



ÉTUDE DU RÔLE DU SÉLÉNIUM ET DE LA SÉLÉNOPROTÉINE NDANS LES PATHOLOGIES MUSCULAIRES.

M. Rederstorff

► To cite this version:

M. Rederstorff. ÉTUDE DU RÔLE DU SÉLÉNIUM ET DE LA SÉLÉNOPROTÉINE NDANS LES PATHOLOGIES MUSCULAIRES.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2006. Français. NNT: . tel-00127081

HAL Id: tel-00127081

<https://theses.hal.science/tel-00127081>

Submitted on 29 Jan 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**ÉTUDE DU RÔLE DU SÉLÉNIUM ET DE LA SÉLÉNOPROTÉINE N
DANS LES PATHOLOGIES MUSCULAIRES**

Présentée
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Mathieu REDERSTORFF

Soutenue publiquement le 15 Septembre 2006 devant la commission d'examen :

Pr. J. KÖHRLE
Pr. J. LUNARDI
Dr. D. METZGER
Pr. E. WESTHOF
Dr. A. LESCURE
Dr. A. KROL

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UPR 9002 du CNRS, « Architecture et Réactivité de l'arN »
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Strasbourg

Table des matières

<i>Table des matières</i>	1
<i>Table des illustrations</i>	5
<i>Liste des abréviations</i>	9
INTRODUCTION	11
1. Sélénium: les deux facettes d'un oligo-élément essentiel	11
2. Le sélénium et ses composés	15
2.1. Propriétés physico-chimiques du sélénium et de ses dérivés inorganiques	15
2.2. Les formes biologiques principales du sélénium	17
2.2.1. La sélénobase	17
2.2.2. Les acides aminés séléniés	17
2.2.2.a. La sélénométhionine	17
2.2.2.b. La sélénocystéine	18
3. Les sélénoprotéines	19
3.1. Biosynthèse de la sélénocystéine	19
3.1.1. L'ARN de transfert sélénocystéine	19
3.1.2. Conversion du séryl-ARNt ^{Sec} en sélénocystéyl-ARNt ^{Sec}	21
3.2. Les partenaires de la machinerie d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines	25
3.2.1. L'élément SECIS	25
3.2.2. Les partenaires protéiques	28
3.3. Aspects régulationnels	30
3.4. Les sélénoprotéines procaryotes	33
3.4.1. Les sélénoprotéines bactériennes	33
3.4.1.a. La famille des formiates déshydrogénases	33
3.4.1.b. La famille des hydrogénases	34
3.4.1.c. La sélénoprotéine D (SelD)	34
3.4.1.d. Les sélénoprotéines des complexes réductase	34
3.4.1.e. La sélénoperoxyrédoxine	35
3.4.2. Les sélénoprotéines archaebactériennes	35
3.4.3. Le sélénoprotéome procaryote	35
3.5. Les sélénoprotéines eucaryotes	37
3.5.1. La sélénoprotéine de 15 kDa (Sel15)	39
3.5.2. La famille des désiodases (DIO)	39
3.5.2.a. La désiodase de type 1 (DIO1)	40
3.5.2.b. La désiodase de type 2 (DIO2)	40
3.5.2.c. La désiodase de type 3 (DIO3)	41
3.5.3. La famille des glutathion peroxydases (GPx)	41
3.5.3.a. La glutathion peroxydase 1 (GPx1 ou cGPx)	41
3.5.3.b. La glutathion peroxydase 2 (GPx2 ou GI-GPx)	43
3.5.3.c. La glutathion peroxydase 3 (GPx3 ou pGPx)	43
3.5.3.d. La glutathion peroxydase 4 (GPx4 ou PH-GPx)	43
3.5.3.e. La glutathion peroxydase 6 (GPx6)	44
3.5.3.f. Les glutathion peroxydases 5 (GPx5) et 7 (GPx7)	44
3.5.4. La sélénoprotéine H (SelH)	44
3.5.5. La sélénoprotéine I (SelI)	44
3.5.6. La sélénoprotéine K (SelK)	44
3.5.7. La sélénoprotéine M (SelM)	45
3.5.8. La sélénoprotéine N (SePN)	45
3.5.9. La sélénoprotéine O (SelO)	45
3.5.10. La sélénoprotéine P (SelP)	45

3.5.11. La sélénoprotéine S (SelS).....	47
3.5.12. La sélénophosphate synthétase 2 (SPS2).....	47
3.5.13. La sélénoprotéine T (SelT).....	47
3.5.14. La famille des thiorédoxine réductases (TrxR).....	48
3.5.14.a. La thiorédoxine réductase 1 (TrxR1).....	48
3.5.14.b. La thiorédoxine réductase 2 (TrxR2).....	48
3.5.14.c. La thiorédoxine réductase 3 (TrxR3 ou TGR).....	49
3.5.15. La sélénoprotéine V (SelV).....	49
3.5.16. La sélénoprotéine W (SelW).....	49
3.5.17. La sélénoprotéine X (SelX) ou méthionine-R-sulfoxyde réductase (MsrB1).....	49
4. Les pathologies liées à des carences en sélénium et/ou au dysfonctionnement de sélénoprotéines.....	51
4.1. Sélénium et système immunitaire.....	51
4.2. Sélénium et maladies infectieuses.....	52
4.3. Sélénium et cancer.....	54
4.4. Sélénium et fertilité.....	55
4.5. Sélénium et maladies thyroïdiennes.....	56
4.6. Sélénium et maladies neurologiques.....	56
4.7. Sélénium et maladies cardiovasculaires.....	57
4.8. Sélénium et maladies musculaires.....	58
4.8.1. « Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function ».....	58
5. Les maladies neuromusculaires.....	67
5.1. Classification des dystrophies musculaires et aspects cliniques.....	69
5.2. Collagène VI et DMC.....	71
5.3. Dystroglycane et DMC.....	71
5.4. Intégrine $\alpha 7$ et DMC.....	73
5.5. Laminine- $\alpha 2$ et DMC.....	73
5.6. Sélénoprotéine N et DMC.....	74
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	77
1. Avant-propos: Identification de mutations dans le gène <i>SEPN1</i>	77
2. Objectifs du travail de thèse.....	83
3. Caractérisation fonctionnelle de la Sélénoprotéine N (<i>SePN</i>).....	85
3.1. Publication numéro 2.....	85
3.1.1. Objectifs de l'étude.....	85
3.1.2. Résumé.....	85
3.1.3. « Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern ».....	86
3.1.4. Discussion.....	97
3.2. Etude de la fonction de <i>SePN</i>	104
3.2.1. Les outils pour la caractérisation fonctionnelle de <i>SePN</i>	104
3.3.2. Biochemical studies of selenoprotein N: looking for interactants.....	112
Results.....	112
Discussion.....	119
Material and Methods.....	120
4. Les modèles animaux.....	123
4.1. Modèle murin des myopathies associées à <i>SePN</i>	123
4.1.1. Avant-propos: principes d'obtention d'un modèle animal.....	123
4.1.2. Résumé.....	127
4.1.3. Conditional targeted disruption of the <i>SEPN1</i> gene in mouse: a new model to study selenoprotein N related myopathies.....	128
Abstract.....	128
Introduction.....	128
Results and Discussion.....	129
Disruption of the <i>SEPN1</i> gene in mouse ES cells.....	129
Engineering of the <i>SEPN1</i> knockout mice.....	135
Phenotypic analysis of the <i>SEPN1</i> gene knockout in the mouse strains.....	137
Differential sensitivity of <i>SEPN1</i> ^{-/-} mice to oxidative stress.....	139

Experimental procedures	141
Construction of the targeted disrupting vector	141
ES cell culture and transfection to generate L3/+ ES cell clones	145
Southern analysis	146
Obtention of heterozygote L2/+ ES cell clones	146
Genesis of chimeric and disrupted mice	147
PCR analysis	148
Western analysis	149
Drug injections to the mice	149
Histological analysis	149
Acknowledgements	150
4.2. Inhibition de l'expression du gène SEPNI chez le poisson-zèbre	151
4.2.1. Résumé	151
4.2.2. « Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo »	151
4.2.3. Contributions	192
5. Annexe	193
5.1. Tentative de correction génique	193
5.1.1. Résumé	193
5.1.2. « Rescue of a selenoprotein N mutation causing congenital dystrophies »	194
5.1.3. Contributions	209
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	211
<i>Contributions à la caractérisation fonctionnelle de la sélénoprotéine N</i>	211
<i>Les premiers modèles physiologiques de la fonction de la sélénoprotéine N</i>	212
<i>Vers une stratégie originale de correction d'une mutation pathologique du gène SEPNI</i>	214
<i>Prospectives</i>	215
MATERIELS ET METHODES	219
1. <i>MATERIELS</i>	219
1.1. Souches bactériennes: <i>E.coli</i>	219
1.2. Vecteurs de clonage	219
1.3. Phages	220
1.4. Anticorps anti-SEPNI	220
2. <i>METHODES</i>	222
2.1. Méthodes relatives à l'ADN	222
2.1.1. Techniques de clonage	222
2.1.1.a. Digestion par les enzymes de restriction	222
2.1.1.b. Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse	222
2.1.1.c. Récupération des fragments d'ADN après migration	222
2.1.1.d. Formation d'extrémités franches	223
2.1.1.e. Déphosphorylation de l'extrémité 5' phosphate de l'ADN du vecteur	223
2.1.1.f. Elimination des protéines	223
2.1.1.g. Ligation	223
2.1.1.h. Transformation de bactéries par la technique du chlorure de calcium	223
2.1.1.i. Préparation fraîche de bactéries compétentes au CaCl ₂	224
2.1.1.j. Préparation de bactéries électrocompétentes	224
2.1.2. Préparation d'ADN double brin à partir d'E.coli	225
2.1.2.a. Minipréparation d'ADN plasmidique par la technique de lyse alcaline	225
2.1.2.b. Midipréparation d'ADN plasmidique	225
2.1.2.c. Maxipréparation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium	226
2.1.3. Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR)	227
2.1.4. Mutagenèse dirigée par la technique de Kunkel	227
2.1.5. Séquençage de l'ADN à la T7 ADN polymérase	228
2.1.6. Criblage d'une banque d'ADN génomique de souris	229
2.1.6.a. Titration de la banque	229
2.1.6.b. Préparation de la sonde marquée	229
2.1.6.c. Criblage de la banque	230

2.1.6.d. Préparation d'ADN phagique.....	230
2.2. Méthodes relatives aux protéines	231
2.2.1. Surproduction de protéine.....	231
2.2.1.a. Surproduction d'une protéine en fusion avec l'étiquette strep-tag® 2.....	231
2.2.1.b. Préparation d'extraits protéiques cytoplasmiques	231
2.2.1.c. Préparation d'extraits protéiques périsplasmiques	232
2.2.1.d. Purification d'une protéine surproduite.....	232
2.2.2. Analyse des protéines par immuno-détection (Western blot)	233
2.2.2.a. Transfert des protéines sur membrane	233
2.2.2.b. Révélation avec l'anticorps de lapin anti-SEPNI	233
2.2.3. Dosage des protéines par la technique de Lowry, selon le protocole Pierce	233
2.2.4. Marquage radioactif de la protéine.....	234
2.2.5. Technique du far-western	234
2.2.6. Préparation de microsomes à partir de cellules en culture.....	234
2.2.7. Préparation de microsomes à partir de muscles	235
2.2.8. Extraction des protéines associées aux membranes	235
2.2.9. Purification par chromatographie d'affinité sur billes de streptactine-sépharose®	236
2.2.10. Purification par chromatographie d'affinité sur billes de streptactine-sépharose® substituées..	236
2.2.11. Co-immuno précipitation	237
2.2.12. Coloration à l'argent des gels SDS-PAGE	237
2.2.13. Coloration des gels au bleu colloïdal, compatible avec la spectrométrie de masse	238
2.2.14. Expériences de protection à la trypsine	238
2.3. Culture cellulaire	239
2.3.1. Décongélation de cellules	239
2.3.2. Amplification des cellules.....	239
2.3.3. Congélation de cellules	240
2.3.4. Transfection de cellules eucaryotes au phosphate de calcium	240
2.3.5. Mesure de l'activité β -Gal par la méthode de Miller	241
2.4. Divers	242
2.4.1. Préparation de tamoxifène pour l'injection aux souris	242

BIBLIOGRAPHIE	243
----------------------------	------------

Table des illustrations

Tableau 1 : Les sélénoprotéines eucaryotes, d'après (Castellano et coll., 2005)	14
Tableau 2: Sélénium.....	16
Tableau 3: Le sélénoprotéome procaryote selon Kryukov et coll. (Kryukov et Gladyshev, 2004).....	36
Tableau 4: Les sélénoprotéines humaines.....	38
Tableau 5: Les Dystrophies Musculaires Congénitales au 1 ^{er} Janvier 2005, d'après (Jimenez-Mallebrera et coll., 2005).....	75
Table 6: Identity of the putative SePN interactants	118
Table 7: Sequence and function of the oligonucleotides used	143
Figure 1: Assimilation du sélénium inorganique	15
Figure 2: Structure chimique de la sélénobase 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine.....	17
Figure 3: Structures chimiques de la sélénométhionine, de la cystéine et de la sélénocystéine.....	18
Figure 4: Comparaison de la structure secondaire d'un ARN de transfert canonique avec celles des ARNt sélénocystéine chez les bactéries (SeIC), les eucaryotes et les archaebactéries	20
Figure 5: Biosynthèse et incorporation de la sélénocystéine chez les bactéries	22
Figure 6: Mécanisme de biosynthèse de sélénocystéine chez les eucaryotes.....	24
Figure 7: Modèles structuraux des ARN SECIS eucaryotes, archaebactériens et bactériens.....	26
Figure 8: Les partenaires de l'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes.....	27
Figure 9: Protéines impliquées dans la synthèse des sélénoprotéines.....	29
Figure 10: Deux modèles d'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes.....	31
Figure 11: Désiodation de la thyroxine par les Iodothyronine Désiodases.....	40
Figure 12: Mécanismes catalytiques des glutathion peroxydases et des thiorédoxine réductases	42
Figure 13: L'ARN messager de la sélénoprotéine P	46
Figure 14: Localisation des principales protéines impliquées dans des dystrophies musculaires congénitales, d'après (Jimenez-Mallebrera et coll., 2005)	68

Figures 15: Caractéristiques cliniques des Dystrophies Musculaires Congénitales, d'après (Ferreiro et coll., 2004).....	70
Figure 16: L'ARN messager de la sélénoprotéine N est ubiquitaire.....	78
Figure 17: Le syndrome « Rigid Lamb » chez l'agneau	79
Figure 18: Structure génomique de SEPNI.	80
Figure 19: Séquence peptidique de la sélénoprotéine N	84
Figure 20: Structure de la sélénoprotéine N.....	98
Figure 21: Localisation du signal d'adressage au réticulum endoplasmique	98
Figure 22: Détermination de la topologie membranaire de SePN.....	100
Figure 23: Détermination de la topologie de SePN dans la membrane de microsomes issus du réticulum endoplasmique	101
Figure 24: Profil d'expression de la sélénoprotéine N au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre, d'après (Thisse et coll., 2003).....	103
Figure 25: Séquence en acides aminés de SePN	104
Figure 26: Principe de la technique du far-western.....	106
Figure 27: Exemples de formes recombinantes de SePN construites pour les études biochimiques.....	107
Figure 28: Surproduction de formes recombinantes de SePN	107
Figure 29: Dosage de la sélénoprotéine N surproduite	108
Figure 30: Principe de la purification par chromatographie d'affinité.....	109
Figure 31: Mécanisme proposé pour la réduction de la thiorédoxine par la thiorédoxine réductase (Gromer et coll., 2003) et principe du cross-link <i>in vivo</i>	111
Figure 32: Observation of SePN interacting partners by far-western experiments.....	113
Figure 33: A strategy for substrate cross-linking to SePN.....	114
Figure 34: Identification of SePN cross-linked complexes	115
Figure 35: Purification of the cross-linked SePN complexes	116
Figure 36: Colloidal blue staining of the putative SePN interactants	117
Figure 37: Méthode générale pour l'obtention d'une souris invalidée	124
Figure 38: Cellules souches embryonnaires et blastocystes	125
Figure 39: Principe de l'inactivation conditionnelle d'un gène par le système Cre-Lox	126
Figure 40: Probes used for screening the mouse genomic library.....	130
Figure 41: Strategy for SEPNI gene disruption in mice.....	131
Figure 42: Screening procedure for identification of recombinant modified alleles.....	132

Figure 43: Southern-blot confirmation of the allelic organization after homologous recombination.....	134
Figure 44: Heterozygous and homozygous mice genotyping for the different allelic situations	136
Figure 45: Selenoprotein N expression in transgenic mice.....	138
Figure 46: Hematoxylin-Eosin stainings of mice tibialis transversal sections	139
Figure 47: Sensitivity to paraquat induced oxidative stress of the different knock-out mice strains.....	140
Figure 48: Organization of the mouse genomic fragment obtained after DNA library screening and engineering of the targeted disrupting fragment.....	142
Figure 49: Cloning strategy for obtaining the SEPN1 gene targeted disrupting fragment	144
Figure 50: La sélénoprotéine N: bilan et perspectives.	216

Liste des abréviations

A, C, G, T, U	adénine, cytosine, guanine, thymine, uracile
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNt ^{sec}	ARN de transfert sélénocystéine
ATP	adénosine 5'-triphosphate
BEt	bromure d'éthidium
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	sérum albumine de boeuf
Cam	chloramphénicol
C.elegans	Caenorhabditis elegans
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
Ci	Curie
CMD	Congenital Muscular Dystrophy
contig	groupe de séquences chevauchantes
cpm	coups par minute
C-ter	extrémité carboxy-terminale
Da	Dalton
ddNTP	didésoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DMC	Dystrophie Musculaire Congénitale
DNase	désoxyribonucléase
D.melanogaster	Drosophila melanogaster
dNTP	désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO _{xxx}	densité optique à la longueur d'onde indiquée en nanomètre
DTT	dithiothréitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	éthylène diamine tétra-acétique
EST	"expressed sequence tag"
G	gramme
g	multiple de la gravitation naturelle de la terre
GPx	glutathion peroxydase
h	heure
his	histidine
HEPES	acide N-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
Ig-G	immunoglobuline de type G
IPTG	isopropyl thio-galactoside
kb	kilo paires de bases
kDa	kilo Dalton
μ	micro
M	molaire
mA	milliampère
min	minute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanomètre

NP-40	Nonidet P-40
nt	nucléotide
N-ter	extrémité amino-terminale
Oligo	oligonucléotide
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	paires de bases
PEG	polyéthylène glycol
PIPES	pipérazine-N, N'-bis-(2-éthanesulfonique)
PH-GPx	phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase
PM	poids moléculaire
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
PU	primer universel
RNase	ribonucléase
rpm	rotation par minute
RPU	primer universel reverse
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
Sec	sélénocystéine
SECIS	selenocysteine insertion séquence
SePN	sélénoprotéine N
SEPN1	gène de la sélénoprotéine N
Ser	sérine
serRS	séryl-tRNA synthétase
SM	sodium/magnésium
snARN	petit ARN nucléaire
snoARN	petit ARN nucléolaire
SSC	saline-sodium citrate
TBE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Trx	Thiorédoxine
TrxR	Thiorédoxine réductase
U	unité enzymatique
3' UTR	région 3' non traduite
UV	ultra-violet
V	volt
p/v	poids à volume
v/v	volume à volume

1. Sélénium: les deux facettes d'un oligo-élément essentiel

Le sélénium a été identifié par le physico-chimiste suédois Berzelius en 1817, au cours de recherches qu'il avait entreprises afin d'identifier l'agent responsable d'une maladie mystérieuse chez les ouvriers d'une usine de fabrication d'acide sulfurique (Hatfield, 2001). Cette découverte ayant eu lieu peu de temps après celle de l'élément tellurium, il l'appela du nom de la déesse grecque de la lune, Selênê. La plupart des dérivés du sélénium sont des poisons, plus dangereux encore que certains cyanures (Falbe et Regitz, 1999), et présentant une odeur alliagée particulièrement tenace. Les premières observations de cette toxicité remontent à plusieurs siècles avant celle faite par Berzelius. En 1295, lorsque Marco Polo arriva en Chine occidentale, sa progression vers l'Est fut rapidement compromise par la perte des sabots de ses chevaux, conduisant les animaux vers une mort certaine (Polo, 1972). Les chevaux indigènes bien portants et adaptés à leur écosystème évitaient, contrairement aux chevaux malades, la consommation d'une herbe dangereuse appelée l'astragale. Bien connue aujourd'hui, cette plante possède la particularité d'accumuler le sélénium, notamment dans les régions où le sol est très sélénifère, comme dans l'Ouest de la Chine. Ce fut également le cas en 1800 dans l'état du Nebraska aux Etats-Unis, où les chevaux de l'armée américaine furent victimes d'une intoxication similaire. Ce syndrome est maintenant connu sous le nom d'« Alkali disease » (Moxon, 1937). L'empoisonnement par le sélénium en est la cause principale et a pu être reproduit expérimentalement chez des animaux d'élevage (O'Toole et Raisbeck, 1995; Yaeger et coll., 1998). Des intoxications identiques ont été décrites chez l'homme, bien avant que l'implication du sélénium ne soit connue. Les symptômes majeurs consistent en une chute des cheveux et des ongles, accompagnée d'états dépressifs et de fatigues, voire d'atteintes neurologiques plus graves, telles des convulsions ou des paralysies, dans les cas d'intoxications les plus sévères (Combs Jr. et S.B., 1986; Fan et Kizer, 1990; Yang et coll., 1983). D'autres études ont montré que le sélénium à forte dose pouvait être cancérigène (Nelson et coll., 1943; Tscherkes et coll., 1963). En résumé, la nuisance du sélénium n'était plus à démontrer et pendant de nombreuses années, sa mauvaise réputation a précédé cet élément.

Ce n'est qu'à partir des années 50 que l'image du sélénium a évolué, pour arriver à son rôle essentiel qu'on lui connaît aujourd'hui. En 1954, il fut démontré que certaines bactéries se développaient plus rapidement dans un milieu enrichi en sélénium (Pinsent, 1954). Toutefois, c'est à l'Allemand Klaus Schwarz que l'on doit, en 1957, la définition du sélénium comme un oligo-élément essentiel. Ses travaux ont démontré qu'une carence en sélénium pouvait entraîner une nécrose fatale du foie chez le rat (Schwarz et Foltz, 1957). Dans les années 60, ce rôle essentiel fut confirmé chez plusieurs animaux d'élevage (Lamand, 1970; Patterson et coll., 1957).

Au début des années 70, dans le cadre d'études chez l'homme, des scientifiques chinois ont suggéré que des carences en sélénium pouvaient être la source de deux pathologies graves, à savoir, les maladies de Keshan et de Kashin-Beck (Ge et Yang, 1993). Par la suite, il a été montré que des déficiences en sélénium étaient associées à des cas de retard mental, d'infertilité masculine, de déficience immunitaire, de maladies cardiovasculaires ainsi qu'à des myopathies et/ou cardiomyopathies. Ces mêmes carences sont également impliquées dans l'apparition de plusieurs types de cancers, dans la recrudescence de certaines infections virales, ainsi que dans l'accélération des processus de vieillissement. Nous y reviendrons en détail plus loin dans l'introduction.

Le sélénium s'avère donc être indispensable à la vie, au même titre que les quatorze autres oligo-éléments essentiels. Les besoins journaliers en sélénium nécessaires à un homme adulte ont été estimés à 50-200 µg. Le seuil maximal d'apport journalier avant toxicité est évalué à 450 µg. Les apports alimentaires en sélénium sont essentiellement fournis par les céréales, les féculents, les champignons, les viandes rouges et abats, le poisson et les œufs, dont les teneurs en sélénium varient en fonction de la disponibilité et de l'abondance de l'oligo-élément dans l'environnement d'origine. Toutefois, cette dose minimale et surtout les formes sous lesquelles elles sont apportées sont l'objet de nombreux débats, notamment en ce qui concerne les supplémentations alimentaires (Rayman, 2004).

Les divers effets du sélénium ne peuvent pas être expliqués de manière évidente par les seuls dérivés inorganiques de cet élément auxquels les êtres vivants sont quotidiennement exposés. Les composés séléniés sont assimilés et incorporés dans de multiples molécules biologiques aux potentiels divers. Une des voies majeure d'assimilation du sélénium consiste en son incorporation spécifique dans des protéines particulières. En 1973, les premières

protéines à sélénium découvertes furent la sélénoprotéine A du système glycine réductase et la formiate déshydrogénase eubactériennes (Andreesen et Ljungdahl, 1973; Turner et Stadtman, 1973), ainsi qu'une sélénoprotéine de mammifère, la glutathion peroxydase (Flohe et coll., 1973; Rotruck et coll., 1973). Depuis, de nombreuses sélénoprotéines ont été mises en évidence. Le sélénium se retrouve dans ces protéines sous sa forme biologique principale, l'acide aminé sélénocystéine, qui est intégré à la chaîne polypeptidique (Cone et coll., 1976; Forstrom et coll., 1978; Wendel et coll., 1978) selon un mécanisme détaillé par la suite. Le résidu sélénocystéine, considéré comme le 21^e acide aminé, confère des avantages catalytiques pour l'activité des sélénoenzymes. Ces protéines ont des activités biochimiques diverses, souvent liées à des mécanismes d'oxydoréduction (Kohrle et coll., 2000) qui expliquent, en partie, le rôle fondamental du sélénium.

On trouve des sélénoprotéines dans de nombreux organismes (Tableau 1). Tous les mammifères en possèdent. C'est le cas aussi chez certains insectes, par exemple *D. melanogaster*, ou encore chez des eucaryotes inférieurs comme *C. Elegans* ou *S. mansoni* (Buettner et coll., 1999; Castellano et coll., 2005; Castellano et coll., 2001; Gladyshev et Kryukov, 2001; Maiorino et coll., 1996; Martin-Romero et coll., 2001; Serras et coll., 2001). De nombreuses sélénoprotéines sont également trouvées chez les procaryotes (Kryukov et Gladyshev, 2004). Néanmoins, même si certaines eubactéries peuvent tirer avantage du potentiel catalytique du sélénium, son caractère essentiel n'a jamais pu être clairement démontré. On décèle sporadiquement des sélénoprotéines chez quelques plantes comme une glutathion peroxydase chez *C. reinhardtii* (Fu et coll., 2002; Novoselov et coll., 2002). En revanche, aucune n'est retrouvée chez la levure. Chez les levures et les plantes supérieures, du sélénium peut être trouvé dans les protéines, mais il n'existe pas de discrimination entre les atomes de sélénium et de soufre, ce qui conduit en général à son incorporation aléatoire dans les biomolécules. Enfin, une glutathion peroxydase proche de la sélénoprotéine humaine a été identifiée dans le génome de certains virus comme le poxvirus *Molluscum contagiosum* (Shisler et coll., 1998; Taylor et coll., 1997).

Récemment encore, deux nouvelles familles de protéines eucaryotes ont été décrites. Elles ne possèdent toutefois d'homologues à sélénocystéine que dans un nombre restreint d'organismes. Il s'agit des sélénoprotéines U chez le poulet, le poisson et l'oursin, et J chez le poisson et l'oursin (Castellano et coll., 2005; Castellano et coll., 2004). Ainsi, plusieurs nouvelles familles de sélénoprotéines ont été découvertes, dans des organismes non-

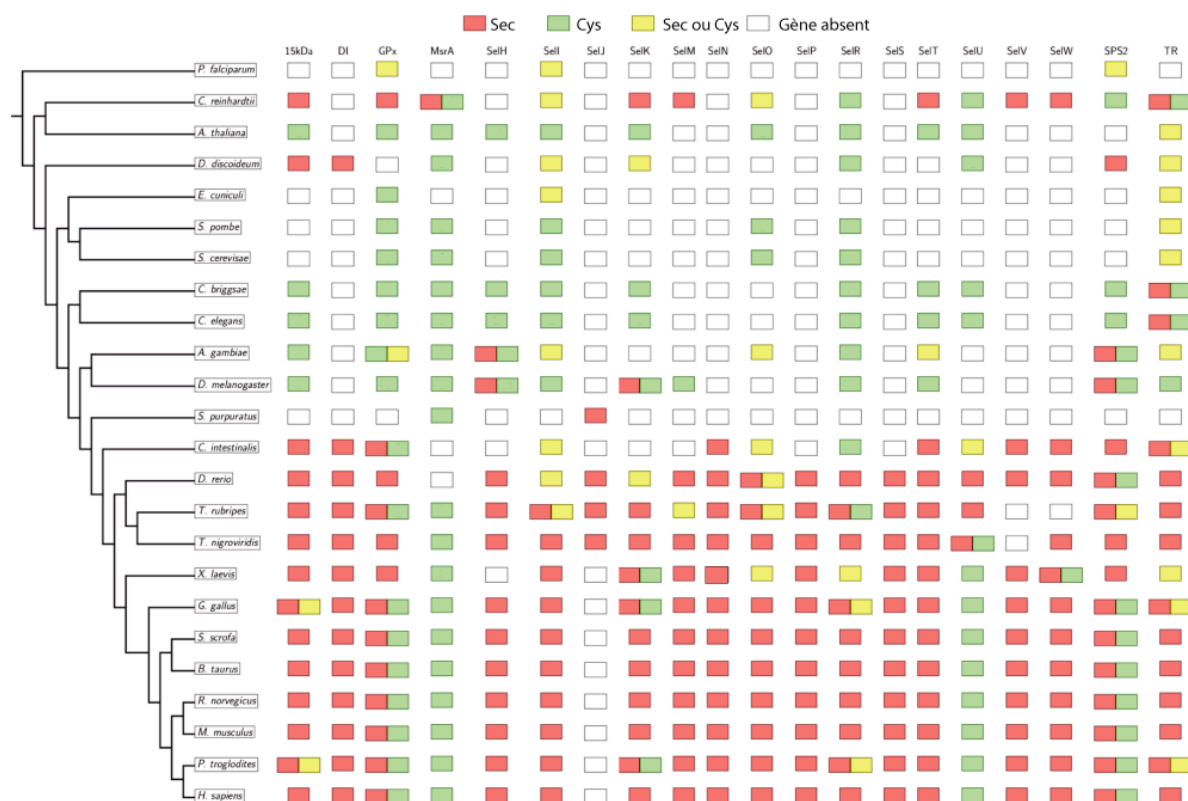


Tableau 1 : Les sélénoprotéines eucaryotes, d'après (Castellano et coll., 2005)

Les sélénoprotéines identifiées chez les eucaryotes sont représentées sur cet arbre récapitulatif. Les gènes codant pour une protéine à sélénocystéine sont représentés en rouge, à cystéine en vert, et pour l'un ou l'autre de ces résidus en jaune.

mammifères ou invertébrés, pour lesquelles la distribution taxonomique de formes à sélénocystéine est plus restreinte, puisque des protéines orthologues à cystéine sont retrouvées dans les autres espèces. Cette observation suggère que les sélénoprotéines ont évolué à partir d'homologues à cystéine, mais leur distribution reflète plus une évolution en mosaïque qu'une simple accumulation au cours des processus évolutifs (Tableau 1): en effet, bien que le nombre de sélénoprotéines augmente avec la complexification des organismes, illustrée par la présence d'une seule sélénoprotéine chez *C. elegans* contre vingt-cinq chez l'homme, l'ensemble des sélénoprotéines n'est pas retrouvé chez les mammifères. Ceci reflète que la présence de sélénoprotéines résulte plutôt de l'adaptation de chaque organisme à son environnement. En ce sens, la sélénoprotéine SelJ occupe une position singulière puisqu'elle n'existe que chez certains animaux marins et ne présente pas d'homologues à cystéine dans les autres espèces.

