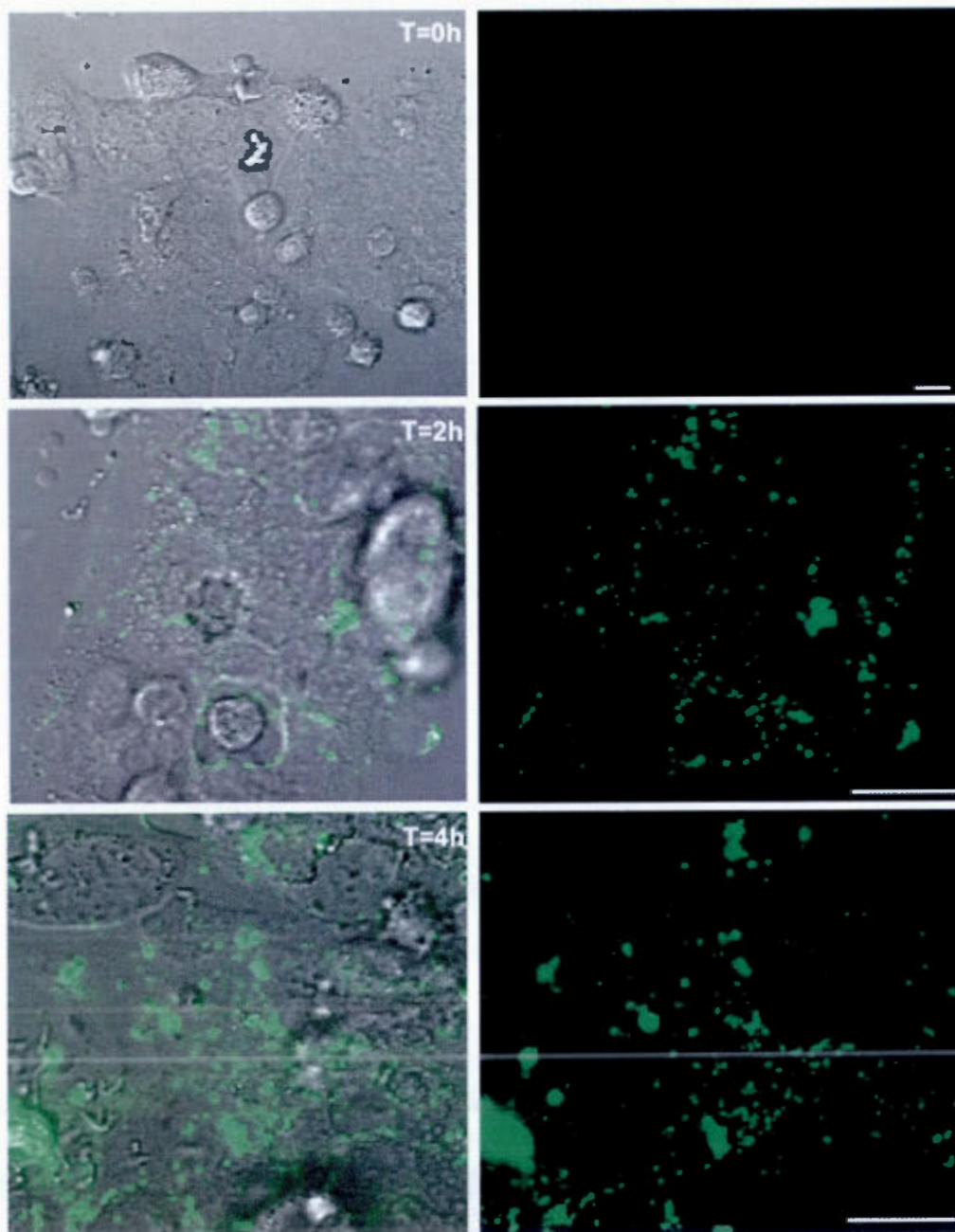
**Table 4.2: Summary of clinical characteristics of normal pregnant women and patients with preeclampsia.**



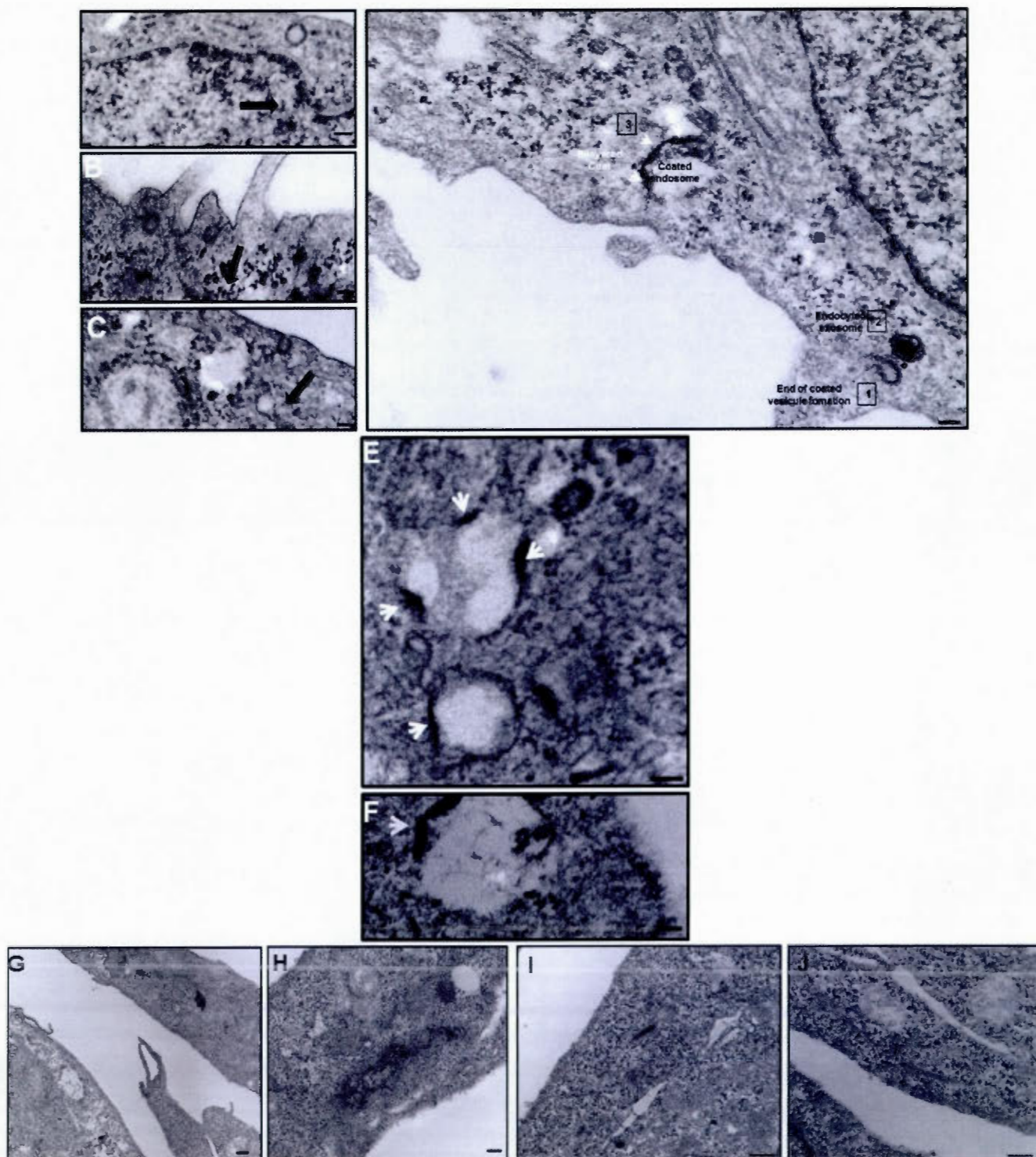
## 4.2.9 Supplementary material



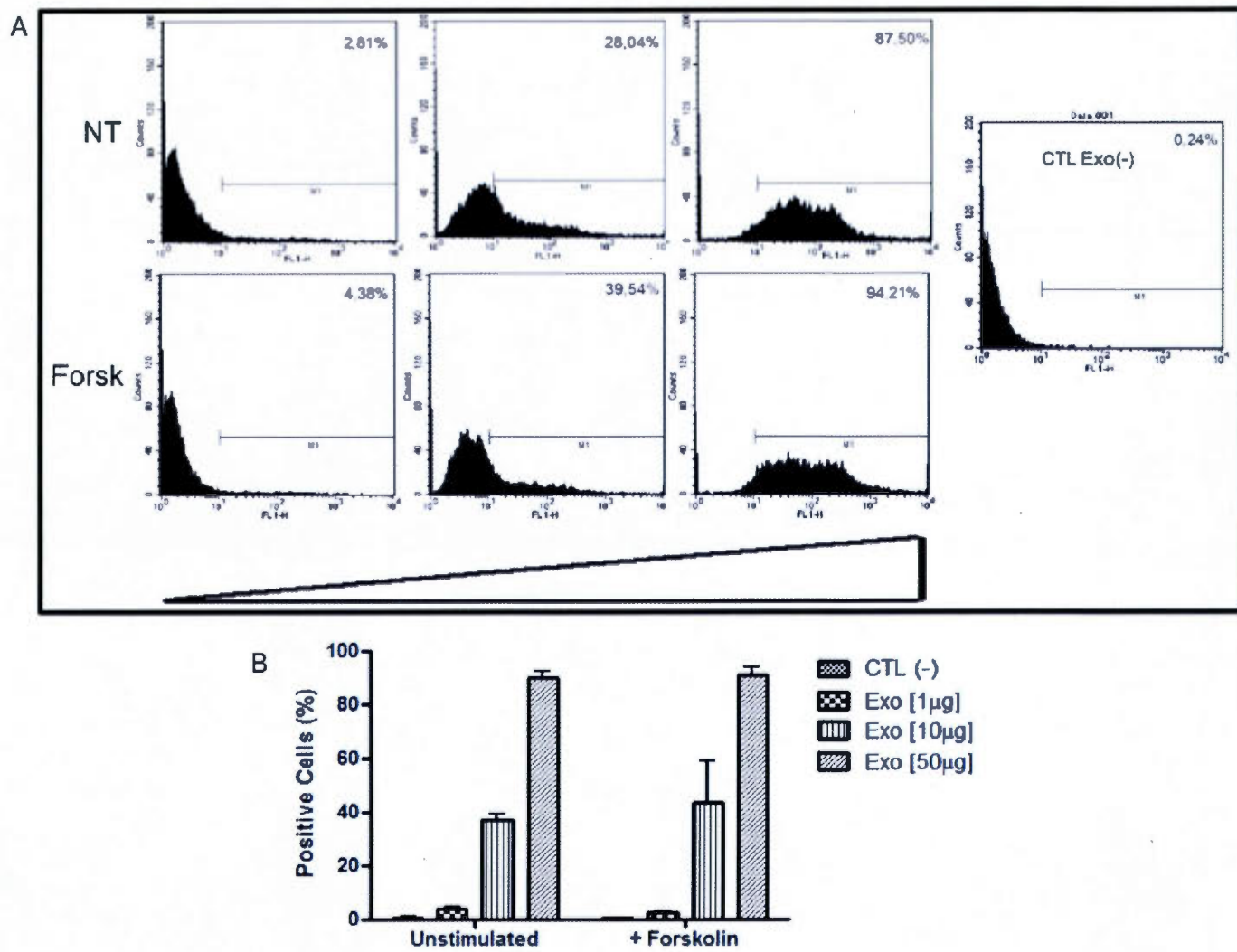
**Figure 4.S1:** Detection of Syncytin-2 at the surface of trophoblast-derived exosomes by confocal microscopy.



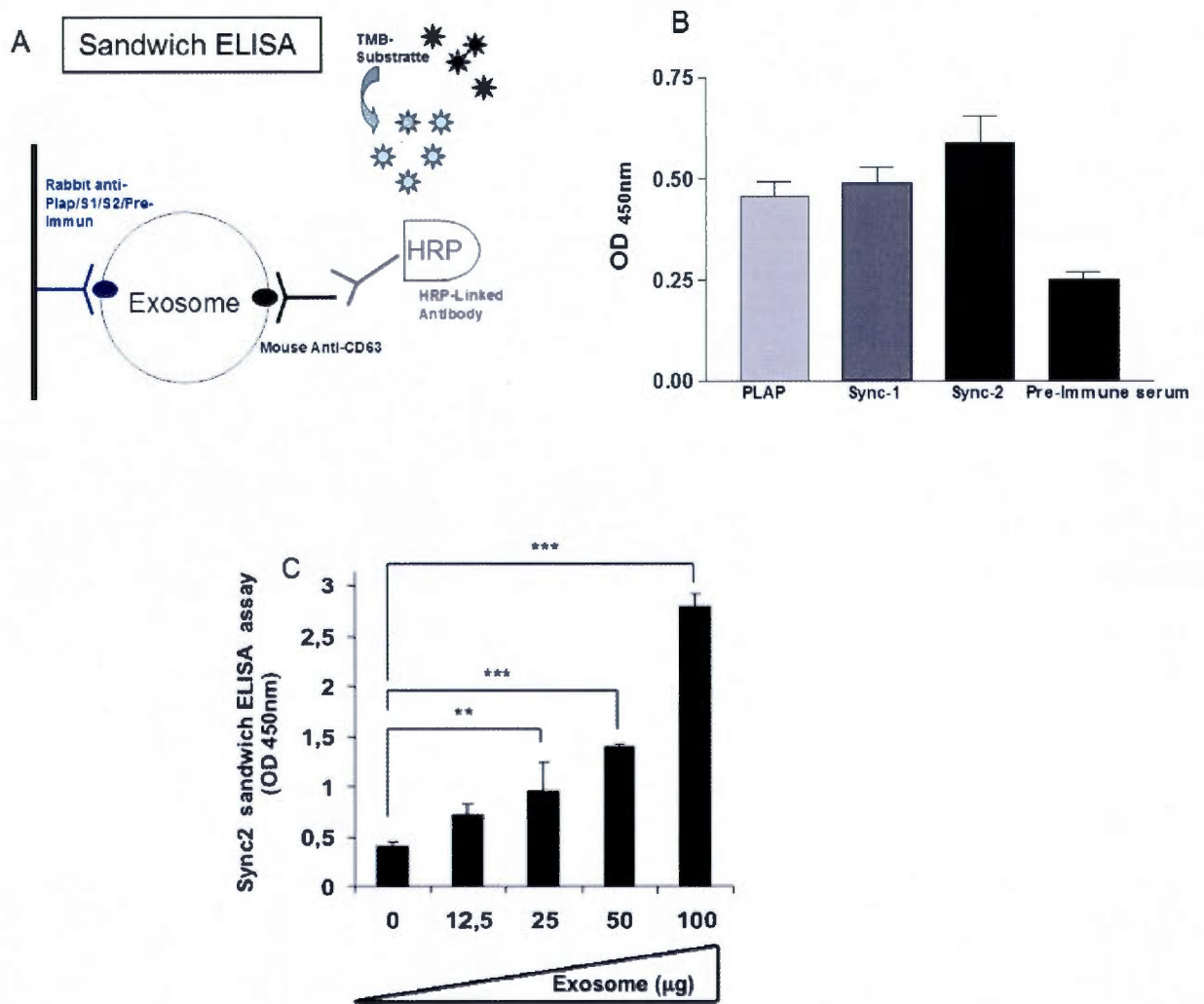
**Figure 4.S2:** Uptake of exosomes from cultured primary trophoblasts in primary culture.



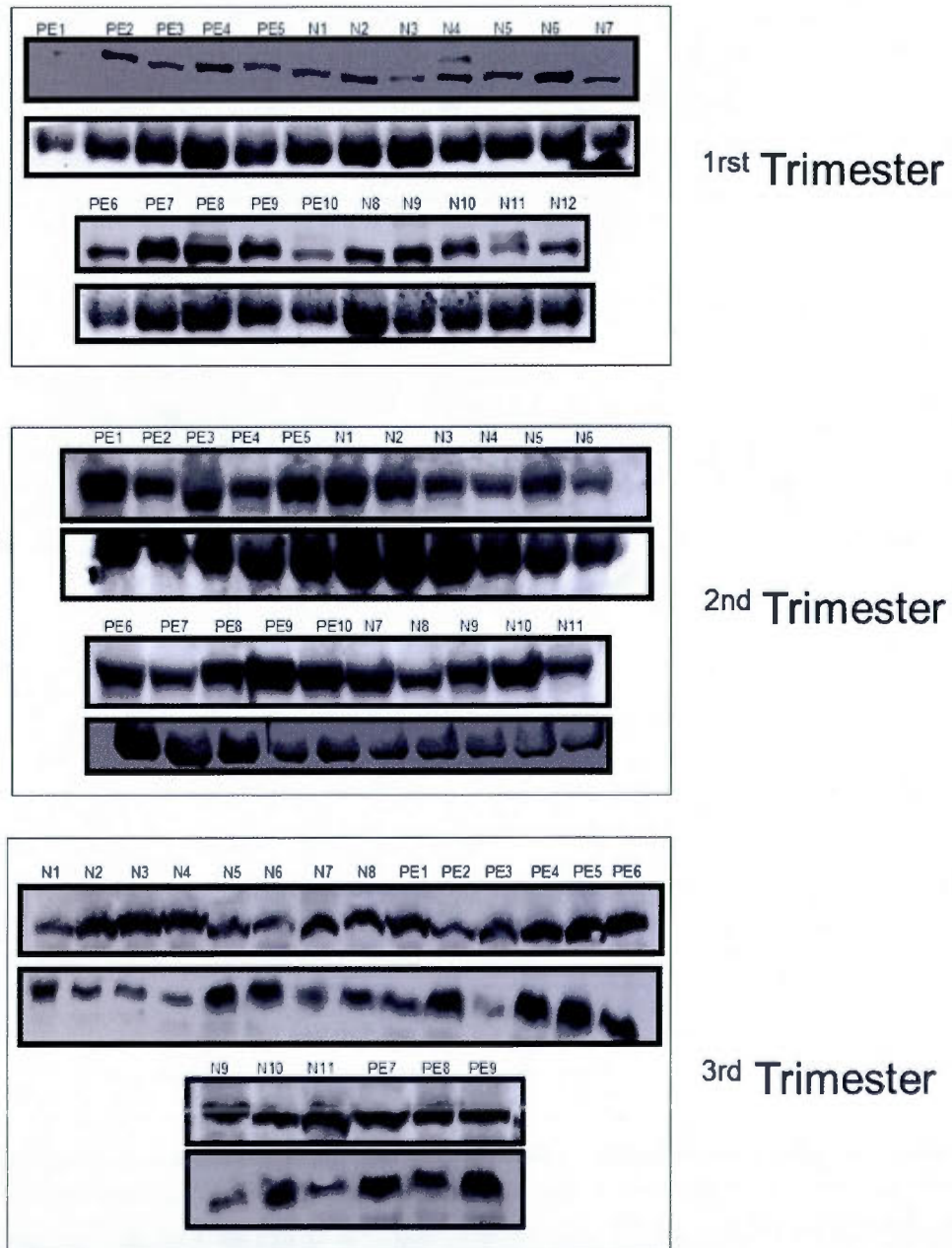
**Figure 4.S3:** EM analyses of exosome uptake by BeWo cells.