2. Le sélénium et ses composés

2.1. Propriétés physico-chimiques du sélénium et de ses dérivés inorganiques

Le sélénium est le 34^e élément de la classification périodique de Mendeleïev, de masse atomique égale à 78,96 (Tableau 2). C'est le 69^e élément en termes d'abondance des différents éléments sur terre. Il est situé dans la colonne VIa, sous l'élément soufre, dans la famille des chalcogènes, comprenant également l'oxygène (Jacob et coll., 2003). Le sélénium existe sous différents degrés d'oxydation, représentés sur la Figure 1. Tous les organismes peuvent assimiler l'oligo-élément sous ses formes sélénite SeO_3^{2-} ou sélénure H_2Se , mais l'assimilation de sa forme sélénate SeO_4^{2-} n'est possible que chez les plantes et les eubactéries (Läuchli, 1993).

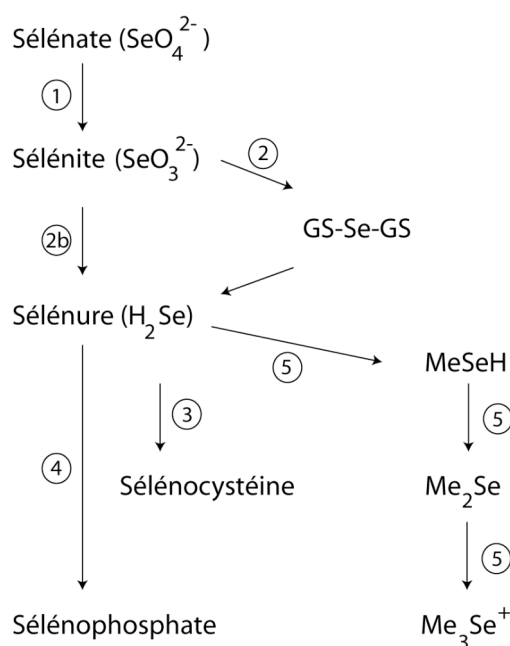


Figure 1: Assimilation du sélénium inorganique

Le sélénium peut être trouvé sous différents degrés d'oxydation. Les numéros entourés se rapportent aux voies métaboliques impliquées. **1:** Réduction du sélénate selon une voie similaire à celle connue pour le sulfate et utilisant une ATP sulfurylase (Läuchli, 1993). Chez la bactérie *Thauera selenatis*, une sélénate réductase spécifique a été trouvée (Schroder et coll., 1997). **2 :** Réaction non enzymatique du sélénite avec le glutathion, suivie d'une réduction en sélénure catalysée par la glutathion ou la thiorédoxine réductase (Bjornstedt et coll., 1992; Hsieh et Ganther, 1975). Une voie de réduction directe existe chez les mammifères par la thiorédoxine réductase (**2b**) (Kumar et coll., 1992). **3:** Formation aspécifique de sélénocystéine par la cystéine synthase. **4:** Formation de sélénophosphate par une sélénophosphate synthétase; c'est le lien vers la synthèse spécifique de sélénocystéine. **5:** Réactions de méthylation par la S-Adénosyl-Méthionine transférase : ces composés méthylés sont excrétés par les organismes afin d'éliminer les excès de sélénium (Foster et coll., 1986; Garbisu et coll., 1995).

2.2. Les formes biologiques principales du sélénium

Dans l'organisme, le sélénium est (principalement) représenté sous 3 formes: il peut être associé à des acides nucléiques (sélénobase), conjugué à des glucides ou des lipides, ou enfin retrouvé sous la forme d'acides aminés séléniés (sélénométhionine et sélénocystéine).

2.2.1. La sélénobase

La 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine (Figure 2) est une base modifiée retrouvée dans l'anticodon des ARN de transfert glutamate et lysine chez *E. coli*, *C. stricklandii* et *M. vanielii*. Sa synthèse fait intervenir du sélénium sous sa forme sélénophosphate (Figure 1) (Veres et coll., 1994). La présence de cette base modifiée, en position 34 de la boucle de l'anticodon de ces ARN de transfert, est d'une importance capitale pour leur aminoacylation (Ching et Stadtman, 1982; Sylvers et coll., 1993).

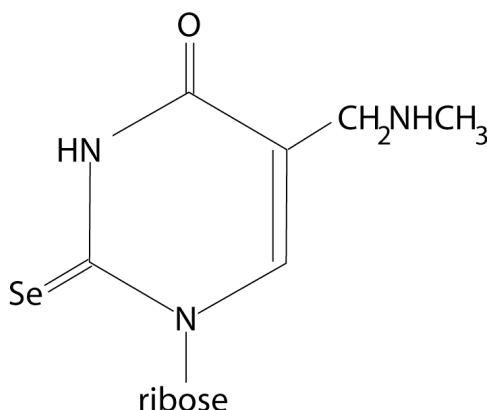


Figure 2: Structure chimique de la sélénobase 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine

Cette base modifiée est trouvée dans l'anticodon des ARN de transfert glutamate et lysine chez *E. coli*, *C. stricklandii* et *M. vanielii*.

2.2.2. Les acides aminés séléniés

Deux mécanismes distincts permettent l'introduction de sélénium dans les protéines, sous la forme de sélénométhionine ou de sélénocystéine.

2.2.2.a. La sélénométhionine

Cet acide aminé (Figure 3) est présent essentiellement dans certains enzymes de l'espèce *Clostridium* (thiolases, β -D-hydroxybutyryl-coenzyme A, β -galactosidase), ainsi que

chez les plantes. Au cours du métabolisme des composés soufrés, un atome de sélénium peut remplacer de façon aléatoire un atome de soufre; la fréquence de cet événement est directement proportionnelle à la concentration de sélénium présent dans la cellule.

2.2.2.b. La sélénocystéine

La sélénocystéine (Figure 3) est un analogue de la cystéine, dans lequel l'atome de soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium pour former un groupement séléniol. Par son mécanisme d'incorporation spécifique dans les sélénoprotéines, la sélénocystéine est considérée comme le 21^{ème} acide aminé protéogénique et se distingue donc de la sélénométhionine, incorporée de façon aléatoire.

Le groupement séléniol ($pK_a=5,2$), contrairement au thiol ($pK_a=8$), est entièrement ionisé à pH physiologique. Cette ionisation, à laquelle s'ajoute sa taille plus importante, fait du séléniol un meilleur nucléophile. De ce fait, la réactivité des protéines à sélénocystéine est bien plus importante que celle de leurs homologues à cystéine (Gromer et coll., 2003; Johansson et coll., 2005; Muller et coll., 1994). Cette réactivité accrue constitue probablement la raison d'être des sélénoprotéines, malgré la faible efficacité et le coût énergétique élevé de leur synthèse.

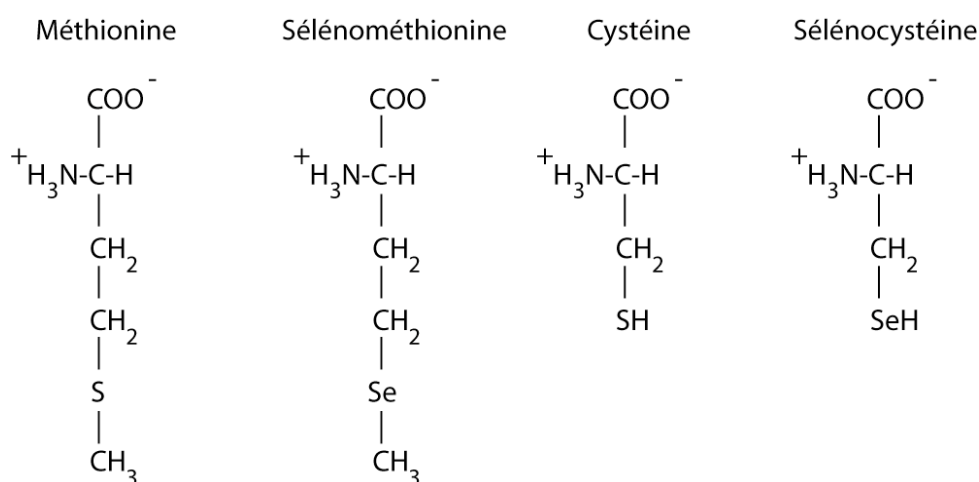


Figure 3: Structures chimiques de la sélénométhionine, de la cystéine et de la sélénocystéine

La sélénocystéine est un analogue de la cystéine, mais de réactivité bien supérieure. Toutefois, elle est synthétisée à partir de sérine (voir au 3.1).

3. Les sélénoprotéines

Le mécanisme d'incorporation spécifique de sélénocystéine dans les sélénoprotéines est demeuré énigmatique, jusqu'au jour où il fut découvert qu'à la position correspondant au résidu sélénocystéine dans l'ADN complémentaire des gènes de la glutathion peroxydase bovine et de la formiate déshydrogénase eubactérienne, se trouvait un codon UGA, reconnu ailleurs comme un codon stop (Chambers et coll., 1986; Zinoni et coll., 1986). Cette reprogrammation du codon UGA par rapport au code génétique classique n'est pas le seul exemple décrit pour ce codon, puisqu'il dicte par exemple aussi l'incorporation de tryptophane dans les mitochondries de mammifères et de levures, ou de cystéine dans le génome nucléaire de l'Euplote (Osawa et coll., 1992). Toutefois, l'incorporation spécifique cotraductionnelle de sélénocystéine chez les eubactéries et les eucaryotes nécessite une machinerie complexe constituant une particularité du monde vivant. Cette machinerie est connue chez les procaryotes (Bock et coll., 1991; Bock et Stadtman, 1988) et elle est en voie d'élucidation chez les eucaryotes (Allmang et Krol, 2006b; Berry et coll., 2001). Depuis, seule la pyrrolysine, considérée comme le 22^{ème} acide aminé protéogénique, et incorporée chez certaines archaebactéries en réponse à un autre codon normalement reconnu comme stop, le codon UAG, pourrait présenter un mécanisme d'incorporation similaire (Krzycki, 2005). L'existence d'un troisième acide aminé non canonique, incorporé suite à une reprogrammation du code génétique classique, semble fortement improbable (Lobanov et coll., 2006).

3.1. Biosynthèse de la sélénocystéine

La sélénocystéine est un acide aminé qui n'existe pas sous forme libre. Sa synthèse est effectuée en deux étapes, directement sur l'ARNt^{Sec}, à partir de la sérine.

3.1.1. L'ARN de transfert sélénocystéine

Les ARNt^{Sec} bactériens, archaebactériens et eucaryotes présentent des caractéristiques communes, notamment d'ordre structural, qui les rendent interchangeables entre les différentes espèces (Figure 4) (Baron et coll., 1994; Lee et coll., 1989; Leinfelder et coll., 1988; Rother et coll., 2000). En effet, un grand nombre de nucléotides invariants ont été décrits dans leur séquence, jouant des rôles dans la structure bi- et tridimensionnelle de la molécule (Carlson, 2001). Caractérisés par leur anticodon UCA capable de reconnaître le

codon UGA, ils se distinguent par contre des ARN de transfert classiques par de nombreux points. Dans un premier temps, leur taille élevée, avoisinant les 100 paires de bases, en font les plus grands ARNt connus. Ils se caractérisent par une tige du bras D longue de 6 paires de bases contre seulement à 3 ou 4 pour un ARNt classique. Cette particularité a été démontrée comme étant un déterminant d'identité majeur pour une étape intermédiaire de phosphorylation de la sérine chez les eucaryotes (voir au 3.1.2) (Wu et Gross, 1994). Le bras accepteur se distingue également par une taille plus importante pour les ARNt^{Sec} (Hubert et coll., 1998; Sturchler et coll., 1993). Chez les bactéries, cette caractéristique est un déterminant pour la reconnaissance par le facteur d'élongation spécifique SelB à la place du facteur EF-Tu. Chez les eucaryotes, elle est requise pour la conversion de la sérine en sélénocystéine (Baron et Bock, 1991; Sturchler-Pierrat et coll., 1995). Le bras variable de l'ARNt^{Sec} est plus long que dans n'importe quel autre ARNt classique, déterminant essentiel pour sa sérylation (Commans et Bock, 1999).

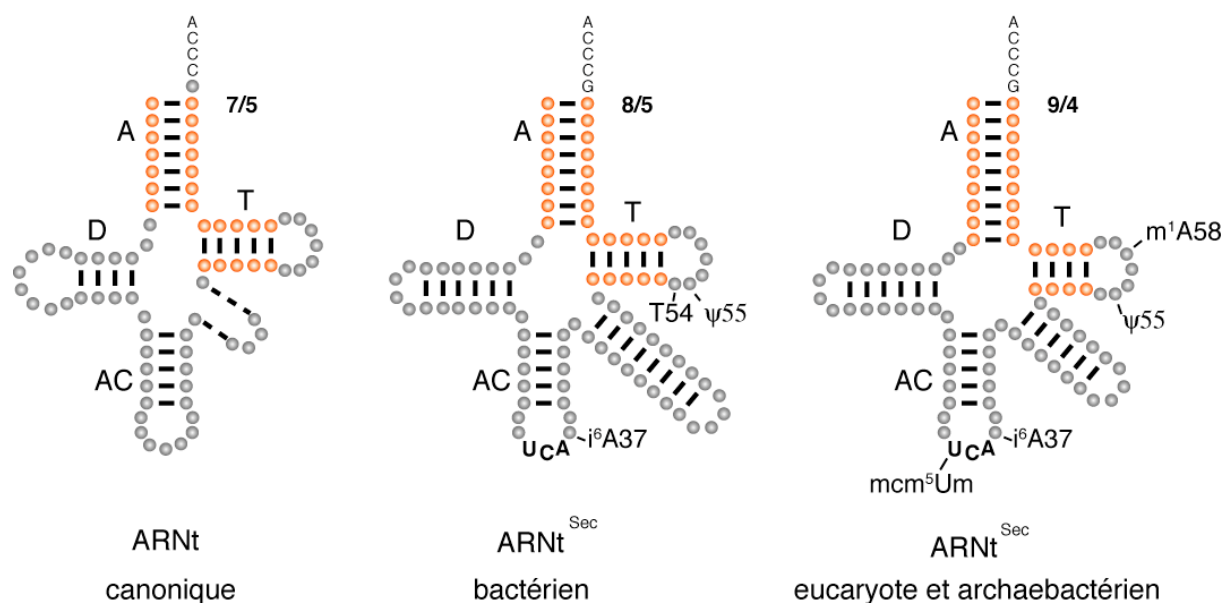


Figure 4: Comparaison de la structure secondaire d'un ARN de transfert canonique avec celles des ARNt sélénocystéine chez les bactéries (SelC), les eucaryotes et les archaebactéries

Les structures secondaires sont indiquées : A: bras accepteur; D: bras du dihydrouracile; AC: bras de l'anticodon; T: bras de la thymine. Les chiffres à côté du bras accepteur indiquent le nombre de résidus (oranges) des bras A et T impliqués dans le repliement tertiaire en forme de L, typique des ARNt. Les pointillés dans le bras additionnel des ARNt canoniques reflètent la variabilité de sa longueur. Les bases modifiées identifiées chez les bactéries et les eucaryotes sont indiquées; elles ne sont volontairement pas représentées sur l'ARNt canonique et n'ont pas fait l'objet d'études chez les archaebactéries.

Chez les eucaryotes, la position et la nature des modifications post-transcriptionnelles dans l'ARNt^{Sec} a été étudiée (Diamond et coll., 1993; Sturchler et coll., 1994): seules quatre bases modifiées ont été mises en évidence, ce qui correspond à un nombre inférieur aux ARNt canoniques. Une pseudouridine et une 1-méthyl-adénosine sont présentes dans la boucle du bras T, respectivement en position 55 et 58. On trouve une 6-isopentényl-adénosine en position 37 dans la boucle de l'anticodon, ainsi qu'une 5-méthylcarboxyméthyl-2'-O-méthyluridine en position 34 de la boucle de l'anticodon. Jusqu'à présent, cette dernière modification n'a été observée que dans l'ARNt^{Sec} eucaryote (Diamond et coll., 1993). La protéine SECp43, identifiée dans un complexe contenant l'ARNt^{Sec} (Ding et Grabowski, 1999), pourrait être impliquée dans cette modification (Xu et coll., 2005). Il a été démontré que la présence des bases modifiées aux positions 34 et 37 pouvait avoir une influence capitale dans la régulation de l'expression des sélénoprotéines (Carlson et coll., 2005; Warner et coll., 2000). Il faut noter que l'invalidation du gène de l'ARNt^{Sec} est létal à un stade embryonnaire précoce chez la souris (Bosl et coll., 1997); or, l'ARNt^{Sec} étant impliqué dans la biosynthèse de toutes les sélénoprotéines de l'organisme, cette observation suggère qu'au moins certaines d'entre elles sont indispensables à la vie.

La nature originale et complexe de l'ARNt^{Sec} peut s'expliquer par plusieurs points: il doit être aminoacylé par une ARNt synthétase canonique, dont ce n'est pas la fonction majeure, puis être reconnu par un facteur d'élongation non conventionnel. Il doit également être reconnu par le ribosome, et donc présenter certains déterminants d'un ARNt classique (Rudinger et coll., 1996). L'ensemble de ces caractéristiques en font une singularité dans le monde des ARN de transfert.

3.1.2. Conversion du séryl-ARNt^{Sec} en sélénocystéyl-ARNt^{Sec}

La première étape de la synthèse de sélénocystéine consiste en l'aminoacylation de l'ARNt^{Sec} avec de la sérine (Figures 5 et 6). Aucune sérine ARNt^{Sec} synthétase n'a été identifiée à ce jour. La sérine ARNt synthétase est capable de réaliser cette réaction non canonique, qui se produit avec une efficacité bien inférieure à celle observée pour chacun des ARNt^{Ser} isoaccepteurs que compte la sérine (Amberg et coll., 1996; Leinfelder et coll., 1988; Ohama et coll., 1994). L'étape de conversion du séryl-ARNt^{Sec} en sélénocystéyl-ARNt^{Sec} est réalisée par la sélénocystéine synthase, une enzyme à pyridoxal phosphate qui utilise le sélénophosphate comme donneur de sélénium.

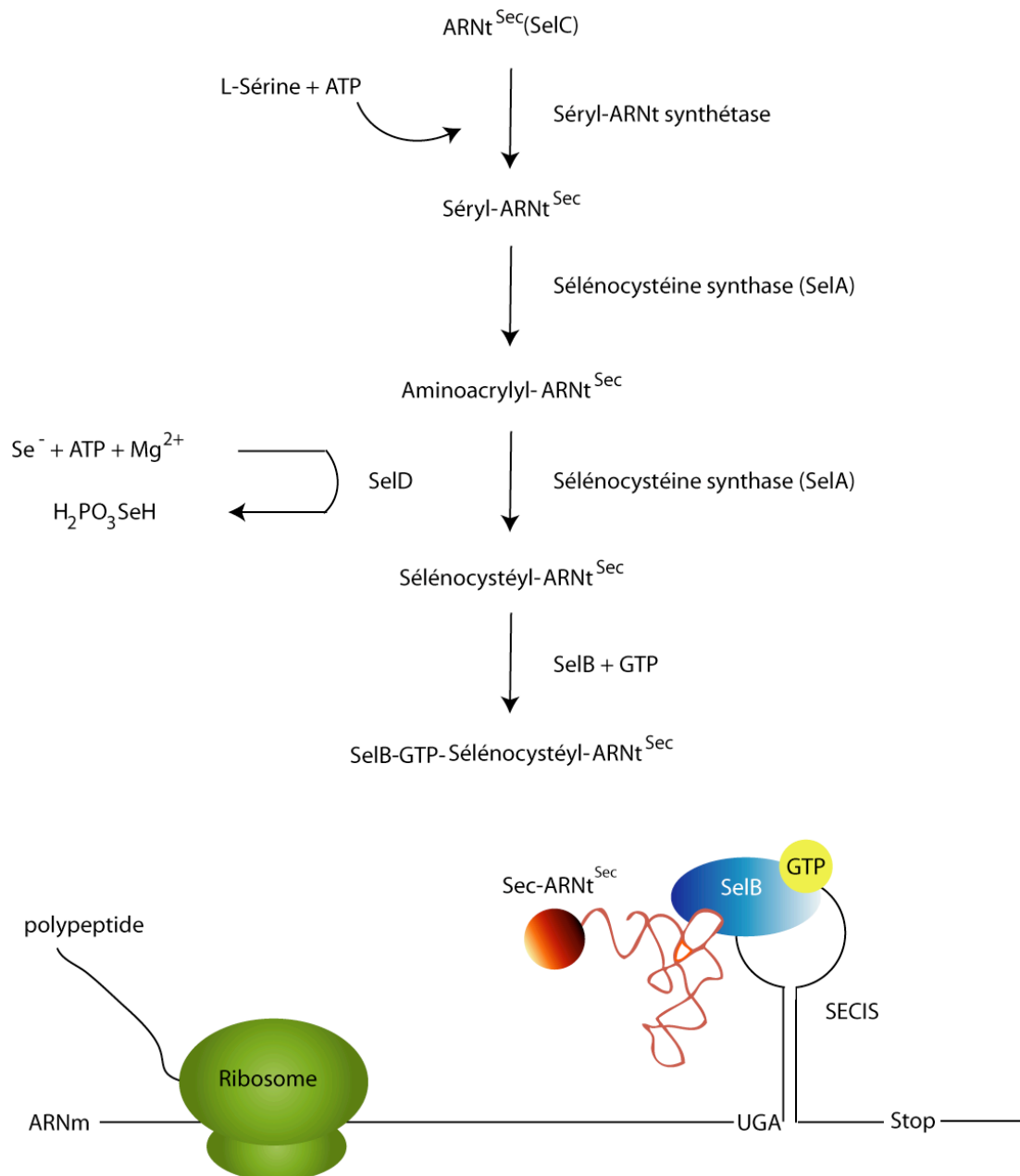


Figure 5: Biosynthèse et incorporation de la sélénocystéine chez les bactéries

Un résidu sérine est chargé sur l' ARNt^{Sec} (SelC) par la sérine-ARNt-synthétase. Le séryl- ARNt^{Sec} est converti en sélénocystéyl- ARNt^{Sec} par la sélénocystéine synthase (SelA). La réaction débute par la formation d'une liaison covalente entre le séryl- ARNt^{Sec} et le phosphate de pyridoxal de la sélénocystéine synthase, qui conduit à la libération d'une molécule d'eau et à la formation de l'intermédiaire aminoacrylyl- ARNt^{Sec} . Le sélénure d'hydrogène formé à partir de sélénophosphate, produit de la réaction catalysée par la sélénophosphate synthétase SelD, est utilisé pour finir la conversion en sélénocystéyl- ARNt^{Sec} . Cette dernière molécule est prise en charge par le facteur d'élongation spécialisé SelB (voir 3.2.2). L'incorporation du résidu sélénocystéine est alors réalisée en réponse à un codon UGA en phase. Ceci nécessite une structure en tige boucle conservée, l'élément SECIS (Selenocysteine Insertion Sequence), localisé directement en aval du codon sélénocystéine (voir 3.2.1).

Chez les bactéries, la sélénoprotéine SelD, une sélénophosphate synthétase, assure la formation du sélénophosphate à partir d'ATP et de sélénium réduit.

A ce jour, il n'a pas encore été possible d'isoler de sélénophosphate chez les eucaryotes ou les archaebactéries. Néanmoins, deux enzymes capables de catalyser la formation de ce composé ont été décrites: dans un premier temps, un ADN complémentaire de sélénophosphate synthétase (SPS1) a été cloné chez l'homme, présentant 32% d'homologie de séquence avec la protéine bactérienne (Low et coll., 1995). Plus tard, une autre enzyme humaine fut clonée et nommée SPS2 (Guimaraes et coll., 1996). Cette deuxième molécule est une sélénoprotéine, tout comme l'enzyme bactérienne SelD, ce qui suggère une activité catalytique supérieure à SPS1. SPS2 nécessitant, en tant que sélénoprotéine, la présence dans la cellule de sélénocystéine et de sélénophosphate, il a été proposé que SPS1 contribuerait à la biosynthèse d'un niveau basal de l'acide aminé particulier et interviendrait par conséquent dans une étape initiale de l'autorégulation de la synthèse de SPS2 (Figure 6A).

Le gène codant pour la sélénocystéine synthase bactérienne, ou protéine SelA, est regroupé avec un opéron incluant également la protéine SelB (Sawers et coll., 1991). Cet enzyme forme un complexe homodécamérique de 500 kDa (Tormay et coll., 1998).

Chez les archaebactéries et les eucaryotes, l'ARNt^{Sec} sérylé peut être phosphorylé sur l'hydroxyde de la sérine (Hatfield et coll., 1982). Cette activation du résidu sérine est considérée comme une étape requise avant la conversion en sélénocystéine (Mizutani, 1989), mais son importance demeure controversée. L'identification et la caractérisation d'une phosphoséryl ARNt^{Sec} kinase spécifique (Carlson et coll., 2004; Kaiser et coll., 2005) semble toutefois indiquer l'importance de cette phosphorylation. Bien que l'activité kinase ait pu être distinguée de l'activité de sélénylation (Mizutani et coll., 1991), aucune protéine présentant d'activité sélénocystéine synthase n'a pu être isolée à ce jour. Récemment, une protéine présentant des similitudes de séquence avec la protéine bactérienne a néanmoins été clonée chez *M. jannaschii*; elle ne permet cependant pas la conversion de sérine en sélénocystéine *in vitro* (Kaiser et coll., 2005). Chez les eucaryotes, l'activité sélénocystéine synthase a pu être détectée dans différents extraits protéiques (Mizutani et coll., 2000), mais c'est une protéine découverte il y a plus de 10 ans chez les mammifères qui attire à nouveau l'attention. Cette protéine se retrouve dans une particule ribonucléoprotéique contenant l'ARNt^{Sec} et est impliquée dans une hépatite chronique auto-immune (Gelpi et coll., 1992).

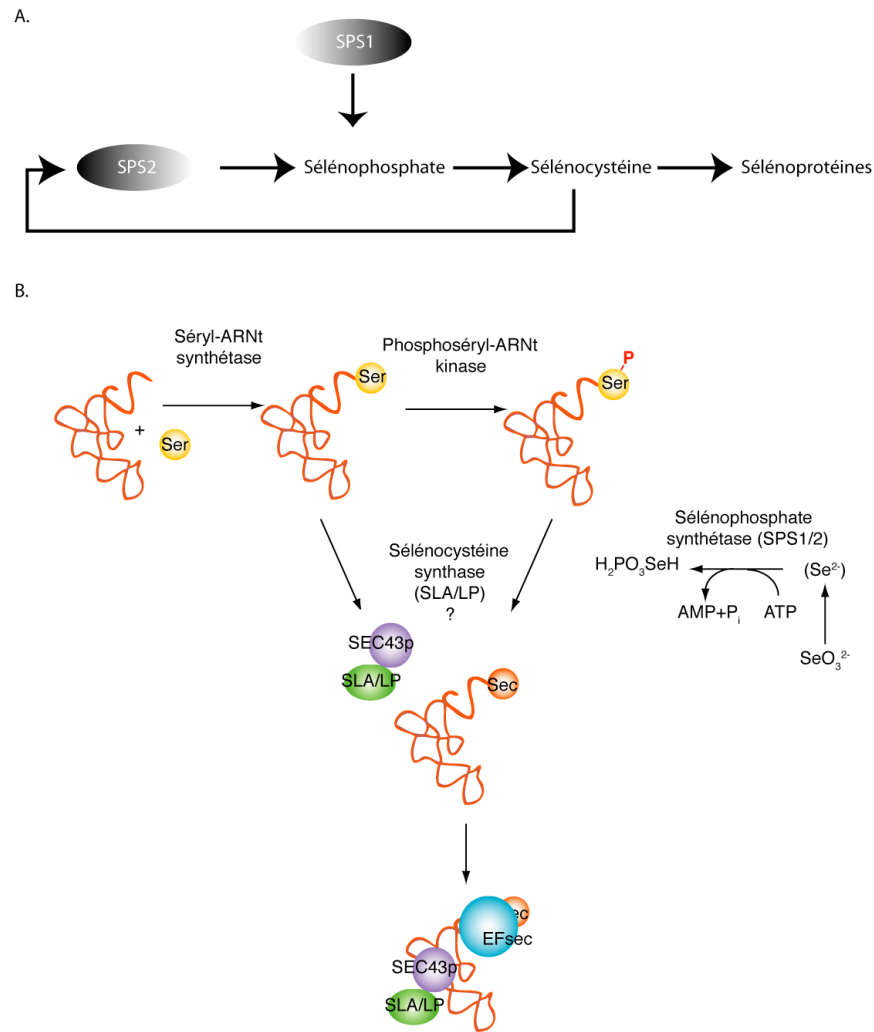


Figure 6: Mécanisme de biosynthèse de sélénocystéine chez les eucaryotes

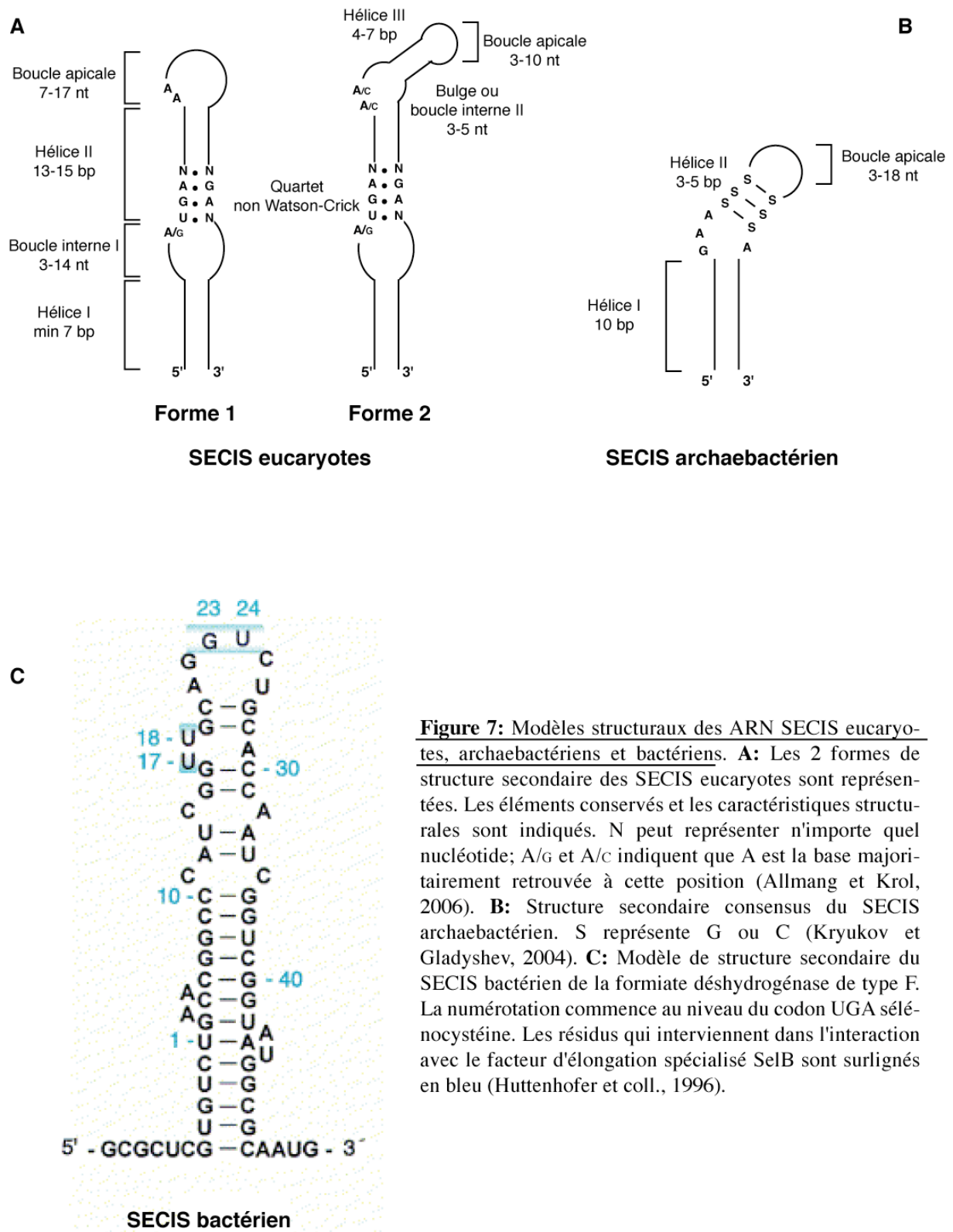
A: Boucle de rétro-régulation de la sélénophosphate synthétase 2 et mécanisme proposé pour la synthèse de sélénophosphate par les SPS1 et 2. **B:** Un résidu sérine est chargé sur l'ARNt^{Sec} par la séryl-ARNt-synthétase, puis phosphorylé par la phosphoséryl-ARNt kinase. Il n'a pas été établi si la conversion en sélénocystéine s'effectue directement ou via l'intermédiaire phosphorylé. Il reste à déterminer si l'activité sélénocystéine synthase est portée par la protéine SLA/LP seule ou complexée à la protéine SECp43. Dans les 2 cas, la synthèse de sélénophosphate est nécessaire. Enfin, une dernière question restant en suspens est de savoir si le facteur d'élongation spécifique EFsec peut se lier à l'ARNt^{Sec} seul ou associé au complexe SLA/LP-SECp43.

Elle est appelée SLA/LP pour Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas et son ADNc a depuis été cloné (Costa et coll., 2000; Wies et coll., 2000). Une approche bioinformatique a même permis de démontrer qu'elle présentait une architecture similaire aux protéines de la famille des transférases pyridoxal dépendantes (Kernebeck et coll., 2001), ce qui serait en faveur d'une activité sélénocystéine synthase potentielle. De plus, il a été démontré que SECp43 et SLA/LP co-existaient *in vivo* dans un complexe avec l'ARNt^{Sec} (Xu et coll., 2005).

3.2. Les partenaires de la machinerie d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines

3.2.1. L'élément SECIS

Cette structure secondaire conservée, indispensable pour la reprogrammation du codon UGA sélénocystéine, diffère selon le phylum considéré, aussi bien en séquence et en structure qu'en ce qui concerne sa localisation sur l'ARN messager (Figure 7). L'élément SECIS fut initialement délimité chez les bactéries comme une région de 27 nt située dans la phase ouverte de lecture, immédiatement en aval du codon UGA dans tous les cas (Figure 5), requise pour l'incorporation de sélénocystéine (Zinoni et coll., 1990). Chez les eucaryotes et les archaeobactéries, l'élément SECIS est localisé dans la région 3' non traduite des ARN messagers de sélénoprotéines, à une distance pouvant varier de 300 nt à plusieurs kb du codon UGA sélénocystéine (Figure 8) (Berry et coll., 1991; Rother et coll., 2001b). Des études effectuées dans les 3 règnes ont permis de déterminer les caractéristiques de séquences et structurales qui sont importantes pour l'incorporation de sélénocystéine (Krol, 2002). Chez les bactéries, la boucle apicale est impliquée dans la liaison du facteur de traduction spécifique SelB (Huttenhofer et coll., 1996). La tige est très variable en séquence mais sa longueur est strictement conservée (Bock, 2001; Engelberg-Kulka et coll., 2001). Chez les eucaryotes, la suppression de l'élément SECIS, situé dans la partie 3' non traduite des ARN messagers, abolit complètement la synthèse des sélénoprotéines (Berry et coll., 1993). Les SECIS eucaryotes se présentent sous la forme de deux hélices séparées par une bulle interne, surmontées d'une boucle apicale. Ils sont très variables en séquence, mais se caractérisent toutefois par deux éléments d'importance capitale: le premier correspond à la présence de deux résidus adénines adjacentes suivies d'une purine ou d'une cytosine au niveau de la boucle apicale. Dans un modèle alternatif de l'élément SECIS, différant du SECIS classique par son extrémité apicale, une troisième hélice est présente, relocalisant ces 3 résidus dans une boucle interne (Figure 7A). Le deuxième élément fonctionnel important est un quartet de paires de bases non Watson-Crick, situé dans l'hélice supérieure (Walczak et coll., 1996). Dans ce quartet, le tandem des paires de bases G-A sheared joue un rôle fondamental (Walczak et coll., 1998). Un tel motif a ensuite été décrit dans les structures des ARN ribosomiques ou des sn et snoARN, constituant un motif récurrent de type « kink-turn » ou « K-turn », et il a été proposé que l'ARN SECIS pouvait lui aussi adopter une structure de ce type (Allmang et Krol, 2006a). Seule sa structure consensus est représentée sur la Figure 7A.



La conservation structurale des éléments SECIS a permis l'identification de nouvelles sélénoprotéines par des approches bioinformatiques; ces approches seront développées plus longuement par la suite (Kryukov et coll., 2003; Kryukov et coll., 1999; Lescure et coll., 1999).

Enfin, chez les archaeobactéries, l'élément SECIS localisé lui aussi dans la région 3' non traduite des ARN messagers de sélénoprotéines, diffère de l'élément eucaryote par l'absence du quartet de paires de bases non canoniques de la deuxième hélice (Kryukov et Gladyshev, 2004). Dans un cas, l'élément SECIS a été trouvé dans la région 5' non traduite du messenger (Rother et coll., 2001a; Wilting et coll., 1997), ce qui correspond à une situation exceptionnelle.

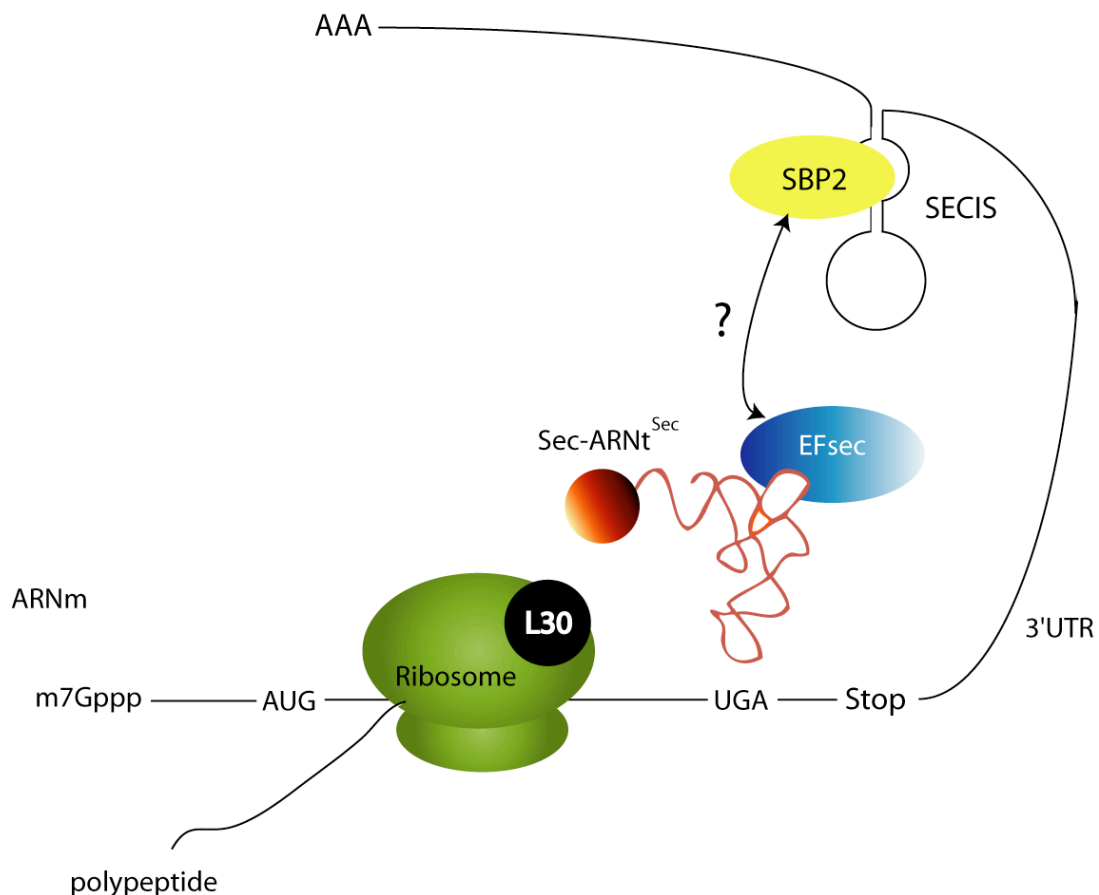


Figure 8: Les partenaires de l'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes

Le sélénocystéyl-ARNt^{Sec} est pris en charge par le facteur d'élongation spécialisé EFsec. L'élément SECIS est reconnu par la protéine SBP2, qui forme un complexe ARNt^{Sec} dépendant avec EFsec. La protéine L30, récemment identifiée comme composante de la machinerie d'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes, est une protéine ribosomique.

3.2.2. Les partenaires protéiques

Chez les bactéries, pour lesquelles le processus d'incorporation de sélénocystéine est entièrement résolu (Figure 5), le dernier partenaire non encore décrit en détail est la protéine SelB, le facteur de traduction spécifiquement dédié à cette tâche (Forchhammer et coll., 1989). SelB est composée de deux domaines: le domaine N-terminal présente de fortes similarités de séquence avec son homologue fonctionnel EF-Tu (Figure 9B) (Bock, 2001). Ces homologies correspondent aux domaines de liaison à l'ARNt, au GTP et au ribosome. Un domaine C-terminal permet la reconnaissance de l'élément SECIS au niveau d'un nombre restreint de nucléotides de la partie apicale de la tige boucle. Ainsi convoyé par SelB, le sélénocystéyl-ARNt^{Sec} peut être dirigé vers le site A du ribosome pour réaliser la reprogrammation du codon UGA (Figure 5).

Chez les archaebactéries et les eucaryotes, les mécanismes d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines ne sont pas encore totalement élucidés. Dans ces organismes, les fonctions de la protéine SelB bactérienne sont assurées par au moins deux protéines. Les facteurs d'élongation sélénocystéine spécifiques ont été caractérisés chez *M. jannaschii* (MjSelB) et la souris (mSelB ou EFsec) (Fagegaltier et coll., 2000; Rother et coll., 2000; Tujebajeva et coll., 2000a). MjSelB et EFsec présentent deux domaines (Figure 9): le domaine N-terminal correspond à l'homologue fonctionnel du facteur d'élongation de la traduction conventionnel EF1-A, comme chez les bactéries, mais le domaine C-terminal additionnel n'est pas capable de se lier spécifiquement à l'ARN SECIS. Aucune protéine se liant au SECIS n'a pu être trouvée jusqu'à présent chez les archaebactéries. Chez les eucaryotes, cette fonction est assurée par SBP2, pour SECIS Binding Protein 2, une protéine capable de se lier spécifiquement à l'élément SECIS (Figure 8 et 9A) (Copeland et coll., 2000; Lescure et coll., 2002a). La séquence en acides aminés de la protéine SBP2 peut grossièrement être subdivisée en 2 parties égales. Aucune fonction n'a jusqu'à présent pu être attribuée à la région N-terminale. La partie C-terminale contient le domaine de liaison à l'élément SECIS. Un domaine putatif d'interaction avec le ribosome est également présent (Caban et Copeland, 2006). La comparaison de la séquence en acides aminés de SBP2 aux banques de données protéiques a permis d'observer de façon intéressante que le domaine de liaison au SECIS contenait le module L7A/L30. Ce domaine protéique est présent par exemple dans des protéines ribosomiques liant des structures d'ARN de type « K-turn » (Allmang et coll., 2002; Copeland et coll., 2000).

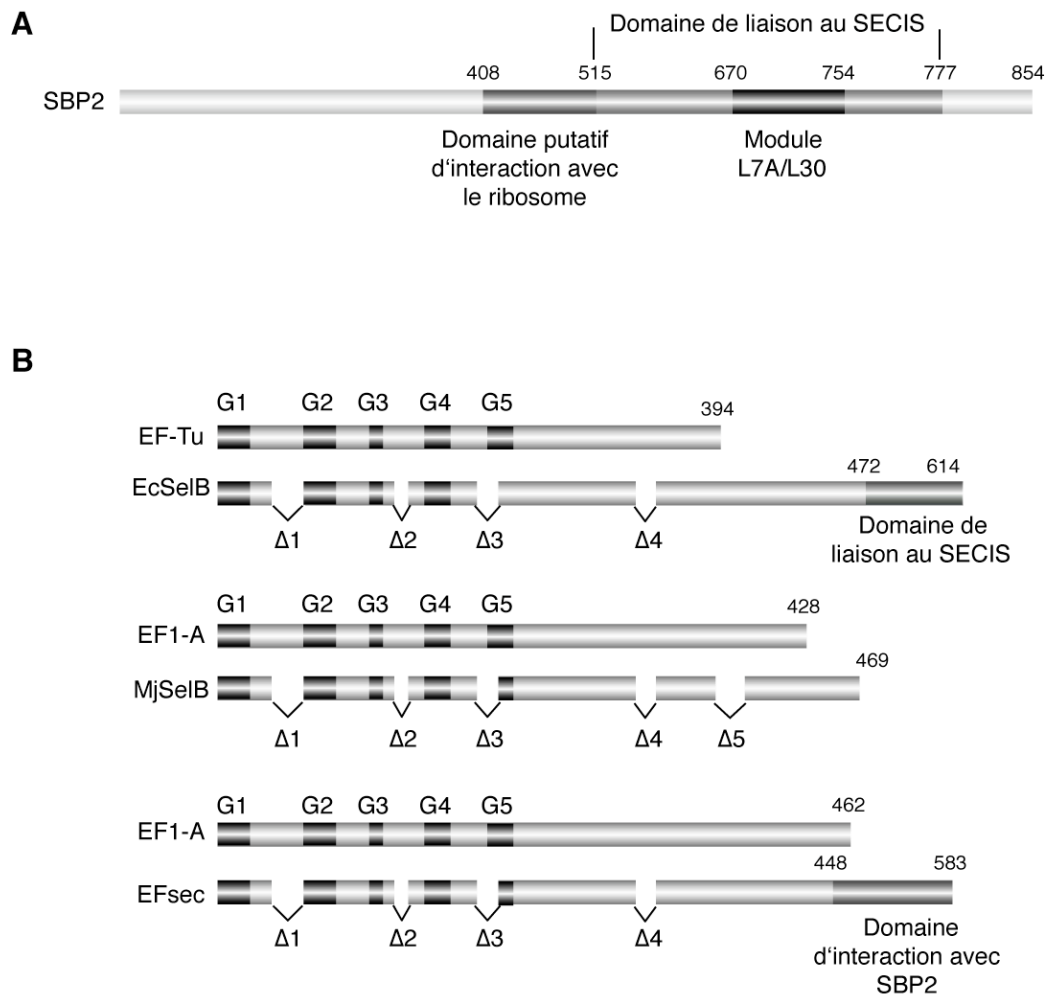


Figure 9: Protéines impliquées dans la synthèse des sélénoprotéines

A: Représentation de la protéine SBP2. Les domaines d'interaction avec l'élément SECIS, le module L7A/L30 et le domaine putatif d'interaction avec le ribosome sont représentés. Les régions N (1-408) et C-terminales (777-854) sont de fonction inconnue. **B:** Représentation des facteurs d'élongation spécialisés de *E. coli* (EcSelB), *M. jannaschii* (MjSelB) et eucaryote (EFsec); comparaison avec les facteurs d'élongation canoniques EF-Tu et EF1-A. Les régions additionnelles correspondent à un domaine de liaison à l'élément SECIS pour EcSelB et à SBP2 pour EFsec. Les domaines de liaison au GTP sont indiqués (G1-5), ainsi que les domaines des facteurs classiques absents dans les facteurs spécialisés (Δ1-5).

Les deux facteurs SBP2 et EFsec ont été trouvés dans un complexe de 500 kDa isolé à partir d'extraits de cellules de mammifères. Cette association est dépendante de l'ARNt^{Sec} (Tujebajeva et coll., 2000a; Zavacki et coll., 2003). *In vitro*, une interaction indépendante de l'ARNt^{Sec} n'est possible qu'avec l'extrémité C-terminale de EFsec. Ceci laisse supposer un rôle important de cette région de la protéine dans l'interaction protéine-protéine avec SBP2 (Figure 8).

Enfin, il a été montré récemment que la protéine ribosomique L30 était un composant à part entière de la machinerie de synthèse des sélénoprotéines (Chavatte et coll., 2005). Cette protéine est également capable de se lier au quartet de paires de bases non canoniques de l'élément SECIS *in vivo* et *in vitro*, mais son intervention dans la machinerie d'incorporation de sélénocystéine reste encore floue (Figure 10) (Halic et coll., 2005; Kinzy et coll., 2005). L'implication d'une protéine ribosomique dans le mécanisme d'incorporation de sélénocystéine s'intègre toutefois dans l'idée proposée par certains auteurs qu'un certain nombre de protéines ribosomiques, de fonction encore évasive, pourraient agir en dehors du ribosome dans des mécanismes de traduction non conventionnels.

La somme des poids moléculaires des éléments identifiés jusqu'à présent étant inférieure au poids moléculaire du complexe de 500 kDa contenant EFsec et SBP2, on peut s'attendre à l'identification de facteurs supplémentaires restant à caractériser.

3.3. Aspects régulationnels

En examinant le mécanisme de synthèse des sélénoprotéines dans son ensemble, on comprend que la diminution du taux de sélénium disponible entraînera une baisse de la quantité de sélénocystéyl-ARNt^{Sec} formé et donc l'arrêt prématuré de la traduction des sélénoprotéines. Toutefois, tout composant de la machinerie d'incorporation de sélénocystéine peut constituer le facteur limitant du système. Il a ainsi été observé que la surexpression sélective d'un seul des facteurs impliqués était en fait contre-productive pour la synthèse des sélénoprotéines car elle déstabilisait le fragile équilibre de l'ensemble (Grundner-Culemann et coll., 2001; Tormay et Bock, 1997; Tormay et coll., 1996; Tujebajeva et coll., 2000b).

Chez les eucaryotes, il semblerait que la protéine SBP2 soit le facteur limitant. En effet, le taux d'expression d'une sélénoprotéine le plus important jamais observé est celui de la glutathion peroxydase 4 dans les spermatozoïdes (Maiorino et coll., 1998); c'est justement dans les tissus testiculaires que SBP2 est fortement exprimée, alors qu'elle est quasiment indétectable dans les autres tissus (Copeland et coll., 2000; Lescure et coll., 2002a). La surexpression de SBP2 dans le testicule suggère son rôle essentiel dans la biosynthèse de fortes quantités de sélénoenzymes dans cet organe.

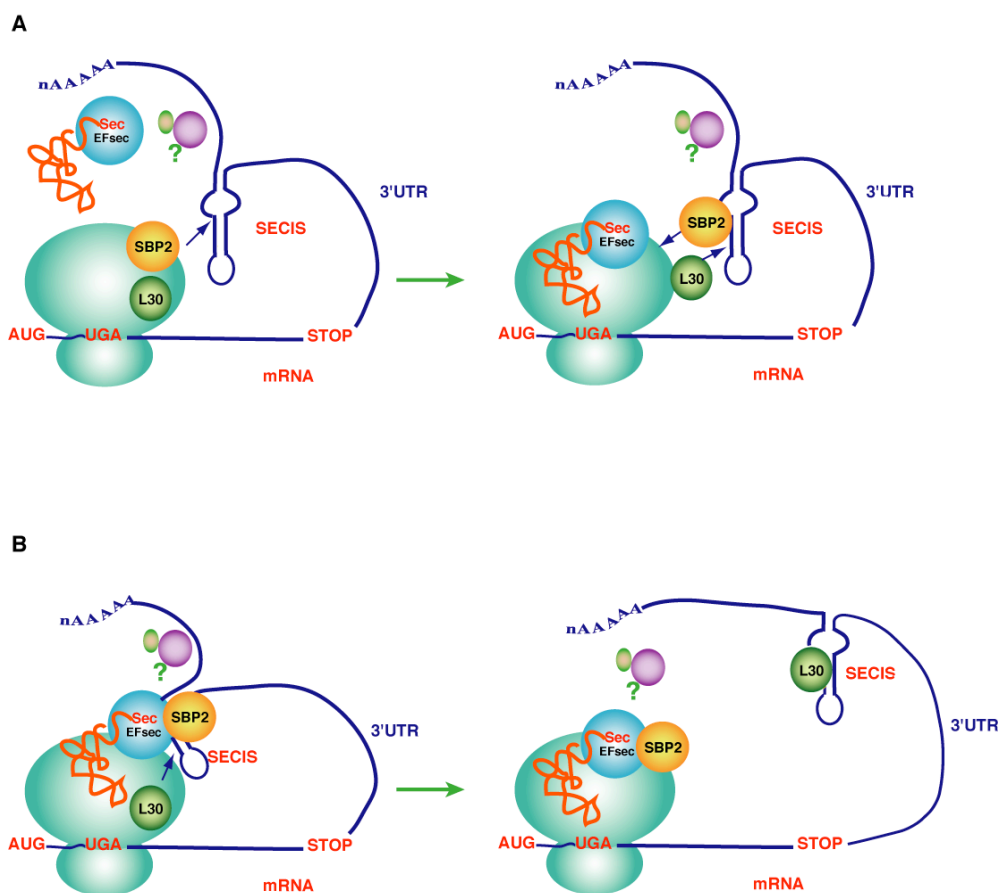


Figure 10: Deux modèles d'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes

A: La protéine SBP2 est liée au ribosome, puis interagit avec l'élément SECIS et le complexe entre EFsec et le sélénocystéyl-ARNt^{Sec}, afin d'amener ce dernier au site A du ribosome. Finalement la protéine L30 déplace la protéine SBP2 liée à l'élément SECIS (Kinzy et coll., 2005). **B:** Le complexe EFsec/sélénocystéyl-ARNt^{Sec} est recruté au niveau de l'élément SECIS par la protéine SBP2. L'échange entre la protéine SBP2 et la protéine ribosomique L30 permet d'amener le sélénocystéyl-ARNt^{Sec} au site A du ribosome (Chavatte et coll., 2005). Dans les 2 modèles, la protéine L30 doit quitter le ribosome afin de permettre le recyclage du système. Les flèches indiquent les mouvements des différents partenaires. D'autres facteurs putatifs, n'ayant pas été identifiés à ce jour, pourraient être impliqués et sont symbolisés par des points d'interrogation.

De plus, un autre phénomène intéressant correspond à ce qu'il est maintenant courant d'appeler la hiérarchie de synthèse des sélénoprotéines, qui consiste en une réponse différente pour chaque sélénoprotéine en cas de carence en sélénium. Les mécanismes de cette hiérarchie sont toutefois peu clairs (Behne et Kyriakopoulos, 1993; Sunde, 2001). Comme cela vient d'être évoqué, SBP2 définirait la capacité maximale de biosynthèse des sélénoprotéines chez les mammifères. La mise en place d'une hiérarchie de synthèse des sélénoprotéines devrait donc également en dépendre. L'implication de l'accumulation tissu spécifique de sélénium ou d'ARNm a aussi été évoquée (Burk et Hill, 1993; Weiss Sachdev et Sunde, 2001). Il a été observé qu'une diminution de la quantité de sélénium disponible avait

pour conséquence non seulement un arrêt prématuré de la traduction des sélénoprotéines, mais aussi la disparition de l'ARNm correspondant après une certaine durée, différente pour chaque sélénoprotéine. Ce phénomène serait dû à une instabilité de l'ARNm plutôt qu'à un processus de transcription dépendant du sélénium (Baker et coll., 1993). Des événements de NMD (nonsense mediated decay) pourraient expliquer cette observation du fait de la présence d'un codon UGA dans la phase ouverte de lecture, interprétable comme une erreur de transcription (Moriarty et coll., 1998). Toutefois cette explication ne peut pas être la seule responsable de l'instabilité observée des ARNm de sélénoprotéines. Effectivement, cette voie de dégradation des ARN est hautement dépendante de la distance entre le codon UGA et la jonction intron/exon la plus proche (Maquat, 2001). Or, certains auteurs ont démontré que des différences de stabilité existaient entre des molécules pour lesquelles ces distances étaient similaires. Par contre, la comparaison entre l'efficacité de différents éléments SECIS à interagir avec la protéine SBP2 et la stabilité respective des messagers de sélénoprotéines correspondants semblerait indiquer que la liaison de cette protéine à l'élément SECIS pourrait protéger l'ARN de la dégradation (Flohe et coll., 1997; Wingler et coll., 1999). Là encore, la protéine SBP2, et sa possible affinité différentielle selon l'élément SECIS considéré, pourrait constituer l'élément régulateur clé de la protection du messager et de ce fait de la hiérarchie de synthèse (Berry, 2005; Berry et coll., 2001).

Ainsi, l'importance fonctionnelle de SBP2 chez l'homme a pu être illustrée par deux autres observations décrites récemment: des patients, présentant une mutation dans le gène codant pour SPB2, développent un défaut de maturation de l'hormone thyroïdienne dû à la chute d'activité d'une sélénoprotéine (Dumitrescu et coll., 2005). Le second exemple correspond à une mutation pathologique dans le quartet de paires de bases non canoniques de l'élément SECIS du gène de la sélénoprotéine N observée chez des patients atteints de dystrophie musculaire congénitale. Cette mutation empêche la fixation de SBP2 sur la tige boucle, ce qui donne lieu à la synthèse d'une sélénoprotéine tronquée non fonctionnelle. Des expériences complémentaires ont montré que le messager correspondant était déstabilisé, suggérant que SBP2 empêche l'adressage du messager vers les voies de dégradation du NMD (Allamand et coll., 2006).