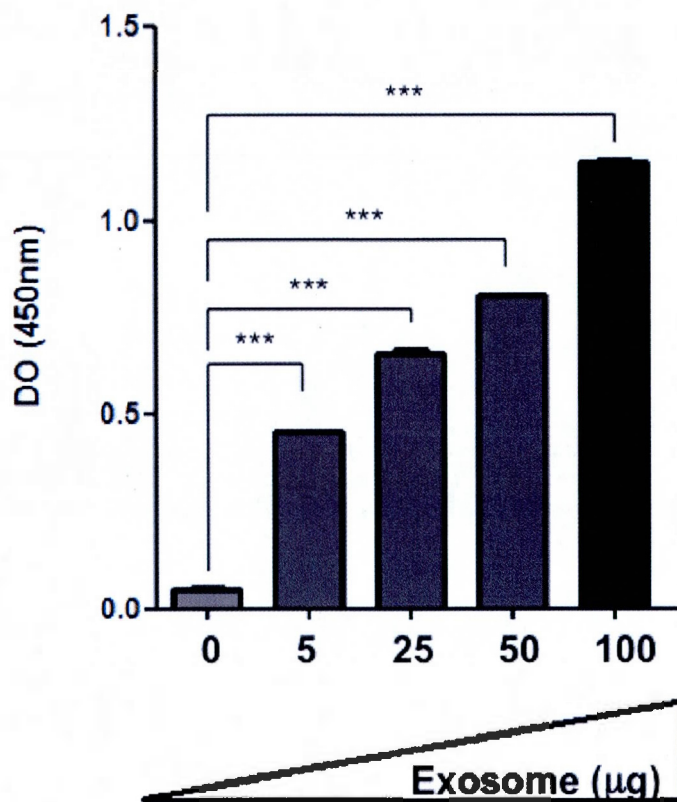
**Figure 4.S4:** Flow cytometry analyses of exosome uptake in BeWo cells.



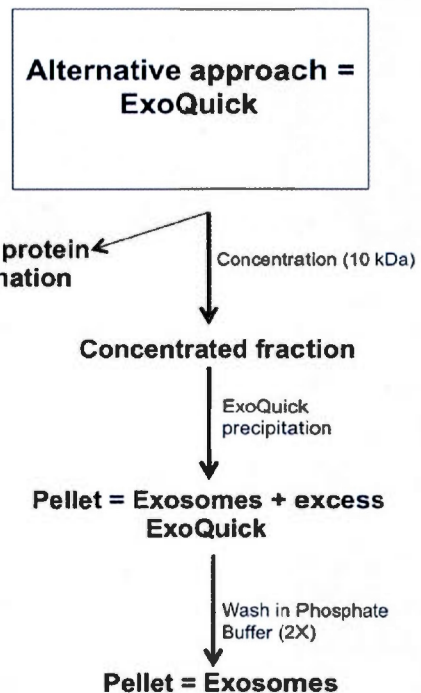
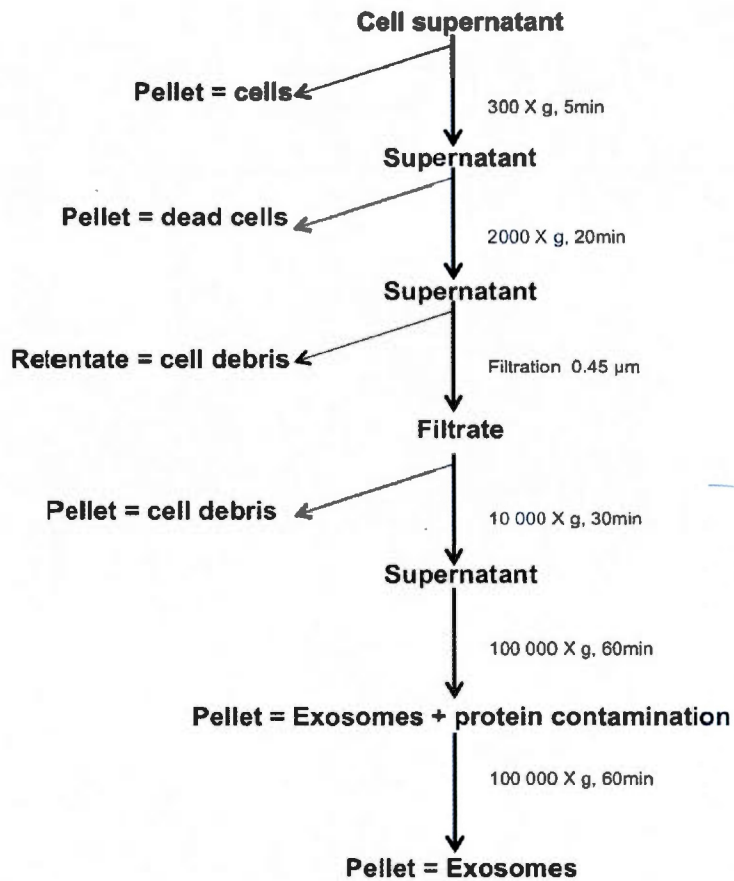
**Figure 4.S5:** Optimized sandwich ELISA assay for detection of Syncytin-2 at the surface of serum-derived exosomes.



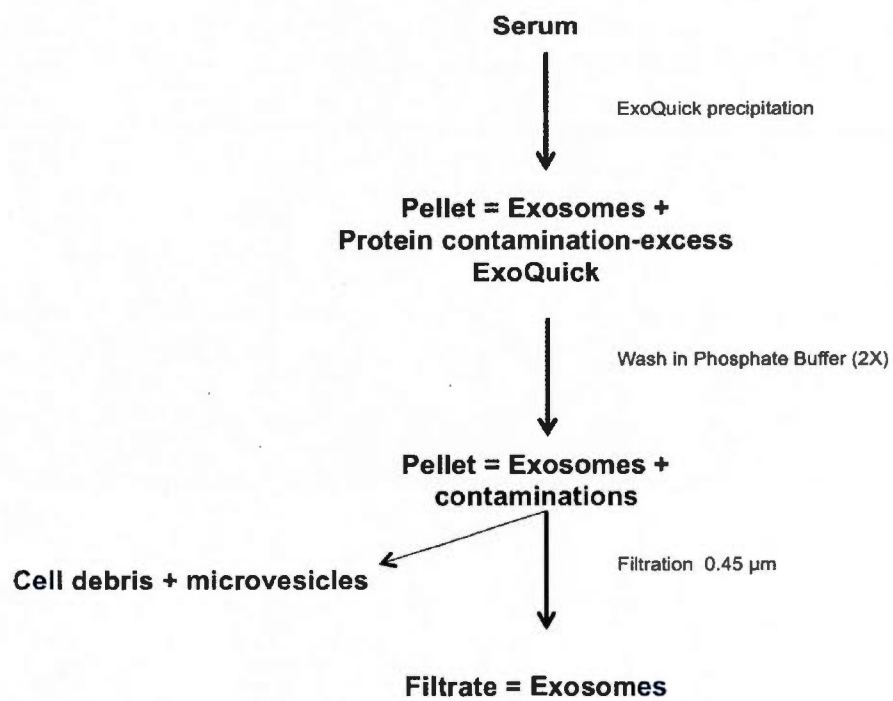
**Figure 4.S6:** Western blot analyses of serum-derived normal vs. PE exosomes for Syncytin-2.



**Figure 4.S7:** Dose-dependent detection of Syncytin-2 on serum-derived exosomes by a direct Syncytin-2 ELISA assay.







**Figure 4.S8:** Optimised protocols for exosome isolation.

	Size (nm)	Zeta average (mV) <sup>1</sup>
Cytotrophoblasts (d1) n=4	99,81 ± 7,702	-17 ± 0,5
Cytotrophoblasts (d3) n=4	91,55 ± 11,6	-15,4 ± 0,7
Serum N (1 <sup>st</sup> Trimester) n=11	111,8 ± 7,033	-9,4 ± 0,6
Serum PE (1 <sup>st</sup> Trimester) n=9	122,6 ± 9,604	-10,5 ± 0,6
Serum N (2 <sup>nd</sup> Trimester) n=5	105,4 ± 10,82	-11,6 ± 0,5
Serum PE (2 <sup>nd</sup> Trimester) n=5	158,3 ± 24,30	-12,8 ± 0,7

<sup>1</sup> Exosomes are charged negatively due to their phospholipid membrane Ce texte devrait plutôt se retrouver en texte annoté à même tableau.

**Table 4.S1:** Summary of nanosizer analyses of exosomes purified by modified method for exosome precipitation using ExoQuick.

Parameters	Controls	Pre-eclampsia
Age (years)	31,36 ± 4,17	31,083 ± 4,42
Gestational age (weeks)	38,40 ± 1,31	39,58 ± 1,24
Diastolic BP (mm Hg)	<90	>90
Proteinuria (g/d) (in a 24-hour collection)	<0.3	≥0.3

**Table 4.S2:** Summary of clinical characteristics of controls and patients with preeclampsia.

#### 4.2.10 Acknowledgements

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (B.B.). A.V. holds an Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarship from NSERC. C.G. is the recipient of a Junior 1 Scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and a New Investigator Award from the CIHR/ HIV/AIDS initiative. B.B. holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2). We thank Emilie Larocque and Diane Gingras for their excellent technical assistance.

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### **5.1 Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre II**

##### **5.1.1 Modulation de l'expression des deux nouvelles protéines d'enveloppe**

Notre première étude (chapitre II) a clairement mis en évidence au sein de la lignée fusogénique BeWo, la présence d'ARNm des deux enveloppes EnvP(b) et EnvV qui plus est, dans les deux cas s'avère être inductible après stimulation avec la forskoline (un agent activateur de l'adénylate cyclase). Les patrons d'expression ainsi mis en évidence (par RT-PCR et qRT-PCR) sont comparables à ceux initialement obtenus pour la Syncytine 1 et Syncytine 2, deux protéines références puisque reconnues comme étant impliquées dans les événements fusogéniques des trophoblastes (Vargas et al., 2009).

Par contre, pour ce qui a trait aux lignées cellulaires non fusogéniques, soit Jar et JEG-3 en culture et ce, après stimulation, nous sommes parvenus à mettre en évidence l'ARNm codant pour EnvP(b) mais aucune modulation de l'expression suite à une stimulation n'a cependant été relevée. Ces dernières observations suggèrent ainsi une activité basale du promoteur de ce gène, pouvant être due au fait que l'on se trouve dans un modèle de lignée cellulaire. En effet, les cellules étant immortalisées, il est possible que de nombreuses cascades signalétiques soient anormalement mises en jeu et ainsi l'expression de certains gènes induite. De plus, une autre hypothèse serait que la région LTR5' de ce gène au sein de ces deux lignées non fusogéniques pourrait être altérée (mutations et/ou délétions). Puisque les extrémités 5' et 3' sont maintenant complètement caractérisées, la région LTR5' pourrait être amplifiée, clonée puis séquencée. Des analyses de comparaisons de séquence avec la région LTR5' issue de la lignée BeWo pourraient alors être réalisées. Fait intéressant, le

profil d'expression de la protéine Syncytine 2 est apparu similaire à celui obtenu pour EnvP(b) dans les lignées non fusogéniques JEG-3 et Jar (résultats non publiés). Ceci suggère que bien qu'exprimées, la possibilité d'une modification des enveloppes (EnvP(b) et Syncytine 2) ou de leur récepteur respectif affectant ainsi leur pouvoir fusogénique, demeure envisageable.

Concernant EnvV, nous ne détectons aucun signal. Outre le fait que possiblement un faible taux d'expression de cette enveloppe puisse en être la cause, ces observations appuieraient l'hypothèse qu'au sein de ces lignées non fusogéniques JEG-3 et Jar, une ou plusieurs mutations dans l'ARNm affectent la détection par RT-PCR ou qRT-PCR. Cette hypothèse est basée sur le fait que des analyses de séquence (ARNm) pour les enveloppes Syncytine 1 et Syncytine 2 ont démontré plusieurs mutations (dans la séquence codante) (résultats non publiés). Afin de juger de la crédibilité de cette hypothèse avancée et après avoir séquencé ce gène, d'autres amplifications de l'ARNm pourraient donc être conduites en utilisant d'autres paires d'amorces ciblant d'autres régions de ce gène. De plus, la possibilité d'une régulation épigénétique au niveau de la transcription de ce gène reste à envisager (Trejbalova et al., 2011). Finalement, et pareillement à EnvP(b), l'hypothèse alternative d'une ou plusieurs mutation(s) et/délétion(s) au niveau de la région promotrice demeure à vérifier. Dans notre modèle cellulaire BeWo, les deux promoteurs clonés semblent être tous deux modulables par la forskoline. Afin de caractériser les régions nécessaires à l'activation, et ainsi les éléments de réponse à la forskoline, des mutants de délétions pourraient être générés et des expériences similaires à celles réalisées dans l'article I (se référer à la figure 2.3) pourraient être menées. Des études comparatives menées au sein de différentes lignées, soit les lignées non fusogéniques Jar et JEG-3 et la lignée fusogénique BeWo, pourraient être envisagées. Les résultats obtenus pourraient ainsi nous renseigner sur les différences de patrons d'expression obtenus pour ces gènes dans les trois lignées trophoblastiques. L'action du ou des facteur(s) de transcription induits et mis en jeu aurait plus d'impact dans un contexte donné (ex : étape précoce de la formation de la couche syncytiale), ce fait pouvant

possiblement expliquer l'absence de transcrits EnvV ou encore l'absence d'une modulation pour le transcrit EnvP(b). La caractérisation des extrémités du transcrit EnvV et ainsi la mise en évidence d'un épissage alternatif donnant lieu à différentes queues polyA (dont certaines contenant plusieurs séquences de polyadénylation), nous amène à penser que le gène envV possède une variabilité au niveau transcriptionnelle avec notamment plusieurs polyadénylations alternatives, pouvant perturber la régulation des gènes par les microARNs (miARNs) ainsi que la stabilité des transcrits (Lin et al., 2009; Moretti et al., 2012).

Au sein des cellules primaires trophoblastiques, les enveloppes EnvP(b) et EnvV présentent un patron d'expression intéressant. Pour l'enveloppe EnvP(b), ce n'est qu'à partir du deuxième jour de différenciation que le transcrit est clairement détecté, ceci étant corrélé avec le début des événements fusogéniques des cytotrophoblastes. Parallèlement, un profil quelque peu différent a été observé concernant l'enveloppe EnvV, avec un niveau d'expression maximal au deuxième et troisième jour. Ainsi, l'expression de ces HERVs varie en fonction du temps, impliquant possiblement plusieurs et différents facteurs transcriptionnels, tels que des répresseurs (chute drastique d'expression observée à 72 h), laissant la place à chacune d'entre-elles durant le processus de différenciation des cytotrophoblastes.

Ces résultats apparaissent importants pour notre étude visant à déterminer le rôle de ces protéines dans la fusion des trophoblastes, puisque placés dans un contexte physiologique représentatif. Advenant que ces protéines aient un rôle quelconque dans la biologie placentaire, et dans l'optique de valider ces observations, il deviendra alors intéressant d'établir les patrons d'expression protéique. Les anticorps n'étant pas encore commercialement disponibles, il deviendra nécessaire au préalable de concevoir et de tester de nouveaux anticorps dirigés contre ces deux protéines, Env(P)b et EnvV.

### 5.1.2 Rôle dans la fusion des cytotrophoblastes humains

De par leur profil d'expression (ARNm), ces enveloppes EnvP(b) et EnvV s'avéraient à ce stade potentiellement importantes et impliquées dans la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. Cependant, nos expériences de surexpression et d'ARN interférence n'ont pas confirmé leur rôle suspecté lors des événements de fusion des cytotrophoblastes. Il est possible qu'anciennement EnvP(b) et EnvV assuraient les fonctions qu'occupent aujourd'hui la Syncytine 1 et la Syncytine 2 et, qu'ainsi au cours de l'évolution, leur rôle se soit progressivement effacé. En effet, puisqu'impossible à dater avec précision, il est possible que l'intégration de toutes ces protéines d'enveloppe d'HERVs se soit produite à différents temps, s'échelonnant sur des dizaines de millions d'années (Aagaard et al., 2005; Feschotte and Gilbert, 2012), laissant ainsi la place et un rôle à chacune d'entre elles.

De plus, notons que, lors de nos expériences de fusion cellulaire (siRNA et système de surexpression, figures 2.4C et 2.5), nous utilisons un système de quantification qui pourrait être optimisé afin de se retrouver dans un contexte plus objectif et quantitatif. Publiée récemment, une technique menée en parallèle de mon sujet de doctorat, a justement fait l'objet d'une telle optimisation (Annexe 3). Ainsi, par le biais de populations stables, soit pour l'élément de réponse à la protéine Tat du VIH-1 placé en amont du gène rapporteur de luciférase où, pour la protéine Tat (vecteur d'expression), il devient facile, rapide et fiable de quantifier avec précision l'état de fusion cellulaire des trophoblastes. Ainsi, il deviendra possible de juger de façon plus exact l'état de différenciation et de fusion des cytotrophoblastes placés dans un contexte de surexpression des deux protéines Env d'HERVs EnvP(b), EnvV (et comparativement aux Syncytine 1 et Syncytine 2) ou de déplétion de ces protéines (via l'utilisation d'ARN interférence). Tel qu'observé dans l'article 1, ces expériences nous permettraient de s'assurer qu'aucun changement, même subtil, de l'état de différenciation/fusion ne s'opère.

Enfin, d'autres hypothèses peuvent expliquer ces observations, notamment pour ce qui a trait à EnvP(b) : en effet, de par nos observations au sein des lignées non trophoblastiques (observations d'événements de fusion cellulaire pour EnvP(b)) (se référer à la figure 2.4), et outre le fait que le récepteur pourrait être absent ou modulé au sein des cellules trophoblastiques, nous sommes amenés à penser que la présence de ces deux enveloppes pourrait tout de même s'avérer nécessaire pour le développement du placenta. En effet, l'intervention de toutes ces protéines d'HERVs soit Syncytine 1, Syncytine 2, EnvP(b) et EnvV, d'ordre synergique ou encore compétitive, pourrait mettre en jeu des cascades signalétiques complexes. Cette hypothèse réside dans le fait que 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. Dans nos études (et lors de nos expériences), nous utilisons des lignées trophoblastiques ou encore des cytotrophoblastes humains isolés de placentas prélevés à terme seulement. Si toutefois réelle, leur intervention pourrait possiblement avoir lieu plus précocement dans les étapes de formation du placenta et l'établissement des villosités choriales, et de ce fait à un ou des stades spécifiques de la placentation et distincts de celui dans lequel nous nous retrouvons lors de nos expériences. Ainsi, toutes ces protéines d'enveloppe pourraient agir de concert et/ou séquentiellement assurant ainsi i) une efficacité de fusion cellulaire des trophoblastes humains, ii) une certaine flexibilité en fonction du contexte précis et, iii) de la complexité dans les différents états du phénomène de fusion.

Enfin, il n'est pas exclu qu'un rôle dans un tout autre contexte, dans d'autres types de fusion, puisse leur être attribué, soit i) lors de la fusion des myoblastes mononucléés en myotubes multinucléés lors de la différenciation fonctionnelle et structurale du muscle squelettique (Horsley and Pavlath, 2004) ou encore, ii) lors de la fusion des pré-ostéoclastes en ostéoclastes, un processus mis en œuvre lors de la résorption osseuse (résultats non publiés) (Vaananen et al., 1988).



### 5.1.3 Autre rôle des HERVs: l'immunosuppression

Finalement, la présence de ces protéines env d'HERVs pourrait s'avérer importante dans un tout autre contexte que celui de la fusion syncytiotrophoblastique. En effet, d'autres fonctions pourraient leur être attribuées.