3.4. Les sélénoprotéines procaryotes

3.4.1. Les sélénoprotéines bactériennes

Les sélénoprotéines bactériennes peuvent être classées en deux groupes: dans un premier groupe, le sélénium est présent sous forme coordonnée ou d'un résidu sélénométhionine incorporé aléatoirement. (voir au 2.2.2.a). Le deuxième groupe, majoritaire, comprend les sélénoprotéines dont l'atome de sélénium est retrouvé sous la forme d'un résidu sélénocystéine, et fera seul l'objet de cette partie.

3.4.1.a. La famille des formiates déshydrogénases

Chez *E. coli*, trois formiates déshydrogénases ont été identifiées. Elles catalysent la réaction de transformation de l'acide formique en dihydrogène et dioxyde de carbone.

La formiate déshydrogénase N (FDH_N) est un membre du complexe nitrite réductase, qui se compose de trois éléments en tout: la FDH_N, la nitrate réductase et la quinone. Cet ensemble constitue la voie majeure d'anaérobiose chez la bactérie (Enoch et Lester, 1974). La FDH_N est composée de trois sous-unités, dont la première est une sélénoprotéine, les deux suivantes correspondant au cytochrome b₅₅₆ et à une protéine constituée de quatre motifs riches en cystéine. Les gènes qui codent pour les trois sous-unités sont organisés en un opéron inductible en conditions anaérobies (Berg et Stewart, 1990).

La deuxième formiate déshydrogénase (FDH_H) appartient au complexe formiate hydrogène lyase (Cox et coll., 1981). Des études cristallographiques de cette protéine ont montré que l'atome de sélénium du résidu sélénocystéine était directement coordonné à un atome de molybdène, localisé dans le site actif, et impliqué dans l'activité catalytique de l'enzyme (Boyington et coll., 1997). Trois autres enzymes bactériennes contenant du sélénium sous une autre forme que la sélénocystéine mais liées au molybdène, ont été décrites. Le sélénium est incorporé dans ces enzymes après la traduction, et y est considéré uniquement comme un cofacteur dissociable. Ces enzymes sont l'hydroxylase de l'acide nicotinique de *Clostridium barkeri*, la monoxyde de carbone déshydrogénase d'*Oligotropha carboxivorans* et la xanthine déshydrogénase de *Eubacterium barkeri* (Dobbek et coll., 1999; Gladyshev et coll., 1996; Schrader et coll., 1999).

Enfin, la troisième formiate déshydrogénase (FDH_O) est un monomère dont le gène a été localisé dans le même opéron que celui de la sélénophosphate synthétase, SelD. Cette protéine est le constituant majeur de la formiate oxydase (Sawers et coll., 1991).

FDH_N et FDH_H ont également été trouvées chez *Salmonella typhimurium*. Chez *Methanococcus vaniellii* et *Clostridium thermoaceticum*, il existe aussi des formiates déshydrogénases, dont les gènes n'ont toutefois pas été clonés.

3.4.1.b. La famille des hydrogénases

La première de ces enzymes fut identifiée chez *M. vaniellii*. Il s'agit d'un hétéro-octamère de trois sous-unités, dont l'une contient un résidu sélénocystéine. L'atome de sélénium y est coordonné à un atome de nickel au niveau du site actif. Les hydrogénases catalysent la réaction de clivage du dihydrogène en 2 protons et 2 électrons. Cette réaction est en partie possible grâce au potentiel catalytique élevé du sélénium (Garcin et coll., 1999). Des enzymes similaires ont été observées chez *Methanobacterium thermoautotrophicum* et *Desulfovibrio baculatus*.

3.4.1.c. La sélénoprotéine D (SelD)

Cette sélénophosphate synthétase de 37 kDa impliquée dans la synthèse de sélénocystéine a été décrite dans le paragraphe 3.1.2. (Guimaraes et coll., 1996; Stadtman, 1996).

3.4.1.d. Les sélénoprotéines des complexes réductase

Les trois complexes glycine réductase, sarcosine réductase et bétaine réductase de *Eubacterium acidaminophilum* sont composés d'une sélénoprotéine A identique, et d'une sélénoprotéine B spécifique pour chaque substrat (Andreesen et Ljungdahl, 1973; Wagner et coll., 1999). Ces complexes catalysent la réduction de leur substrat par désacétylation, ce qui permet la synthèse d'ATP. Elles jouent donc un rôle important dans le métabolisme énergétique (Andreesen et coll., 1999; Sliwowski et Stadtman, 1988). La proline réductase du même organisme est également une sélénoprotéine, assez similaire à la protéine B du complexe glycine réductase. Les complexes réductase existent également chez *Clostridia* (Turner et Stadtman, 1973).

3.4.1.e. La sélénoperoxi-rédoxine

Une enzyme de la famille des peroxy-rédoxines a été identifiée avec un résidu sélénocystéine à la place du résidu cystéine classique chez *E. acidaminophilum* (Andreesen et coll., 1999). Ces enzymes sont impliquées dans la réduction des hydroperoxydes.

3.4.2. Les sélénoprotéines archaébactériennes

Bien que le mécanisme d'incorporation de sélénocystéine chez les archaébactéries soit plus similaire à celui observé chez les eucaryotes, les sélénoprotéines archaébactériennes sont plus proches de celles trouvées chez les bactéries. Il avait été démontré que les archaébactéries méthanogènes proliféraient mieux en présence de sélénium (Rother et coll., 2001b). Chez *M. jannaschii*, sept sélénoprotéines ont été identifiées dont six impliquées dans la méthanogenèse (Bult et coll., 1996; Wilting et coll., 1997): ceci inclut trois hydrogénases, une formiate déshydrogénase, une disulfure réductase et une formylméthanofurane déshydrogénase. La dernière est la sélénophosphate synthétase. Chez *M. jannaschii*, ces enzymes sont obligatoirement des sélénoprotéines alors que chez *Methanococcus voltae*, *Methanococcus vanielii* ou *Methanopyrus kandleri*, des protéines homologues à cystéine peuvent être retrouvées, ce qui explique l'influence moindre du sélénium dans ces organismes (Halboth et Klein, 1992; Jones et coll., 1979; Sorgenfrei et coll., 1997; Vorholt et coll., 1997; Yamazaki, 1982).

3.4.3. Le sélénoprotéome procaryote

En 2004 et 2005, le groupe de V. Gladyshev à l'université du Nebraska a largement contribué à l'identification exhaustive du sélénoprotéome procaryote (Tableau 3) (Kryukov et Gladyshev, 2004; Zhang et coll., 2005). Ces études sont basées sur deux types d'approches bioinformatiques: la première consiste en la recherche d'éléments SECIS dans les banques de données des génomes bactériens et archaébactériens entièrement séquencés. L'autre approche vise à identifier des paires sélénocystéine/cystéine d'une même protéine dans des séquences homologues retrouvées dans ces mêmes banques de données. Alors qu'il avait été suggéré que l'ensemble des sélénoprotéines procaryotes avaient été identifiées avant cette étude, consistant en une dizaine de molécules (voir 3.4.1 et 3.4.2), plusieurs nouvelles sélénoprotéines ont pu être caractérisées. En effet, l'annotation systématique des génomes n'avait envisagé le codon UGA que comme un codon stop, résultant en des erreurs d'annotation des gènes de

Nom de la protéine	Génomes bactériens	Génomes archaebactériens
Sélénoprotéines connues		
Formiate déshydrogénase α (FDH _N)	37	3
Formylméthanofurane déshydrogénase B	0	2
Coenzyme F420-réductrice hydrogénase α	0	3
Méthylviologène-réductrice hydrogénase α	3	2
Coenzyme F420-réductrice hydrogénase δ	2	3
Hétérosulfide réductase A	1	2
Sélénophosphate synthétase	17	2
Peroxi-rédoxine (Prx)	2	0
Glycine réductase A	9	0
Glycine réductase B	8	0
Proline réductase	3	0
Nouvelles sélénoprotéines		
Protéine du métabolisme Fer-Soufre (HesB)	5	1
Thiorédoxine	4	0
Thiol-disulfure oxydoréductase de type Prx	3	0
Protéine de type SelW	3	0
Glutathion peroxydase	1	0
Sélénoprotéines putatives		
Glutarédoxine (Grx)	1	0
Protéine similaire à la Peroxi-rédoxine	1	0
Protéine de conversion thiol-disulfure (Dsb)	1	0
Protéine de type Dsb (disulfide bond)	1	0
Oxydoréductase Fer-Soufre	1	0
Protéine de type Dsr (disulfide reduction)	1	0
NADH oxydase	1	0
Peroxydase/peroxynitrite réductase	1	0

Tableau 3: Le sélénoprotéome procaryote selon Kryukov et coll. (Kryukov et Gladyshev, 2004)

Les noms des différentes sélénoprotéines sont indiqués, ainsi que le nombre de génomes bactériens ou archaebactériens dans lesquels elles ont été trouvées. Onze sélénoprotéines connues ont pu être identifiées, ainsi que 5 nouvelles sélénoprotéines (sur la base de leur caractérisation dans plusieurs génomes et la présence d'éléments SECIS putatifs) et 8 sélénoprotéines potentielles (sur la base de leur identification dans 1 seul génome et la présence d'éléments SECIS putatifs). Les protéines identifiées lors de l'analyse complémentaire de la population microbienne globale de la mer des Sargasses ne sont pas représentées (Zhang et coll., 2005).

sélénoprotéines. Certaines des nouvelles sélénoprotéines identifiées n'ont été caractérisées que dans un nombre restreint de génomes, suggérant une évolution récente à partir d'homologues à cystéine, plus fréquemment trouvés; c'est le cas par exemple de la thiorédoxine. Au contraire, les formiate déshydrogénases, présentes dans la plupart des génomes, ont une origine plus ancienne. Parmi les nouvelles sélénoprotéines identifiées lors de l'étude génomique de la population microbienne globale de la mer des Sargasses (Zhang et coll., 2005), il est surprenant d'observer la présence de glutathion peroxydases, de désiodases et de sélénoprotéines de type W, que l'on pensait d'origine eucaryote (voir 3.5). Leur origine bactérienne est maintenant fortement soupçonnée et leurs fonctions seront évoquées plus en détail dans la partie suivante. Toutefois, il semble évident que la désiodase, dont la fonction est d'activer ou d'inactiver l'hormone thyroïdienne chez les mammifères par des réactions d'oxydoréduction, possède une fonction différente chez les bactéries, mais utilisant les mêmes propriétés catalytiques.

3.5. Les sélénoprotéines eucaryotes

Dans cette partie, nous ne nous consacrerons qu'aux sélénoprotéines humaines qui sont au nombre de vingt-cinq (voir Tableau 1 dans l'article de revue numéro 1, intitulé « Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function », (Rederstorff et coll., 2006)).

Les premières sélénoprotéines identifiées dans les années 70 chez les mammifères furent les protéines de la famille des glutathion peroxydases. Depuis, grâce à des approches *in silico*, le répertoire quasi exhaustif des sélénoprotéines humaines a pu être déterminé (Driscoll et Chavatte, 2004; Kryukov et coll., 2003; Kryukov et coll., 1999; Lescure et coll., 1999; Lescure et coll., 2002b). Les sélénoprotéines partagent peu de similitudes de séquences et leur grande diversité reflète leur implication dans des fonctions biologiques diverses qui n'ont pas encore été déterminées pour certaines d'entre elles. Les sélénoprotéines ne constituent pas une famille de protéines au sens strict du terme, puisqu'elles ne dérivent pas d'un ancêtre commun; toutefois, elles partagent des propriétés physico-chimiques communes. Dans l'impossibilité de les classer en les regroupant selon des données structurales ou fonctionnelles, elles seront décrites suivant une classification alphabétique (Tableau 4).

Sélénoprotéine	Position chromosomique	Nombre de résidus	Position du résidu Sélénocystéine
15kDa	1p22.3	162	93
DIO1	1p32	249	126
DIO2	14q24.2	265	133
DIO3	14q32	278	144
GPx1	3p21.31	201	47
GPx2	14q23.3	190	40
GPx3	5q33.1	226	73
GPx4	19p13.3	197	73
GPx6	6p22.1	221	73
H	11q12.1	122	44
I	2p23.3	397	387
K	3p21.31	94	92
M	22q12.2	145	48
N	1p35.36	556	428
O	22q13.33	669	667
P	5p12	381	59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378
S	15q26.3	189	188
SPS2	16p11.2	448	60
T	3q24	182	36
TRx1	12q23.3	499	498
TRx2	3p13	655	656
TRx3	22q11.21	523	522
V	19q13.13	346	273
W	19q13.32	87	13
MsrB (X/R)	16p13.3	116	95

Tableau 4: Les sélénoprotéines humaines

La position sur le chromosome est indiquée. Le nombre de résidus et la position de l'acide aminé sélénocystéine dans la protéine sont donnés.

3.5.1. La sélénoprotéine de 15 kDa (Sel15)

La première description de la sélénoprotéine de 15 kDa fut réalisée suite à des expériences de radiomarquage au ^{75}Se dans la prostate (Behne et coll., 1997). Elle est principalement exprimée dans la prostate, le cerveau, le rein et le foie. La protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique, et forme un complexe avec l'UDP-glucose-glycoprotéine glucosyltransférase (GT) (Korotkov et coll., 2001; Labunskyy et coll., 2005), une enzyme dont la fonction est d'empêcher le transport de glycoprotéines mal repliées hors du réticulum endoplasmique et de les orienter vers des voies de dégradation (Arnold et coll., 2000). L'interaction de Sel15 avec cette protéine laisse fortement penser qu'elle pourrait être impliquée dans le contrôle qualité précédant le transport des protéines hors du réticulum, mais les preuves de cette fonction restent à démontrer. Il faut noter toutefois qu'un nouveau domaine riche en cystéines localisé dans sa région N-terminale a été mis en évidence dans la séquence de Sel15, et est nécessaire pour l'interaction avec la GT (Labunskyy et coll., 2005). Un homologue de Sel15, la sélénoprotéine M, ne possède pas ce domaine et est incapable de se lier à la GT. L'étude structurale par résonance magnétique nucléaire en solution de ces deux protéines a permis de les regrouper au sein d'une nouvelle famille de type thiorédoxine (Ferguson et coll., 2006). Au cours de cette dernière étude, l'activité d'oxydoréduction des deux protéines a été vérifiée.

3.5.2. La famille des désiodases (DIO)

La première désiodase identifiée comme sélénoprotéine fut, en 1990, la désiodase de type 1 (DIO1) (Behne et coll., 1990). Les désiodases permettent de cliver une liaison carbone-iode dans les hormones thyroïdiennes, régulant ainsi leur activité (Figure 11). Ces hormones thyroïdiennes sont d'une importance cruciale pour la santé humaine et la régulation de la plupart des fonctions métaboliques (Bianco et coll., 2002). La fonction thyroïdienne dépend donc de deux oligo-éléments essentiels, l'iode et le sélénium; ce dernier est présent dans la glande thyroïde avec les plus forts taux par gramme d'organe, sous la forme de désiodases mais aussi de glutathion peroxydases (Dickson et Tomlinson, 1967). Les trois types de désiodases connues aujourd'hui diffèrent non seulement par leurs séquences et leurs structures, mais aussi par les réactions qu'elles catalysent. Leur rôle au cours du développement des vertébrés est fondamental bien que leur inactivation chez la souris ne soit pas létale (Kohrle, 1999a; Kohrle, 1999b; Kohrle, 2000; Schweizer et Schomburg, 2005).

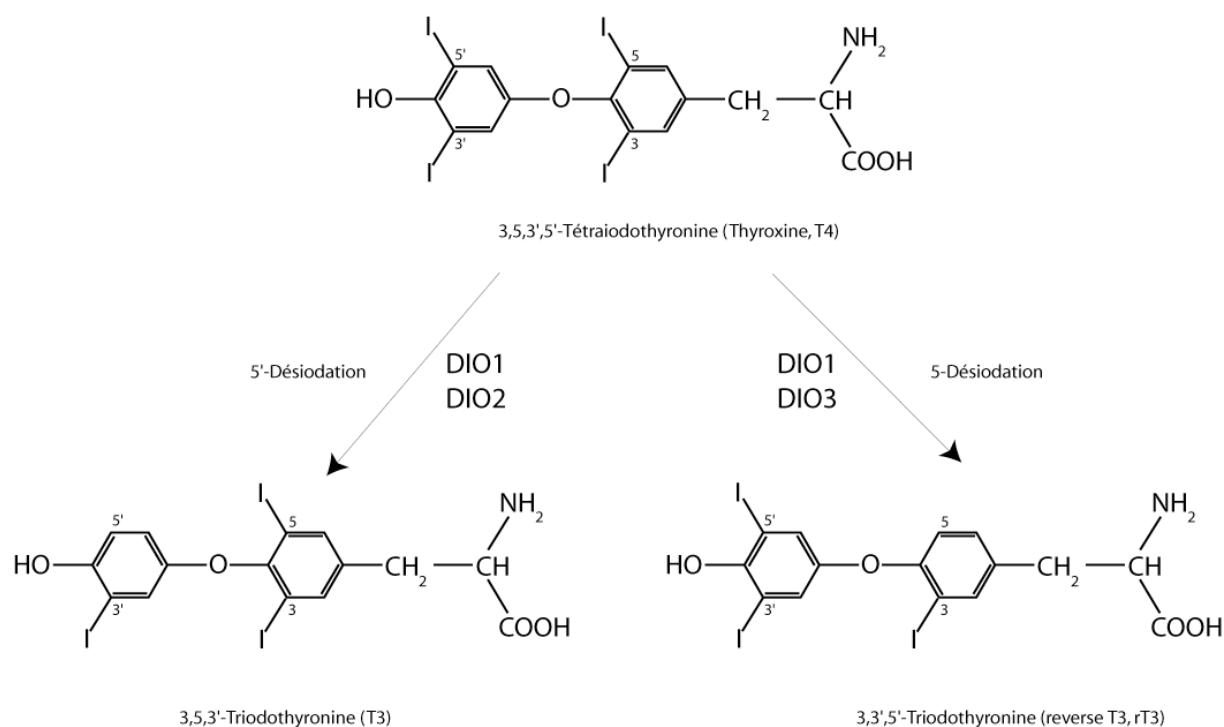


Figure 11: Désiodation de la thyroxine par les Iodothyronine Désiodases

La DIO1 permet de désioder par réduction la position 5' du groupement phényle de la T4, conduisant à la T3. Il se forme un intermédiaire Se-I au niveau de l'enzyme. Dans certains cas, la DIO1 peut aussi agir sur la position 5 du groupement tyrosyle, donnant lieu à la rT3. La DIO2 agit sur la position 5', avec une préférence de substrat pour la T4 par rapport à la rT3. La DIO3 agit sur la position 5. Les mêmes enzymes permettent d'obtenir, après une étape supplémentaire de désiodation, des composés diiodés, qui ne sont pas représentés. Certains de ces composés sont physiologiquement actifs, mais uniquement chez un nombre restreint d'animaux.

3.5.2.a. La désiodase de type 1 (DIO1)

La DIO1 est une protéine homodimérique associée aux surfaces membranaires plasmiques, et dont la fonction principale est de convertir la prohormone thyroxine, T4, sécrétée par la thyroïde en hormone thyroïdienne active, T3, circulante (Figure 11). La DIO1 est très fortement exprimée dans le foie, le rein et la glande thyroïde (Berry et coll., 1991; Jakobs et coll., 1997). La contribution relative de ces différents tissus à la synthèse de T3 plasmatique par l'intermédiaire de la DIO1 est toutefois difficile à établir.

3.5.2.b. La désiodase de type 2 (DIO2)

Le caractère de sélénoprotéine de la DIO2 a été déterminé tardivement du fait de la distance inhabituellement élevée de l'élément SECIS par rapport au codon sélénocystéine, égale à 5,4 kb (Araki et coll., 1999; Buettner et coll., 1998). La DIO2 est une protéine membranaire du réticulum endoplasmique retrouvée essentiellement dans le système nerveux

central, la glande thyroïde ainsi que les muscles cardiaques et squelettiques. Un deuxième codon UGA sélénocystéine en phase existe dans le gène de la protéine, localisé à l'avant-dernière position de la séquence peptidique. Ce codon est, la plupart du temps, interprété comme un codon stop. Le rôle de cette seconde sélénocystéine n'est pas important pour l'activité catalytique de l'enzyme et la synthèse d'une protéine plus courte d'un acide aminé n'est pas délétère pour l'enzyme (Salvatore et coll., 1999). La fonction essentielle de la DIO2 consiste en la synthèse de la forme T3 active de l'hormone à partir de T4 dans des régions localisées du système nerveux central et en particulier dans le cerveau.

3.5.2.c. La désiodase de type 3 (DIO3)

Cette dernière désiodase est majoritairement présente dans le cerveau et les tissus placentaires (Hernandez et coll., 1998; Salvatore et coll., 1995). Sa fonction physiologique principale correspond à l'inactivation de la prohormone T4 ou de la T3 sous une forme non reconnue par son récepteur nucléaire.

3.5.3. La famille des glutathion peroxydases (GPx)

La glutathion peroxydase fut en 1973 la première sélénoprotéine de mammifère identifiée (Flohe et coll., 1973; Rotruck et coll., 1973). On connaît aujourd'hui sept isoenzymes de cette famille chez l'homme, dont cinq seulement sont des sélénoprotéines (Hall et coll., 1998; Kryukov et coll., 2003; Vernet et coll., 1996). Les glutathion peroxydases permettent de réduire, et donc de détoxifier, différents types de peroxydes en leur alcool correspondant, et ce aux dépens du glutathion (Figure 12A). Le mécanisme catalytique employé semble être le même pour chaque enzyme, et implique une triade conservée d'acides aminés: sélénocystéine, tryptophane et glutamine (Brigelius-Flohe, 1999). Les glutathion peroxydases constituent l'armure essentielle de l'organisme contre le stress oxydatif (Arthur, 2000; Fu et coll., 1999a).

3.5.3.a. La glutathion peroxydase 1 (GPx1 ou cGPx)

Découverte en 1957 (Mills, 1957), la GPx1 ne fut identifiée comme sélénoprotéine qu'en 1973 (Flohe et coll., 1973). C'est une protéine tétramérique ubiquitaire du cytosol, d'où le nom qui lui est parfois donné de glutathion peroxydase cytosolique (cGPx). GPx1 est particulièrement abondante dans le foie et les érythrocytes, bien que dans ces derniers, la majorité du peroxyde d'hydrogène formé soit détoxifiée par la catalase (Mueller et coll.,

1997). Des souris invalidées pour le gène de la GPx1 ne présentent de phénotype délétère qu'en conditions de stress oxydatif (Fu et coll., 1999a; Fu et coll., 1999b; Ho et coll., 1997), suggérant peut-être le rôle mineur de l'enzyme dans des conditions physiologiques normales.

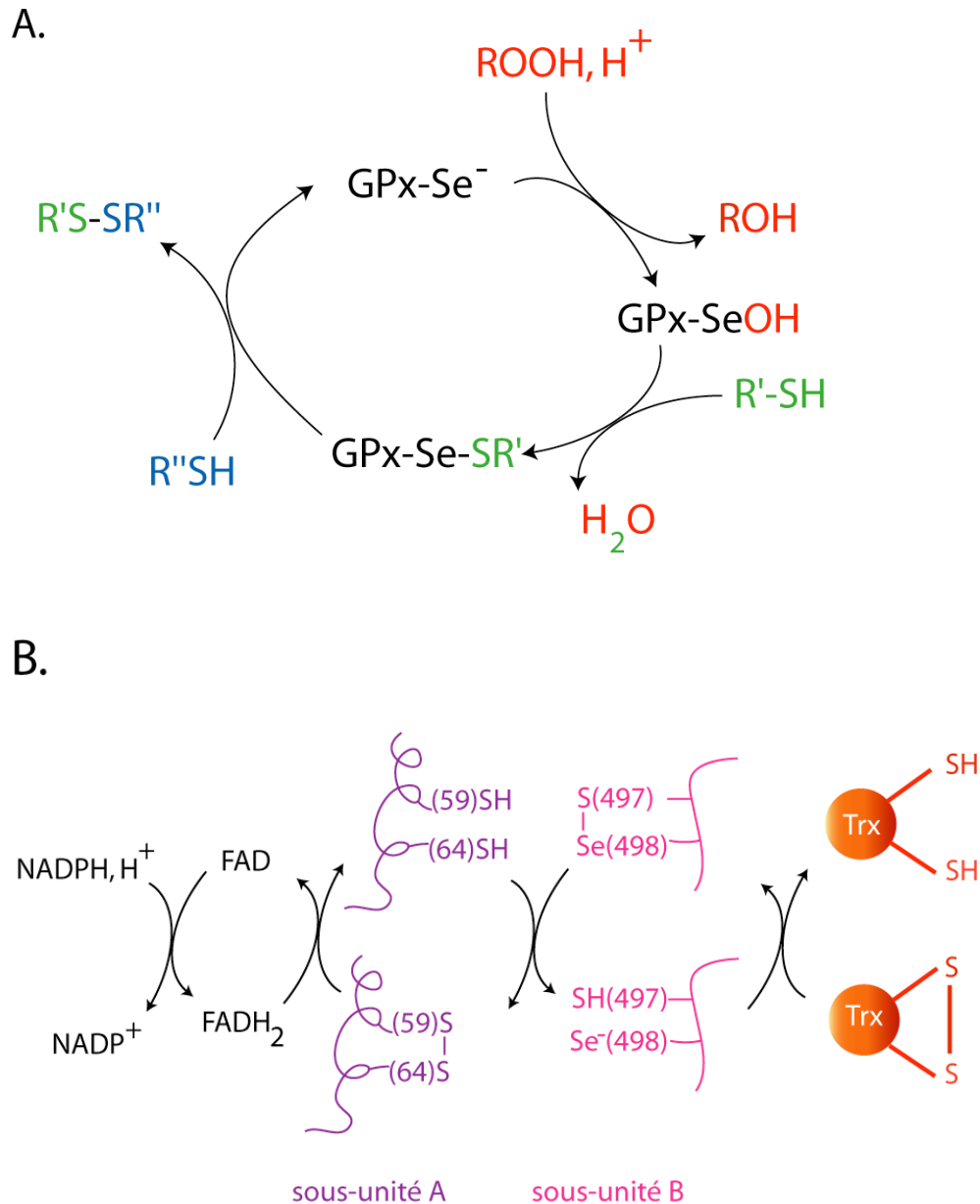


Figure 12: Mécanismes catalytiques des glutathion peroxydases et des thiorédoxine réductases

A: Glutathion peroxydases : La forme sélénolate de l'enzyme (GPx-Se⁻) est oxydée par du peroxyde d'hydrogène ou par un hydroperoxyde (ROOH, H⁺) pour donner un acide sélénénique (GPx-SeOH) qui est ensuite réduit par une nouvelle molécule (R'SH). Généralement, c'est le glutathion (GSH) qui joue cette fonction. Un pont disulfure se forme ensuite avec une dernière molécule ce qui permet de régénérer l'enzyme sous sa forme réduite. **B:** Thiorédoxine réductases : Les électrons du NADPH sont transférés par l'intermédiaire du FAD au premier site actif, composé de 2 cystéines, de la première sous-unité de la TrxR1. Les électrons sont alors transférés au deuxième site actif de la deuxième sous-unité, composé d'une cystéine et d'une sélénocystéine. Le dernier accepteur d'électrons est la thiorédoxine.

3.5.3.b. La glutathion peroxydase 2 (GPx2 ou GI-GPx)

La Gpx2 est un homotétramère cytoplasmique essentiellement trouvé dans le système gastro-intestinal, d'où son deuxième nom possible de GI-GPx (Florian et coll., 2001). Elle a pour substrats différents types d'hydroperoxydes et certains auteurs la considèrent comme la première ligne de défense de l'organisme en cas d'ingestion de molécules pro radicalaires (Brigelius-Flohe et coll., 2001). Des fonctions régulatrices sont également envisagées pour la GPx2, notamment dans le contrôle de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Florian et coll., 2001).

3.5.3.c. La glutathion peroxydase 3 (GPx3 ou pGPx)

La GPx3 est retrouvée principalement dans le plasma (pGPx) (Takahashi et coll., 1990; Tham et coll., 1998), où elle détoxifie un certain nombre d'hydroperoxydes. Des rôles de régulation ont également été proposés pour cette protéine. C'est la deuxième sélénoprotéine la plus abondante dans le plasma après Selp.

3.5.3.d. La glutathion peroxydase 4 (GPx4 ou PH-GPx)

La phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PH-GPx) présente plusieurs singularités. Des sites alternatifs d'initiation de la traduction permettent la synthèse de deux isoformes mitochondriale ou cytoplasmique. Son spectre de substrats est le plus vaste de toutes les GPx, et elle peut réduire les phospholipides hydroperoxydés ou des hydroperoxydes intégrés aux membranes, soulignant une fonction de protection des membranes biologiques (Ursini et coll., 1985). Tout comme pour la GPx3, des rôles dans des processus de régulation ont été proposés (Brigelius-Flohe et coll., 1997). L'invalidation du gène chez la souris est létal à un stade embryonnaire précoce, suggérant sa fonction antioxydante fondamentale (Yant et coll., 2003). C'est toutefois une fonction originale qui la caractérise. Elle est la sélénoprotéine majoritaire dans les testicules et elle joue un rôle structural fondamental dans la formation de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes, composée de nombreuses mitochondries (Flohe et coll., 2002). Une troisième isoforme, nucléaire, intervenant dans la condensation de la chromatine (Conrad et coll., 2005; Moreno et coll., 2003), est également impliquée dans la spermatogenèse, mais ne présente plus d'activité anti-oxydante (Ursini et coll., 1999).

3.5.3.e. La glutathion peroxydase 6 (GPx6)

La GPx6 est la dernière sélénoprotéine de la famille à avoir été identifiée, et son expression semble limitée à l'épithélium olfactif et les tissus embryonnaires (Kryukov et coll., 2003). Sa fonction proposée dans le métabolisme d'enzymes impliquées dans les mécanismes d'olfaction doit encore être démontrée (Dear et coll., 1991).

3.5.3.f. Les glutathion peroxydases 5 (GPx5) et 7 (GPx7)

Ces deux enzymes de la famille des GPx ne sont pas des sélénoprotéines. La GPx5 est exprimée uniquement dans l'épididyme et pourrait jouer un rôle de compensation des isoformes à sélénocystéine dans les spermatozoïdes en cas de déficience de celles-ci, lors de carences en sélénium par exemple (Okamura et coll., 1997; Vernet et coll., 1996). La GPx7 est une protéine cytoplasmique de 22 kDa (Utomo et coll., 2004).

3.5.4. La sélénoprotéine H (SelH)

SelH est exprimée dans de nombreux tissus, mais aucune donnée expérimentale n'a permis pour l'instant de déterminer sa fonction (Kryukov et coll., 2003). La présence d'un motif de type CXXU dans la séquence peptidique suggère toutefois une activité d'oxydoréduction impliquant la formation éventuelle d'un pont sélénylsulfure entre la sélénocystéine et la cystéine en position 41. En effet, de tels motifs CXXU ou CXXC sont retrouvés dans de nombreuses enzymes impliquées dans des mécanismes d'oxydoréduction, permettant la formation ou l'isomérisation de ponts disulfures (Fomenko et Gladyshev, 2003).

3.5.5. La sélénoprotéine I (SelI)

L'ARNm de cette protéine est détecté dans de nombreux tissus (Kryukov et coll., 2003). Aucune donnée, que ce soit structurale ou fonctionnelle, n'est connue pour SelI; seule la prédiction de la présence de 10 hélices transmembranaires permet de supposer son intégration à la membrane.

3.5.6. La sélénoprotéine K (SelK)

La sélénoprotéine K est une protéine membranaire initialement clonée à partir de cellules souches hématopoïétiques (Zhang et coll., 2000). Comme pour de nombreuses autres sélénoprotéines, le codon UGA avait été interprété initialement comme un codon d'arrêt de la

traduction. Sa séquence entière a ensuite été dévoilée (Kryukov et coll., 2003) mais sa fonction reste indéterminée.

3.5.7. La sélénoprotéine M (SelM)

SelM est exprimée dans de nombreux tissus, mais est trouvée majoritairement dans le cerveau (Kryukov et coll., 2003). Elle pourrait jouer un rôle dans l'évolution du phénotype de la maladie d'Alzheimer (Hwang et coll., 2005). Localisée dans le réticulum endoplasmique (RE), cette protéine est homologue à la protéine Sel15, et appartient à une nouvelle famille de protéines de type thiorédoxine (Ferguson et coll., 2006). Elle ne partage cependant pas toutes les propriétés de Sel15 (voir 3.5.1). Son mécanisme de rétention dans le RE semble nouveau, puisque son motif d'adressage de vingt-trois résidus localisés en position N-terminale n'était pas connu précédemment. Le résidu sélénocystéine est situé dans un motif CXXU, ce qui laisse présager une fonction liée à une activité rédox. Son élément SECIS est inhabituellement composé de deux résidus cytosine à la place des adénosines invariantes dans la boucle apicale (Figure 7A) (Korotkov et coll., 2002).

3.5.8. La sélénoprotéine N (SePN)

La sélénoprotéine N est l'une des nouvelles sélénoprotéines de fonction inconnue identifiée dans notre laboratoire par une approche *in silico* en 1999 (Lescure et coll., 1999). Sa description ainsi que l'état des connaissances la concernant sont détaillés plus loin dans l'introduction, dans l'article de revue numéro 1 et dans le chapitre résultats.

3.5.9. La sélénoprotéine O (SelO)

Cette protéine présente un motif C-terminal de type CXXU, indicatif d'une fonction d'oxydoréduction (Kryukov et coll., 2003), mais sa fonction catalytique et ses substrats restent inconnus. Tout comme pour la sélénoprotéine M, l'élément SECIS de SelO est particulier dans la mesure où les deux résidus adénosine de la boucle apicale sont remplacés par des cytosines (Figure 7A) (Korotkov et coll., 2002).

3.5.10. La sélénoprotéine P (SelP)

Sécrétée par le foie, la sélénoprotéine P n'est pas seulement la sélénoprotéine la plus abondante dans le plasma, mais c'est également elle qui constitue plus de 50% des réserves de sélénium plasmatique (Mostert, 2000). Découverte initialement chez le rat en 1982

(Motsenbocker et Tappel, 1982), elle fut identifiée chez l'homme en 1993 (Eberle et Haas, 1993; Kryukov et coll., 2003). SelP a la particularité d'être la seule sélénoprotéine, à part la désiodase de type 2 humaine, à contenir plus d'un résidu sélénocystéine (Figure 13) (Burk et Hill, 1992). Elle est retrouvée dans le plasma sous forme de peptides de différentes tailles (Figure 13), et peut contenir jusqu'à dix résidus sélénocystéine chez l'homme (Burk et Hill, 2005). Autre particularité, elle comprend deux éléments SECIS dans la région 3' non traduite de son ARNm.

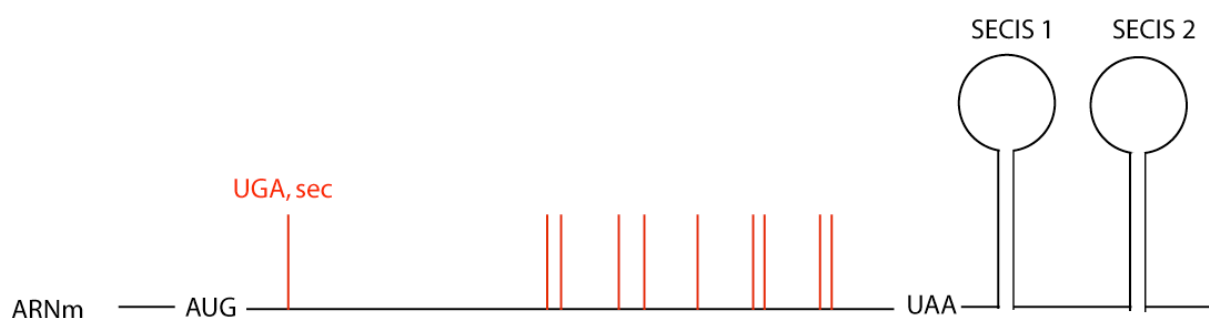


Figure 13: L'ARN messager de la sélénoprotéine P

La structure de l'ARNm de la sélénoprotéine P est inhabituelle. On peut y trouver 10 codons UGA sélénocystéine en phase, ainsi que 2 éléments SECIS dans la région 3' non traduite. Dans la séquence peptidique, les résidus sélénocystéine sont localisés aux positions 59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378, pour une longueur totale de 381 acides aminés. Chez le rat, 3 isoformes de la protéine ont été trouvées en plus de la forme entière. Elles correspondent à des arrêts prématurés de la traduction au niveau des codons UGA numéros 2, 3 et 7. Chez l'homme, l'existence de deux isoformes a été décrite par certains auteurs, mais elle demeure un sujet de débats (Akesson et coll., 1994; Mostert et coll., 1998).

Il a été proposé que sa fonction primaire serait le stockage et le transport de sélénium dans l'organisme (Saito et Takahashi, 2002). Ses propriétés rédox ainsi que la capacité du sélénium à se lier aux métaux lourds (voir 3.4.1.a et b) suggèrent également une fonction potentielle d'antioxydant plasmatique et « d'antidote » en cas d'empoisonnement par des métaux lourds (Arteel et coll., 1998; Fujii et coll., 1997; Steinbrenner et coll., 2006). En 2003, l'inactivation du gène de SelP a été réalisée chez la souris, entraînant la chute de 80% du taux de sélénium dans le plasma ainsi que dans des organes tels que le cerveau, les reins ou les testicules (Hill et coll., 2003). Cette observation illustre le rôle de transporteur plasmatique de sélénium de SelP. Néanmoins, le phénotype n'est pas létal, reflétant le rôle non essentiel de la protéine. Trois semaines après la naissance, des phénotypes anormaux ont toutefois pu être observés, qui peuvent être compensés par des apports alimentaires en sélénium plus importants (Schomburg et coll., 2003). Il a été démontré que ces rémissions étaient dues à une

activité plus importante des sélénoenzymes dans les tissus affectés. L'invalidation conditionnelle de l'ARNt^{Sec} dans le foie (Schweizer et coll., 2005) entraîne la chute du taux de sélénium dans le plasma, due à l'absence de synthèse de SelP, mais pas dans le cerveau. Ceci indique que SelP est requise pour approvisionner le cerveau avec une quantité critique de sélénium, mais que des sources, autres que la sélénoprotéine P hépatique, sont disponibles. L'ensemble de ces données permet d'établir les bases de la fonction de SelP (Richardson, 2005): le sélénium ingéré est délivré au foie et utilisé pour la biosynthèse de la sélénoprotéine P. Ce mode de stockage circulant sous forme de sélénocystéine est relativement inerte d'un point de vue toxicologique, en comparaison à la plupart des composés sélénés de faible poids moléculaire. SelP est ensuite sécrétée dans le plasma et délivrée dans les différents tissus où la présence de sélénium est requise. Dans les cellules, SelP est dégradée et permet la libération de sélénium qui est recyclé pour permettre la synthèse de nouvelles sélénoprotéines. Du fait de l'importance du sélénium pour le cerveau, d'autres sources de SelP existent pour maintenir son approvisionnement.

3.5.11. La sélénoprotéine S (SelS)

Initialement identifiée chez un modèle de rat diabétique, la protéine SelS, appelée alors Tanis, a une expression inversement proportionnelle à la concentration en glucose plasmatique (Gao et coll., 2003; Kryukov et coll., 2003; Walder et coll., 2002). SelS interagit également avec une protéine impliquée dans une complication inflammatoire due au diabète (Gao et coll., 2004; Gao et coll., 2006). Des données plus récentes montrent que SelS pourrait également être impliquée dans le transport de protéines mal repliées du réticulum vers le cytosol, afin qu'elles y soient dégradées par le protéasome; cette observation doit faire l'objet d'investigations supplémentaires (Ye et coll., 2004).

3.5.12. La sélénophosphate synthétase 2 (SPS2)

La fonction de cette protéine impliquée dans la synthèse des sélénoprotéines est évoquée dans le paragraphe 3.1.2 (Low et coll., 1995).

3.5.13. La sélénoprotéine T (SelT)

Peu de choses sont connues sur cette sélénoprotéine (Kryukov et coll., 2003): un motif CXXU suggère des propriétés rédox potentielles. Toutefois, cette hypothèse n'a pas encore été validée.

3.5.14. La famille des thiorédoxine réductases (TrxR)

Le système thiorédoxine est classiquement composé de la thiorédoxine réductase (TrxR) et de son substrat, la thiorédoxine (Trx). La Trx est une protéine active, réduite aux dépens du NADPH, et dont la forme oxydée permet la réduction de nombreuses molécules cibles. Le spectre de substrats des thiorédoxine réductases est relativement large, du fait de la grande accessibilité de leur site catalytique, localisé à l'extrémité C-terminale. Elles partagent toutes un même mécanisme catalytique, détaillé dans la Figure 12B pour la TrxR1 (Gromer et coll., 2003; Gromer et coll., 2004). On connaît aujourd'hui trois thiorédoxine réductases chez l'homme, qui sont toutes des protéines homodimériques. Toutefois, de nombreux variants de celles-ci sont générés par des épissages alternatifs qui permettent notamment leur adressage vers différents organites (Rundlof et coll., 2004; Sun et coll., 2001c). L'invalidation des gènes des TrxR1 ou 2 est létal *in utero*, reflétant l'implication du système thiorédoxine dans un grand nombre de processus cellulaires indispensables.

3.5.14.a. La thiorédoxine réductase 1 (TrxR1)

La TrxR1 est une enzyme ubiquitaire du cytoplasme. Elle est impliquée dans divers aspects de la régulation du statut redox de la cellule et peut être sécrétée dans le plasma (Sun et Gladyshev, 2002). La Trx, réduite par la TrxR1, peut inhiber l'apoptose en se liant à une kinase particulière (Saitoh et coll., 1998), ou participer à la synthèse de l'ADN en fournissant des électrons à la ribonucléotide réductase (Gromer et coll., 2004; Matsui et coll., 1996; Nonn et coll., 2003). La TrxR1 est l'une des sélénoprotéines les plus étudiées: des travaux récents ont permis par exemple de démontrer que sa surexpression stable dans des cellules en culture entraînait une baisse de l'expression d'autres sélénoprotéines, traduisant sa position élevée dans le classement hiérarchique des sélénoprotéines. Dans cette lignée cellulaire, l'expression plus importante de différents marqueurs épithéliaux suggère également une implication de la TrxR1 dans la différenciation cellulaire (Nalvarte et coll., 2004).

3.5.14.b. La thiorédoxine réductase 2 (TrxR2)

La TrxR2 est une enzyme mitochondriale dont l'expression la plus intense est observée dans la prostate, les testicules, l'utérus, le foie et les intestins (Miranda-Vizuet et coll., 2000). Elle présente la même fonction que son équivalent cytoplasmique, la TrxR1. Deux variants de cette sélénoprotéine, nommés SelZ1 et SelZ2, issus d'un épissage alternatif,

ont été décrits (Lescure et coll., 1999). Ils n'ont pas d'activité catalytique identifiée et leur fonction doit être déterminée.

3.5.14.c. La thiorédoxine réductase 3 (TrxR3 ou TGR)

La TRx3 peut, contrairement aux TrxR1 et 2, réduire le disulfure de glutathion (Thiorédoxine Glutathion Réductase). Elle est localisée dans le réticulum endoplasmique (Sun et coll., 2001b), et elle intervient, avec la GPx4, dans un nouveau système de formation de ponts disulfures, impliqué dans la maturation des spermatozoïdes (Su et coll., 2005). En effet, la TGR permet de catalyser l'isomérisation de ponts disulfures dans différentes protéines impliquées dans la formation des spermatozoïdes matures, y compris la GPx4.

3.5.15. La sélénoprotéine V (SelV)

SelV présente un motif CXXU, ce qui suggère une activité de type rédox possible. Identifiée sur la base de similitudes de séquence avec SelW, la sélénoprotéine V ne semble être exprimée qu'au niveau des tubules séminifères (Kryukov et coll., 2003). Elle vient ainsi compléter la liste des sélénoprotéines fortement exprimées dans les tissus où a lieu la spermatogenèse, soulignant l'importance du sélénium dans ce processus.

3.5.16. La sélénoprotéine W (SelW)

La sélénoprotéine W a initialement été purifiée à partir de muscles de rat (Kryukov et coll., 2003; Vendeland et coll., 1993). Des fonctions rédox ont été suggérées pour cette protéine capable de lier le glutathion (Bauman et coll., 2004; Jeong et coll., 2002), mais sa véritable activité reste à déterminer. Son implication éventuelle dans une pathologie musculaire est décrite plus loin.

3.5.17. La sélénoprotéine X (SelX) ou méthionine-R-sulfoxyde réductase (MsrB1)

Cette protéine cytosolique et nucléaire a été identifiée simultanément par deux groupes (Kryukov et coll., 1999; Lescure et coll., 1999). Le premier groupe l'a caractérisée chez la souris et l'a nommée sélénoprotéine R. Son activité catalytique a été identifiée: il s'agit d'une méthionine-sulfoxyde réductase spécifique de l'énantiomère R, ou méthionine-R-sulfoxyde réductase (MsrB1) (Grimaud et coll., 2001; Kim et Gladyshev, 2004a; Kryukov et coll., 2002). Trois formes de MsrB codées par trois gènes et adressées à différents compartiments cellulaires ont été identifiées, mais seule MsrB1 est une sélénoprotéine (Kim et Gladyshev,

2004b). Une méthionine-S-sulfoxyde réductase (MsrA) existe, mais qui ne possède un résidu sélénocystéine que chez *C. reinhardtii* (Novoselov et coll., 2002). Les expressions de MsrB1 et de MsrA sont stimulées par le stress oxydatif (Kryukov et coll., 2002) et leurs mécanismes catalytiques sont très proches, bien qu'elles ne partagent aucune similarité structurale (Boschi-Muller et coll., 2005). Le réducteur utilisé par MsrB1 est la thiorédoxine, qui à son tour est réduite par la thiorédoxine réductase, ce qui permet de lier les activités de ces deux sélénoenzymes (Boschi-Muller et coll., 2005). La conversion stéréospécifique et réversible de la méthionine par les méthionine-R/S-sulfoxyde réductase est impliquée dans de nombreux mécanismes biologiques fondamentaux. Ces processus incluent des fonctions antioxydantes, comme la réparation des méthionines oxydées lors de dommages causés aux protéines par des radicaux libres oxygénés, la régulation d'activités enzymatiques ou encore la communication cellulaire.

4. Les pathologies liées à des carences en sélénium et/ou au dysfonctionnement de sélénoprotéines

Un nombre important de pathologies liées à des carences alimentaires ont été décrites depuis la définition du sélénium comme un oligo-élément essentiel. Toutefois, la simple déficience en sélénium ne permet pas, généralement, d'expliquer en soi l'occurrence de ces maladies. D'autres facteurs environnementaux sont également impliqués. Depuis plusieurs années, la connaissance des fonctions des sélénoprotéines a permis de comprendre le lien entre un nombre croissant de pathologies et des déficits en sélénium. En général, les propriétés anti-oxydantes de ces protéines impliquées dans différents mécanismes de protection de l'organisme contre les agressions oxydatives conduisent par exemple au vieillissement global de l'organisme. Certains de ces phénomènes commencent à être bien étudiés mais il faut noter que les informations rassemblées dans cette partie de l'introduction ne sauraient être exhaustives tant les études concernant le sélénium et la santé humaine sont nombreuses et s'accumulent, avec parfois des résultats partiels ou contradictoires.

4.1. Sélénium et système immunitaire

De nombreuses études suggèrent qu'une déficience en sélénium peut s'accompagner d'une immunodépression dont l'origine est vraisemblablement indissociable du fait que le sélénium est retrouvé en grandes quantités dans différents tissus jouant un rôle important dans l'immunité, comme le foie ou le thymus (Spallholz et coll., 1990). Par exemple, il a été décrit qu'une supplémentation en sélénium, même chez des personnes saines, entraînait une augmentation de la prolifération des lymphocytes et de la sécrétion d'immunoglobulines (Arthur et coll., 2003; Kiremidjian-Schumacher et coll., 1994). Ce mécanisme semble être lié à la capacité du sélénium à réguler l'expression de récepteurs de différentes cytokines. L'interaction entre les interleukines et leurs récepteurs sur les lymphocytes est capitale pour permettre leur expansion clonale et leur différenciation. Un autre exemple de l'influence du sélénium dans le fonctionnement de cellules blanches concerne le cas des neutrophiles: leur nombre et leur prolifération ne sont pas tributaires du taux de sélénium, mais une chute de l'activité glutathion peroxydase cytosolique (GPx1) entraîne leur mort, suite à l'accumulation de radicaux libres oxygénés produits lorsqu'ils sont activés (Arthur et coll., 2003).

En outre, il semblerait que les cellules du système immunitaire, qui présentent une activité sélénophosphate synthétase particulièrement importante (Guimaraes et coll., 1996), auraient recours à la synthèse de nombreuses sélénoprotéines pour leur bon fonctionnement. L'une de ces sélénoprotéines correspond à la sélénoprotéine S, dont l'implication dans la réponse inflammatoire a été démontrée (Curran et coll., 2005). En effet, des mutations dans son gène influent directement sur les taux de cytokines sécrétées telles IL-1 β , TNF- α ou IL-6. La suppression de l'expression de SePS par ARN interférence résulte dans la production et la sécrétion accrues de cytokines en réponse au stress oxydatif dans une lignée de macrophage. SePS serait en conséquence impliquée dans plusieurs pathologies complexes dont l'apparition est influencée par des phénomènes d'inflammation, tels les cancers, l'athérosclérose, le diabète ou la maladie d'Alzheimer.

4.2. Sélénium et maladies infectieuses

La plupart des maladies infectieuses sont associées à des stress oxydatifs, engendrés par la réponse immunitaire innée. En cas de déficience en sélénium ou de dysfonctionnement important d'une sélénoprotéine impliquée dans l'élimination de radicaux libres, il est facile d'imaginer qu'une des premières conséquences sera un dysfonctionnement de la réaction inflammatoire, et par cela même, l'aggravation de l'infection.

Une observation surprenante a permis, il y a plusieurs années, d'illustrer cet aspect; il a été démontré que la maladie de Keshan, en Chine, était due à deux facteurs au moins: une déficience en sélénium et l'infection par un virus de la famille des coxsackie. Quand des souris, dont l'alimentation était dépourvue de sélénium, furent infectées par une souche virale inoffensive, des mutations se produisirent dans le génome viral, induisant des problèmes cardiaques graves chez l'animal, identiques à ceux observés chez les patients atteints de la maladie de Keshan (Ge et Yang, 1993). De plus, l'inoculation de ces virions mutés à des souris soumises à un régime adéquat en sélénium, engendrait malgré tout la pathologie cardiaque. Cette expérience démontra le caractère virulent irréversible de ces mutations (Beck et coll., 1995). Il est intéressant de noter que le même processus a été démontré chez des souris invalidées pour le gène codant pour la GPx1, traduisant le rôle fondamental de cette sélénoprotéine dans la prévention des dommages oxydatifs causés au génome viral (Beck et coll., 1998). Le virus coxsackie a ensuite pu être isolé chez les patients atteints de la maladie de Keshan, et il est maintenant évident qu'il joue un rôle à part entière dans l'apparition de la maladie. Une déficience en sélénium chez l'homme, comme c'est le cas dans la province

chinoise de Keshan dont le sol est très peu sélénifère, semble être suffisante pour modifier le génome viral et rendre les virions virulents. Depuis, l'apport de compléments alimentaires sélénisés a quasiment permis d'éradiquer la maladie dans ces régions (Cheng et Qian, 1990).

De façon similaire, il a été prouvé qu'une déficience en sélénium était également responsable d'infections pulmonaires graves, provoquées par des mutations dans le génome du virus de l'influenza de type A, toujours dans cette même région de la Chine (Beck, 2001). Les observations identiques ont été réalisées lors d'infections par le virus de l'hépatite B (Yu et coll., 1999; Yu et coll., 1997). Ce phénomène pourrait d'ailleurs être la cause de l'apparition de nombreuses nouvelles maladies, virales ou non, et pourrait dans l'avenir jouer un rôle fondamental en santé publique. Les premières souches non-simiennes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) trouveraient leur origine dans des régions pauvres en sélénium du Zaïre (Beck et coll., 1995).

Depuis, d'autres relations entre sélénium et VIH ont été étudiées en détail. Il a été observé qu'une déficience en sélénium était associée à une évolution plus rapide de la maladie et un décès précoce des patients infectés (Baum et coll., 1997; Chariot et coll., 1997). La progression de la maladie est synonyme d'une chute du taux de lymphocytes T dans le sang et cette diminution s'accompagne chez les patients de la chute du taux plasmatique de sélénium (Look et coll., 1997). Or, il a été montré que le sélénium était un inhibiteur de la réplication du virus *in vitro* (Sappey et coll., 1994). Certains auteurs ont proposé que le virus contribuait lui-même à la déficience en sélénium en produisant ses propres sélénoprotéines virales, notamment un homologue de GPx (Cohen et coll., 2004; Taylor et coll., 1997; Zhao et coll., 2000), comme cela avait déjà été décrit pour d'autres virus (Shisler et coll., 1998; Zhang et coll., 1999). Dans le cas d'HIV, l'hypothèse d'une sélénoprotéine codée par le génome viral reste toutefois très controversée. Néanmoins, l'optimisation du taux de sélénium chez des patients atteints par le VIH doit être discutée. En effet, les études qui devaient permettre de démontrer ce rôle bénéfique ont eu des résultats négatifs inattendus (Diamond et coll., 2001). Suite à l'inhibition de l'apoptose cellulaire (Sandstrom et coll., 1998) par la surexpression de la glutathion peroxydase dans des tissus infectés en culture, une accentuation de l'expansion virale a été observée. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. En présence de sélénium, l'immunité et le statut rédox cellulaires sont préservés et les cellules sont moins sujettes à l'apoptose. De ce fait, le virus adopte une stratégie d'infection systémique persistante et se multiplie sous forme latente. Dès que le taux de sélénium devient

insuffisant, le stress oxydatif et l'apoptose réactivent le virus et sa prolifération entraîne des effets pathogéniques accrus.

L'importance du taux de sélénium dans l'organisme en cas d'infection bactérienne a été moins étudiée. Toutefois, quelques études tendent à démontrer que l'absence de mécanismes de défense contre les agents oxydants doit avoir un rôle dans l'aggravation de ces infections bactériennes (Gartner et coll., 2001).

4.3. Sélénium et cancer

Depuis les années 70, de nombreuses études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence une relation inverse entre les apports de sélénium et l'incidence de cancers (Clark et coll., 1991; Schrauzer et coll., 1977). Les mécanismes de ce phénomène sont toutefois mal connus, et plusieurs hypothèses ont été avancées: la première d'entre elles suggère que le sélénium, ou certaines sélénoprotéines, pourraient entraîner l'arrêt de la croissance tumorale. Une autre hypothèse serait que les effets du sélénium aient lieu en amont de la tumorigenèse, dans la prévention de l'apparition de mutations délétères, grâce aux mécanismes de protection contre les agressions oxydantes mutagènes de l'ADN.

Des approches expérimentales diverses plaident en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses, et les connaissances de plus en plus précises de la fonction de certaines sélénoprotéines permettent également de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu.

Les GPx sont, par exemple, des protéines qui contribuent à protéger l'ADN contre les dommages oxydatifs, en détoxifiant différents peroxydes. Récemment, il a été montré qu'une chute de l'activité de ces enzymes ou du taux de composés sélénés de faible poids moléculaire provoquait une augmentation de la susceptibilité au cancer du côlon (Irons et coll., 2006). Certains variants de la GPx1 ont été associés à une fréquence plus importante de cancers du sein ou du côlon (Hu et coll., 2005; Hu et Diamond, 2003; Moscow et coll., 1994; Ratnasinghe et coll., 2000). Les TrxR ont des effets contradictoires sur le développement tumoral. En effet, leur activité catalytique permet de lutter contre les radicaux libres oxygénés, directement ou par l'intermédiaire de cascades de signalisation cellulaire, empêchant ainsi les dommages oxydatifs (Sun et coll., 1999). Cependant, l'activité des TrxR peut devenir défavorable car elles permettent l'alimentation en désoxyribonucléotides des cellules en prolifération, dont la synthèse dépend du système Trx (Biaglow et Miller, 2005).

Ainsi, en 2005, certains auteurs ont démontré que la curcumine, un composé connu pour ses propriétés anti-cancéreuses, pouvait inhiber le système thiorédoxine en bloquant de manière irréversible la TrxR1 sous forme pro-oxydante (Fang et coll., 2005).

Récemment, deux sélénoprotéines ont été associées à l'apparition de cancers de la prostate: la sélénoprotéine de 15 kDa et la sélénoprotéine P. Il avait été montré préalablement que l'incidence de ce type de cancers était réduite en cas de supplémentation en sélénium (Clark et coll., 1998). Cette corrélation peut être mise en regard des grandes quantités de SeP15 dans la prostate. Cette hypothèse est étayée par la présence de niveaux particulièrement faibles de SeP15 dans certaines lignées cellulaires de cancers prostatiques (Kumaraswamy et coll., 2000). En outre, deux mutations dans le gène de cette sélénoprotéine ont été observées, et la perte de l'hétérozygotie pour ce locus est associée à l'apparition de tumeurs (Diwadkar-Navsariwala et coll., 2006; Hu et coll., 2001). De façon similaire, les quantités de SeIP mesurées lors de cancer de la prostate sont plus faibles qu'à la normale (Calvo et coll., 2002). Toutefois, concernant ces deux dernières sélénoprotéines, il est encore prématuré de conclure à une implication véritable et directe dans l'apparition de cancers.

4.4. Sélénium et fertilité

Il est connu depuis longtemps que le sélénium a une influence sur la fertilité mâle chez le bétail (Maiorino et coll., 1999), caractérisée le plus souvent par une fragilité de la pièce intermédiaire assurant la mobilité des spermatozoïdes. Depuis, des observations similaires ont pu être réalisées chez l'homme et il a été également constaté que des taux plasmatiques de sélénium particulièrement faibles avaient été observés chez des femmes ayant subi plusieurs interruptions naturelles de grossesse (Barrington et coll., 1996; Behne et coll., 1996; Oldereid et coll., 1998). Une première explication moléculaire a été apportée concernant les problèmes d'infertilité masculine, et correspond au rôle structural que peut avoir la PH-GPx (GPx4) dans la spermatogenèse (voir paragraphe 3.5.3.d.). Il est à noter néanmoins que d'autres sélénoprotéines sont abondamment exprimées dans le testicule et leur fonction dans la maturation des spermatozoïdes commence à être connue: il s'agit de la TGR et de la sélénoprotéine V (paragraphe 3.5.14.c et suivant).

Il est intéressant également de noter que lors de l'invalidation du gène de la sélénoprotéine P chez la souris, le seul symptôme qui persiste, après supplémentation en sélénium, correspond à une hypofertilité chez le mâle. Les bases moléculaires de ce

phénomène sont méconnues. Cette observation n'a pas pu être confirmée chez l'homme en l'absence de mutations pathologiques caractérisées dans le gène de Selp (Hill et coll., 2003; Olson et coll., 2005; Schomburg et coll., 2003).