Initialement mis en évidence pour les Syncytines 1 et 2, l'une des particularités de toutes ces protéines HERVs réside dans le fait qu'elles sont dotées d'un domaine immunosuppresseur (Haraguchi et al., 1995 ; Takahashi et al., 2001). L'équipe du Dr Heidmann a démontré, dans un modèle murin, que les protéines d'enveloppe Syncytine 2, EnvP(b) et EnvV semblaient être capables de médier une immunosuppression (Mangeney et al., 2007b). Menés dans notre laboratoire, des résultats préliminaires ont démontré que ces protéines d'enveloppe sont toutes capables d'inhiber l'état d'activation des lymphocytes T (Annexe 2), controversant ainsi les résultats obtenus pour la Syncytine 1 par l'équipe du Dr Heidmann. Notons qu'une diminution modérée de l'état d'activation des cellules Jurkat semblent s'opérer en présence de la Syncytine 1. Ces observations s'orientent ainsi vers les résultats obtenus *in vivo* par Mangeney et al (excluant la Syncytine 1). Ainsi, un rôle additionnel dans le processus d'immunotolérance materno-fœtal pourrait leur être conféré. Pour parvenir à vérifier et confirmer ceci, d'autres expériences pourraient alors être envisagées : similairement aux expériences d'inhibition présentées en annexe 2, différents autres modèles de lymphocytes T activés pourraient être utilisés, soit les différentes lignées lymphocytaires SupT1, HPB-ALL et CEM, ainsi que des cellules T primaires CD4<sup>+</sup> isolées de cellules mononucléaires circulant dans le sang. Les cellules seront transfectées avec plusieurs constructions, soit d'une part avec l'un des vecteurs d'expression pCMV-env vs pCMV1 (contrôle), une des constructions renfermant les éléments de réponse des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, NFAT et AP-1 placés en amont du gène rapporteur *luciférase* et, enfin le vecteur exprimant la protéine  $\beta$ -gal (pactin-lacZ), pour normaliser les transfections. Après transfection, les cellules devraient être mises en présence d'une série d'activateurs tels que, des

lymphokine (IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ), le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate), le PHA (phytohemmaglutinine) et la Ionomycine. Il pourrait également être intéressant d'utiliser des constructions où seules les régions codantes pour les domaines immunosuppresseurs respectifs seraient présentes.

D'autre part, afin de vérifier que l'inhibition de l'activation des lymphocytes T est médiée via un contact direct entre les cellules, des expériences similaires seront conduites en utilisant deux populations de lymphocytes différentes, à savoir l'une transfectée avec les constructions pNFkB-luc, pNFAT-luc ou pAP-1-luc / pactin-lacZ puis mises en co-culture avec une seconde transfectée avec phCMV-env / pactin-lacZ vs phCMV1/ pactin-lacZ. Dans un ultime cas, et ce au vu des résultats obtenus dans le chapitre IV et lors d'expériences menées en collaboration avec l'équipe du Dr Smith (Tolosa et al., 2012a), des exosomes de cytotrophoblastes primaires pourraient être testés sur une population de lymphocytes transfectés tel qu'énoncé précédemment (pNFkB-luc, pNFAT-luc ou pAP-1-luc / pactin-lacZ). Ces expériences pourraient ainsi nous renseigner sur le rôle des HERVs associés aux exosomes dans l'immunosuppression materno-fœtale (se référer à la section 5.3.3).

Finalement, et afin de poursuivre les études sur l'immunosuppression médiée par les HERVs, d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> et les NK pourraient être également testés.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences permettrait de vérifier si tous ces rétrovirus endogènes sont capables d'induire une tolérance aux mécanismes de défenses immunitaires induits par l'hôte.

## **5.2 Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre III**

### **5.2.1 Défaut fusogénique des CT primaires/PE**

Dans l'article présenté dans le chapitre III, nous avons clairement mis en évidence une altération de l'état de différenciation et plus précisément de fusion cellulaire des cytotrophoblastes primaires issus de patientes pré-éclamptiques versus « saines ». Pour quantifier et juger de l'état de la fusion cellulaire, nous avons utilisé un système semi-quantitatif basé sur un décompte de cellules fusionnées, visualisables en microscopie confocale après un marquage immunofluorescent (anti-desmoplakine) et une coloration des noyaux (iodure de propidium). Pour pallier au labour mais également à la subjectivité de ce système, et tel que vu précédemment, nous avons mis au point un système de quantification plus objectif basé sur l'établissement de populations stables et faisant intervenir une unité de mesure : l'Unité de Lumière Relative (ULR). L'article en annexe 3 détaillant la technique fait état finalement de l'application et de l'extrapolation de cette technique sur les cytotrophoblastes primaires (Figure 5). En effet, des cytotrophoblastes primaires ont été, soit transfectés avec un vecteur renfermant la séquence codant pour la protéine Tat soit, avec un plasmide renfermant un fragment contenant le LTR et la région TAR (reconnue spécifiquement par Tat) du VIH-1 en amont du gène codant pour la luciférase. Ainsi, les deux populations mises en co-culture fusionnent spontanément dès 48 heures de culture, ce qui conduit et se traduit *in fine* par une augmentation de la luciférase détectable par le système de dosage de l'activité luciférase communément utilisé. Les essais ont ainsi révélé une URL significativement différente à 48 h et 72 h lorsque les deux populations sont mises en co-culture, comparativement avec l'expérience où seule la population transfectée avec le vecteur pLTRxluc est présente. Ainsi, ce système pourrait être un moyen de quantification fiable et rapide permettant de mettre en évidence les différences en terme de fusion cellulaire des cytotrophoblastes issus de plusieurs placentas (de patientes « saines » ou pré-éclamptiques). Finalement, en isolant des cytotrophoblastes issus de patientes pré-éclamptiques présentant différents degrés de sévérité des symptômes, ce système pourrait permettre de déterminer si la sévérité de la pré-éclampsie est corrélée à un défaut de fusion plus prononcé.

### 5.2.2 Rôle des HERVs dans ce défaut fusogénique

Tel que vu dans l'article 2 (se référer aux figures 3.2 et 3.3) à travers les expériences de quantification des niveaux d'expression des Syncytine 1 et Syncytine 2 dans les tissus totaux placentaires, nous croyons qu'un défaut d'expression de celles-ci conduit à la condition pré-éclampsie et ce, via une altération du pouvoir fusogénique des cytotrophoblastes à l'origine de la couche syncytiale. En vue de clairement corréler ce défaut du caractère fusogénique des cytotrophoblastes issus de placentas pré-éclamptiques à l'expression de certains gènes *env* d'HERVs, les niveaux d'expression des différentes protéines d'enveloppe Syncytine 1 et Syncytine 2 pourraient être évalués par RT-PCR, qRT-PCR et immunobuvardage de type Western-blot, et ce au sein de cultures cytotrophoblastiques issues de plusieurs placentas (sains ou pré-éclamptiques modérés à sévères). Les analyses devraient être conduites à différents temps (T=24 h à T=96 h), à savoir dès la mise en culture, puis toutes les 24 heures, jusqu'à ce que les cellules atteignent leur différenciation maximale, soit après 96 heures de culture.

Pareillement, il devient également intéressant d'évaluer les niveaux d'expression des deux nouvelles protéines Env soit EnvP(b) et EnvV.

Aussi, les niveaux d'expression de toutes ces protéines d'enveloppe d'HERVs pourraient être mis en évidence au sein de cytotrophoblastes isolés de patientes atteintes ou non d'une pré-éclampsie modérée à sévère. Une fois les patrons d'expression établis, nous pourrions possiblement cibler celle(s) qui démontre(nt) la/les plus importante(s) et indiscutable(s) corrélation(s) en termes de diminution d'expression au cours des événements fusogéniques des CT, avec la condition pré-éclampsie, et qui plus est avec la sévérité des symptômes (modéré à sévère). Par la suite, il deviendrait intéressant d'entreprendre des expériences de recombplémentation de cette (ou ces) protéine(s) d'enveloppe. Pour ce faire, les cytotrophoblastes issus de placentas pré-éclamptiques pourraient être transfectés selon le protocole décrit dans l'article Vargas *et al.*, 2009. Les cellules isolées pourraient être transfectées avec les

différentes constructions phCMV-envs choisies (délétées ou non de la séquence correspondant au peptide fusion). Il s'en suivrait une évaluation de l'état de la fusion cellulaire et de la différenciation des cytotrophoblastes transfectés.

Dans les figures 3.2 et 3.3, les niveaux d'expression des deux enveloppes Syncytine 1 et Syncytine 2 ont été mis en évidence dans des placentas de patientes pré-éclampsiques. Cependant, bien que détectable tant au niveau génique que protéique, il est probable que la fonction de ces protéines soit affectée. Afin de vérifier cette hypothèse et de déceler une ou plusieurs mutations et/ou délétions, les différentes séquences pourraient être analysées (comparaisons de séquences).

Finalement, l'ensemble de ces expériences pourrait nous suggérer qu'un défaut fusogénique médié par une altération ou une diminution de l'expression d'une ou plusieurs protéines Env d'HERVs est à l'origine de la pré-éclampsie. Il est important de mentionner qu'une récente étude est en contradiction avec nos observations ainsi que celles faites par d'autres équipes (Holder et al., 2012a). En effet, dans cette étude, les auteurs prétendent à une augmentation du niveau protéique des enveloppes Syncytine 1 dans des cas de pré-éclampsie. Ils expliquent ces observations contradictoires avec toutes celles mentionnées dans la littérature par le fait que possiblement la partie SU de l'enveloppes est délocalisée au niveau de l'endothélium des vaisseaux placentaires, biaisant ainsi l'immunoréactivité des anticorps communément utilisés et, ainsi la détection. Ainsi, à la vue de cette étude, et bien que divers points (procédures expérimentales et autres résultats peu concordants avec de nombreux autres existants dans la littérature) restent obscures, il demeure important de vérifier ces observations afin de comprendre la divergence de tous ces résultats.

### **5.2.3 Altération de l'activité immunosuppressive des HERVs dans la PE**

Tel qu'énoncé précédemment, les HERVs ont un potentiel immunosuppresseur. Outre le fait qu'un défaut au niveau de l'expression des HERVs puisse avoir lieu et ainsi affecter l'environnement immunosuppresseur, un défaut

associé à la région immunosuppressive des HERVs pourrait également être relié à la pré-éclampsie. Afin de vérifier cette hypothèse, et selon la condition « patiente saine/pré-éclamptique », il devient intéressant, d'une part de comparer les séquences relatives à ces régions (ISD), et d'autre part d'en étudier le pouvoir immunosuppresseur en utilisant le procédé expérimentale énoncé dans la section 5.1.3.

Finalement, d'autres études pourraient devenir pertinentes à réaliser (utilisant des placentas PE modérée à sévère), visant à corrélérer cette altération du pouvoir immunosuppresseur des HERVs avec la sévérité des symptômes de la pré-éclampsie.

### **5.3 Conclusions et discussion complémentaires du Chapitre du IV**

Les HERVs, dont les mécanismes de fusion semblent être médiés via un contact direct cellule /cellule, sont d'origine rétrovirale et il n'est pas exclu qu'un second mécanisme proche de celui emprunté aujourd'hui par certains rétrovirus exogènes, soit une voie d'endocytose, puisse être envisageable. En effet, plusieurs études attribuent aux exosomes des propriétés « virus-like », telles que le transfert de matériel génétique à une cellule cible (Belting and Wittrup, 2008; Simons and Raposo, 2009). Cependant, contrairement à ceux des virus, les mécanismes d'entrée des exosomes demeurent encore non élucidés. Deux hypothèses semblent cependant s'ouvrir : celle de la fusion avec la membrane plasmique cellulaire médiée par les protéines d'enveloppe d'HERVs ou encore celle d'une internalisation via une voie d'endocytose. La finalité de ce dernier processus serait qu'une fois à l'intérieur d'une vésicule endosomale, l'exosome transfère son contenu après un processus de fusion exosome/endosome médié par les enveloppes d'HERVs.

### 5.3.1 Communication exosomes/CT: entrée par fusion cellulaire

Nos expériences menées dans l'article 3 (chapitre IV) n'ont pas apporté d'informations concernant l'entrée possible des CT-exosomes via un mécanisme de fusion avec la membrane plasmique. En effet, bien que probablement minoritaire, ce processus ne peut être exclu car il est difficilement observable. En effet, dans les expériences utilisant le marquage au PKH67, on pourrait s'imaginer qu'une fois entré, le signal diffuse à la membrane plasmique, le rendant ainsi difficilement détectable. Aussi, en microscopie électronique, il est difficile de visualiser un phénomène bien précis à un temps bien déterminé. Ainsi, à la vue de ces différentes remarques, mais aussi du fait qu'il s'agit probablement d'un événement rare, il est donc possible que nous n'ayons simplement pas réussi à observer ce phénomène. Cependant, il serait possible de mettre en évidence ce processus par l'observation de la résultante de ce procédé: à savoir une association des deux unités membranaires. Des expériences de microscopie immuno-électronique pourraient permettre de visualiser un élément (ex : une protéine non membranaire étiquetée) préalablement incorporé dans la particule exosomale.

La possibilité que les exosomes fusionnent avec la membrane plasmique des cytotrophoblastes est intéressante puisqu'il s'agirait d'un processus rapide et efficace de transfert d'informations. En effet, les exosomes, connus pour leur contenu en microARN ARNm ou protéines, pourraient venir réguler une cellule cible et il devient possible de s'imaginer qu'un défaut dans ce transfert, ou une déficience en ce qui a trait à son contenu, pourrait altérer la fonction du cytotrophoblaste et/ou son devenir. Ceci engendrerait des complications liées au maintien et/ou à l'établissement du placenta et plus particulièrement celui de la couche syncytiale.

Finalement, les exosomes pourraient également fusionner non pas avec la membrane plasmique, mais avec des prolongements membranaires ou « filopodes », ayant ainsi plausiblement un rôle dans le rapprochement cellulaire (résultats non publiés) (Erices et al., 2011; Genbacev et al., 1993; Nicola et al., 2008; Vargas et al.,

2009). Généralement associées aux trophoblastes extravilleux, une de nos études a mis en évidence la présence de telles structures au sein des cellules trophoblastiques BeWo (Vargas et al., 2009). Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la Syncytine 1, puisque retrouvée le long de ses protrusions, pouvait avoir un rôle dans le rapprochement cellulaire permettant indirectement la fusion des cytotrophoblastes se retrouvant ainsi à proximité. Les exosomes, véhiculant cette protéine, pourraient donc transférer, après fusion avec ces prolongements, leur contenu riche en Syncytine 1 et ainsi médier le rapprochement des cytotrophoblastes qui *in fine* fusionneraient formant ainsi des syncytia. Inversement, il est plausible qu'il y ait formation d'un MVB riche en Syncytine 1, s'orientant vers une protrusion membranaire qui *in fine*, assurerait un rôle dans le rapprochement des cellules cytotrophoblastiques. Notons que, dans le contexte des lignées cellulaires, soit ici les cellules BeWo, ce processus possiblement observé par Vargas *et al.*, 2009 ne semble pas aboutir en la libération d'exosomes puisque non sécrétés par ces cellules (résultats non publiés) (Luo et al., 2009).

### **5.3.2 Communication exosomes/CT: entrée par internalisation**

La deuxième hypothèse, celle de l'entrée par internalisation, est celle que nous avons confirmée avec la plus grande conviction. En effet, à travers nos expériences en microscopie confocale ainsi qu'en microscopie électronique, la possibilité que les exosomes pénètrent par endocytose dépendante de la clathrine/caveoline semble se dessiner. Il devient alors intéressant de poursuivre ces études et de tenter d'élucider la voie ainsi empruntée, le cheminement exact à travers la cellule, le devenir des exosomes ainsi que de leur contenu. D'autres marqueurs pourraient être utilisés en microscopie confocale. On pensera aux marqueurs d'endosomes tardifs non testés dans nos études. Il devient également pertinent de tester différents inhibiteurs des voies d'endocytose (ex : inhibiteur de la clathrine) afin de déterminer la voie empruntée par les exosomes. D'autres études en microscopie électronique devront



également être réalisées et l'utilisation d'un immunomarquage permettrait avec certitude d'associer les exosomes internalisés avec des structures intracellulaires comme les endosomes (précoces ou tardifs et les lysosomes). L'utilisation de protéines étiquetées associées aux exosomes nous permettrait également de nous assurer que les exosomes que nous pensons retrouver à l'intérieur de la cellule sont bien ceux provenant du milieu extérieur, et non de la voie du MVB. Dans nos études, ce problème ne semblait pas nous concerner car nous ne sommes jamais parvenus à démontrer une synthèse d'exosomes active dans la lignée trophoblastique BeWo utilisée dans nos expériences. Cependant, tous ces résultats concernant l'internalisation des exosomes devront être confirmés dans un modèle plus représentatif soit les cytotrophoblastes primaires qui eux, sécrètent activement des exosomes. Savoir discriminer les exosomes « entrants » ou « sortants » deviendra alors primordial.

Aussi, dans l'article 3, il est suggéré que possiblement les exosomes transfèrent leur contenu après fusion avec la membrane endosomale. Il devient important d'explorer cette piste. L'utilisation d'un marquage (composé fluorescent) du contenu protéique ou encore d'une protéine spécifique véhiculée par les exosomes (ex : la Syncytine 1 ou la Syncytine 2 étiquetée GFP) pourrait être envisagée et permettrait de faire le suivi des exosomes et de leur contenu en temps réel via l'utilisation de la microscopie confocale. Les résultats pourraient également être confirmés par microscopie immuno-électronique, utilisant des protéines étiquetées et véhiculées par les exosomes mis en contact avec les cytotrophoblastes. Il deviendrait alors possible de voir si des protéines initialement contenues dans les exosomes se retrouvent libres dans la cellule et donc dissociées des exosomes d'origine ou, si elles sont localisées spécifiquement, empruntant ainsi une forme de voie de recyclage.

Si cette hypothèse est validée et, pareillement à la théorie de fusion cellulaire entre les deux entités (exosome/cellule) (se référer au paragraphe 5.3.1), les phénomènes de fusion ainsi engendrés pourraient permettre le transfert de protéines ou encore de molécules d'ARNm ou de microARN.

Finalement, comme discuté précédemment, les deux hypothèses d'entrée devront être envisagées et étudiées même si l'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici laisse penser que seule l'internalisation entre en jeu. En effet, il est nécessaire de rappeler que nous ne nous trouvons pas dans le contexte physiologique exact. Le système utilisé ici, basé sur des études antérieures, est peut-être non adapté et la quantité d'exosome utilisé pourrait s'avérer démesurée ou moindre comparativement au contexte *in vivo*. De ce fait, certains mécanismes en dépit d'autres, à savoir l'internalisation plutôt que la fusion membranaire, pourraient être anormalement sollicités et ainsi ne pas représenter ce qui se produit *in vivo*. Utiliser les cytotrophoblastes primaires dans ces études devient alors indispensable, d'autant plus que notre étude (article 3) apporte pour la première fois des informations quant à la quantité d'exosomes sécrétés par les cytotrophoblastes primaires et ce, au cours de la différenciation cellulaire (se référer à la figure 4.1).

Outre le fait que les exosomes puissent ainsi assurer un transfert de matériel au niveau des cytotrophoblastes humains, d'autres types de communication ciblant d'autres types cellulaires que les cytotrophoblastes pourraient également entrer en jeu. En effet, les exosomes se retrouvent en circulation et il est possible de s'imaginer que durant leur cheminement ils pourraient communiquer avec de nombreuses cellules via les Syncytines qu'ils véhiculent à leur surface, et mettant en jeu une interaction spécifique avec leur récepteur (pour ASCT1 et ASCT2, pouvant être retrouvés dans d'autres tissus) ou de nouveaux récepteurs non mis en évidence dans un contexte différent de celui du placenta. Durant la grossesse, ces interactions spécifiques pourraient être un mode de communication consciencieusement orchestré durant lequel divers mécanismes pourraient avoir lieu (transfert d'informations et induction de cascades signalétiques).