4.5. Sélénium et maladies thyroïdiennes

Trois sélénoprotéines, les désiodases, sont impliquées dans la régulation de la fonction thyroïdienne, et permettent la maturation et la dégradation de l'hormone thyroïdienne (Figure 11). Les fonctions de ces hormones sont cruciales pour la santé humaine; il est reconnu aujourd'hui qu'un déséquilibre des taux de la prohormone T4, ou des hormones matures T3 et rT3, provoque des pathologies cliniques diverses, et que leur absence totale peut avoir des effets fatals pour l'organisme (Bianco et coll., 2002). Les études des effets d'un déficit en sélénium sur la fonction thyroïdienne sont difficiles, car la glande thyroïde parvient à préserver son contenu en sélénium, même en cas de carence, et les concentrations en désiodases sont peu affectées (Kohrle, 1999b). Les mécanismes de cette rétention sont encore inconnus. Récemment, il a été décrit qu'une mutation dans le gène codant pour SBP2, une protéine de la machinerie de synthèse des sélénoprotéines, avait pour conséquence chez l'homme l'apparition d'une pathologie mineure due essentiellement à la perte de fonction de la DIO2 (Dumitrescu et coll., 2005).

D'autres observations démontrent qu'une double déficience en iode et en sélénium est la cause de deux maladies sévères: la maladie de Kashin-beck et le crétinisme myxédémateux (Contempre et coll., 2004; Moreno-Reyes et coll., 1998). La supplémentation en sélénium chez ces patients, si elle n'est pas accompagnée d'iode, tend à aggraver les problèmes thyroïdiens, et ce pour deux raisons: d'une part, l'augmentation du taux de glutathion peroxydase thyroïdienne entraîne la diminution des quantités de peroxyde d'hydrogène disponibles dans la glande thyroïde, alors que ce composé est indispensable à la synthèse de T4; d'autre part, l'intensification de l'activité de désiodation entraîne une surcharge du taux d'hormone sous forme active (Kohrle et coll., 2000; Vanderpas et coll., 1990).

4.6. Sélénium et maladies neurologiques

De nombreux points indiquent que le sélénium est important pour l'activité cérébrale, en commençant par la priorité de rétention du sélénium dans le cerveau en cas de déficit de l'oligo-élément (Chen et Berry, 2003; Hawkes et Hornbostel, 1996). Un rôle du sélénium

dans la régulation de l'humeur a été évoqué, et plusieurs études ont démontré qu'une carence en sélénium entraînait une incidence plus forte de pathologies comme la dépression, l'anxiété ou l'agressivité (Benton et Cook, 1991). De plus, de faibles concentrations plasmatiques de sélénium ont été observées dans des cas de sénilité précoce ou de maladie d'Alzheimer (Hawkes et Hornbostel, 1996). Depuis, trois sélénoprotéines pouvant jouer un rôle dans l'apparition de cette dernière maladie ont été identifiées: la sélénoprotéine X (MsrB1), impliquée dans les voies métaboliques de la méthionine, voies dont le dérèglement est associé à la maladie d'Alzheimer (Gabbita et coll., 1999), et les sélénoprotéines M et TrxR1, deux des nombreuses protéines dérégulées dans le cas de cette pathologie (Akterin et coll., 2005; Hwang et coll., 2005).

4.7. Sélénium et maladies cardiovasculaires

Certaines études ont suggéré que le sélénium pouvait avoir des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires. Sur le plan théorique, ces hypothèses peuvent être soutenues par la capacité des GPx à lutter contre l'oxydation des lipides et l'agrégation des plaquettes (Neve, 1996). La Gpx4 est capable de réduire les phospholipides hydroperoxydés ainsi que les esters de cholestérol associés aux lipoprotéines (Sattler et coll., 1994) et pourrait ainsi contribuer à limiter l'accumulation de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans les parois artérielles. Les résultats de plusieurs études épidémiologiques sont pourtant contradictoires; certains auteurs ont observé une augmentation du taux d'apparition de maladies cardiovasculaires lors de déficit en sélénium, alors que d'autres n'ont pas observé de corrélation significative (Salonen et coll., 1982; Virtamo et coll., 1985). Une explication moléculaire pourrait être que la GPx4, la seule enzyme capable de réduire les lipides hydroperoxydés, n'est pas présente dans les espaces extracellulaires où sont localisés les LDL. En outre, la GPx4 est peu affectée par les carences en sélénium. De ce fait, son activité ne devrait jamais être limitante dans les pays développés où les carences en sélénium sont faibles et où pourtant les problèmes cardiovasculaires sont le plus souvent observés. La GPx3, bien qu'en contact direct avec les LDL par sa localisation, n'a pas la spécificité de substrat lui permettant de réduire les lipides hydroperoxydés. Le cas de la GPx1 est surprenant. En effet, il a été montré que sa surexpression était associée à des cas d'obésité et de résistance à l'insuline (Lei et Cheng, 2005; McClung et coll., 2004). Les mécanismes sous-jacents à ces observations commencent à être connus: les radicaux libres oxygénés sont nécessaires au bon fonctionnement de l'insuline et par conséquent leur élimination par la GPx1 interfère avec

l'activité de l'hormone. Les effets bénéfiques du sélénium en prévention de maladies cardiovasculaires sont donc controversés et nécessitent des investigations supplémentaires. L'oligo-élément pourrait être l'un des composants impliqués dans l'émergence de ces maladies multifactorielles.

Plus récemment, il a été suggéré que trois autres sélénoprotéines pouvaient avoir un rôle dans la prévention de maladies cardiovasculaires: il s'agit de la sélénoprotéine P dont une forte proportion est liée aux protéoglycanes à la surface des cellules épithéliales, notamment dans le système vasculaire, ce qui pourrait permettre la protection de l'endothélium contre les agressions oxydantes locales (Hill et Burk, 1997; Hondal et coll., 2001). La deuxième protéine candidate est la sélénoprotéine S, dont la dérégulation a été identifiée dans certains cas de diabète ou d'intolérance au glucose (Curran et coll., 2005; Gao et coll., 2004). Enfin, il a été observé que les acides biliaires, dont la fonction hormonale est connue depuis peu, préviennent l'obésité et la résistance à l'insuline, en stimulant la synthèse de la DIO2 (Watanabe et coll., 2006). Ce résultat converge avec l'observation antérieure d'un polymorphisme dans le gène de la DIO2 chez certains patients atteints de diabète (Canani et coll., 2005), et confirme l'implication de l'enzyme dans ces processus.

4.8. Sélénium et maladies musculaires

Enfin, de nombreuses pathologies musculaires ont été corrélées avec des déficiences en sélénium (Chariot et Bignani, 2003); la compilation et l'analyse des données relatives à ces maladies ont fait l'objet de l'article de revue numéro 1, intitulé « Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function ». Cet article présente également l'état actuel des connaissances dans le cadre de l'implication directe de certaines sélénoprotéines dans des maladies musculaires.

4.8.1. « Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function »

Mathieu Rederstorff, Alain Krol and Alain Lescure

Cellular and Molecular Life Science, 2006, Vol. 63, No. 1, pp. 52-59

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function

Mathieu Rederstorff, Alain Krol et Alain Lescure

Cellular and Molecular Life Science, 2006, Vol. 63, Pages 52-59

Pages 52 à 59 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://springerlink.metapress.com/content/y724626471675875/fulltext.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

5. Les maladies neuromusculaires

Les maladies neuromusculaires regroupent de très nombreuses affections du muscle qui peuvent avoir plusieurs origines, musculaires ou nerveuses, touchant préférentiellement les muscles cardiaques et squelettiques. Une taxonomie de ces différentes pathologies a été proposée, sur la base de caractéristiques cliniques et morphologiques, afin d'en faciliter les études génétiques. L'établissement de cette classification est compliqué par le fait que nombre de ces pathologies présentent des phénotypes chevauchants, et que leurs frontières nosologiques et étiologiques restent mal définies. Les études actuelles visent à identifier les gènes et les mécanismes moléculaires dont les dysfonctionnements sont responsables de l'apparition de ces maladies. Le but de cette dernière partie de l'introduction n'est pas de dresser un bilan exhaustif des connaissances actuelles, mais d'évoquer certaines de ces pathologies, pour lesquelles les mécanismes mis en jeu commencent à être connus. Ceci permettra également d'illustrer la grande hétérogénéité de ces maladies, qui touchent plus d'une personne sur 3000 dans le monde (pour une revue exhaustive, voir (Emery, 1999)). Nous ne nous intéresserons qu'aux Dystrophies Musculaires Congénitales (DMC). Nous tenterons de définir pour chacune d'elles les mécanismes moléculaires connus mis en jeu, ainsi que le contexte cellulaire, nous permettant d'apporter un regard sur les maladies musculaires liées au sélénium. L'ensemble des protéines citées sont regroupées sur la Figure 14 et le Tableau 5.

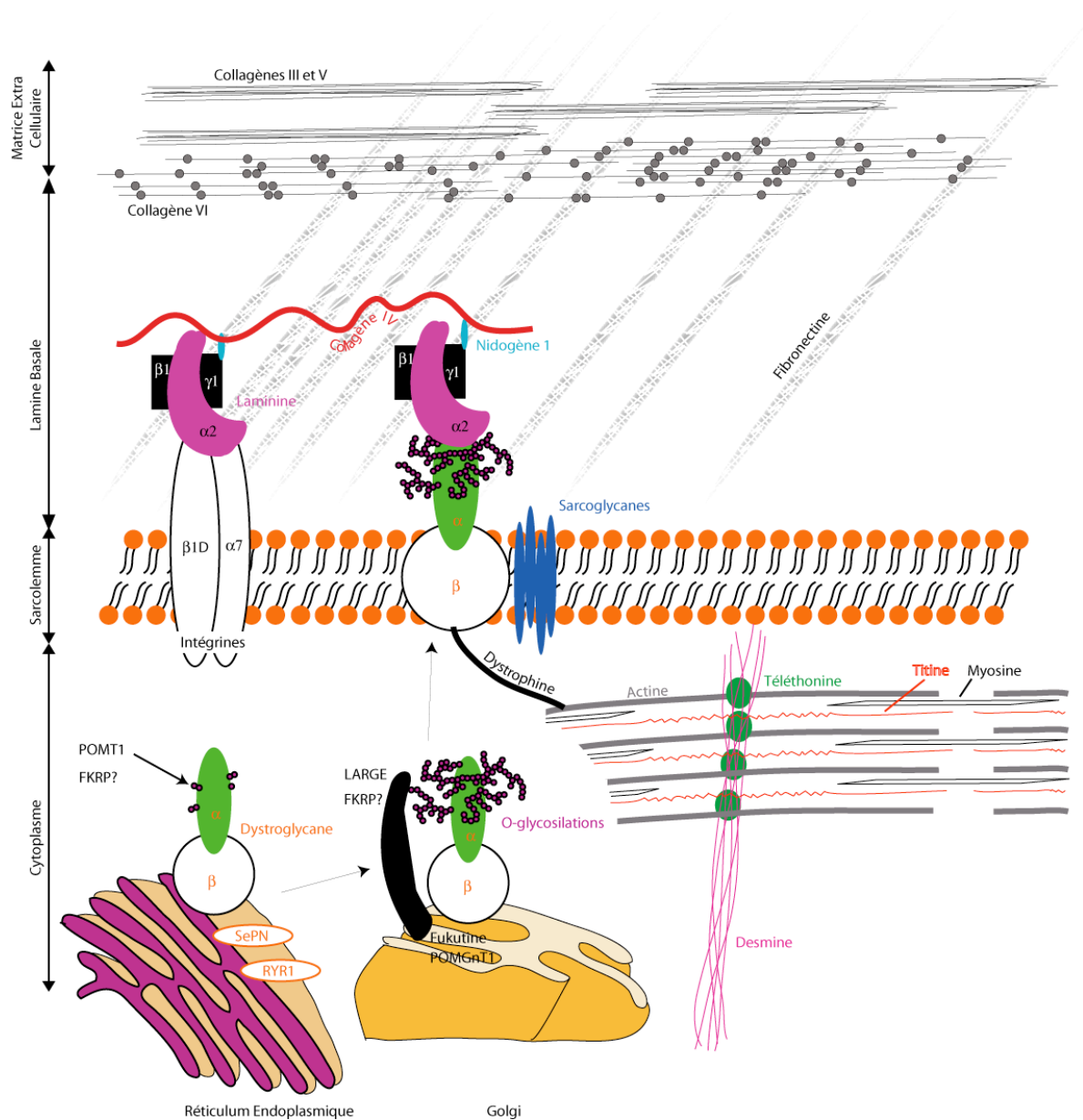


Figure 14: Localisation des principales protéines impliquées dans des dystrophies musculaires congénitales. d'après (Jimenez-Mallebrera et coll., 2005)

Les 3 sous-unités de la laminine sont représentées, associées aux intégrines ou à l' α -dystroglycane. Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), le dystroglycane est glycosylé par POMT1 et peut-être par la protéine de type Fukutine (FKRP). Après transfert vers le Golgi, les modifications se poursuivent avec les protéines LARGE, POMGnT1 et peut-être FKRP, avant que le dystroglycane ne soit transféré vers le sarcolemme. La Fukutine, de fonction encore non déterminée est localisée dans le Golgi. Le collagène VI est représenté dans la matrice extra-cellulaire. La Sélénoprotéine N (SePN), de fonction inconnue, et le Récepteur Ryanodine de type 1 (RYR1), impliqué dans les flux calciques intracellulaires, sont représentés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique.

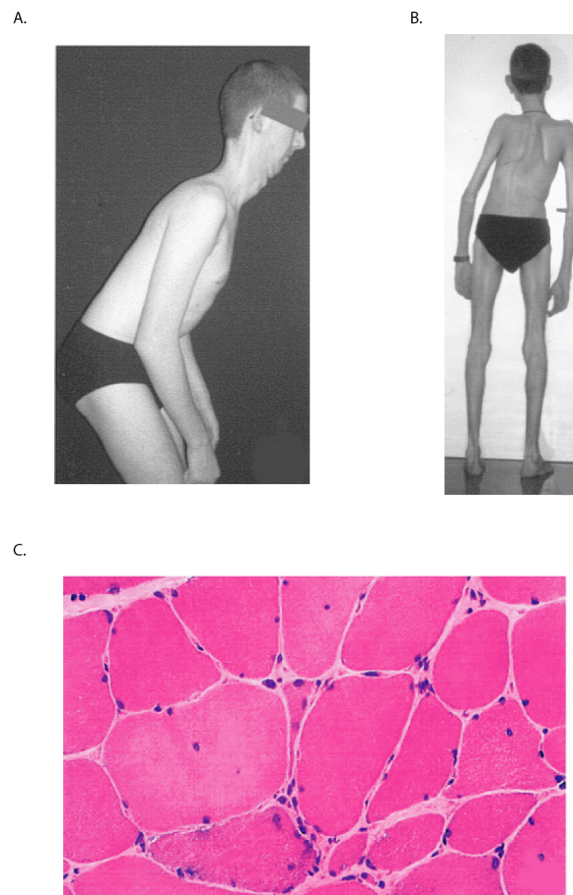
5.1. Classification des dystrophies musculaires et aspects cliniques

La première description d'une dystrophie musculaire congénitale (DMC) remonte au début du XX^e siècle, et est attribuée à un pédiatre anglais, Francis Batten (Batten, 1904). Les DMC constituent un groupe de pathologies musculaires dont la transmission est généralement autosomique récessive. Les premiers signes cliniques apparaissent de façon très précoce, généralement dans la période néonatale. Les DMC sont étés rassemblées au sein d'une entité sur la base de plusieurs signes cliniques ou morphologiques (Dubowitz et Fardeau, 1995; Muntoni et coll., 2003). Elles se caractérisent par une hypotonie et une faiblesse musculaires apparaissant dans les premiers mois de la vie, accompagnées ensuite par des rétractions musculaires multiples. Certains patients présentent de plus une rigidité spinale, une hypertrophie musculaire, une hyperlaxité distale ou une insuffisance respiratoire particulièrement marquées (Figure 15A et B). Les taux de créatine kinase plasmatiques sont très variables, de la normale à cinquante fois la normale. Les biopsies musculaires présentent des caractéristiques dystrophiques: augmentation prononcée du tissu conjonctif entre les fibres, présence de fibres en nécrose ou en régénération et observation de noyaux centraux dans certaines fibres. Les fibres sont aussi caractérisées par une grande variabilité de diamètre et une forme circulaire, contrairement aux fibres normales qui ont un aspect polygonal (Figure 15C) (Banker, 1994). Le diagnostic des DMC s'effectue donc sur la base de ce tableau clinique et sur l'analyse de biopsies musculaires de patients. Enfin, une dernière caractéristique discriminante majeure entre ces pathologies concerne l'implication du système nerveux central. Ceci peut inclure des anomalies de la substance blanche, des retards mentaux parfois importants et des problèmes oculaires.

Parallèlement, les myopathies congénitales forment aussi un groupe de maladies hétérogènes, associées généralement à un développement de la maladie plus tardif et moins sévère. Les biopsies musculaires ne présentent pas de phénomènes de nécrose et de régénération, mais des anomalies structurales souvent caractéristiques auxquelles ces pathologies doivent leur classification. C'est le cas par exemple, des myopathies à « cores » centraux (CCD) et des myopathies à multiminicores (MmD), qui sont caractérisées par la présence de « cores » dans les fibres musculaires, qui sont des zones de désorganisation cellulaire remarquables par l'absence de mitochondries et donc d'activité oxydative. Nous verrons par la suite que l'analyse génétique de plusieurs pathologies a conduit à reconsidérer cette classification. Les dystrophies progressives, comme la dystrophie musculaire des

ceintures (LGMD) ou la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), se manifestent de façon plus tardive que la plupart des DMC, précoces et le plus souvent peu évolutives. En outre, la DMD peut aussi être différenciée du groupe des DMC par son mode d'hérédité récessive, lié au chromosome X, et pour ses atteintes courantes du muscle cardiaque, qui sont rares dans les DMC.

Actuellement, le développement des techniques d'immunohistochimie et la disponibilité de différents anticorps, dirigés contre les protéines associées à la membrane des fibres musculaires, facilitent le diagnostic. Malgré cela, de nombreuses dystrophies demeurent encore non étiquetées, et les limites entre les différentes entités restent floues.



Figures 15: Caractéristiques cliniques des Dystrophies Musculaires Congénitales, d'après (Ferreiro et coll., 2004).

Les trois photographies proviennent de patients atteints d'une forme de dystrophie liée à SePN. On peut observer chez les patients DMC une rigidité de la nuque et de la colonne vertébrale (**A**), une scoliose et une diminution de la masse musculaire (**B**). **C**: Coloration Hématoxyline-Eosine d'une biopsie musculaire de patient. On constate une grande variabilité dans la taille des fibres musculaires, des noyaux centraux, quelques fibres en régénération et une légère augmentation du tissu conjonctif entre les fibres.

5.2. Collagène VI et DMC

Le collagène VI (Figure 14) est une protéine majeure de la matrice extracellulaire, composée de trois chaînes $\alpha 1$, 2 et 3, et dont la localisation chromosomique des gènes est connue. Les différentes chaînes polymérisent entre elles pour former un réseau de microfilaments (Bruns et coll., 1986). Plusieurs mutations dans les trois gènes codant pour chacune des chaînes du collagène VI ont été décrites chez des patients atteints de DMC avec hyperlaxité distale encore appelé syndrome d'Ullrich (UCMD) ou d'une myopathie moins sévère, la myopathie de Bethlem (Camacho Vanegas et coll., 2001; Demir et coll., 2004). Plusieurs fonctions sont connues pour cette protéine: elle interagit avec différentes protéines de la lamine basale comme le collagène IV ou la fibronectine, mais également avec des protéines transmembranaires telles les intégrines. Elle permet ainsi la transmission de signaux de l'espace péricellulaire vers l'espace intracellulaire, entraînant par exemple l'induction de la prolifération cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose (Atkinson et coll., 1996; Ruhl et coll., 1999).

5.3. Dystroglycane et DMC

Le gène DAG1 code pour un polypeptide qui est modifié post-traductionnellement pour obtenir les deux protéines α - et β -dystroglycane (Figure 14). Ces deux protéines sont fortement glycosylées et sont ensuite associées de manière non-covalente au niveau de la surface de la cellule. L' α -dystroglycane interagit alors avec différents ligands de la matrice extracellulaire par ses radicaux glycosylés. Quant au β -dystroglycane transmembranaire, l'interaction a lieu avec des protéines cytoplasmiques, ce qui permet de connecter l'extérieur de la cellule au cytosquelette (Chen et coll., 2003; Winder, 2001). Les dystroglycanes sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, comme le développement ou l'adhésion cellulaires, mais c'est leur rôle dans la formation de la membrane basale qui a le plus attiré l'attention. Chez la souris, l'inactivation du gène DAG1 est létal à un stade embryonnaire précoce, et son invalidation musculaire conditionnelle conduit à un phénotype dystrophique (Cohn et coll., 2002; Williamson et coll., 1997). L'intégrité musculaire est également perdue lors de l'inactivation du gène chez le poisson zèbre (Parsons et coll., 2002). L' α -dystroglycane est glycosylé de façon différentielle selon le tissu considéré, ce qui lui confère une fonctionnalité variable (McDearmon et coll., 2001). Des études ont permis de démontrer qu'il s'agissait d'O-glycosylations, parmi lesquelles on trouve les O-mannosylations,

particulièrement rares chez les mammifères, et qui confèrent des propriétés de liaison à des ligands particuliers (Endo, 1999; Holt et coll., 2000). De nombreuses formes de DMC sont associées à des dysfonctionnements dans ces processus de glycosylations, et l'on parle aujourd'hui de « dystroglycanopathies » pour décrire ces pathologies particulières (Muntoni et coll., 2002). Ces maladies sont la Dystrophie Musculaire Congénitale de type Fukuyama (FCMD), la maladie « Muscle-Eye-Brain » (MEB), le syndrome de Walker-Warburg (WWS) et les Dystrophies Musculaires Classiques de type C (MDC1C) ou D (MDC1D). Les premières protéines identifiées responsables de ces pathologies sont respectivement la Fukutine (Toda et coll., 1993), la protéine O-mannose 1,2-N-acétylglucosaminyltransférase (POMGnT1) (Yoshida et coll., 2001), les protéines O-mannosyltransférase (POMT1/2) (Beltran-Valero de Bernabe et coll., 2002), la protéine de type Fukutine (FKRP) (Brockington et coll., 2001) et la protéine LARGE (Longman et coll., 2003) (Figure 14). La Fukutine, la protéine LARGE et POMGnT1 sont localisées dans le Golgi, alors que POMT1/2 résident dans le réticulum endoplasmique. La FKRP est retrouvée dans l'un ou l'autre de ces compartiments, selon le type cellulaire et le stade de développement considérés (Esapa et coll., 2002; Matsumoto et coll., 2004). La Fukutine, la POMGnT1 et la FKRP sont des protéines transmembranaires et possèdent un motif conservé de type glycosyltransférase, ce qui n'est pas le cas de POMT1 (Martin-Rendon et Blake, 2003). POMT1/2 catalysent le transfert d'un résidu mannose sur l' α -dystroglycane et POMGnT1 réalise l'étape suivante d'addition de N-acétyl glucosamine sur le mannose lié au peptide (Manya et coll., 2004). La protéine LARGE permet d'induire la glycosylation d'un domaine central de l' α -dystroglycane (Kanagawa et coll., 2005; Kanagawa et coll., 2004). Les activités de la Fukutine et de la FKRP ne sont pas entièrement élucidées, mais les patients possédant des mutations de ces gènes présentent des profils d' α -dystroglycane hypoglycosylé (Michele et coll., 2002), suggérant que ce dernier pourrait être un substrat pour la Fukutine et la FKRP. L'importance de l' α -dystroglycane dans le développement du système nerveux central et dans la formation des jonctions neuromusculaires a pu être précisée au cours d'études récentes (Quijano-Roy et coll., 2006; Saito et coll., 2006; Taniguchi et coll., 2006; Torelli et coll., 2005). Chez la souris, l'inactivation des gènes codant pour la Fukutine ou POMT1 est également létal à un stade précoce du développement (Takeda et coll., 2003; Willer et coll., 2004). Les seuls modèles actuellement disponibles pour les dystroglycanopathies sont la souris myodystrophique, qui porte une mutation naturelle dans le gène de la protéine LARGE, et la souris déficiente en POMGnT1. Ces souris présentent des déficiences du muscle, du cerveau

et des yeux identiques à celles observées dans les dystroglycanopathies humaines (Liu et coll., 2006).

5.4. Intégrine $\alpha 7$ et DMC

L'hétérodimère d'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ (Figure 14) est un récepteur majeur des laminines dans les cellules musculaires (Figure 14) (Burkin et Kaufman, 1999). L'inactivation de son gène ITGA7 chez la souris provoque une myopathie accompagnée de défauts majeurs des jonctions myotendineuses (Mayer et coll., 1997). Jusqu'à présent, seuls trois patients présentant des mutations de ce gène ont été décrits et les informations concernant le phénotype sont limitées (Hayashi et coll., 1998).

5.5. Laminine- $\alpha 2$ et DMC

Les laminines sont des hétérotrimères essentiels, composants de la membrane basale. Actuellement, quinze types différents sont connus, formés de la combinaison de trois chaînes parmi cinq laminines α , trois laminines β et trois laminines γ . Les chaînes de laminine sont codées par des gènes différents. L'interaction des laminines avec l' α -dystroglycane ou certaines intégrines permet de maintenir l'intégrité de la membrane basale dans le muscle (Colognato et Yurchenco, 2000; Yurchenco et coll., 2004). La forme musculaire majeure est la laminine-2, encore appelée mérosine (Figure 14). Elle est constituée des chaînes de laminine $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\gamma 1$. Un tiers des cas de DMC, les Dystrophies Musculaires Congénitales déficientes en mérosine ou de type A (MDC1A), est causé par des mutations dans le gène LAMA2, qui code pour la chaîne de laminine $\alpha 2$, résultant généralement de l'absence complète de cette protéine (Tome et coll., 1994). Certaines mutations plus rares, entraînant la synthèse de formes aberrantes de la laminine $\alpha 2$, peuvent conduire à des phénotypes de sévérité variable, selon que la polymérisation de la laminine-2 est affectée ou non (Guo et coll., 2003; Nissinen et coll., 1996).

5.6. Sélénoprotéine N et DMC

La sélénoprotéine N (Figure 14) et son implication dans des cas de DMC ont été l'objet de mon travail de thèse, et sont traités en détail dans la partie introductive à l'article n°2, ainsi que dans tout le chapitre « Résultats », où sont également évoqués les gènes impliqués dans d'autres pathologies apparentées aux formes de DMC associées à une déficience de SePN, mais qui sont classées dans le groupe des myopathies congénitales sur la base de données cliniques et morphologiques.

Dystrophies Musculaires Congénitales (DMC) dont le gène responsable est connu

Nom	Implication du Système Nerveux Central (SNC)	Gène	Pos.	Protéine
Déficit en mérosine (MDC1A)	Hypodensité de la substance blanche	LAMA2	6q	Laminine- α 2
Fukuyama (FCMD)	Retard mental et changements structuraux	FKTN	9q	Fukutine
Maladie « Muscle-Eye-Brain » (MEB)	Retard mental et changements structuraux	POMGnT1 (FKRP)	1p	POMGnT1
Forme italienne de la MEB	Retard mental et changements structuraux	POMT1	9q	POMT1
Syndrome Walker-Warburg (WWS)	Changements structuraux	POMT1/2 (FKRP, POMGnT1)	9q	POMT1
Dystrophie Musculaire Classique de type 1C (MDC1C)	Variable	FKRP	19	FKRP
Dystrophie Musculaire Classique de type 1D (MDC1D)	Retard mental et changements structuraux	LARGE	22q	LARGE
Dystrophie Musculaire Congénitale à Rigidité Spinale (RSMD1)	Non	SEPN1	1p	SePN
Déficit en Intégrine α 7	Non	ITGA7	12q	Intégrine α 7
Syndrome d'Ullrich (UCMD)	Non	COL6A1, A2, A3	2 et 21q	Collagène VI

Dystrophies Musculaires Congénitales dont le gène responsable n'est pas connu

Nom	Implication du Système Nerveux Central (SNC)	Gène	Pos.	Protéine
WWS non lié à POMT1/2 (80% des cas)	Changements structuraux	?	?	?
Dystrophie Musculaire Classique de type 1B (MDC1B)	Non	?	1q	?
DMC avec implication des Systèmes Nerveux Centraux et Périphériques	Changements structuraux et hypodensité de la substance blanche	?	?	?
DMC avec pouces de travers	Retard mental et hypoplasie cérébelleuse	?	?	?

Tableau 5: Les Dystrophies Musculaires Congénitales au 1^{er} Janvier 2005, d'après (Jimenez-Mallebrera et coll., 2005)

Les DMC dont le gène responsable a été identifié ou non sont indiquées. Les implications du Système Nerveux Central sont données si elles existent, de même que la protéine impliquée et la position de son gène, s'ils sont connus.

1. Avant-propos: Identification de mutations dans le gène SEPN1

Cinquante pour cent des patients atteints de dystrophies musculaires congénitales (DMC) présentent une mutation dans le gène LAMA2 qui code pour une sous-unité de la mérosine (Tome et coll., 1994). A l'opposé de ce groupe, les patients DMC non déficients en mérosine constituent un groupe cliniquement très disparate, suggérant de ce fait une hétérogénéité génétique (Dubowitz, 1997). L'identification des gènes responsables de ces différentes formes de DMC constitue donc une étape importante dans la caractérisation de ces maladies. A la fin des années 90, l'équipe de Pascale Guicheney, à l'Institut de Myologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris, s'est consacrée à l'identification de gènes responsables de DMC non déficientes en mérosine. Elle s'est particulièrement intéressée à une forme particulière de DMC caractérisée par une rigidité du rachis, pour laquelle une famille consanguine informative était disponible. Par des techniques de cartographie récurrente par homozygotie, elle a pu ainsi identifier un premier locus impliqué dans l'une de ces DMC (Moghadaszadeh et coll., 1998). Localisé sur le chromosome 1 en position p35.36, sur un intervalle de 6 cM, ce locus nommé RSMD1 pour « Rigid Spine Muscular Dystrophy 1 » contenait toutefois un nombre trop important de gènes pour permettre l'identification de la mutation. Parmi eux, deux gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire constituaient de bons candidats. En 1999, des enfants d'autres familles, atteints d'une DMC avec un phénotype proche de celui décrit pour le syndrome associé à une rigidité du rachis furent étudiés. La liaison au locus RSMD1 ne fut confirmée que pour l'une d'entre elles, indiquant l'implication probable d'autres gènes dans ces pathologies (Moghadaszadeh et coll., 1999). En 2001, une nouvelle série de familles informatives permit de restreindre le locus à une taille de moins de 1 cM, grâce à l'existence d'un déséquilibre de liaison, excluant de fait les deux candidats envisagés initialement. Cette région contenait une vingtaine de gènes, parmi lesquels SEPN1, le gène codant pour une sélénoprotéine nouvellement identifiée (Moghadaszadeh et coll., 2001).

La sélénoprotéine N a été identifiée par Alain Lescure dans notre laboratoire en 1999, grâce à une approche bioinformatique basée sur la recherche d'éléments SECIS dans les bases de données issues du séquençage de génomes (Lescure et coll., 1999). Hormis un domaine N-

terminal riche en acides aminés hydrophobes, un motif putatif de liaison du calcium et la présence du résidu sélénocystéine dans un motif similaire à celui observé dans le site catalytique de la famille des thiorédoxine réductases, aucune fonction n'avait pu être prédite pour SePN sur la base des similitudes de séquence avec des protéines de fonction connue. SePN constituait un bon candidat pour la DMC avec rigidité du rachis. Nous avons montré que la sélénoprotéine N était exprimée dans le muscle squelettique (Figure 16). En outre, il avait été décrit dans la littérature qu'une double carence en sélénium et en vitamine E provoquait une pathologie chez des agneaux (Figure 17) (Rudert et coll., 1978). Cette pathologie ovine, appelée « Rigid Lamb Syndrome », semblable en plusieurs points à la pathologie humaine, se caractérise par une rigidité des membres inférieurs ainsi qu'une calcification des muscles squelettiques et cardiaques. Le séquençage du gène de SePN chez les patients a conduit à l'identification d'une mutation dans tous les cas analysés, démontrant ainsi que SEPNI était responsable de la pathologie. Cette étude a permis la mise en évidence de plusieurs mutations alléliques (Moghadaszadeh et coll., 2001). Par la suite, la caractérisation de l'ADN complémentaire complet du gène a permis d'établir sa structure génomique. Elle est constituée de 13 exons pour une taille de 18,5 kb. L'existence de deux isoformes de l'ARNm a pu être prédite à partir de banques de données EST et d'expériences de RT-PCR. Elles diffèrent par la présence ou non d'un exon 3 qui peut être épissé alternativement.

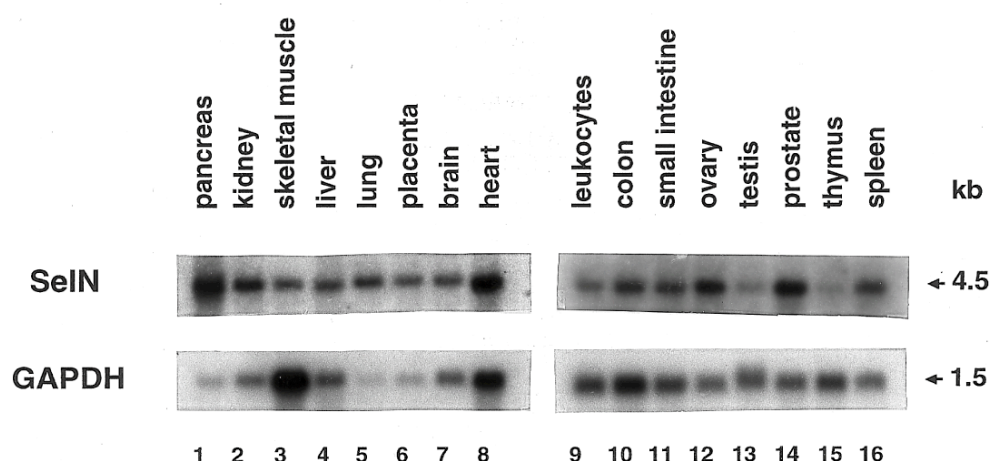


Figure 16: L'ARN messager de la sélénoprotéine N est ubiquitaire

Etude de l'expression de SEPNI dans différents tissus par northern blot d'après Lescure et coll. (Lescure et coll., 1999). Le transcrit de SEPNI, d'une taille environ égale à 4,5 kb, est retrouvé dans tous les tissus analysés. On peut toutefois remarquer un signal particulièrement intense dans le pancréas, le poumon et le placenta. Cette ubiquité du messager de la sélénoprotéine N est surprenante au regard de la pathologie restreinte aux muscles observée chez l'homme lorsque le gène SEPNI est muté.

Cet exon correspond à une cassette Alu et contient un codon UGA en phase (Figure 18). La traduction de l'isoforme la plus courte conduit à la synthèse d'une protéine de 590 acides aminés (Moghadaszadeh et coll., 2001). De façon intéressante, en 2002, l'équipe de Pascale Guicheney, qui suspectait une relation entre la forme classique de la myopathie à multiminicores (MmD) et la sélénoprotéine N sur la base d'informations cliniques et morphologiques convergentes, a montré qu'une mutation dans le gène SEPN1 était trouvée dans plusieurs des familles considérées (Ferreiro et coll., 2002a). Ceci illustre une nouvelle fois l'hétérogénéité d'une pathologie musculaire, la MmD, dont le premier gène impliqué avait été identifié quelques mois auparavant: il s'agit du gène codant pour le récepteur ryanodine de type 1 (RYR1) (Ferreiro et coll., 2002b).

374

THE VETERINARY RECORD, APRIL 29, 1978

Papers and Articles

A rigid lamb syndrome in sheep in Rhodesia

C. P. RUDERT, DIPAGRIC, BSC(AGRIC), Henderson Research Station, Department of Research and Specialist Services, Ministry of Agriculture, Private Bag 222 A, Salisbury, Rhodesia, J. A. LAWRENCE, DPHIL, BSC, DVM, C. FOGGIN, BVSC, Veterinary Research Laboratory, Department of Veterinary Services, Ministry of Agriculture, PO Box 8101, Causeway Salisbury, Rhodesia, R. M. BARLOW, DSC, DVM&S, Moredun Institute, 408 Gilmerton Road, Edinburgh

Veterinary Record (1978), 102, 374-377

A syndrome characterised by the birth of lambs with varying degrees of rigidity of the limbs and spine has been encountered on several occasions in Rhodesia. Outbreaks have occurred in autumn-born lambs from Dorper ewes grazing heavily fertilised Star grass cv No 2 (*Cynodon aethiopicus*) pastures. The condition appears to be exacerbated by the application of sulphur to the pasture and is partly prevented by the administration of selenium and vitamin E to the ewes before lambing. The aetiology is unknown.



Figure 17: Le syndrome « Rigid Lamb » chez l'agneau

Dans cet article de 1978 publié par Rudert et coll. (Rudert et coll., 1978), une pathologie liée à la double carence alimentaire en sélénium et vitamine E est décrite. Il s'agit d'un syndrome musculaire, caractérisé par une rigidité des membres et de la colonne vertébrale, et une calcification des muscles cardiaques et squelettiques. Ces symptômes, notamment la rigidité spinale, similaires à ceux observés chez les enfants atteints de dystrophie musculaire congénitale, ont suggéré que le gène SEPN1 codant pour la sélénoprotéine N pouvait être un gène candidat. Le séquençage du gène chez des patients et l'identification de mutations a confirmé par la suite cette hypothèse (Moghadaszadeh et coll., 2001).

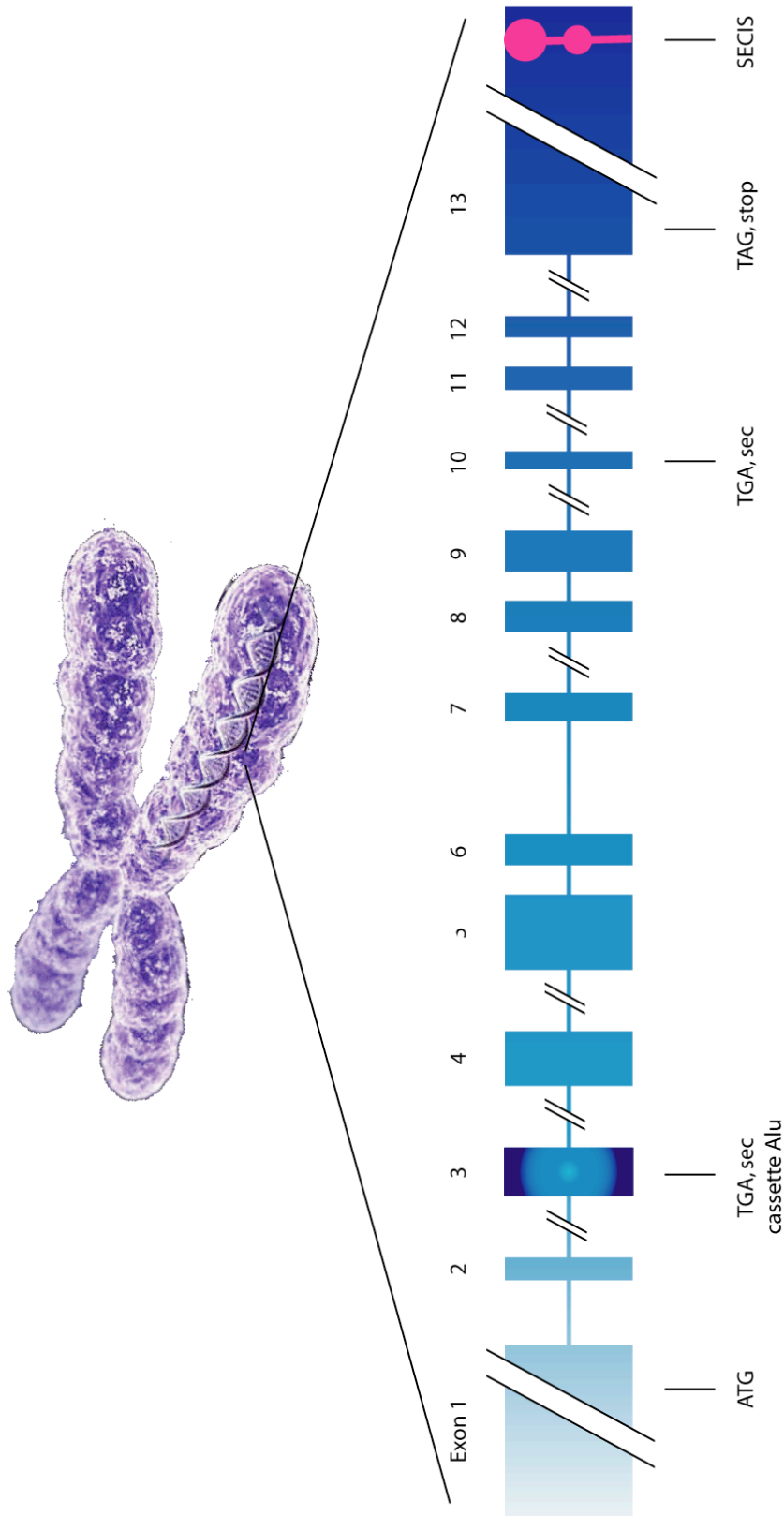


Figure 18: Structure génomique de SEP1. Le gène codant pour la sélénoprotéine N est localisé sur le chromosome 1 en position p35-36. Il a une taille de 18,5 kb. Sa transcription produit deux ARN messagers de 4,4 et 4,5 kb, résultant d'un épissage alternatif de l'exon 3. Cet exon 3 correspond à une cassette Alu. Le transcrit le plus court est majoritairement exprimé, mais les 2 isoformes sont détectées dans les muscles squelettiques, le cerveau, les poumons ou encore le placenta. L'exon 3 présente un codon UGA en phase, mais le produit de la traduction de l'isoforme 1 incluant cette séquence additionnelle n'a jamais été observé. Le codon TGA sélénocystéine est situé dans l'exon 10. Le codon stop TAG et l'élément SECIS sont portés par l'exon 13.

Parmi les mutations décrites dans SEPNI, certaines sont communes aux patients RSMD et MmD, suggérant que ces deux pathologies consistent en des expressions différentes d'une seule et même maladie. On parle depuis lors de la famille des myopathies reliées à la sélénoprotéine N (SePN-RM) pour évoquer ces différentes pathologies musculaires.

Au cours de mon travail de thèse, de nouvelles mutations dans le gène SEPNI et de nouveaux syndromes sont venus enrichir cette famille. L'observation d'inclusions de type corps de Mallory dans deux cas de SePN-RM a conduit à la recherche de nouvelles maladies musculaires provoquées par un dysfonctionnement de la protéine. Des corps d'inclusion similaires ont été observés chez certains patients atteints d'une forme particulière de myopathies reliées à la desmine (DRM): les DRM à inclusions de type corps de Mallory (MB-DRM). Ces pathologies constituent un groupe hétérogène de maladies musculaires, pour lesquelles le gène responsable n'a été déterminé que dans un nombre restreint de cas. La suspicion d'une implication de SEPNI fut confirmée par la démonstration du lien entre la maladie et le locus 1p35.36, puis le séquençage du gène chez différents patients (Ferreiro et coll., 2004). Il a donc été proposé que les MB-DRM soient classées dans le groupe des SePN-RM, ce qui élargit encore le spectre des maladies de ce groupe particulier tout en soulignant l'hétérogénéité moléculaire des DRM. Des mutations inédites ont ensuite été décrites dans SEPNI, chez des patients atteints de DMC dont le gène responsable n'avait pas encore été déterminé (Tajsharghi et coll., 2005; Venance et coll., 2005). En 2005, des auteurs travaillant sur le syndrome « Dropped Head » ont pu identifier les gènes responsables de la maladie chez deux patients. Dans l'un des cas, il s'agissait d'une mutation dans le gène codant pour la lamine A/C, généralement impliquée dans la famille de pathologies musculaires des laminopathies, alors que dans l'autre, la cause a une nouvelle fois pu être imputée au gène SEPNI. Enfin, très récemment, le gène SEPNI a encore été associé à la myopathie congénitale à disproportion de type de fibre (CFTD), et constitue le deuxième gène responsable de cette pathologie, après le gène ACTA1 codant pour l'actine α 1 sarcomérique (Clarke et coll., 2006). L'ensemble de ces résultats reflète une nouvelle fois la grande diversité phénotypique et génétique des maladies musculaires. En outre, l'observation d'un même défaut génétique dans différents syndromes suggère l'implication de facteurs environnementaux ou génétiques additionnels dont les rôles dans l'apparition des diverses pathologies musculaires ne doivent pas être négligés. L'identification de ces facteurs additionnels est une question complexe, mais dont la compréhension permettrait de mieux

appréhender la variabilité d'expression d'une même mutation, au sein parfois d'une même famille de patients.

2. Objectifs du travail de thèse

Au début de mon travail de thèse, peu de choses étaient connues concernant la sélénoprotéine N. Elle avait été identifiée deux ans auparavant au laboratoire par une approche bioinformatique et l'implication de son dysfonctionnement dans deux pathologies musculaires venait d'être démontrée. L'organisation génomique de SEPN1 avait pu être déduite de l'alignement de la séquence du chromosome 1 avec les ADNc. La comparaison de la séquence peptidique de SePN avec les séquences des protéines de fonction connue avait permis de caractériser, en position N-terminale, un motif riche en acides aminés hydrophobes et un domaine putatif de liaison du calcium de type « EF-Hand », ainsi que la présence du résidu sélénocystéine dans un motif similaire au site actif conservé des enzymes de la famille des thiorédoxine réductases (Figure 19). Toutefois, aucune information concernant sa fonction potentielle n'a pu être obtenue sur la base de l'analyse comparative de séquences, motivant de ce fait la poursuite de son étude par différentes approches. Des études de biologie cellulaire et de biochimie ont été entreprises afin de caractériser le produit du gène SEPN1, de déterminer sa localisation intracellulaire et d'appréhender sa fonction biochimique. Nous avons également choisi de développer des modèles animaux des pathologies musculaires provoquées par un dysfonctionnement de SePN, chez la souris et le poisson zèbre.

MGRARPGQRGPPSPGPAAQPPAPPRRRARSLALLGALLAAAAAAVRVCARHA
 EAQAAARQELALKTLGTDGLFLFSSLDTDGDMYISPEEFKPIAEKLTGSTPAA
 SCEEELPPDPSEETLTIEARFQPLLPETMTKSKDGFLGVSRLALSGLRNWTA
 AASPSAVFATRHFQPFLLPPPGQELGEPWWIIPSELSMFTGYLSNNRFYPPPK
 GKEVIIHRLLSMFHPRPFVKTRFAPQGAVACLTAISDFYYTVMFRIHAEFQLS
 EPPDFPFWFSPAQFTGHIILSKDATHVRDFRLFVPNHRSLNVDMEWLYGASES
 SNMEVDIGYIPQMELEATGPSVPSVILDEDGSMIDSHLPSGEPLQFVFEEIKW
 QQELSWEEAARRLEVAMYPFKKVSYPFTEAFDRAKAENKLVHSILLWGALDD
 QSCUGSGRTLRETVLESSPILTLNESFISTWSLVKELEELQNKQENSSHQKL
 AGLHLEKYSFPVEMMICLPNGTVVHHINANYFLDITSVKPEEIESNLFSFSST
 FEDPSTATYMQFLKEGLRRGLPLLQP

Figure 19: Séquence peptidique de la sélénoprotéine N

La séquence des acides aminés de la sélénoprotéine N est représentée. Sur la base de l'analyse comparative de la séquence de SePN avec les séquences des protéines de fonction connue répertoriées dans les banques de données, un motif N-terminal riche en acides aminés hydrophobes a été mis en évidence, représenté en vert. Il constitue un motif d'adressage potentiel vers un compartiment particulier et contient des résidus arginine aux positions 3 et 5, ainsi qu'une séquence hydrophobe entre les positions 30 et 49. Un motif putatif de liaison du calcium de type EF-Hand est indiqué en orange. Le résidu sélénocystéine est représenté en rose, au sein d'un motif SCUG représenté en gras. Il est conservé dans le site actif des sélénoprotéines de la famille des thiorédoxine réductases (TrxR). Dans celles-ci, ce motif est associé à un motif CXXC très important pour l'activité catalytique, qui est absent chez SePN, où l'on ne retrouve que 4 résidus sélénocystéine représentés en bleu. Le lien fonctionnel entre les TrxR et SePN n'est donc pas connu et peut ne pas être significatif.

3. Caractérisation fonctionnelle de la Sélénoprotéine N (SePN)

3.1. Publication numéro 2

3.1.1. Objectifs de l'étude

Les objectifs de l'étude dont les travaux sont décrits dans cet article étaient multiples. Il s'agissait dans un premier temps d'analyser l'expression des deux variants de l'ARNm de la sélénoprotéine N et d'en caractériser les produits. Ensuite, nous souhaitions déterminer la localisation intracellulaire de la sélénoprotéine N et, enfin, étudier son profil d'expression au cours de la myogenèse, à partir de fibroblastes en cours de différenciation.

3.1.2. Résumé

Dans cet article est décrite la première caractérisation du produit du gène *SEPN1*, la sélénoprotéine N, ainsi que la détermination de sa localisation intracellulaire. Pour cela, des anticorps polyclonaux, dirigés contre un domaine C-terminal commun aux protéines issues de l'expression des deux isoformes d'ADNc identifiées préalablement, ont été développés. Ils nous ont permis de montrer qu'une protéine unique de 70 kDa était synthétisée, correspondant à l'expression de l'isoforme la plus courte qui ne contient qu'un seul résidu sélénocystéine. Par des expériences de fractionnement cellulaire et de sensibilité à l'endoglycosidase H, nous avons montré que SePN est une glycoprotéine associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Ces observations ont été confirmées par des analyses d'immunofluorescence. Des expériences de fusion avec la « Green Fluorescent Protein » (GFP) ont conduit à l'identification d'un signal d'adressage et de rétention au RE à l'extrémité N-terminale de la protéine. Enfin, nous avons montré que SePN était exprimée dans de nombreux tissus humains, y compris dans les muscles squelettiques. Cependant, le niveau d'expression dans les tissus fœtaux est toujours supérieur à celui des tissus adultes. L'étude de l'expression de SePN au cours des processus de différenciation myogénique suggère un rôle important au cours du développement embryonnaire et de la prolifération cellulaire.

3.1.3. « Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern »

Nathalie Petit, Alain Lescure, Mathieu Rederstorff, Alain Krol, Behzad Moghadaszadeh, Ulla M. Wewer et Pascale Guicheney

Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 9, pp. 1045-1053

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern

Nathalie Petit, Alain Lescure, **Mathieu Rederstorff**, Alain Krol, Behzad Moghadaszadeh, Ulla M. Wewer et Pascale Guicheney

Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, Pages 1045-1053

Pages 1045 à 1053 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/12/9/1045>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

3.1.4. Discussion

L'obtention de plusieurs anticorps polyclonaux dirigés contre différentes régions de la protéine a permis l'étude de l'expression du gène SEPN1 (Figure 1 de l'article). Bien que l'existence de deux transcrits avait été décrite dans plusieurs tissus par des expériences de RT-PCR (Moghadaszadeh et coll., 2001), nous n'avons observé qu'une seule protéine de 70 kDa, et ce dans tous les tissus et types cellulaires analysés. En outre, le traitement de SePN avec une glycosidase permet d'obtenir une protéine présentant une mobilité électrophorétique de 62 kDa. Cette valeur correspond à la taille prédite pour la protéine issue du variant 2, dépourvu de l'exon 3. Il est intéressant de rappeler que l'exon 3 correspond à une cassette Alu. Les éléments Alu sont des petits éléments de séquence qui sont amplifiés et disséminés dans les génomes de primates par des événements de rétrotransposition (Rowold et Herrera, 2000). On estime leur nombre à environ 1,4 million, constituant ainsi plus de 10% du génome humain (Lander et coll., 2001). Il a été démontré également que 5% des exons du génome humain épissés alternativement étaient dérivés de séquences Alu. Réciproquement, la plupart des exons contenant une cassette Alu sont épissés alternativement (Sorek et coll., 2002). Il n'est donc pas surprenant que l'exon 3 de SEPN1 soit lui aussi épissé. L'absence de produit d'expression issu du variant 1 suggère que le codon UGA additionnel localisé dans l'exon 3 est reconnu comme un codon stop. Il faut noter également que cet exon 3 n'est pas phylogénétiquement conservé. Il est par exemple absent dans la séquence génomique de SEPN1 chez la souris. On peut imaginer que le variant 1 corresponde à un pseudo-transcrit, reflétant un mécanisme évolutif non productif. Nous avons donc conclu que la sélénoprotéine N est une glycoprotéine de 70 kDa contenant un seul résidu sélénocystéine (Figure 20).

Les expériences de fractionnement subcellulaire réalisées à partir de fibroblastes, combinées à des analyses par immunofluorescence, indiquent que SePN est une protéine associée au réticulum endoplasmique. Afin de déterminer quelle région de la protéine permet l'adressage à ce compartiment, des expériences de fusion avec la protéine fluorescente GFP ont été réalisées. C'est à cette partie de l'étude que je me suis consacré à mon arrivée au laboratoire. Différentes régions N-terminales de SePN de taille croissante ont été clonées dans un vecteur d'expression eucaryote permettant la synthèse de protéines de fusion avec la GFP (Figure 21). Quatre constructions ont ainsi été réalisées correspondant aux fusions à la GFP des exons 1, 1-2, 1-2-4 ou 1-2-3-4 (Figure 21). La GFP seule est utilisée comme contrôle. L'expression de ces protéines de fusion par transfection dans des cellules HeLa a permis

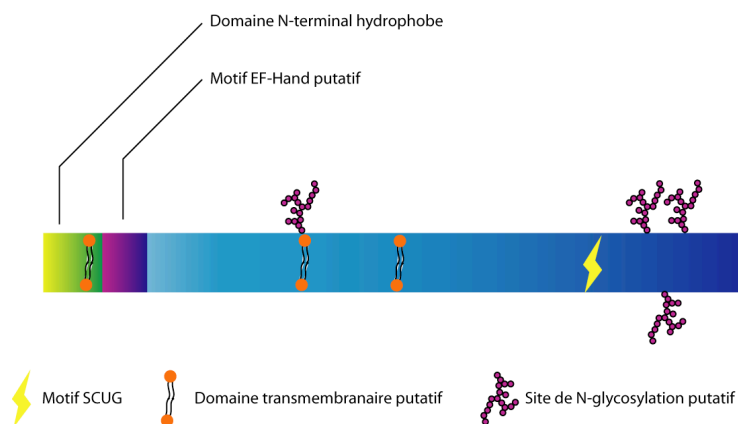


Figure 20: Structure de la sélénoprotéine N

SePN correspond à une protéine de 70 kDa composée de 590 acides aminés, issue de la traduction du transcrit majoritaire (le plus court) du gène SEPNI. La sélénocystéine est trouvée en position 428, au sein d'un motif SCUG, similaire en séquence au site actif des thiorédoxine réductases. Le domaine N-terminal riche en acides aminés hydrophobes est schématisé par un rectangle vert; il permet l'adressage de SePN dans le réticulum endoplasmique. Le domaine putatif de liaison du calcium de type EF-Hand est schématisé par un rectangle mauve. Quatre sites potentiels de N-glycosylation et 3 domaines transmembranaires putatifs, prédits sur la base d'analyses bioinformatiques, sont schématisés; seul le premier domaine transmembranaire serait fonctionnel. L'action de la N-glycosidase F sur SePN augmente sa mobilité électrophorétique de 8 kDa environ, démontrant l'existence de groupements glycosidiques sur cette protéine.

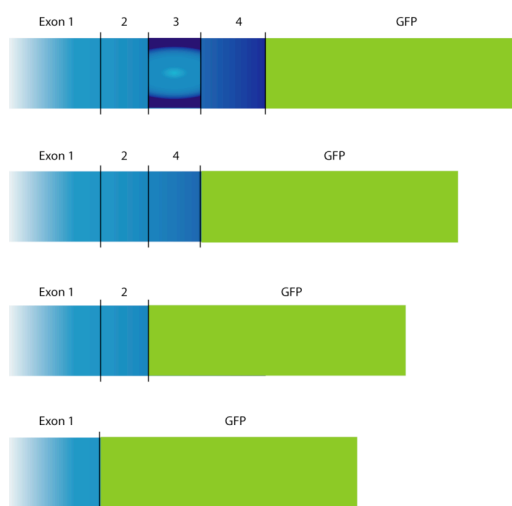


Figure 21: Localisation du signal d'adressage au réticulum endoplasmique

Les 4 constructions utilisées pour la détermination de la localisation des séquences d'adressage et de rétention de SePN dans le réticulum endoplasmique sont schématisées. Les fusions à la GFP ont été réalisées avec les exons 1, 1-2, 1-2-4 ou 1-2-3-4. Dans chacun des cas, l'autofluorescence de la GFP a pu être observée dans le réticulum endoplasmique, alors que la GFP servant de témoin est distribuée de façon diffuse dans l'ensemble de la cellule. Ces observations permettent d'affirmer que l'exon 1 est nécessaire et suffisant pour permettre l'adressage de SePN dans le réticulum endoplasmique.

de démontrer que l'exon 1 était nécessaire et suffisant pour obtenir l'adressage de la protéine de fusion dans le réticulum endoplasmique. En effet, la localisation dans ce compartiment a pu être vérifiée pour chacune de ces quatre constructions, y compris celle restreinte au seul exon 1. Par comparaison, la GFP témoin est localisée de façon diffuse dans la cellule (Figure 4B de l'article). De façon surprenante, la délétion de l'exon 1 conduit à la relocalisation de SePN dans le noyau. L'exon 1 code pour une région N-terminale riche en acides aminés hydrophobes et contient deux éléments remarquables, constituant des signaux canoniques d'adressage au réticulum. Il s'agit de deux résidus arginine aux positions 3 et 5, ainsi qu'une séquence hydrophobe entre les positions 30 et 49 (Figure 19).

Des analyses bioinformatiques de la séquence avaient prédit la présence de un à trois domaines transmembranaires dans la protéine. Pour déterminer le mode d'association de SePN à la membrane du réticulum, des expériences d'extraction de la protéine ont été réalisées sur des fractions enrichies en microsomes, en présence de détergents. La faible solubilisation de la protéine SePN à de fortes concentrations en détergent (1% Triton X-100), conditions dans lesquelles est extraite la calnexine, une autre protéine de la membrane du réticulum endoplasmique, permet d'imaginer que cette protéine est fortement associée, peut-être sous forme d'un complexe. La présence d'un motif di-arginine aux positions 3 et 5 suggère en outre que le domaine N-terminal est protubérant du côté cytoplasmique. Cette topologie a pu être confirmée par des expériences de digestion à la trypsine, effectuées sur des préparations membranaires de cellules HeLa. Des cellules ont préalablement été transfectées avec différentes constructions, codant pour des formes recombinantes de SePN. Ces différentes formes présentent des étiquettes, soit strep-tag[®] en position N-terminale, soit 6-histidines en position C-terminale, qui permettent de détecter la protéine avec des anticorps spécifiques. Selon l'orientation de SePN dans la membrane, les extrémités de la protéine seront différenciellement protégées de la digestion par la trypsine (Figure 22). En l'absence de détergent, les régions localisées à l'intérieur des microsomes formés lors de la préparation des extraits membranaires sont protégées. *In vivo*, ces régions protégées correspondent au lumen du réticulum endoplasmique. L'addition de détergent rompt l'intégrité membranaire, rendant ainsi accessibles à la digestion tryptique les régions de la protéine initialement protégées. On constate qu'en absence de détergent, la région C-terminale est insensible à la digestion (Figure 23, piste 2), contrairement à la région N-terminale (piste 5). La région C-terminale est digérée lorsque l'extrait membranaire est traité par l'addition de détergent (piste 3).