### 5.3.3 Communication exosomes/cellules immunitaires: immunosuppression

Transportant à leur surface les deux protéines d'env d'HERVs, Syncytine 1 et Syncytine 2, dont l'une des caractéristiques est le possible pouvoir immunosuppresseur, il devient donc envisageable de finalement considérer que la présence de ces deux protéines à la surface des exosomes contribuent au pouvoir immunomodulateur de ces derniers. Afin d'évaluer la possibilité que les exosomes soient les messagers véhiculant les HERVs et médiant ainsi une activité immunosuppressive, des expériences comparables à celles énoncées dans le paragraphe 5.1.3 pourraient être entreprises. Cependant, les vecteurs d'expression des différentes protéines d'enveloppe d'HERVs seraient remplacés par l'ajout d'une préparation d'exosomes issus de cytotrophoblastes primaires. Il deviendra ainsi possible de corréler l'effet d'inhibition avec les protéines d'enveloppe d'HERVs, contenues dans les exosomes relargués par les cellules cytotrophoblastiques. Afin de corréler les HERVs à cet effet immunosuppresseur, des préparations d'exosomes issues de surnageants de culture de cytotrophoblastes primaires préalablement transfectés ou non avec différentes molécules d'ARN interférant spécifiques de chacune des protéines d'enveloppe étudiées, pourraient être finalement testées. Dans un ultime cas, des expériences utilisant des fragments F(ab')<sub>2</sub> pourraient confirmer les résultats obtenus.

Enfin, il deviendrait également pertinent de tester l'immunosuppression induite par des exosomes issus de placentas pré-éclampsiques, dont les cytotrophoblastes (déficients en protéines d'enveloppe d'HERVs tel que démontré dans l'article 3) seront éventuellement et en parallèle reconstitués avec différents vecteurs d'expression pour les différentes protéines d'enveloppe d'HERVs (ou les régions ISD respectives).

### 5.3.4 Exosomes et biomarqueurs de la PE

Bien que les rôles joués par les HERVs ne soient pas encore connus dans tous les détails, il n'en est pas moins qu'ils semblent être d'excellents biomarqueurs de la pré-éclampsie (Article 2 et 3). Les résultats obtenus dans la seconde partie de l'étude décrite dans le troisième article font état d'une différence significative d'expression de la Syncytine 2 associée aux exosomes présents dans la circulation sanguine de patientes pré-éclamptiques en comparaison avec des patientes « saines ». La méthode utilisée, soit la technique ELISA, est une méthode communément utilisée dans le domaine du diagnostic, ce qui rend notre analyse intéressante. Il devient alors important de valider notre test en augmentant le nombre d'échantillons mais également en utilisant d'autres techniques d'isolation des exosomes reconnues pour assurer une qualité et une pureté irréprochable de l'échantillon. Il s'agirait de la méthode par séries d'ultracentrifugation combinée avec une étape d'immunoprécipitation suivie d'une purification sur gradient de sucrose (They et al., 2006).

Aussi, une perspective intéressante serait de démontrer, via le test proposé dans l'article, l'existence d'une corrélation entre l'abondance de la Syncytine 2 associée aux exosomes et la sévérité des symptômes de la maladie. En fait, dans l'optique de développer un test de diagnostic de la pré-éclampsie, il devient essentiel de connaître ces informations. De plus, il devient également pertinent d'élaborer sur une étude visant à démontrer que dans des cas de pré-éclampsie, des exosomes reconstitués en Syncytine 2 pourraient devenir d'efficaces agents thérapeutiques. Il serait ici envisagé d'utiliser le seul modèle d'étude de la pré-éclampsie connu à ce jour, soit le modèle d'étude murin développé par une équipe de New York et mimant les désordres associés à la pré-éclampsie (Ahmed et al., 2010).

Finalement, l'ensemble des résultats présentés dans le quatrième chapitre, nous amène à penser que les exosomes circulants (dans la circulation maternelle) sont le reflet de la dynamique placentaire mise en place et pourraient donc nous renseigner

quant au bon déroulement des étapes de développement et du maintien du placenta. De ce fait, il n'est pas difficile d'envisager que d'autres anomalies liées à la grossesse pourraient également se traduire par une dérégulation de la Syncytine 2 associée aux exosomes circulants. Citons par exemple, le retard de croissance intra-utérin ou encore le syndrome HELLP.

### **5.3.5 Un nouvel outil : les exosomes associés à la Syncytine 2**

Outre le fait que cette association Syncytine 2/exosomes pourrait devenir une référence dans le diagnostic d'anomalies liées à la grossesse, il n'en est pas moins qu'un second bénéfice pourrait lui être attribué. En effet, la Syncytine 2 pourrait devenir un outil permettant, à partir d'échantillons sanguins, la sélection spécifique d'exosomes d'origine placentaire. Ainsi, cela pourrait attirer différents domaines de recherche intéressés d'étudier le contenu exosomal dans un contexte donné. En effet, tout comme cet outil pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la pré-éclampsie, il pourrait également conduire en la découverte de nouveaux marqueurs ou pistes thérapeutiques dans de nombreuses autres pathologies liées à la grossesse ou affectant le placenta. Enfin, dans le cas de la pré-éclampsie, mettant en jeu un processus complexe encore peu élucidé, ce nouvel outil pourrait finalement permettre d'élucider les mécanismes engendrés dans cette pathologie.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les expériences menées lors de mon doctorat visaient à caractériser le rôle des HERVs dans la formation normale du placenta mais aussi à en connaître les limites conduisant à des désordres biologiques à l'origine de la pré-éclampsie. L'ensemble des résultats et la réflexion entourant ceux-ci soulignent l'idée qu'une dérégulation de la protéine d'HERVs Syncytine 2 pourrait être associée à un défaut de la placentation, traduit dans la circulation maternelle par une présence d'exosomes déficients en cette protéine d'enveloppe. Une perspective intéressante s'ouvre alors: celle d'utiliser cette protéine ancestrale (déficiente) comme nouveau marqueur de la pré-éclampsie. Cette étude représente un grand pas vers la prévention des risques liés à la première cause des complications materno-fœtales. Son dépistage précoce est un facteur essentiel quant à un meilleur traitement de ses symptômes, parfois graves tant pour le fœtus que pour la future mère, en permettant une prise en charge rapide, adaptée et efficace.

Finalement, outre les perspectives intéressantes qu'ouvre ce projet et, tel qu'énoncé, la possibilité d'utiliser la Syncytine 2 associée aux exosomes pour découvrir diverses pistes de diagnostic ou de cibles thérapeutiques associées à diverses pathologies, l'ensemble de cette étude apporte de nouvelles informations quant aux rôles joués par ces protéines ancestrales au cours de la placentation. Certaines protéines d'enveloppe d'HERVs jouent non seulement un rôle majeur et direct dans les événements fusogéniques des cytotrophoblastes, mais semblent également avoir une fonction beaucoup plus large. Elles circulent le long de la couche syncytiale via leur association avec des exosomes et se retrouvent ainsi jusqu'à la circulation sanguine maternelle. Leur action, s'étendant alors à plus grande échelle, reste alors à découvrir. Les études concernant l'existence et le rôle de ces protéines d'origine virale prirent naissance autour des années 80. Après plus d'une trentaine

d'années de recherches, nous n'en sommes certainement qu'au commencement d'une longue série d'études nous menant progressivement vers de surprenantes et fascinantes découvertes.

## SOURCES DE FINANCEMENT

Bourse de recherche Alexander Graham Bell du CRSNG pour mes travaux de doctorat.

Subvention de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), accordée au Dr Benoit Barbeau pour le financement des projets portant sur les Rétrovirus Endogènes.

Chaire de Recherche du Canada en rétrovirologie humaine du Dr Benoit Barbeau.



ANNEXES

ANNEXE I  
 LISTE DES PROTEINES IDENTIFIEES DANS LES EXOSOMES  
 PLACENTAIRES

Protein family	Members
Cytoskeleton proteins	Actin
	Myosin
	Tubulin
	Ezrin
	Profilin 1
	Cofilin 1
Heat shock proteins chaperons	HSP27
	HSP70
	HSP90
Tetraspanins	CD9
	CD63
MVB biogenesis	Ubiquitin
	TSG101
	Alix
	Vacuolar sorting protein 29 (ESCRT)
	Charged MVB proteins 1B and 4B (ESCRT)
Apoptosis regulation	Programmed cell death proteins 6 and 10
Protein biosynthesis and degradation	60S ribosomal proteins
	40S ribosomal proteins

	Elongation factors 1- $\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 3 and $\gamma$
	Proteasome $\alpha$ 4 subunit
	Proteasome $\alpha$ 5 subunit
	Proteasome 26S non-ATPase subunit
Adhesion, targeting	Integrins $\alpha$ 5, $\alpha$ V, $\beta$ 1, $\beta$ 3
	CD47
	Transferrin receptor
	Epidermal growth factor receptor
	Liprin b-2
Signal transduction	14-3-3 proteins
	Rab 1A, 1B, 35
	Ras-related proteins 1B and R
	Guanine nucleotide binding protein

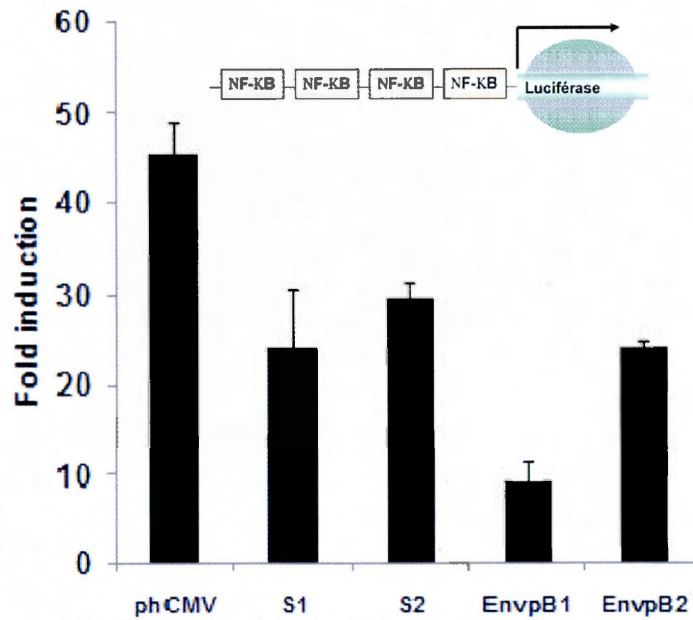
	Ras GTPase-activating protein
	Transforming protein RhoA
	Sorcin
Enzymes	$\alpha$ -enolase
	5' nucleotidase
	Dipeptidyl peptidases
Membrane transport and fusion	Annexins
	Rab proteins: 2A, 5A, 5B, 5C, 6, 7, 10, 14
	Clathrin heavy chain
	Copine-3
	Dysferlin
	Testilin
	Myoferlin
	Syntaxin
Vesicle transport through interaction protein 1B	
Others	Histones
	LAMP2 (CD107B)
	Multidrug resistance protein 1

	S-100 proteins
	Lysosomal membrane protein 2
	Protein DI-1

Résultats obtenus par analyses protéomiques. Tiré de (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010).

## ANNEXE 2

### INHIBITION DE L'ACTIVATION DES CELLULES T PAR LES HERVS



**Annexe 2 : L'expression des différentes protéines Env d'HERVs inhibent l'activation des cellules Jurkat (lymphocytes T).** Les cellules Jurkat ont été co-transfectées avec les vecteurs i) pNF- $\kappa$ B-Luc, ii) phCMV-ORF Syncytin-1 (S1), Syncytin-2 (S2), EnvP(b) ou EnvV (vs. le vecteur vide) et, iii) pRcActin-LacZ. Vingt-quatre heures post-transfection, les cellules ont été stimulées avec les agents PMA (20 ng/ml) et ionomycin (1 mM). Les mesures des différentes activités luciférases normalisées par l'activité  $\beta$ -galactosidase ont été réalisées en triplicata.

ANNEXE 3  
ARTICLE PUBLIÉ DANS LE JOURNAL *REPRODUCTIVES SCIENCES*  
(AVRIL 2012)

**A new luciferase-based quantitative assay for the evaluation of  
human trophoblast fusion**

**Amandine Vargas M.Sc., Émilie Larocque M.Sc., Chirine Toufaily M.Sc., Éric  
Rassart Ph.D., Julie Lafond Ph.D. and Benoit Barbeau Ph.D.\***

*Département des Sciences Biologiques and Centre de recherche BioMed, Université  
du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

E-MAIL address: [amandine.vargas@voila.fr](mailto:amandine.vargas@voila.fr); [larocque.emilie@courrier.uqam.ca](mailto:larocque.emilie@courrier.uqam.ca);  
[toufailychirine@hotmail.com](mailto:toufailychirine@hotmail.com); [rassart.eric@uqam.ca](mailto:rassart.eric@uqam.ca); [lafond.julie@uqam.ca](mailto:lafond.julie@uqam.ca)

\* Corresponding author. Mailing address

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

2080 St-Urbain, Room SB-3335

Montréal (Québec) Canada

H2X3X8

Tel: (514) 987-3000 ext. 4576

Fax: (514) 987-4647

## ABSTRACT

The syncytiotrophoblast is a multinuclear cell layer maintained through fusion events with cytotrophoblasts and plays a key role in the properties of the placenta. Monitoring fusion in this cell layer is important in studies aimed at understanding its function. We herein propose a new fusion assay based on the transactivating potential of the HIV-1 Tat protein on its promoter present in the LTR region. We used two BeWo cell populations, one stably transfected with the HIV-1 LTR positioned upstream of the luciferase gene and the other stably transfected with a Tat expression vector. Both stable cell lines were responsive to Tat-mediated LTR transactivation and demonstrated normal fusion and hCG secretion upon stimulation. When both BeWo cell lines were co-cultured, forskolin-mediated induction of fusion led to an increase in luciferase activity, which was sensitive to anti-Syncytin-1 and anti-Syncytin-2 antibodies and Syncytin-2 siRNAs. Similar results were obtained in primary trophoblasts. Our results highlight the effectiveness and accuracy of this new quantification assay for trophoblast fusion.

Keywords: cell fusion, human trophoblasts, Syncytin-1, Syncytin-2, luciferase, HIV-1 tat



## INTRODUCTION

The growth and development of the placenta, an auxiliary fetal organ present between the mother and the fetus, is a fundamental process that involves the differentiation and renewal of trophoblast cells. Cytotrophoblasts and the syncytiotrophoblast appear to be key players in placental development. Indeed, the syncytiotrophoblast layer results from the fusion of villous trophoblast cells and its renewal is constantly assured during pregnancy. The syncytiotrophoblast permits the exchange of nutrients and hormone between the mother and the fetus<sup>1</sup>. Syncytialisation, the fusion of cells into a multinuclear syncytium, is thereby a normal morphogenic feature of the formation of the syncytiotrophoblast layer. Syncytin-1 and Syncytin-2 are two envelope proteins derived from human endogenous retroviruses HERV-W and HERV-FRD, respectively, which play an important role in these cell fusion events<sup>2-5</sup>.

Many research groups have been studying this biological process trying to elucidate the fusion mechanism and the effect of numerous drugs on the fusogenic potential of trophoblasts *in vitro* (for review, see <sup>6,7</sup>). Indeed, a better understanding of the mechanistic regulation of trophoblast fusion is necessary to more closely determine the alteration of placenta development in the various associated disorders such as pre-eclampsia. Previous studies have used *in vitro* systems to study trophoblast differentiation and fusion. For example, human cytotrophoblasts can be isolated from placenta and are known to spontaneously fuse in cell culture. In addition, the human BeWo choriocarcinoma cell line can differentiate and form syncytia in the presence of forskolin induces adenylyl cyclase, which increase intracellular cAMP levels <sup>8-10</sup>. Over the years, research groups have developed methods to quantify fusion events, some of which are based on two-colour fluorescence assay or immunofluorescence using membrane-staining antibodies<sup>11-14</sup>. However, these methods are tedious and not always easily quantifiable.

In the present study, our objective was to develop a new quantitative assay to evaluate trophoblast fusion. Based on previous syncytium assays that we have developed for HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)<sup>15-17</sup>, we have made use of the powerful HIV-1 tat transactivator, which strongly upregulates viral gene expression through its interaction with the RNA hairpin structure known as the *trans*-activating response region (TAR) located in the long terminal repeat (LTR)<sup>18,19</sup>. Using an HIV-1 Tat-responsive luciferase reporter gene construct stably transfected into BeWo cells, we have developed a technique that enables us to quantify trophoblast fusion. Our results show that this quantitative method, which does not affect the integrity of trophoblastic cells, is specific and rapid. This new system should be a useful tool to greatly improve our comprehension of syncytiotrophoblast formation during the development of the placenta.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

The human BeWo choriocarcinoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and was maintained in Ham's F-12 medium (Invitrogen Canada Inc, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada) and 2mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Placentas from 35 to 41 weeks of gestation were obtained immediately after spontaneous vaginal delivery, in accordance with the established guidelines of the ethic committee of St- Luc Hospital of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (Montréal, Canada) and of the Université du Québec à Montréal (Montréal, Canada). Primary trophoblasts were isolated from human placentas of uncomplicated term pregnancy following a previously and adapted published protocol<sup>5,20</sup>. Briefly, placental villi were cut and thoroughly washed to remove blood. Thereafter, they were incubated four times in a digestion medium composed of Hanks' balanced salt solution containing trypsin (from  $9.6 \times 10^5$  to  $1.8 \times 10^6$  U per digestion) and DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis IN) (from 19 to 37.5mg per digestion) for 30 min at 37 °C in a water bath with continuous shaking. The dispersed cells were layered on top of a discontinuous 5–70% Percoll gradient and centrifuged for 25 min at 507g. The intermediate layers (density between 1.048 and 1.062) containing cytotrophoblast cells were removed and washed extensively, and cell viability was determined by trypan blue exclusion. Following trophoblast isolation, cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells per well in a 24-well plate, in complete culture medium, consisting of DMEM-HG, 2mM glutamine, 10% FBS and PSN (penicillin/streptomycin/neomycin) (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Canada). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was refreshed daily and trophoblasts were maintained for a maximum of 3 days in culture. The purity of each preparation of cytotrophoblasts was evaluated by flow cytometry using FITC (fluorescein

isothiocyanate)-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin-7, (Millipore, Mississauga, Canada), a specific marker of trophoblast cells. The experiment with isolated primary trophoblast cells were conducted in triplicate under normoxia conditions and repeated three times, in each case with a different placenta donor. Both BeWo cells and primary trophoblasts were regularly tested for mycoplasma contamination.

#### ***Generation of stable transfectants in BeWo cells***

Two stably transfected BeWo populations were generated, one harboring the HIV-1 LTR-driven luciferase vector, pLTRxLuc and the other carrying the Tat expression vector, pCMVTat. Briefly, BeWo cells ( $8 \times 10^5$  cells/well in a 6-well plate) were co-transfected with pLTRxLuc or pCMVTat (0.7 $\mu$ g) (kindly provided by Dr. O. Schwartz, Institut Pasteur, Paris, France) and ph $\beta$ Pr.1-neo (0.1 $\mu$ g) (generous gift from Dr. M. Najkamura, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan). Twelve hours after transfection, cells were selected in Ham's F-12 medium containing 400 $\mu$ g/ml G418 (Sigma-Aldrich) and the selective medium was renewed daily during a period of two weeks. Resistant BeWo cells were pooled and subsequently maintained in medium containing 300 $\mu$ g/ml G418.

#### ***Transient transfection of BeWo cells***

Stably transfected BeWo cells were plated at  $2 \times 10^5$ /well in a 24-well plate 24 h prior to transfection with the FuGENE 6 (Roche Diagnostics) reagent according to manufacturer's instructions. BeWo cells stably transfected with pLTRxLuc were transiently transfected with pCMVTat or the control vector phCMV1 (0.2 $\mu$ g) while BeWo cells stably transfected with pCMVTat were transiently transfected with pLTRxLuc or pGL3Basic (0.2 $\mu$ g). The pRcActin-LacZ vector was co-transfected for each condition and experiments were performed in triplicates (0.05 $\mu$ g). Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured 48 h post-transfection as previously

described<sup>5</sup>. Luciferase activity was calculated in terms of relative light units (RLU) and represents the mean  $\pm$  SD of three transfected samples. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t* test with StatGraphics. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

#### ***Co-culture experiments in BeWo cells and primary trophoblasts***

Both stable BeWo populations ( $2 \times 10^5$ ) were co-cultured at a 1:1 ratio or cultured individually for 24, 36 and 48 h in a 24-well plate. Cells were concomitantly stimulated or not with forskolin (50  $\mu$ M). In some experiments, after 16 h, cultured cells were subsequently transfected using Hiperfect reagent (Qiagen, Mississauga, Canada) with Syncytin-2 siRNA or a control siRNA as previously described<sup>5</sup>. In other experiments, after 24 h, cells were co-cultured in the presence or absence of anti-Syncytin-1 antibodies (0.2  $\mu$ g/ml) with or without the antibody-specific peptide (1  $\mu$ g/ml) (Santa Cruz, CA) or our polyclonal anti-Syncytin-2 antibodies (vs. a preimmune serum) (1/1000)<sup>5</sup>. Primary trophoblasts ( $1.5 \times 10^6$ ) were microporated with a MP-100 device (Digital Bio, Montreal, Qc) with either pLTRxLuc (0.4  $\mu$ g), phCMV1 (0.4  $\mu$ g) or pCMVTat (0.4  $\mu$ g) along with pRcActin-LacZ (0.1  $\mu$ g) for normalization. Transfected cells were next harvested with Accutase (1ml per 25cm<sup>2</sup> of surface area) and either co-cultured at a 1:1 ratio or cultured individually for 24 h. For all experiments, cultured or co-cultured cells were lysed and luciferase activity (after  $\beta$ -galactosidase normalization for primary trophoblasts) was assessed in the form of triplicates. Luciferase activity represents the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t* test with StatGraphics. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

#### ***Measurement of hCG concentration in cell supernatant***

Parental BeWo cells or the two stably transfected BeWo cell populations (cultured individually or mixed) were treated or not with forskolin (50  $\mu$ M).

Subsequently, supernatants were harvested 48 h post-stimulation, centrifuged at 2000g for 10 min for removal of debris and frozen at -20 °C until use. Concentrations of hCG were evaluated by ELISA following manufacturer's instructions (DRG Diagnostics, New Jersey, USA). Protein concentrations were quantified for each supernatant with the BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester NY) and used for normalization.

### ***Confocal microscopy***

Cultured and co-cultured cells ( $2 \times 10^5$  BeWo cells and  $1.5 \times 10^6$  primary trophoblasts in 24-well plates) were either left untreated or stimulated with 50  $\mu$ M forskolin up to 48 h. Cells were then fixed in methanol at -20°C for 30 min and incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 30 min to eliminate non-specific binding. Samples were next rinsed with PBS and incubated with a mouse monoclonal anti-desmoplakin antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, cat. no. D-1286; 1/700) in PBS containing 0.2% bovine serum albumin for 1½ h at room temperature, washed three times with PBS, and incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen ; 1/1000) for 1 h at room temperature. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (Sigma-Aldrich; PI; 50  $\mu$ g/ml) for an additional 30 min at room temperature, washed three times with PBS, and observed with a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, Hercules, CA). All observations were performed at a final magnification of 400X. A syncytium was defined as an agglomeration of two or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane staining. Cellular fusion index was determined as follows: three fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei in syncytia. In general, a total of 200 nuclei were counted per field and, thus, nearly 600 nuclei were counted in each well. Three replicate wells were examined per experimental condition from which a final cellular fusion index (mean  $\pm$  SEM) is presented and represents the final

average of the three percentage values. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's *t* test with StatGraphics. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

### ***RT-PCR analysis***

RNA was isolated from BeWo cells by the Rneasy<sup>(R)</sup> Plus mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. RNA (500ng) was incubated in the presence of 25ng/ $\mu$ l oligo dT, 10mM DTT, 100 $\mu$ M dNTP, SuperScript reverse transcriptase (10U) (Invitrogen Canada Inc) and SUPERase-In (20U) at 42°C for 50 min. Aliquots from the RT reactions were then amplified by PCR in the presence of 2U Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering Canada), 1X ThermoPol buffer, 100 $\mu$ M dNTP and 15 $\mu$ M of each primer. Primers used for Syncytin-2 cDNA amplification were 5'-CCACCAACATCCTTTCAA-3' (forward) and 5'-CGTGAGAATGAGAACCAG-3' (reverse), while those for  $\beta$ -actin were 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3' (forward) and 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTT-3' (reverse). PCR conditions were as followed: a first step of denaturation at 94°C for 4 min followed by 26 cycles of denaturation (94°C for 30 seconds), annealing (57°C for 30 seconds) and elongation (72°C for 20 seconds).

## RESULTS

### **Tat-dependent transactivation of the HIV-1 promoter in BeWo cells.**

Based on quantitative syncytium assays that we have previously published<sup>15,16</sup>, a similar assay was developed to quantify cell fusion of human trophoblasts. This system basically relies on the capacity of the HIV-1 Tat protein to transactivate the HIV-1 promoter through its TAR RNA region. Using a BeWo cell line expressing the Tat protein and another BeWo cell line containing the pLTRxLuc construct, we reasoned that luciferase activity should augment as more fusion events occur through simple diffusion of the Tat protein (Figure 1). We thereby initially generated both stable cell lines by co-transfection of a neo<sup>r</sup>-expressing vector. To validate the responsiveness of these pooled resistant clones, each population was transiently transfected with the reciprocal construct (Figure 2A). We were indeed able to demonstrate that both stable cell lines demonstrated an increase in luciferase activity when compared to cells transiently transfected with control vectors. Differences were noted in terms of responses of each stable cell population toward transfection of their reciprocal vector and could be accounted by the fact that Tat expression levels were more homogenous in stably transfected cells. The Tat-expressing stable cell line indicated the expected background luciferase activity level (0.5 RLU) and its values were thereby omitted in the presented results below. These results hence confirmed that both stable cell populations were successfully established and responsive to the Tat transactivator in the context of the HIV-1 LTR.

### **Induction of HIV LTR activity in co-culture conditions of both stably transfected BeWo cells.**

We next wanted to test whether increased cell fusion between both stable BeWo cell lines led to an increase in luciferase activity. To test this, BeWo cells stably transfected with pLTRxLuc were incubated with pCMVTat-transfected stable BeWo cells. Luciferase activity was measured at 24, 36 and 48 h of co-culture



conditions in the absence or absence of forskolin, an inducer of trophoblast fusion. Our results demonstrated that 48 h forskolin stimulation led to a maximal increase in luciferase activity. At this time point, luciferase activity in the absence of stimulation was  $1.45 \pm 0.31$ , while in the presence of forskolin, a 12.38 fold induction was observed (Figure 2B). Furthermore, the augmentation of luciferase activity at both 24 and 36 h were modest. The typical cell fusion assay using anti-desmoplakin antibodies and propidium iodide was tested in parallel on BeWo cells (Figure 2C and D). Interestingly, as we have previously noted, our cell fusion index was modestly increased at 24 h after stimulation in comparison to untreated cells while forskolin treatment led to a more important augmentation in cell fusion at 48 h. These results thereby paralleled the luciferase activity obtained above with the two stably transfected populations.

To determine that our stably transfected cells were behaving similarly to the parental BeWo cells, measurement of hCG levels were first conducted for the two populations either cultured individually or in co-culture conditions. Results demonstrated a normal hCG induction as compared to parental BeWo cells (Fig 3A). In addition, assessment of cell fusion by nucleus and desmoplakin staining was observed to be normally occurring for each population and in co-culture conditions as determined by confocal microscopy. Indeed, cell fusion was only noted upon forskolin treatment and was shown to be maximal at 48 h (Fig 3B and data not shown). In Fig 3C, a cell fusion index was determined for co-culture conditions and compared to the index of each cell population grown separately. No significant differences in fusion events between the different growth conditions were noted, thereby strongly suggesting that, in co-culture conditions, a BeWo cell will likely fuse to a similar extent with another cell from the same stably transfected population (homotypical fusion) or from the other population (heterotypical fusion).

These results hence demonstrated that, in our assay, luciferase activity was maximal at the same time point as for optimal cell fusion events, thereby suggesting that the increase in luciferase activity was mediated by cell fusion.

**Increased luciferase activity is blocked by anti-Syncytin-1 and anti-Syncytin-2 antibodies or specific siRNA.**

In order to determine that the increase in luciferase activity in our assay was dependent on cell fusion, the two stable BeWo cell populations were cultured individually or co-cultured in the absence or presence of forskolin with anti-Syncytin-1 or anti-Syncytin-2 antibodies (Fig 4A). Our former results had indeed indicated that both antibodies could specifically block fusion of stimulated BeWo cells. When either antibody was incubated in the presence of mixed BeWo cell populations, fold induction of luciferase activity upon forskolin treatment was severely hampered. A less pronounced inhibition was also noted in culture experiments of both stably transfected pools without stimulation. No significant effect was measured in pLTRxLuc-transfected cells cultured alone with or without stimulation. In addition, controls using a blocking peptide for anti-Syncytin-1 antibodies or a pre-immune serum for anti-Syncytin-2 antibodies were included in these experiments and showed no impact on cell fusion or luciferase activity (data not shown).

To further confirm that increased luciferase activity in stimulated co-cultured BeWo cells was dependent on fusion, a Syncytin-2-specific siRNA, which we have previously shown to be a strong inhibitor of BeWo cell fusion<sup>5</sup>, was transfected in our stably transfected populations. RT-PCR analyses confirmed the knockdown of Syncytin-2 expression in cells transfected with the Syncytin-2 siRNA (Fig. 4B). After 48 h of co-culture and stimulation, we found a decrease in the induction of luciferase activity upon transfection of the siRNA specific to Syncytin-2 in comparison to the non-specific siRNA (Fig 4C).

These results thereby confirmed that luciferase activity was increased following forskolin stimulation of co-cultured BeWo cells and that this increase was dependent on cell fusion.

### **Cell fusion assay in human primary trophoblasts.**

We next wanted to test our assay on human primary trophoblasts, which upon culture are known to spontaneously fuse. We thus transfected pLTRxLuc and pCMVTat individually in two different samples of freshly isolated human trophoblasts and co-cultured both transfected cell populations. Luciferase activity was measured when cellular fusion occurred, hence after 48 h and 72 h. Our results indicated a significant increase in luciferase activity at 48 h and an even more pronounced augmentation at 72 h post-transfection (Fig 5A). Analysis by confocal microscopy confirmed an important increase in cell fusion of these trophoblasts at both 48 and 72 h (Fig. 5B).

These results therefore underscored the potential use of our assay in primary human trophoblasts to measure cell fusion events.

## **DISCUSSION**

Current quantification methods of trophoblast fusion events depend on the use of immunomarkers and are counted by confocal microscopy. Although they are extensively used, these methods are often tedious and cell fusion events are not always easy to discern. Herein we propose a new luciferase-based method, which is specific and reproducible. Our luciferase system is based on the use of the HIV-1 promoter present in the pLTRxLuc construct and the strong HIV-1 transactivator Tat.

We first tested this luciferase-based approach in the BeWo cell line. This cell line remains the best cell line model to study fusion events typical of trophoblasts<sup>21-23</sup>. We have hence derived two different BeWo populations, one stably expressing the

Tat protein and the other stably transfected with the pLTRxLuc vector. Both populations provided an adequate cellular context for Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter, as determined by transient transfection. These results were not surprising since a previous study has indeed demonstrated that Tat induced HIV-1 LTR activity in different trophoblastic cell lines, including BeWo<sup>24</sup>. In addition, we importantly demonstrated that each BeWo population behaved similarly to the parental BeWo cell population in terms of cell fusion and differentiation marker such as hCG. This is an important issue as the viral Tat protein has been shown to modulate different cellular genes in infected cells.

We have next optimized conditions to obtain the most important induction of luciferase activity. The 1:1 ratio was optimal as we had similarly shown in other cell fusion assay<sup>15,16</sup>. Also, importantly, no increase in luciferase activity was noted when both cell populations were co-cultured in the absence of forskolin, thereby excluding the possibility that the Tat protein was mediating its effect following secretion and entry in pLTRxLuc-transfected BeWo cells. We have further confirmed this by testing supernatant of forskolin-stimulated Tat-expressing BeWo cells on BeWo cells stably transfected with pLTRxLuc and have not observed any significant modulation of LTR activity (data not shown). In addition, forskolin, which in itself can induce HIV-1 LTR activity, did not lead to an important induction of luciferase activity of pLTRxLuc-transfected BeWo cells.

The specificity of our assay was further confirmed by Syncytin-2-specific siRNA and Syncytin-1 and Syncytin-2 antibodies. In fact, the time-dependent increase in luciferase activity in co-cultured and stimulated populations was observed to be concomitant with the increase in cell fusion events occurring in stimulated parental BeWo cells as determined by the standard anti-desmoplakin/propidium iodide staining protocol. Our data therefore indicated that cell fusion is determinant in the upregulation of luciferase expression in this assay. These data demonstrate that different agents (siRNA, antibodies, and inhibitors) could be tested in our assay to determine their potential impact on trophoblast fusion. Indeed, using this assay,

preliminary results from our team confirmed that lactose blocks cell fusion as reported by others<sup>25</sup> (data not shown).

In the current study, we have further tested the potential use of our assay on cultured primary trophoblasts. Given the transient nature of these spontaneously fusing cells, which can be maintained no more than four days, cells were directly transfected after isolation as we have previously performed<sup>5</sup>. We have again measured a significant increase in luciferase activity upon co-culture of both transfected cell populations. In these experiments, transfection efficiency in primary trophoblasts was important (greater than 90%, as previously described<sup>5</sup>) and the modest luciferase activity in pLTRxLuc-transfected primary trophoblasts was likely due to low HIV-1 LTR activity in this cell setting. The use of our assay in primary trophoblasts will permit to assess the impact of particular proteins on cell fusion through co-transfection of expression vectors or siRNA.

Our time course experiments have revealed that luciferase upregulation is as sensitive as the typical cell fusion index measured by confocal microscopy through membrane and nuclear staining as demonstrated above, although the latter approach is more tedious<sup>12</sup>. Luciferase activity also does not require direct observation and identification of syncytia, which are not always conclusive. Cell fusion assays in which two population of trophoblasts are stained with different fluorescent dyes before being mixed have also been described previously<sup>11,13</sup>. These approaches resemble our assay but are based on confocal microscopy observations, which remain occasionally cumbersome in demonstrating two-color positive syncytia. It should however be stated that quantification by FACS analysis in this type of cell fusion assay has been tested<sup>13</sup>. As described above, our assay is also more amenable to the use of expression vectors through transient co-transfection experiments than these latter assays.

Our results thereby highlight the usefulness of our assay in quantifying trophoblast fusion in cell lines as well as in more physiologically relevant primary trophoblasts. Through our protocol, we are currently addressing the defective

potential of trophoblast fusion in preeclamptic placentas. Such studies will also be expanded in the evaluation of trophoblast fusion in other disorders potentially linked to placentation, such as Trisomy 21 and intrauterine growth retardation<sup>26,27</sup>.

## CONCLUSIONS

We have demonstrated that our simple assay, which is based on the strong transactivation potential of the HIV-1 tat protein, is a reliable alternative to current quantifying assays of trophoblast fusion. This system could be successfully used to rapidly quantify cellular fusion events in primary trophoblasts and will be an interesting tool to determine variation of trophoblast fusion in disorders such as preeclampsia.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. New quantification assay for cell fusion events in trophoblasts.**

BeWo cells are first stably transfected with a construct containing the luciferase reporter gene under the control of the HIV-1 LTR region (pLTRxLuc). A second population is stably transfected with an expression vector for the powerful HIV-1 LTR transactivator, Tat (pCMVTat). Upon cell fusion, the expressed Tat protein will be transferred to cells harboring the HIV-1 luciferase cassette and elicits an induction in luciferase activity proportional to the extent of cell fusion.

### **Figure 2. Induction of luciferase activity following co-culture of both stable BeWo populations.**

A. BeWo cells stably transfected with pLTRxLuc (Luc) were transiently transfected with pCMVTat (or the empty vector) while pCMVTat-stably transfected BeWo cells

(Tat) were transiently transfected with pLTRxLuc (or pGL3basic). The pRcActin-LacZ vector was co-transfected in each condition and experiments were performed in triplicates. Luciferase activity was measured at 48 h post-transfection and normalized for  $\beta$ -gal activity. **B.** The two stably transfected BeWo cell populations were cultured individually or co-cultured in the absence or presence of forskolin in triplicates. Luciferase activities were measured at different time points and are presented as the average values of triplicates. **C and D.** Fusion of BeWo cells in the presence or absence of forskolin. **C.** Parental BeWo cells were cultured for 24 and 48 h after stimulation with forskolin (50  $\mu$ M) and stained with an anti-desmoplakin antibody (green) and propidium iodide (nucleus: red). Stained trophoblast cells were visualised by confocal microscopy at a 400X magnification. **D.** Cellular fusion index was determined as follow: three fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei comprised in syncytia.

### **Figure 3. Differentiation and cell fusion of stable BeWo cell populations**

**A.** The two stably transfected BeWo cell populations were cultured individually (Tat and Luc) or co-cultured (Luc/Tat) in the absence or presence of forskolin in triplicates. The hormonal marker hCG was subsequently measured by an ELISA assay from harvested supernatant at day 2. Final concentration are presented after normalization from total protein content. **B.** The evaluation of cellular fusion was performed for each condition presented in A. Cytoplasmic membranes were stained using an anti-desmoplakin antibody and nuclei were revealed using propidium iodide. Slides were visualized through confocal microscopy at a 400X magnification. Scale bars are indicated for each image and are equal to 100  $\mu$ M. **C.** Cellular fusion index was determined as follow: three fields were counted per well and an average was calculated and expressed as the percentage number of nuclei comprised in syncytia.

**Figure 4. Cell fusion-dependent increase in luciferase activity is specific.**

**A** The two stably transfected BeWo cell populations were cultured individually (Tat and Luc) or co-cultured (Luc/Tat) in the absence or presence of forskolin and anti-Syncytin-1 or anti-Syncytin-2 antibodies in triplicates. Luciferase activity was measured after a total of 48 h. **B** After 16 h of forskolin treatment, both stably transfected BeWo cell populations were transfected with Syncytin-2-specific siRNAs or control siRNAs and co-cultured after 16 h. Syncytin-2 expression level was evaluated by RT-PCR after 36 h of stimulation. **C** Luciferase activity was measured after a total of 36 h of stimulation (50 $\mu$ M forskolin) from siRNA-transfected BeWo cell populations in co-culture conditions.

**Figure 5. Cell fusion-dependent increase in luciferase activity is observed in primary trophoblasts.**

**A** Freshly isolated human trophoblasts were microporated with either pLTRxLuc or pCMVTat and plated for 24 h. Each transfected cell populations were next harvested with Accutase and replated at a 1:1 ratio (Tat/Luc) or alone (Luc). Luciferase activity was measured at day 2 and 3 after onset of co-culture. **B** The state of cellular fusion was observed at 48 and 72 h. Cytoplasmic membranes were stained using an anti-desmoplakin antibody and nuclei were revealed using propidium iodide. Slides were visualized through confocal microscopy at a 400X magnification.



## FIGURES

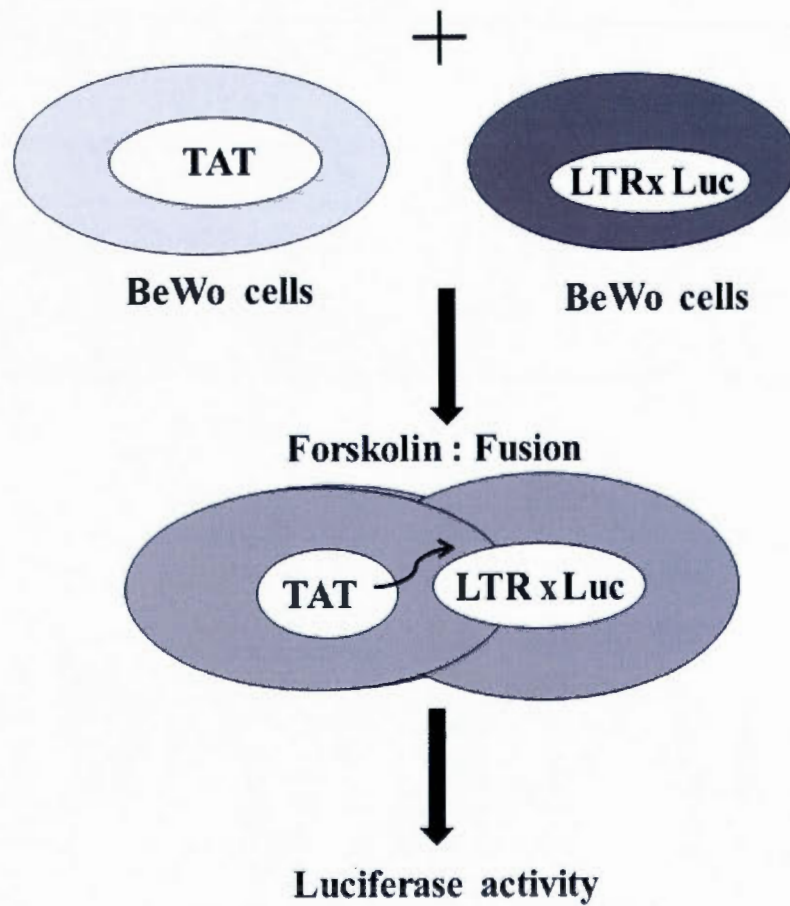
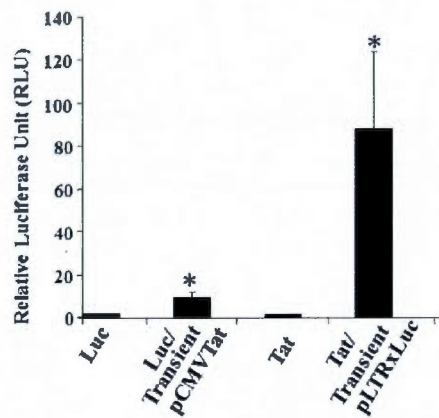
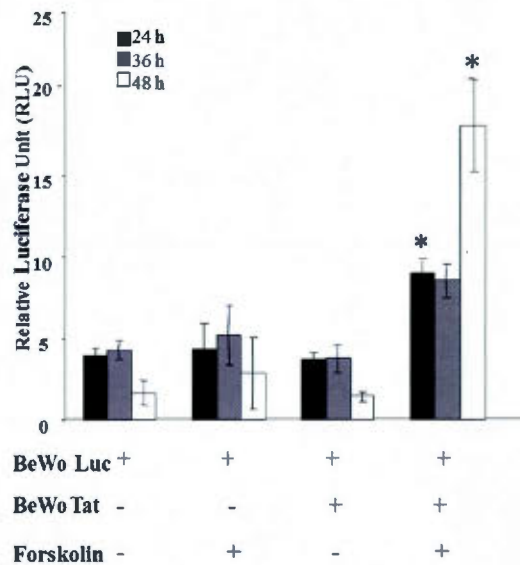


Figure 1: New quantification assay for cell fusion events in trophoblasts.

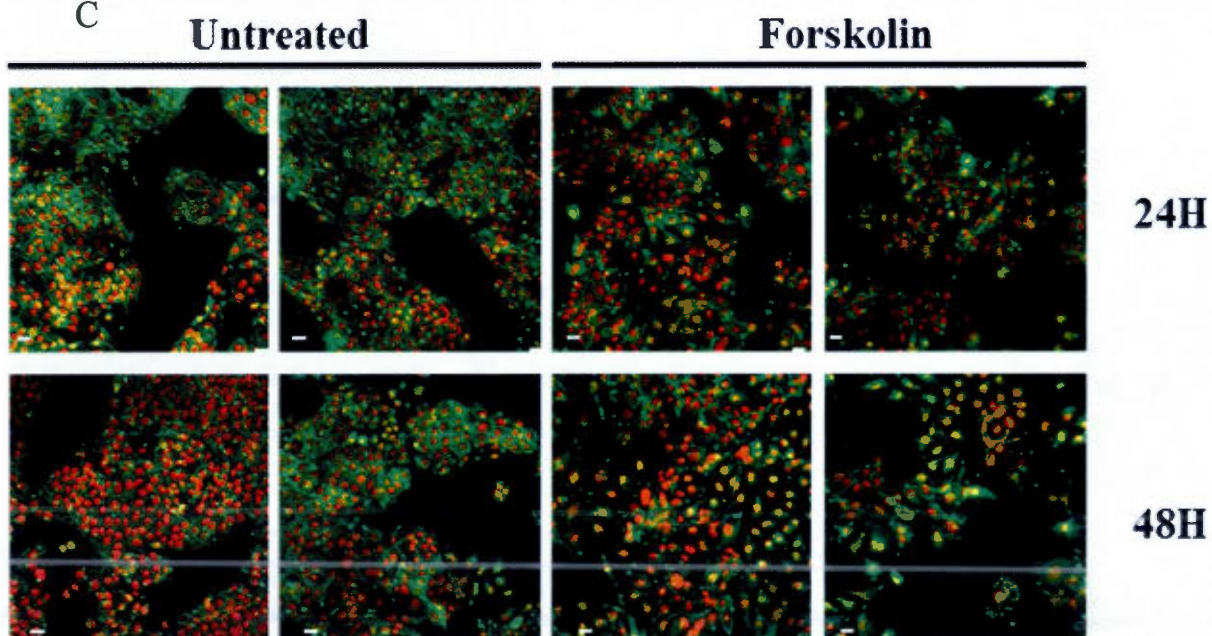
A

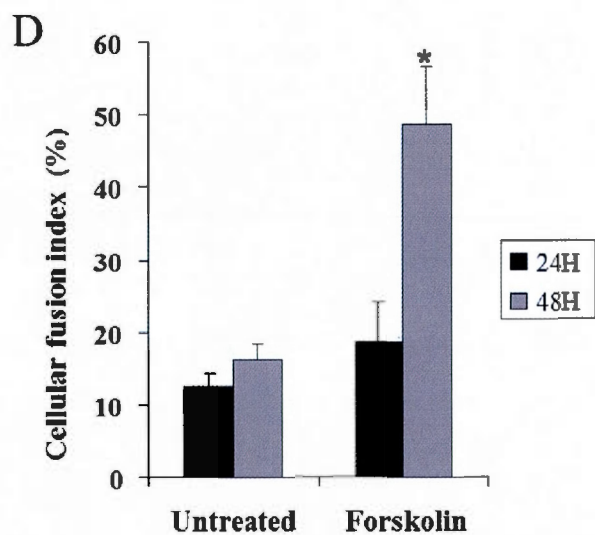


B



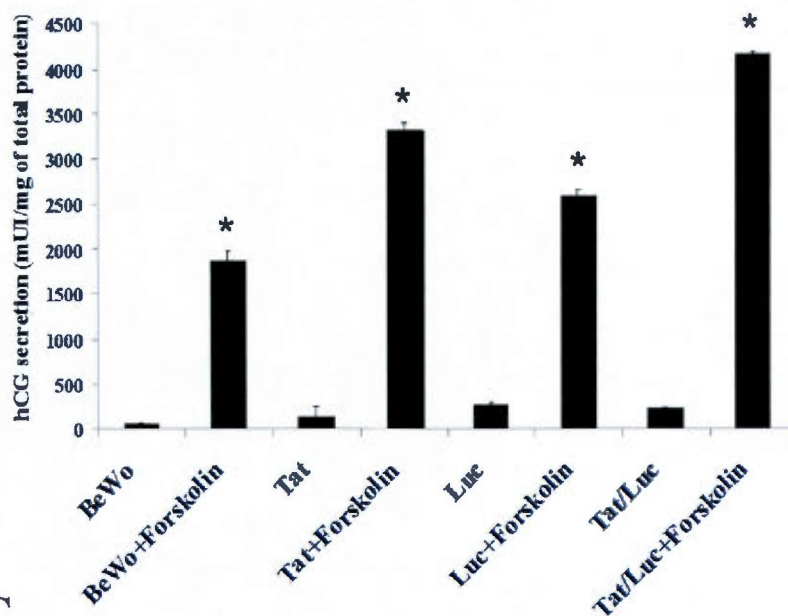
C



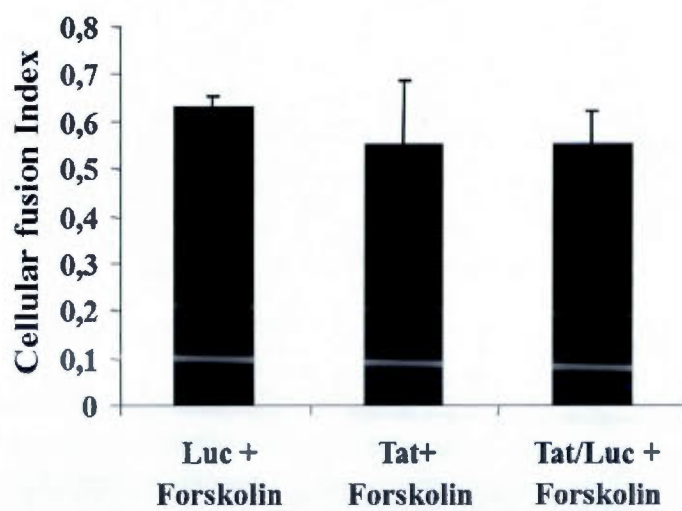


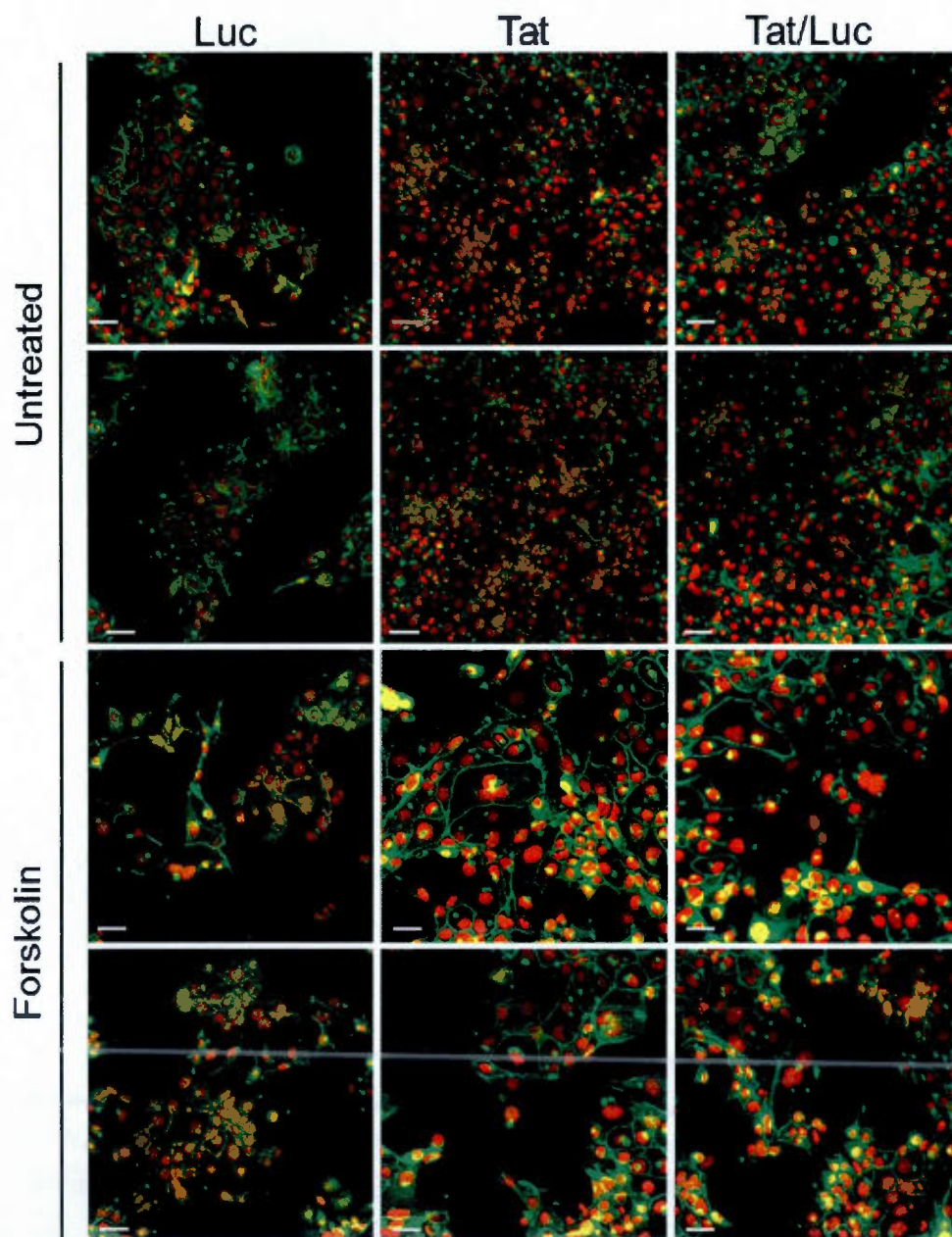
**Figure 2: Induction of luciferase activity following co-culture of both stable BeWo populations**

A

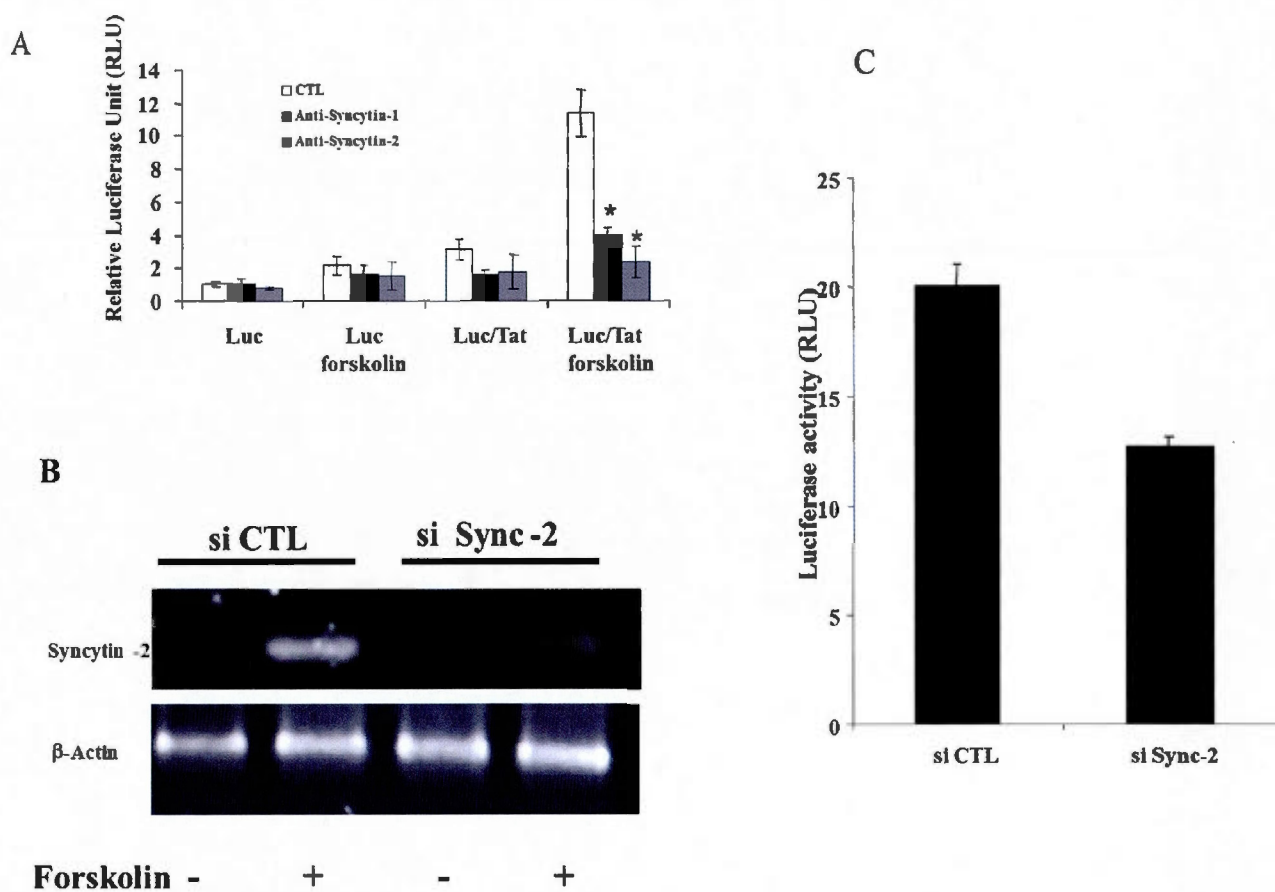


C



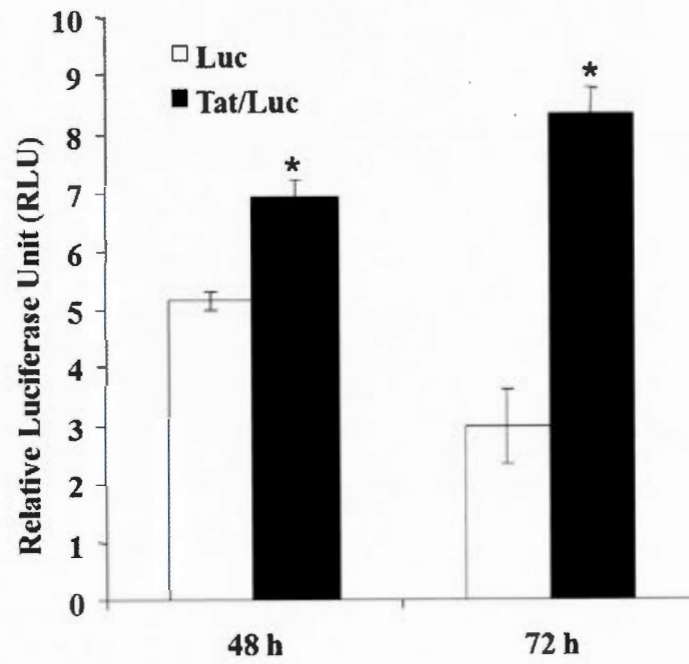
**B**

**Figure 3: Differentiation and cell fusion of stable BeWo cell populations**

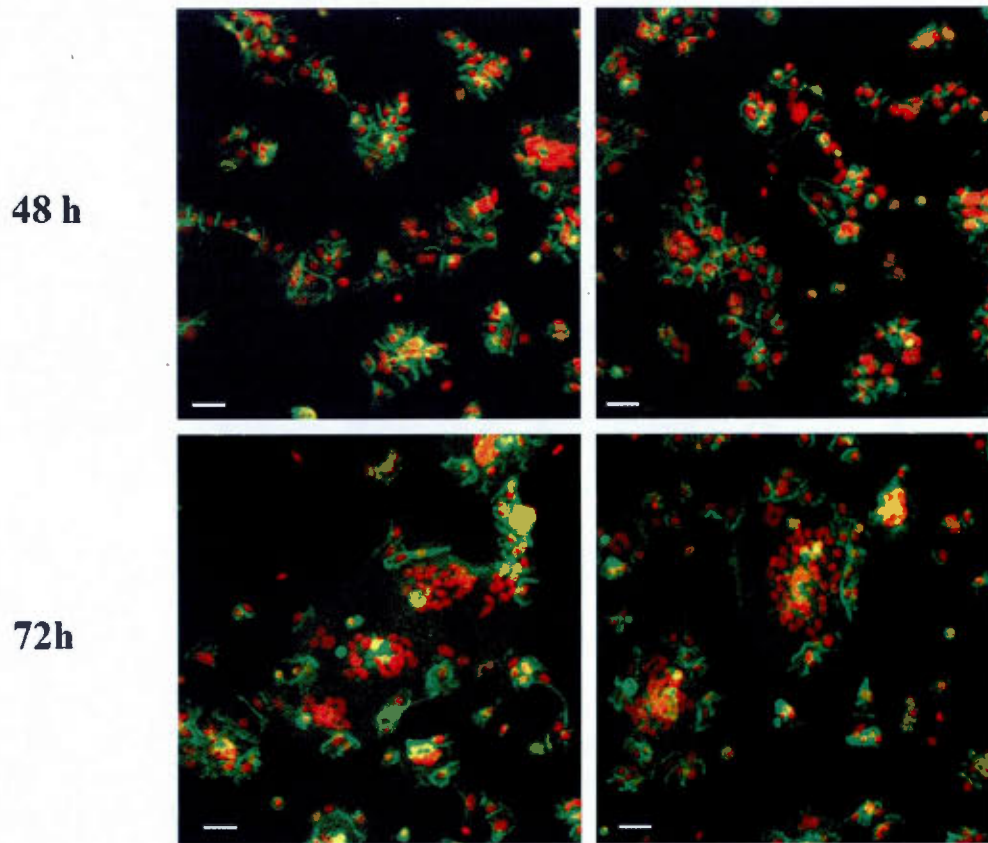


**Figure 4: Cell fusion-dependent increase in luciferase activity is specific**

A



B



**Figure 5: Cell fusion-dependent increase in luciferase activity is observed in primary trophoblasts**



## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant # 298527-07) (BB). AV was supported by a NSERC PhD scholarship. BB holds a Canada Research Chair in Human Retrovirology (Tier 2).

## REFERENCES

1. Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. Edited by Verlag S. New York; 2000
2. Mi S, Lee X, Li X et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000, 403:785-789.
3. Frendo JL, Olivier D, Cheynet V et al. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003, 23:3566-3574.
4. Blond JL, Lavillette D, Cheynet V et al. 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* 2000, 74:3321-3329.
5. Vargas A, Moreau J, Landry S et al. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol* 2009, 392:301-318.
6. Huppertz B, Bartz C, Kokozidou M. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* 2006, 37:509-517.
7. Aplin JD, Straszewski-Chavez SL, Kalionis B et al. Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration -- a workshop report. *Placenta* 2006, 27 Suppl A:S141-143.

8. Taylor RN, Newman ED, Chen SA. Forskolin and methotrexate induce an intermediate trophoblast phenotype in cultured human choriocarcinoma cells. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 164:204-210.
9. Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz AL. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res* 1990, 186:306-316.
10. Lyden TW, Ng AK, Rote NS. Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* 1993, 14:177-186.
11. Borges M, Bose P, Frank HG, Kaufmann P, Potgens AJ. A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 2003, 24:959-964.
12. Mounier C, Barbeau B, Vaillancourt C, Lafond J. Endocrinology and cell signaling in human villous trophoblast. *Methods Mol Biol* 2009, 550:89-102.
13. Kudo Y, Boyd CA, Kimura H, Cook PR, Redman CW, Sargent IL. Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1640:25-31.
14. Fischer I, Redel S, Hofmann S et al. Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta*, 31:825-832.
15. Barbeau B, Fortin J-F, Genois N, Tremblay MJ. Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay. *J Virol* 1998, 72:7125-7136.
16. Paré M-È, Gauthier S, Sun JF et al. A new sensitive and quantitative HTLV-I-mediated cell fusion assay in T cells. *Virology* 2005, 338:309-322.
17. Sun J, Barbeau B, Tremblay MJ. HIV-1-mediated syncytium formation promotes cell-to-cell transfer of Tax protein and HTLV-I gene expression. *Virus Res* 2006, 118:120-129.

18. Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Baynor RB. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *Embo J* 1989, 8:765-778.
19. Cullen BR. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 1986, 46:973-982.
20. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3<sup>rd</sup>. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986, 118:1567-1582.
21. Vargas A, Moreau J, Le Bellego F, Lafond J, Barbeau B. Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Placenta* 2008, 29:170-174.
22. Benveniste R, Scommegna A. Human chorionic gonadotrophin (HCG) and free alpha subunit secreted by cultured human choriocarcinoma (JEG-3) cells. *Placenta Suppl* 1981, 3:241-250.
23. Bergemann C, Reimer T, Muller H et al. Stimulation of hCG protein and mRNA levels in trophoblast tumour cells Jeg3 and BeWo by glycodelin A. *Anticancer Res* 2003, 23:1107-1113.
24. Zachar V, Ebbesen P, Thomas RA, Zacharova V, Goustin AS. Basal and Tat-transactivated expression from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human placental trophoblast rules out promoter-enhancer activation as the partial block to viral replication. *J Gen Virol* 1994, 75 ( Pt 6):1461-1468.
25. Dalton P, Christian HC, Redman CW, Sargent IL, Boyd CA. Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells--implication for placental cell fusion. *FEBS J* 2007, 274:2715-2727.

26. Langbein M, Strick R, Strissel PL et al. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev* 2008, 75:175-183.
27. Malassine A, Frenzo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003, 9:531-539.

## RÉFÉRENCES

- [\[http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/help.php%5D](http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/help.php%5D). Gene Promoter Miner.
- Aagaard, L., Villesen, P., Kjeldbjerg, A.L., Pedersen, F.S., 2005. The approximately 30-million-year-old ERVPb1 envelope gene is evolutionarily conserved among hominoids and Old World monkeys. *Genomics* 86, 685-691.
- Abrahams, V.M., Straszewski-Chavez, S.L., Guller, S., Mor, G., 2004. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Molecular human reproduction* 10, 55-63.
- Acién, P., Lloret, G., Lloret, M., 1990. Perinatal morbidity and mortality in pregnancy hypertensive disorders: prognostic value of the clinical and laboratory findings. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 32, 229-235.
- Ahmed, A., Singh, J., Khan, Y., Seshan, S.V., Girardi, G., 2010. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PloS one* 5, e13663.
- Ahn, K., Kim, H.S., 2009. Structural and quantitative expression analyses of HERV gene family in human tissues. *Molecules and cells* 28, 99-103.
- Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R., 2006. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 21, 193-201.
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., Dimier-Poisson, I., 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and immunity* 72, 4127-4137.
- Alsat, E., Wyplosz, P., Malassine, A., Guibourdenche, J., Porquet, D., Nessmann, C., Evain-Brion, D., 1996. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *Journal of cellular physiology* 168, 346-353.
- Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Honing, S., Jahn, R., 2000. The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Molecular biology of the cell* 11, 3289-3298.
- Antony, J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D.A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren, K., Power, C., 2004. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7, 1088-1095.
- Apodaca, G., 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2, 149-159.
- Armbruster, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K., Mueller-Lantsch, N., 2002. A novel gene from the human

- endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* 8, 1800-1807.
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I.M., Skupski, D., Witkin, S.S., 2008. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of reproductive immunology* 79, 12-17.
- Atay, S., Gercel-Taylor, C., Kesimer, M., Taylor, D.D., 2011a. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Experimental cell research* 317, 1192-1202.
- Atay, S., Gercel-Taylor, C., Suttles, J., Mor, G., Taylor, D.D., 2010. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *Am J Reprod Immunol* 65, 65-77.
- Atay, S., Gercel-Taylor, C., Taylor, D.D., 2011b. Human trophoblast-derived exosomal fibronectin induces pro-inflammatory IL-1beta production by macrophages. *Am J Reprod Immunol* 66, 259-269.
- Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M.Z., 2002. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Experimental hematology* 30, 450-459.
- Bang, C., Thum, T., 2012. Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 2060-2064.
- Bannert, N., Kurth, R., 2004. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14572-14579.
- Belting, M., Wittrup, A., 2008. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *The Journal of cell biology* 183, 1187-1191.
- Benit, L., Dessen, P., Heidmann, T., 2001. Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol* 75, 11709-11719.
- Bette-Bobillo, P., Vidal, M., 1995. Characterization of phospholipase A2 activity in reticulocyte endocytic vesicles. *European journal of biochemistry / FEBS* 228, 199-205.
- Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L., Heidmann, T., 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13013-13018.
- Blaise, S., de Parseval, N., Heidmann, T., 2005a. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology* 2, 19.
- Blaise, S., de Parseval, N., Heidmann, T., 2005b. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology* 2, 19-22.

- Blaise, S., Ruggieri, A., Dewannieux, M., Cosset, F.L., 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. *Journal of virology* 78, 1050-1054.
- Blanc, L., Vidal, M., 2010. Reticulocyte membrane remodeling: contribution of the exosome pathway. *Current opinion in hematology* 17, 177-183.
- Blond, J.-L., Besème, F., Duret, L., Bouton, O., Bedin, F., Perron, H., Mandrand, B., Mallet, F., 1999a. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J. Virol.* 73, 1175-1185.
- Blond, J.L., Beseme, F., Duret, L., Bouton, O., Bedin, F., Perron, H., Mandrand, B., 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., 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. *Journal of virology* 74, 3321-3329.
- Boeke, J.D., Stoye, J.P., 1997. Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements, in: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (Eds.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
- Boller, K., Frank, H., Lower, J., Lower, R., Kurth, R., 1983. Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* 64 ( Pt 12), 2549-2559.
- Bonifacino, J.S., Lippincott-Schwartz, J., 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 409-414.
- Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J.L., Muriaux, D., Este, J.A., 2008. A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* 80, 185-193.
- Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M.C., Calogero, R.A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., Tetta, C., Camussi, G., 2009. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20, 1053-1067.
- Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C., 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology* 17, 879-887.
- Cantin, R., Diou, J., Belanger, D., Tremblay, A.M., Gilbert, C., 2008. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *Journal of immunological methods* 338, 21-30.
- Castellucci, M., Kosanke, G., Verdenelli, F., Huppertz, B., Kaufmann, P., 2000. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 6, 485-494.
- Chaiworapongsa, T., Romero, R., Espinoza, J., Bujold, E., Mee Kim, Y., Goncalves, L.F., Gomez, R., Edwin, S., 2004. Evidence supporting a role for

- blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award. American journal of obstetrics and gynecology 190, 1541-1547; discussion 1547-1550.
- Chang, C., Chen, P.T., Chang, G.D., Huang, C.J., Chen, H., 2004. Functional Characterization of the Placental Fusogenic Membrane Protein Syncytin. *Biology of reproduction*.
- Chaput, N., Taieb, J., Scharz, N.E., Andre, F., Angevin, E., Zitvogel, L., 2004. Exosome-based immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 53, 234-239.
- Chen, C.P., Chen, L.F., Yang, S.R., Chen, C.Y., Ko, C.C., Chang, G.D., Chen, H., 2008. Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biology of reproduction* 79, 815-823.
- Chen, C.P., Wang, K.G., Chen, C.Y., Yu, C., Chuang, H.C., Chen, H., 2006. Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 113, 152-158.
- Chen, H.R., Barker, W.C., 1984. Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions. *Nucleic Acids Res* 12, 1767-1778.
- Chen, Y., Huang, Y., Jiang, R., Teng, Y., 2012. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*.
- Cheyne, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J.L., Boson, B., Vachot, L., Verrier, B., Cosset, F.L., Mallet, F., 2005. Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *Journal of virology* 79, 5585-5593.
- Chu, J.J., Ng, M.L., 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of virology* 78, 10543-10555.
- 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., Ferrante, P., 1999. Immune responses to antigens of human endogenous retroviruses in patients with acute or stable multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 99, 173-182.
- Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J., 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19, 43-51.
- Colbern, G.T., Main, E.K., 1991. Immunology of the maternal-placental interface in normal pregnancy. *Seminars in perinatology* 15, 196-205.
- Costas, J., 2002. Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol Biol Evol* 19, 526-533.
- Couzin, J., 2005. Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* 308, 1862-1863.
- Cronier, L., Bastide, B., Defamie, N., Nigier, C., Pointis, G., Gasc, J.M., Malassine, A., 2001. Involvement of gap junctional communication and connexin



expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histology and histopathology* 16, 285-295.

Daoud, G., Rassart, E., Masse, A., Lafond, J., 2006. Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta. *J Physiol* 571, 537-553.

Daoud, G., Simoneau, L., Masse, A., Rassart, E., Lafond, J., 2005. Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1687, 181-194.

Darlix, J.L., 1986. Control of Rous sarcoma virus RNA translation and packaging by the 5' and 3' untranslated sequences. *J Mol Biol* 189, 421-434.

De Camilli, P., Takei, K., McPherson, P.S., 1995. The function of dynamin in endocytosis. *Current opinion in neurobiology* 5, 559-565.

De Groote, G., De Waele, P., Van de Voorde, A., De Broe, M., Fiers, W., 1983. Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. *Clin Chem* 29, 115-119.

de Parseval, N., Heidmann, T., 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenetic and genome research* 110, 318-332.

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

Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., Camussi, G., 2007. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440-2448.

Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G., Heidmann, T., 2006. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res* 16, 1548-1556.

Dhar, R., McClements, W.L., Enquist, L.W., 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, 3937-3941.

Dupressoir, A., Heidmann, T., 2011. [Syncytins - retroviral envelope genes captured for the benefit of placental development]. *Med Sci (Paris)* 27, 163-169.

Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Benit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V., Heidmann, T., 2005. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 725-730.

Ejiri, S., 1983. The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Archivum histologicum Japonicum. Nippon soshikigaku kiroku* 46, 533-557.

- Erices, R., Corthorn, J., Lisboa, F., Valdes, G., 2011. Bradykinin promotes migration and invasion of human immortalized trophoblasts. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 9, 97.
- Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., Andre, F., Caby, M.P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., Boccaccio, C., Bonnerot, C., Dhellin, O., Movassagh, M., Piperno, S., Robert, C., Serra, V., Valente, N., Le Pecq, J.B., Spatz, A., Lantz, O., Tursz, T., Angevin, E., Zitvogel, L., 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine* 3, 10.
- Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Vernochet, C., Bruls, T., Lavialle, C., Weissenbach, J., Heidmann, T., 2008. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17532-17537.
- Fackler, O.T., Peterlin, B.M., 2000. Endocytic entry of HIV-1. *Current biology : CB* 10, 1005-1008.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., Gould, S.J., 2007. Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS biology* 5, e158.
- Ferguson, S.M., De Camilli, P., 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 75-88.
- Feschotte, C., Gilbert, C., 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nature reviews. Genetics* 13, 283-296.
- Fevrier, B., Raposo, G., 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology* 16, 415-421.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., Raposo, G., 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9683-9688.
- Fleissner, F., Goerzig, Y., Haverich, A., Thum, T., Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 289-297.
- Frangmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., Mincheva-Nilsson, L., 2005. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Molecular human reproduction* 11, 35-41.
- Freimanis, G., Hooley, P., Ejtehadi, H.D., Ali, H.A., Veitch, A., Rylance, P.B., Alawi, A., Axford, J., Nevill, A., Murray, P.G., Nelson, P.N., 2010. A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clinical and experimental immunology* 160, 340-347.

- Frendo, J.L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., Mallet, F., 2003. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 3566-3574.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C.Z., Mukhopadhyay, A., Stahl, P.D., 1997. Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 16147-16151.
- Gardiner, C., Tannetta, D.S., Simms, C.A., Harrison, P., Redman, C.W., Sargent, I.L., 2011. Syncytiotrophoblast microvesicles released from pre-eclampsia placenta exhibit increased tissue factor activity. *PloS one* 6, e26313.
- Genbacev, O., Jensen, K.D., Powlin, S.S., Miller, R.K., 1993. In vitro differentiation and ultrastructure of human extravillous trophoblast (EVT) cells. *Placenta* 14, 463-475.
- Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C.H., Polliotti, B.M., Fisher, S.J., 1996. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 97, 540-550.
- Goswami, D., Tannetta, D.S., Magee, L.A., Fuchisawa, A., Redman, C.W., Sargent, I.L., von Dadelszen, P., 2006. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 27, 56-61.
- Griffiths, D.J., 2001. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome biology* 2, REVIEWS1017.
- Haseltine, W.A., Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 989-993.
- Hayward, M.D., Potgens, A.J., Drewlo, S., Kaufmann, P., Rasko, J.E., 2007. Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta. *Pathology* 39, 406-412.
- Hedlund, M., Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., 2009. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 183, 340-351.
- Heidmann, O., Vernochet, C., Dupressoir, A., Heidmann, T., 2009. Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology* 6, 107.
- Hemler, M.E., 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 397-422.
- Hertig, A., Berkane, N., Lefevre, G., Toumi, K., Marti, H.P., Capeau, J., Uzan, S., Rondeau, E., 2004. Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem* 50, 1702-1703.

- Holder, B.S., Tower, C.L., Abrahams, V.M., Aplin, J.D., 2012a. Syncytin 1 in the human placenta. *Placenta* 33, 460-466.
- Holder, B.S., Tower, C.L., Forbes, K., Mulla, M.J., Aplin, J.D., Abrahams, V.M., 2012b. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology* 136, 184-191.
- Horsley, V., Pavlath, G.K., 2004. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells, tissues, organs* 176, 67-78.
- Huppertz, B., Bartz, C., Kokozidou, M., 2006. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* 37, 509-517.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borrás, F.E., Blanco, J., Martínez-Picado, J., 2010. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS pathogens* 6, e1000740.
- Izquierdo-Useros, N., Puertas, M.C., Borrás, F.E., Blanco, J., Martínez-Picado, J., 2011. Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg? *Cell Microbiol* 13, 10-17.
- John, R., Hemberger, M., 2012. A placenta for life. *Reproductive biomedicine online* 25, 5-11.
- Johnson, L.S., Dunn, K.W., Pytowski, B., McGraw, T.E., 1993. Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Molecular biology of the cell* 4, 1251-1266.
- Johnstone, R.M., 1992. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 70, 179-190.
- Johnstone, R.M., 2006. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood cells, molecules & diseases* 36, 315-321.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry* 262, 9412-9420.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Pan, B.T., 1984. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* 62, 1246-1254.
- Johnstone, R.M., Ahn, J., 1990. A common mechanism may be involved in the selective loss of plasma membrane functions during reticulocyte maturation. *Biomedica biochimica acta* 49, S70-75.
- Johnstone, R.M., Bianchini, A., Teng, K., 1989. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* 74, 1844-1851.

- Jordan, I.K., Rogozin, I.B., Glazko, G.V., Koonin, E.V., 2003. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends in genetics : TIG* 19, 68-72.
- Kaaja, R.J., Greer, I.A., 2005. Manifestations of chronic disease during pregnancy. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 294, 2751-2757.
- Kageyama, R., Hirata, H., Hatakeyama, J., 2003. Retroviral vectors for gene delivery to neural precursor cells. *International review of neurobiology* 55, 123-147.
- Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., Telemo, E., 2001. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *European journal of immunology* 31, 2892-2900.
- Kaufmann, P., Stegner, H.E., 1972. [Functional differentiation of the human placental syncytiotrophoblast]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 135, 361-382.
- Keith, J.C., Jr., Pijnenborg, R., Van Assche, F.A., 2002. Placental syncytin expression in normal and preeclamptic pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* 187, 1122-1123; author reply 1123-1124.
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., 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, 18657-18661.
- Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., Hager, H.D., Abdel-Bakky, M.S., Gutwein, P., Altevogt, P., 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney international* 72, 1095-1102.
- Kim, H.S., Yi, J.M., Jeon, S.H., 2001. Isolation and phylogenetic analysis of HERV-K long terminal repeat cDNA in cancer cells. *AIDS research and human retroviruses* 17, 987-990.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., Whiteside, T.L., 2005a. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11, 1010-1020.
- Kim, S.H., Bianco, N., Menon, R., Lechman, E.R., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., Robbins, P.D., 2006. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 289-300.
- Kim, S.H., Lechman, E.R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., Mi, Z., Watkins, S.C., Gambotto, A., Robbins, P.D., 2005b. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 174, 6440-6448.
- Kingdom, J., Huppertz, B., Seaward, G., Kaufmann, P., 2000. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92, 35-43.

- Kjeldbjerg, A.L., Villesen, P., Aagaard, L., Pedersen, F.S., 2008a. Gene conversion and purifying selection of a placenta-specific ERV-V envelope gene during simian evolution. *BMC Evol Biol* 8, 266-276.
- Kjeldbjerg, A.L., Villesen, P., Aagaard, L., Pedersen, F.S., 2008b. Gene conversion and purifying selection of a placenta-specific ERV-V envelope gene during simian evolution. *BMC evolutionary biology* 8, 266.
- Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A.Y., Ossendorp, F., Melief, C.J., Stoorvogel, W., Geuze, H.J., 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *The Journal of cell biology* 155, 53-63.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss, J.F., 3rd, 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118, 1567-1582.
- Knerr, I., Beinder, E., Rascher, W., 2002. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 186, 210-213.
- Knerr, I., Huppertz, B., Weigel, C., Dotsch, J., Wich, C., Schild, R.L., Beckmann, M.W., Rascher, W., 2004. Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Molecular human reproduction* 10, 581-588.
- Knight, M., Redman, C.W., Linton, E.A., Sargent, I.L., 1998. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *British journal of obstetrics and gynaecology* 105, 632-640.
- Kudaka, W., Oda, T., Jinno, Y., Yoshimi, N., Aoki, Y., 2008. Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension. *Placenta* 29, 282-289.
- Kudo, Y., 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, 536-541.
- Kudo, Y., Boyd, C.A., Sargent, I.L., 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. *Biochimica et biophysica acta* 1638, 63-71.
- Kumpel, B.M., Manoussaka, M.S., 2012. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox sanguinis* 102, 2-12.
- Kurth, R., 1986. Endogenous retrovirus in multiple sclerosis? *Nature* 320, 219-220.
- Kurzchalia, T.V., Parton, R.G., 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Current opinion in cell biology* 11, 424-431.

- Lakadamyali, M., Rust, M.J., Babcock, H.P., Zhuang, X., 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9280-9285.
- Lakkaraju, A., Rodriguez-Boulan, E., 2008. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 18, 199-209.
- Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Kochert, K., Bouhrel, M.A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Johrens, K., Wurster, K.D., Callen, D.F., Harte, M.F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P.N., Siebert, R., Dorken, B., Bonifer, C., Mathas, S., 2010. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nature medicine* 16, 571-579, 571p following 579.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman,

- A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Landry, J.R., Rouhi, A., Medstrand, P., Mager, D.L., 2002. The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol Biol Evol* 19, 1934-1942.
- Langbein, M., Strick, R., Strissel, P.L., Vogt, N., Parsch, H., Beckmann, M.W., Schild, R.L., 2008. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev* 75, 175-183.
- Larsson, E., Andersson, G., 1998. Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scand. J. Immunol.* 48, 329-338.
- Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B., Record, M., 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS letters* 572, 11-14.
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F.L., Kabat, D., 2002. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *Journal of virology* 76, 6442-6452.
- Lavillette, D., Maurice, M., Roche, C., Russell, S.J., Sitbon, M., 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, 9955-9965.
- Lawrence, B.P., Brown, W.J., 1992. Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal of cell science* 102 ( Pt 3), 515-526.
- Lee, X., Keith, J.C., Jr., Stumm, N., Moutsatsos, I., McCoy, J.M., Crum, C.P., Genest, D., Chin, D., Ehrenfels, C., Pijnenborg, R., van Assche, F.A., Mi, S., 2001. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 808-812.
- Lefranc, D., Dubucquoi, S., Almeras, L., De Seze, J., Tourvieille, B., Dussart, P., Aubert, J.P., Vermersch, P., 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, 437-444.
- Levine, R.J., Qian, C., Maynard, S.E., Yu, K.F., Epstein, F.H., Karumanchi, S.A., 2006. Serum sFlt1 concentration during preeclampsia and mid trimester blood pressure in healthy nulliparous women. *American journal of obstetrics and gynecology* 194, 1034-1041.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes & development* 12, 3663-3674.
- Lin, H.H., Huang, L.F., Su, H.C., Jeng, S.T., 2009. Effects of the multiple polyadenylation signal AAUAAA on mRNA 3'-end formation and gene expression. *Planta* 230, 699-712.
- Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R., 1996. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 5177-5184.
- Luo, S.S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., 2009. Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes. *Biology of reproduction*.
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., Piper, R.C., 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of cell science* 113 ( Pt 9), 1515-1524.
- Lyden, T.W., Ng, A.K., Rote, N.S., 1993. Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* 14, 177-186.
- Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D., 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., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Gerbaud, P., Cheynet, V., Oriol, G., Mallet, F., Evain-Brion, D., 2005. Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta* 26, 556-562.
- Mangeney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Heidmann, T., 2007a. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20534-20539.
- Mangeney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Heidmann, T., 2007b. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of

- retroviral envelope proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20534-20539.
- Marguerat, S., Wang, W.Y., Todd, J.A., Conrad, B., 2004. Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 852-854.
- Marin, M., Lavillette, D., Kelly, S.M., 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. *Journal of virology* 77, 2936-2945.
- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T.S., Houghton, M., Pileri, P., Abrignani, S., 2004. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European journal of immunology* 34, 2834-2842.
- Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73, 1907-1920.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F., Gruenberg, J., 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531-534.
- Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Muller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K.D., Meese, E., 2004. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* 322, 190-198.
- Mayhew, T.M., 2008. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 29, 1-14.
- Maynard, S., Epstein, F.H., Karumanchi, S.A., 2008. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 59, 61-78.
- Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J., Lim, K.H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., Epstein, F.H., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 111, 649-658.
- Mayor, S., Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 603-612.
- McKeeman, G.C., Ardill, J.E., Caldwell, C.M., Hunter, A.J., McClure, N., 2004. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 1240-1246.
- Mears, R., Craven, R.A., Hanrahan, S., Totty, N., Upton, C., Young, S.L., Patel, P., Selby, P.J., Banks, R.E., 2004. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 4019-4031.

- Medstrand, P., Landry, J.R., 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, 1896-1903.
- Messerli, M., May, K., Hansson, S.R., Schneider, H., Holzgreve, W., Hahn, S., Rusterholz, C., 2010. Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta* 31, 106-112.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C., Jr., McCoy, J.M., 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785-789.
- Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G., Alevizos, I., 2010. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral diseases* 16, 34-38.
- Midgley, A.R., Pierce, G.B., Jr., Deneau, G.A., Gosling, J.R., 1963. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* 141, 349-350.
- Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., 2010. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 63, 520-533.
- Miyauchi, K., Kozlov, M.M., Melikyan, G.B., 2009. Early steps of HIV-1 fusion define the sensitivity to inhibitory peptides that block 6-helix bundle formation. *PLoS pathogens* 5, e1000585.
- Montell, C., Fisher, E.F., Caruthers, M.H., Berk, A.J., 1983. Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequence AAUAAA. *Nature* 305, 600-605.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr., Thomson, A.W., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., Hentze, M.W., 2012. PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nature structural & molecular biology* 19, 603-608.
- Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., Uchiyama, Y., Yamanishi, K., 2008. Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9, 1728-1742.
- Morrish, D.W., Dakour, J., Li, H., 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *Journal of reproductive immunology* 39, 179-195.
- Morrish, D.W., Shaw, A.R., Seehafer, J., Bhardwaj, D., Paras, M.T., 1991. Preparation of fibroblast-free cytotrophoblast cultures utilizing differential expression of the CD9 antigen. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 27A, 303-306.

- Nicola, C., Lala, P.K., Chakraborty, C., 2008. Prostaglandin E2-mediated migration of human trophoblast requires RAC1 and CDC42. *Biology of reproduction* 78, 976-982.
- Nishizawa, M., Koyama, T., Kawai, S., 1985. Unusual features of the leader sequence of Rous sarcoma virus packaging mutant TK15. *J Virol* 55, 881-885.
- Norkin, L.C., Kuksin, D., 2005. The caveolae-mediated sv40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Virology journal* 2, 38.
- Ono, M., Kawakami, M., 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, 2059-2062.
- Pan, B.T., Blostein, R., Johnstone, R.M., 1983. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *The Biochemical journal* 210, 37-47.
- Pan, B.T., Johnstone, R., 1984. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 259, 9776-9782.
- Pan, B.T., Johnstone, R.M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967-978.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology* 101, 942-948.
- Pant, S., Hilton, H., Burczynski, M.E., 2011. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical pharmacology*.
- Patschinsky, T., Schroer, B., Bister, K., 1986. Protein product of proto-oncogene c-mil. *Mol Cell Biol* 6, 739-744.
- Pearse, B.M., 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *Journal of molecular biology* 97, 93-98.
- Pearse, B.M., Robinson, M.S., 1984. Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *The EMBO journal* 3, 1951-1957.
- Peche, H., Renaudin, K., Beriou, G., Merieau, E., Amigorena, S., Cuturi, M.C., 2006. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, 1541-1550.
- Peng, X., Pan, J., Gong, R., Liu, Y., Kang, S., Feng, H., Qiu, G., Guo, D., Tien, P., Xiao, G., 2007. Functional characterization of syncytin-A, a newly murine endogenous virus envelope protein. Implication for its fusion mechanism. *The Journal of biological chemistry* 282, 381-389.

- 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., Lalande, B., Seigneurin, J.M., Mandrand, B., 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, 7583-7588.
- Perron, H., Lazarini, F., Ruprecht, K., Pechoux-Longin, C., Seilhean, D., Sazdovitch, V., Creange, A., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Santoro, L., Jolivet, M., Darlix, J.L., Rieckmann, P., Arzberger, T., Hauw, J.J., Lassmann, H., 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.
- Pisitkun, T., Shen, R.F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13368-13373.
- Plotz, E.J., 1965. Endocrine activities of the placenta. *Clinical obstetrics and gynecology* 8, 580-600.
- Potgens, A.J., Drewlo, S., Kokozidou, M., Kaufmann, P., 2004a. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update*.
- Potgens, A.J., Drewlo, S., Kokozidou, M., Kaufmann, P., 2004b. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update* 10, 487-496.
- Prudhomme, S., Oriol, G., Mallet, F., 2004. A retroviral promoter and a cellular enhancer define a bipartite element which controls env ERVWE1 placental expression. *Journal of virology* 78, 12157-12168.
- Rabesandratana, H., Toutant, J.P., Reggio, H., Vidal, M., 1998. Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during *In vitro* maturation of reticulocytes. *Blood* 91, 2573-2580.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., Marks, M.S., 2001. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *The Journal of cell biology* 152, 809-824.
- Rasko, J.E., Battini, J.L., Gottschalk, R.J., Mazo, I., 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, 2129-2134.
- Reddy, A., Suri, S., Sargent, I.L., Redman, C.W., Muttukrishna, S., 2009. Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia. *PloS one* 4, e4453.
- Redline, R.W., Patterson, P., 1995. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Human pathology* 26, 594-600.

- Redman, C.W., Sargent, I.L., 2008. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 29 Suppl A, S73-77.
- Redman, C.W., Tannetta, D.S., Dragovic, R.A., Gardiner, C., Southcombe, J.H., Collett, G.P., Sargent, I.L., 2012. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 33 Suppl, S48-54.
- Renard, M., Varela, P.F., Letzelter, C., Duquerroy, S., Rey, F.A., 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. *Journal of molecular biology* 352, 1029-1034.
- Rote, N.S., Chakrabarti, S., Stetzer, B.P., 2004. The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta* 25, 673-683.
- Roth, T.F., Porter, K.R., 1964. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *The Journal of cell biology* 20, 313-332.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C., Taylor, D.D., 2006. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol* 56, 345-355.
- Sargent, I.L., Germain, S.J., Sacks, G.P., Kumar, S., Redman, C.W., 2003. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *Journal of reproductive immunology* 59, 153-160.
- Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R., Wewers, M.D., 2009. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PloS one* 4, e7140.
- Schlecht-Louf, G., Renard, M., Mangeney, M., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Bouallaga, I., Heidmann, T., 2010. Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3782-3787.
- Schnitzer, J.K., Berzel, S., Fajardo-Moser, M., Remer, K.A., Moll, H., 2010. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* 28, 5785-5793.
- Schulte, A.M., Lai, S., Kurtz, A., Czubyko, F., Riegel, A.T., Wellstein, A., 1996. Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14759-14764.
- Seifarth, W., Skladny, H., Krieg-Schneider, F., Reichert, A., Hehlmann, R., Leib-Mosch, C., 1995. Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J Virol* 69, 6408-6416.

- Shank, P.R., Linial, M., 1980. Avian oncovirus mutant (SE21Q1b) deficient in genomic RNA: characterization of a deletion in the provirus. *J Virol* 36, 450-456.
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology* 21, 575-581.
- Sin, H.S., Huh, J.W., Kim, D.S., Kang, D.W., Min, D.S., Kim, T.H., Ha, H.S., Kim, H.H., Lee, S.Y., Kim, H.S., 2006. Transcriptional control of the HERV-H LTR element of the GSDML gene in human tissues and cancer cells. *Archives of virology* 151, 1985-1994.
- Smallwood, A., Papageorghiou, A., Nicolaidis, K., Alley, M.K., Jim, A., Nargund, G., Ojha, K., Campbell, S., Banerjee, S., 2003. Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10, and SGCE in human placenta. *Biology of reproduction* 69, 286-293.
- Sood, R., Zehnder, J.L., Druzin, M.L., Brown, P.O., 2006. Gene expression patterns in human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5478-5483.
- Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., Takasu, N., Oda, T., Jinno, Y., 2001. Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 72, 137-144.
- Sugimoto, J., Schust, D.J., 2009. Review: human endogenous retroviruses and the placenta. *Reprod Sci* 16, 1023-1033.
- Taylor, D.D., Akyol, S., Gercel-Taylor, C., 2006. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176, 1534-1542.
- Taylor, D.D., Zacharias, W., Gercel-Taylor, C., 2011. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods Mol Biol* 728, 235-246.
- Taylor, M.V., 2000. Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr Biol* 10, R646-648.
- Temme, S., Eis-Hubinger, A.M., McLellan, A.D., Koch, N., 2010. The herpes simplex virus-1 encoded glycoprotein B diverts HLA-DR into the exosome pathway. *J Immunol* 184, 236-243.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3 22.
- Thery, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology* 9, 581-593.
- Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology* 147, 599-610.
- Thery, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews. Immunology* 2, 569-579.
- Tolosa, J.M., Schjenken, J.E., Clifton, V.L., Vargas, A., Barbeau, B., Lowry, P., Maiti, K., Smith, R., 2012a. The endogenous retroviral envelope protein

- syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta*.
- Tolosa, J.M., Schjenken, J.E., Clifton, V.L., Vargas, A., Barbeau, B., Lowry, P., Maiti, K., Smith, R., 2012b. The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta* 33, 933-941.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., Simons, M., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-1247.
- Trejbalova, K., Blazkova, J., Matouskova, M., Kucerova, D., Pecnova, L., Vernerova, Z., Heracek, J., Hirsch, I., Hejnar, J., 2011. Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic acids research* 39, 8728-8739.
- Troen, P., 1956. Endocrine functions of the human placenta. *Transactions of the New England Obstetrical and Gynecological Society* 10, 111-112.
- Tsatsaris, V., Fournier, T., Winer, N., 2008. [Pathophysiology of preeclampsia]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 37, 16-23.
- Tsatsaris, V., Fournier, T., Winer, N., 2010. [Pathophysiology of preeclampsia]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 29, e13-18.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E., Eisenberg, E., 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632-635.
- Urnovitz, H.B., Murphy, W.H., 1996. Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* 9, 72-99.
- Vaananen, H.K., Hentunen, T., Lakkakorpi, P., Parvinen, E.K., Sundqvist, K., Tuukkanen, J., 1988. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption. *Annales chirurgiae et gynaecologiae* 77, 193-196.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9, 654-659.
- van der Goot, F.G., Gruenberg, J., 2006. Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* 16, 514-521.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337-349.
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J., Barbeau, B., 2009. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *Journal of molecular biology* 392, 301-318.
- Vargas, A., Moreau, J., Le Bellego, F., Lafond, J., Barbeau, B., 2008. Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Placenta* 29, 170-174.



- Vargas, A., Toufaily, C., LeBellego, F., Rassart, E., Lafond, J., Barbeau, B., 2011. Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reprod Sci* 18, 1085-1091.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.H., Yuan, H.T., Libermann, T.A., Stillman, I.E., Roberts, D., D'Amore, P.A., Epstein, F.H., Sellke, F.W., Romero, R., Sukhatme, V.P., Letarte, M., Karumanchi, S.A., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine* 12, 642-649.
- Vidal, M., Sainte-Marie, J., Philippot, J.R., Bienvenue, A., 1989. Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". *Journal of cellular physiology* 140, 455-462.
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., Pedersen, F.S., 2004a. Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1, 32.
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., Pedersen, F.S., 2004b. Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1, 32.
- Walker, J.D., Maier, C.L., Pober, J.S., 2009. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* 182, 1548-1559.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Epp, L., Lu, D.W., Johanning, G.L., 2003. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 22, 1528-1535.
- Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Johanning, G.L., Khazaeli, M.B., LoBuglio, A.F., Shaw, D.R., Strong, T.V., 2001. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 7, 1553-1560.
- White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., Futter, C.E., 2006. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *The EMBO journal* 25, 1-12.
- Wich, C., Kausler, S., Dotsch, J., Rascher, W., Knerr, I., 2009. Syncytin-1 and Glial Cells Missing a: Hypoxia-Induced Deregulated Gene Expression along with Disordered Cell Fusion in Primary Term Human Trophoblasts. *Gynecologic and obstetric investigation* 68, 9-18.
- Wilson, M.L., Goodwin, T.M., Pan, V.L., Ingles, S.A., 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstetrical & gynecological survey* 58, 39-66.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L., 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine* 7, 297-303.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., Stoorvogel, W., 2003. Proteomic

and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of biological chemistry* 278, 10963-10972.

Yi, J.M., Kim, H.M., Kim, H.S., 2004. Expression of the human endogenous retrovirus HERV-W family in various human tissues and cancer cells. *The Journal of general virology* 85, 1203-1210.

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

Zitvogel, L., Fernandez, N., Lozier, A., Wolfers, J., Regnault, A., Raposo, G., Amigorena, S., 1999. Dendritic cells or their exosomes are effective biotherapies of cancer. *Eur J Cancer* 35 Suppl 3, S36-38.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine* 4, 594-600.