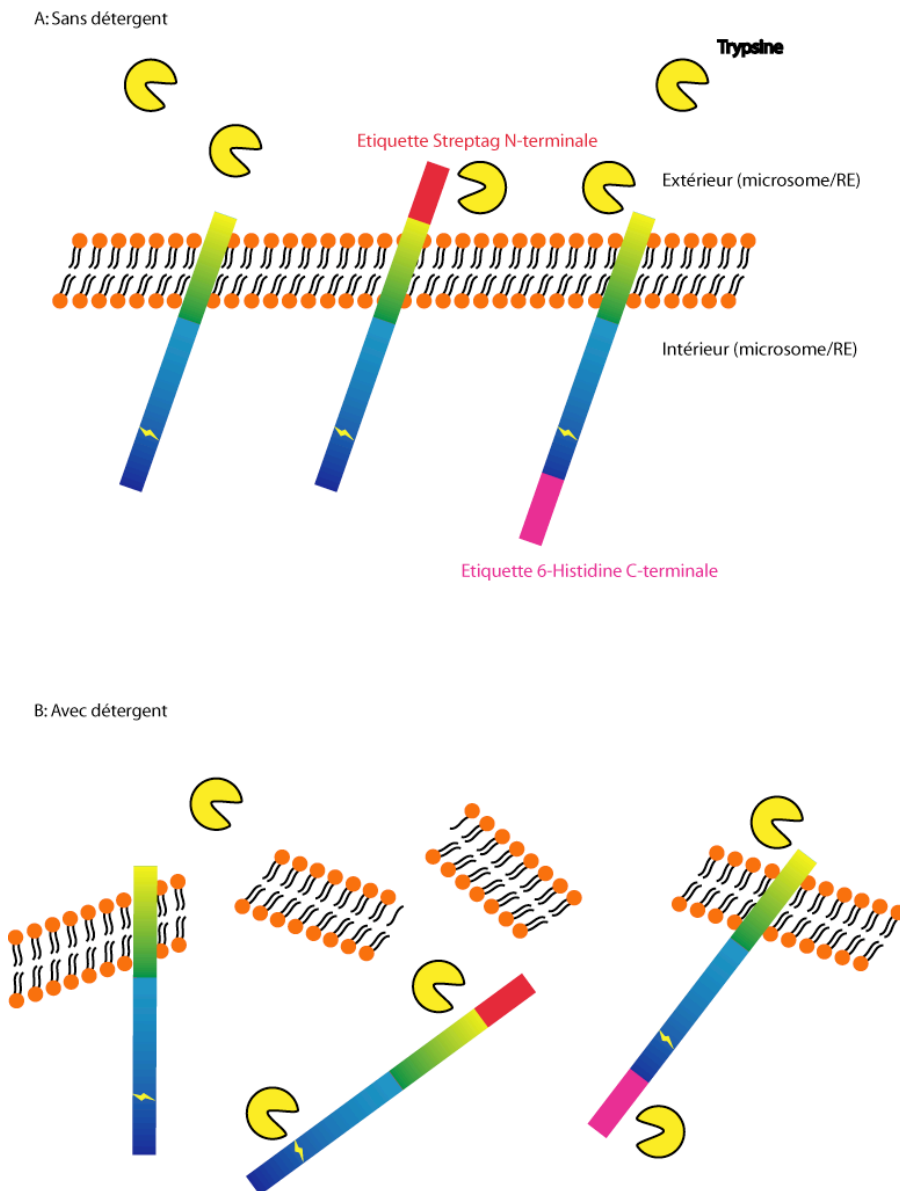


Figure 22: Détermination de la topologie membranaire de SePN

Des expériences d'extraction en présence de détergent ont montré que SePN était une protéine associée à la membrane. Des prédictions avaient permis d'émettre l'hypothèse qu'une courte région N-terminale était localisée dans le cytoplasme. Pour vérifier cette orientation de la protéine dans la membrane, des expériences de protection à la trypsine ont été réalisées sur des préparations membranaires en absence (**A**) ou en présence (**B**) de détergent. Les extraits membranaires sont issus de cellules HeLa exprimant des formes recombinantes de SePN, portant des étiquettes en position N- ou C-terminale. **A:** Sur le microsome intègre, seule l'étiquette située à l'extrémité de la protéine située à l'extérieur du microsome (face cytoplasmique) est sensible à la digestion trypsique, l'autre extrémité étant protégée. **B:** Après addition de détergent, l'intégrité membranaire est rompue. L'ensemble de la protéine devient accessible à la trypsine.

Ainsi, on peut conclure que la partie C-terminale hydrophile de la protéine est localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique et que seule une petite région N-terminale, sensible à la digestion lorsque les membranes sont intègres, est protubérante dans le cytoplasme. En outre, on peut conclure qu'il n'existe probablement qu'un seul domaine transmembranaire.

Sur la base des informations disponibles, plusieurs fonctions possibles peuvent être proposées pour SePN. Tout d'abord, sa localisation dans la membrane du réticulum endoplasmique conduit à envisager un rôle dans le trafic membranaire ou la maturation des protéines. Sa nature de sélénoprotéine laisse entrevoir une autre fonction possible dans des phénomènes de lutte contre les radicaux libres oxygénés, notamment au niveau des muscles, tissus dont l'activité génère des espèces oxydantes en abondance. La présence du résidu sélénocystéine dans un motif SCUG similaire au site actif des thiorédoxine réductases (TrxR), peut constituer un nouvel indice. Toutefois, dans les TrxR, ce motif est toujours associé à un second motif rédox CXXC localisé dans la partie N-terminale de la protéine. Ce second motif

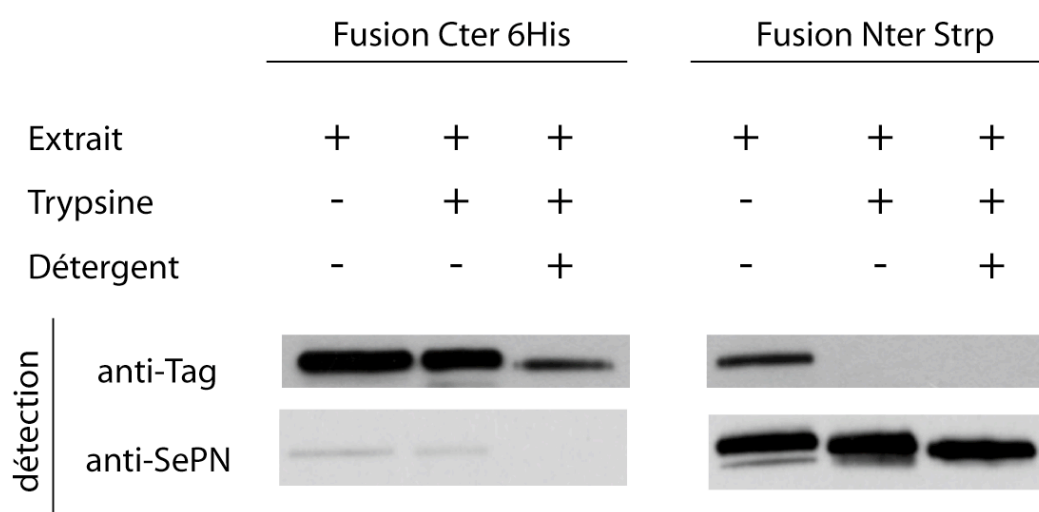


Figure 23: Détermination de la topologie de SePN dans la membrane de microsomes issus du réticulum endoplasmique

La sélénoprotéine N est détectée par western-blot utilisant différents anticorps dirigés contre deux étiquettes, Histidine en position C-terminale (panneau supérieur gauche), Strep-tag 2 en position N-terminale (panneau supérieur droit) ou directement la protéine SePN (panneaux inférieurs). Sans détergent, la région C-terminale de la protéine n'est pas sensible à la trypsine (comparer les pistes 1, contrôle sans trypsine, et 2). En présence de détergent, une fraction de la protéine est dégradée (comparer pistes 2 et 3). La région N-terminale de la protéine est digérée par la trypsine indépendamment de la présence de détergent (comparer la piste 4 avec les pistes 5 et 6). Les membranes ont été réhybridées avec un anticorps dirigé contre la sélénoprotéine N, pour vérifier sa présence. La taille de la protéine est légèrement inférieure en présence de trypsine et la quantité de protéine diminue en présence de trypsine et de détergent.

est très important pour l'activité catalytique de l'enzyme: il permet la réduction NADPH dépendante du site actif. Il n'est pas retrouvé dans la sélénoprotéine N. De ce fait, le niveau de relation fonctionnelle entre SePN et les TrxR n'est pas bien défini. Une dernière fonction que nous pouvons envisager, du fait de sa localisation, correspond à la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire. En effet, le réticulum endoplasmique est le lieu de stockage du calcium cellulaire. En réponse à certains signaux, le calcium est sélectivement relargué dans le cytoplasme, où il constitue à son tour un signal pour de nombreux processus tels que la contraction musculaire. Cette dernière hypothèse est étayée par la présence d'un domaine putatif de liaison du calcium de type « EF-Hand » dans la région N-terminale de la protéine. Ce domaine a été identifié sur la base d'analyses bioinformatiques de la séquence. De plus, une des autres protéines dont une mutation dans le gène a été corrélée à la MmD est le récepteur ryanodine de type 1. Cette protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique correspond à un canal calcique spécifique du muscle squelettique (Romero et coll., 2005). Il a été démontré que l'activité de RYR1 pouvait être régulée ou affectée par la présence de radicaux libres oxygénés dans la cellule (Eu et coll., 2000; Han et coll., 2006; Sun et coll., 2001a). On peut imaginer que la sélénoprotéine N et ses capacités rédox pourraient intervenir dans ces processus de régulation.

D'autres indices fonctionnels sont apportés par des analyses de l'expression du gène SEPN1. Des expériences de northern-blot ont illustré précédemment la distribution des transcrits de SEPN1 dans la majorité des tissus adultes analysés (Figure 16). Les travaux réalisés dans notre étude indiquent que la protéine est ubiquitaire. Ce résultat peut paraître surprenant au regard de la pathologie musculaire engendrée par le dysfonctionnement de SePN. Cependant, nous avons montré que la protéine s'accumule de façon plus importante dans les tissus fœtaux comparés aux tissus adultes et que le niveau de SePN décroît fortement au cours de la différenciation de fibroblastes en culture en myotubes. Ces observations suggèrent une expression préférentielle de la protéine dans les cellules en prolifération ou les tissus en développement. Cet aspect a pu être confirmé par les travaux réalisés par Alain Lescure au laboratoire, en collaboration avec le groupe de Bernard Thisse à Illkirch, spécialisé dans la biologie du développement du poisson zèbre. L'analyse du patron d'expression de SEPN1 par des expériences d'hybridation *in situ* réalisées sur des embryons de poisson zèbre au cours des stades précoces du développement, ont permis de déterminer que les transcrits de SEPN1 étaient d'abord détectés dans l'axe antéro-postérieur et la notocorde, puis dans les somites (Figure 24) (Thisse et coll., 2003). De façon remarquable, ces régions correspondent

respectivement aux précurseurs de la colonne vertébrale et aux structures à partir desquelles les muscles squelettiques se forment, organes qui sont affectés dans la DMC à rigidité spinale. En outre, au stade de 24 heures, on observe une expression intense dans le bourgeon caudal, lieu de prolifération des cellules précurseurs, alors que l'expression du gène décroît progressivement dans les somites en cours de différenciation. Cette implication de la sélénoprotéine N dans le développement précoce du muscle est en accord avec l'apparition particulièrement précoce au stade néonatal des maladies liées à une mutation dans son gène. La présence d'un niveau basal de protéine dans les tissus adultes peut traduire alors un rôle dans la maintenance ou la régénération musculaires. L'étude du rôle de SePN dans le contrôle de la prolifération cellulaire peut être une source d'investigations futures.

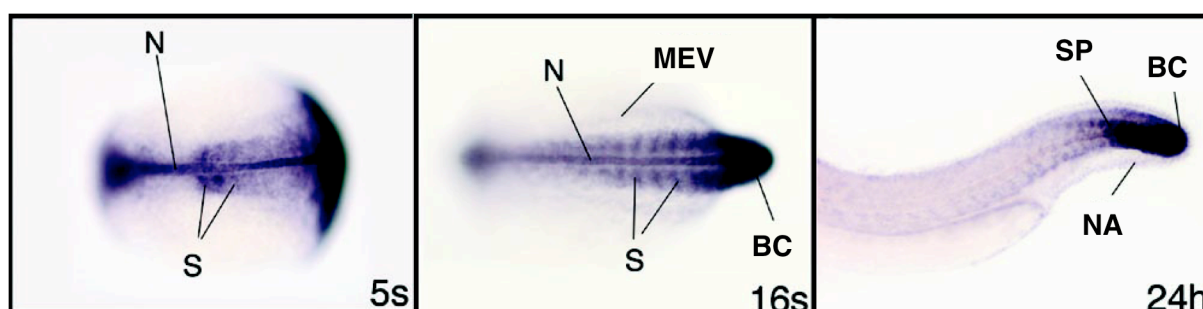


Figure 24: Profil d'expression de la sélénoprotéine N au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre, d'après (Thisse et coll., 2003)

Au stades 5 (5s) et 16 somites (16s), on constate que la sélénoprotéine N est fortement exprimée dans la notocorde (N) et les somites (S), qui correspondent aux précurseurs de la colonne vertébrale et des muscles. Après 24 heures, on observe une expression intense dans le bourgeon caudal (BC), alors que l'expression décroît dans les somites différenciés. MEV: mésoderme ventral; SP: somites postérieurs; NA: nageoire axiale.

3.2. Etude de la fonction de SePN

3.2.1. Les outils pour la caractérisation fonctionnelle de SePN

Après avoir déterminé la localisation cellulaire de la sélénoprotéine N, nous avons choisi de caractériser sa fonction, toujours inconnue. L'analyse de la séquence en acides aminés de SePN n'avait pas permis de lui assigner une fonction potentielle sur la base de similitudes de séquence avec des protéines de fonction connue dans les banques de données. Néanmoins, cette analyse a permis une observation intéressante: la protéine possède 49 résidus proline, représentant 10% de sa séquence totale (Figure 25). Cette richesse est une caractéristique assez inhabituelle. De plus, ces résidus proline sont organisés en 8 motifs de type PXXP, dont la présence correspond à la signature d'un domaine d'interaction protéine-protéine avec des protéines à domaine SH3 (Li, 2005; Mayer, 2001).

MGRARPGQRGPPSPGPAAQPPAPRRRARSLLGALLAAAAAA
 AVRVCARHAEAQAAARQELAKTLGTDGLFLFSSLDTDGDMYIS
 PEEFKPIAEKLTGSTPAASCEEEELPPDPSEETLTIEARFQPLLHETM
 TKSKDGLGVSRLALSGLRNWTAASPSAVFATRHFAQPFLPPPGQ
 ELGEPWWIIPSELSMFTGYLSNNRFYPPPPKGGKEVIIHRLLSMFHP
 RPFVKTRFAPQGAVACLTAISDFYYTVMFRIHAEFQLSEPPDFPFW
 FSPAQFTGHIILSKDATHVRDFRLFVFNHRSLNVDMEWLYGASES
 SNMEVDIGYIPQMELEATGPSVPSVILDEDGSMIDSHLPSGEPLQF
 VFEEIKWQQELSWEEAARRLEVAMYPFKKVSYLPFTEAFDRAKA
 ENKLVHSILLWGALDDQSCUGSGRTLRETVLESSPILTLNESFIST
 WSLVKELEELQNKQENSSHQKLAGLHLEKYSFPVEMMICLPNGT
 VVHHINANYFLDITSVKPEEIESNLFSFSSTFEDPSTATYMQFLKEG
 LRRGLPLLQP

U: Sélénocystéine

X: motif PXXP

B: résidus basiques
 associés au
 consensus PXXP

Figure 25: Séquence en acides aminés de SePN

Les résidus proline sont représentés en bleu, ce qui permet d'observer leur nombre inhabituellement élevé: on en trouve 84 dans la séquence, ce qui correspond à environ 15% de la protéine. Plusieurs de ces résidus sont organisés en motifs PXXP (boîtes vertes) qui sont caractéristiques d'un domaine interaction protéine-protéine.

Cette observation nous a conduits à rechercher et caractériser les partenaires ou substrats putatifs de SePN. En effet, l'identification d'interactants de fonction connue fournirait des indices précieux quant à la propre fonction de SePN. En outre, la découverte de partenaires pourrait permettre également la recherche de mutations dans leurs gènes. Ces mutations pourraient être la cause de maladies apparentées à SePN, chez des patients ne présentant pas de mutations dans le gène *SEPN1* et dont le gène responsable reste à identifier. Il faut noter que cette entreprise de recherche de partenaires ou substrats de SePN était un défi, principalement parce que SePN est une protéine peu abondante, peu soluble du fait de sa localisation membranaire, et donc difficilement détectable. Pour pallier ces difficultés, nous avons eu recours à plusieurs approches successives.

Dans un premier temps, une approche classique pour la détermination d'interactions protéine-protéine avait été entreprise, consistant en la technique du double hybride. Toutefois, cette tentative a avorté car la construction de SePN en phase avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 entraînait, à elle seule, l'activation de la transcription des gènes rapporteurs chez la levure. Nous avons alors décidé d'utiliser la technique de far-western, dont le principe est expliqué sur la Figure 26, pour caractériser les partenaires de SePN, s'ils existent. Cette technique nous semblait la plus adaptée à notre étude. Par le passé, elle a permis à de nombreux auteurs de détecter ou confirmer l'interaction entre deux protéines. Pour cela, nous avons réalisé une construction permettant l'expression, chez *E. coli*, d'une forme recombinante de la sélénoprotéine N humaine, avec une étiquette strep-tag[®], permettant sa purification sur une colonne streptactine sépharose[®], et un motif de phosphorylation spécifique pour la radiomarquer (Figure 27). Pour permettre la surexpression de cette protéine sonde chez *E. coli*, nous avons dû réaliser deux modifications supplémentaires de la protéine humaine. Les systèmes d'incorporation de sélénocystéine étant différents entre eucaryotes et bactéries, la première modification a consisté à transformer le codon sélénocystéine, localisé dans le site actif putatif de SePN, en codon cystéine. Nous avons prédit que cette modification ne devrait pas changer la spécificité de substrat de la protéine, même si son efficacité catalytique est diminuée. La deuxième modification a consisté en la suppression du motif N-terminal de SePN, riche en acides aminés hydrophobes, qui permet son adressage vers la membrane du réticulum endoplasmique. En effet, nous avons constaté lors de tentatives de surproduction de SePN pour des expériences de cristallogénèse, que la présence de ce motif entraînait l'accumulation toxique de la protéine dans l'espace périplasmique de la bactérie,

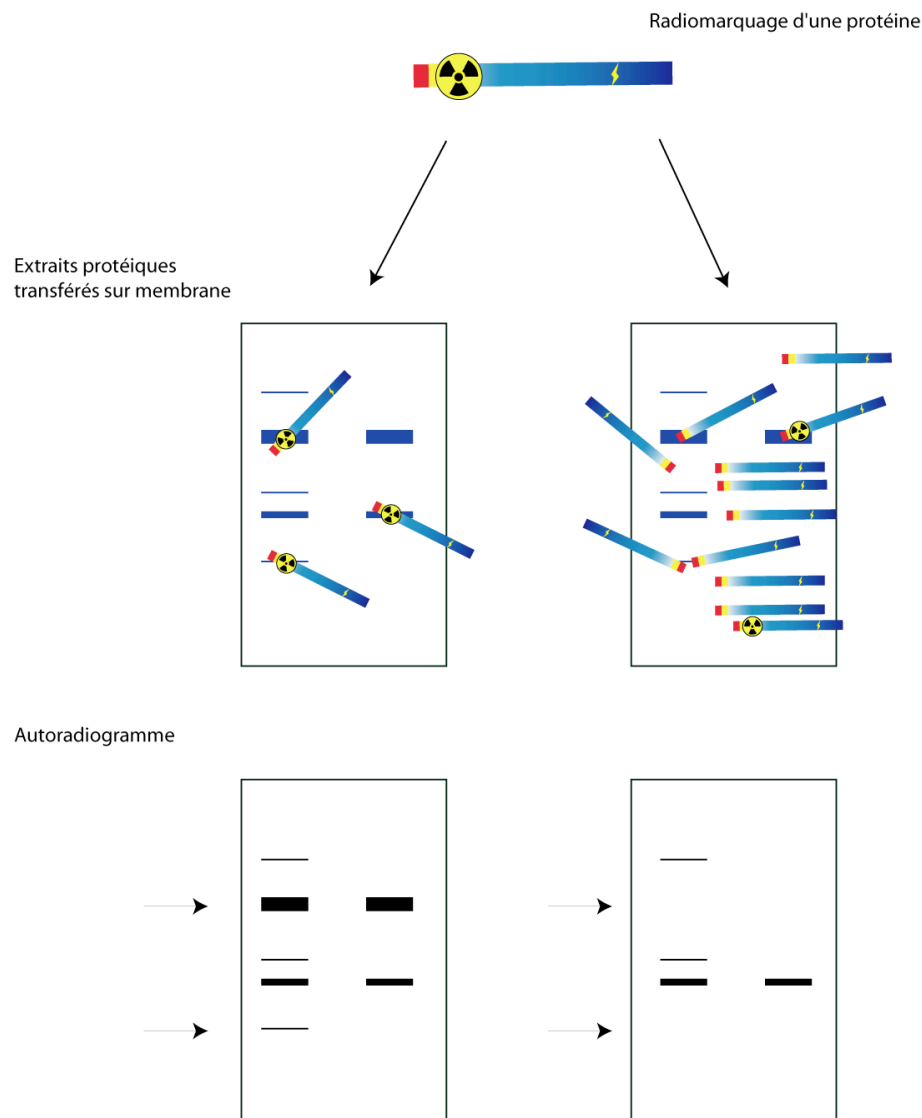


Figure 26: Principe de la technique du far-western

Une protéine recombinante servant de sonde est marquée avec du ^{32}P et des extraits protéiques transférés sur membrane sont incubés en sa présence et de celle ou non d'un large excès de protéine sonde non marquée (panneaux supérieurs). L'autoradiographie permet ensuite d'identifier les protéines ayant interagi avec la sonde (panneaux inférieurs). Les signaux spécifiques, indiqués par des flèches noires, disparaissent en conditions compétitives (comparer panneaux inférieurs gauche et droit).



Figure 27: Exemples de formes recombinantes de SePN construites pour les études biochimiques

Différentes constructions ont été réalisées pour permettre l'étude biochimique de la sélénoprotéine N, notamment afin d'identifier ses partenaires ou substrats putatifs. Pour permettre la surproduction de la protéine dans les bactéries, le domaine N-terminal hydrophobe (représenté par un rectangle vert) doit être délété et le résidu sélénocystéine muté en cystéine. Selon le cas, une étiquette de purification (représenté par un rectangle rouge) ou un site de phosphorylation spécifique (représenté par un rectangle jaune) ont été ajoutés à l'extrémité N-terminale. Le site actif putatif SCUG de SePN (représenté par un éclair jaune) a été muté en différentes formes pour des expériences de pontage *in vivo*.

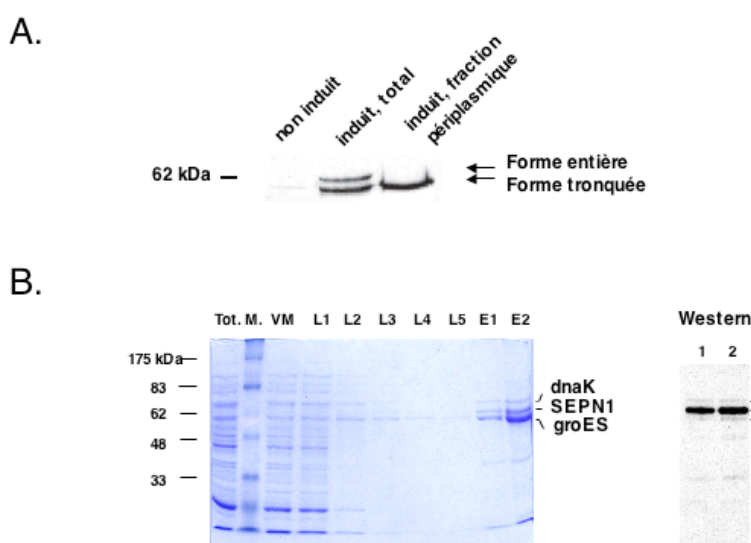


Figure 28: Surproduction de formes recombinantes de SePN

A: Western-blot réalisé sur des extraits protéiques bactériens. La surproduction de la forme entière de la sélénoprotéine N est toxique pour la bactérie. Deux signaux sont observables après induction, correspondant à des formes entières ou tronquées de la protéine (pistes 2 et 3). Le motif N-terminal hydrophobe de la protéine conduit à son adressage dans le compartiment périplasmique après clivage (piste 3). **B:** La délétion du motif N-terminal permet l'expression de quantités suffisantes de SePN dans les bactéries. Son profil de purification sur colonne de streptactine sépharose® permet de voir qu'elle est co-éluee avec deux protéines chaperonnes (pistes E1 et E2). Une expérience de western-blot permet de voir que la bande intermédiaire correspond à la sélénoprotéine N (pistes 1 et 2). Tot.: extrait total; M.: marqueur de poids moléculaire; VM: volume mort; L: lavages; E: élution.

après clivage du domaine transmembranaire (Figure 28A, comparer les pistes 2 et 3). Cette toxicité de la protéine pour les bactéries résulte probablement de la forte activité oxydo-réductrice de SePN, malgré l'absence du résidu sélénocystéine. Cette réactivité importante a pu également être observée lors d'un phénomène surprenant. Le dosage de la protéine surproduite n'est pas possible par la technique de Bradford car elle entraîne la précipitation du réactif, selon un mécanisme que nous essayons depuis de déterminer (Figure 29). Nous sommes ainsi parvenus à produire les quantités nécessaires de protéine SePN sonde. Son étiquette strep-tag® N-terminale a permis sa purification partielle; elle demeure associée à deux protéines chaperonnes bactériennes, DnaK et GroES (Figure 28B, pistes E1 et E2, et Western-blot). Comme SePN est une protéine associée aux membranes du réticulum endoplasmique, nous avons utilisé, pour réaliser nos expériences, des extraits protéiques de cellules HeLa enrichis en protéines membranaires solubilisées. Par des expériences de far-

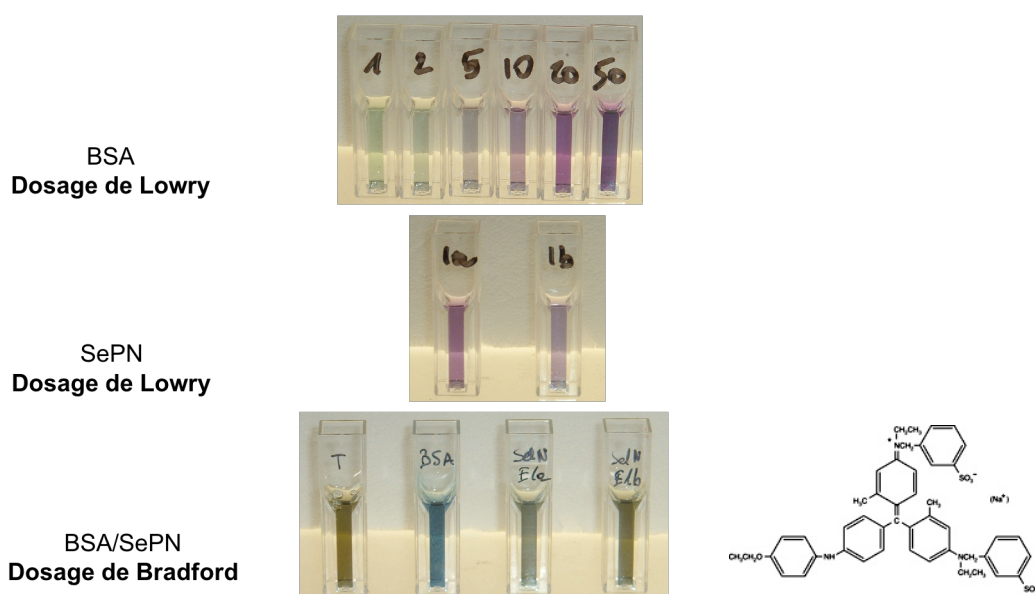


Figure 29: Dosage de la sélénoprotéine N surproduite

Lors du dosage de SePN surproduite dans *E. coli* par la technique de Bradford, un phénomène surprenant est observable: le réactif de Bradford, dont le composant essentiel est le bleu de Coomassie représenté en bas à droite de la figure, est dégradé. Le panneau inférieur illustre ce phénomène. Le dosage de Bradford a été réalisé sur un témoin sans protéine (T), ou des quantités identiques de Sérum Albumine Bovine (BSA) ou de SePN (SePN E1a/b). On observe la coloration bleue typique du réactif de Bradford en présence de protéines uniquement dans le cas de la BSA. Les mêmes quantités de SePN utilisées pour le dosage de Bradford ont été soumises à un dosage selon Lowry (panneau intermédiaire 1a/b), à comparer à la gamme étalon de BSA réalisées selon cette même technique (panneau supérieur, 1 à 50).

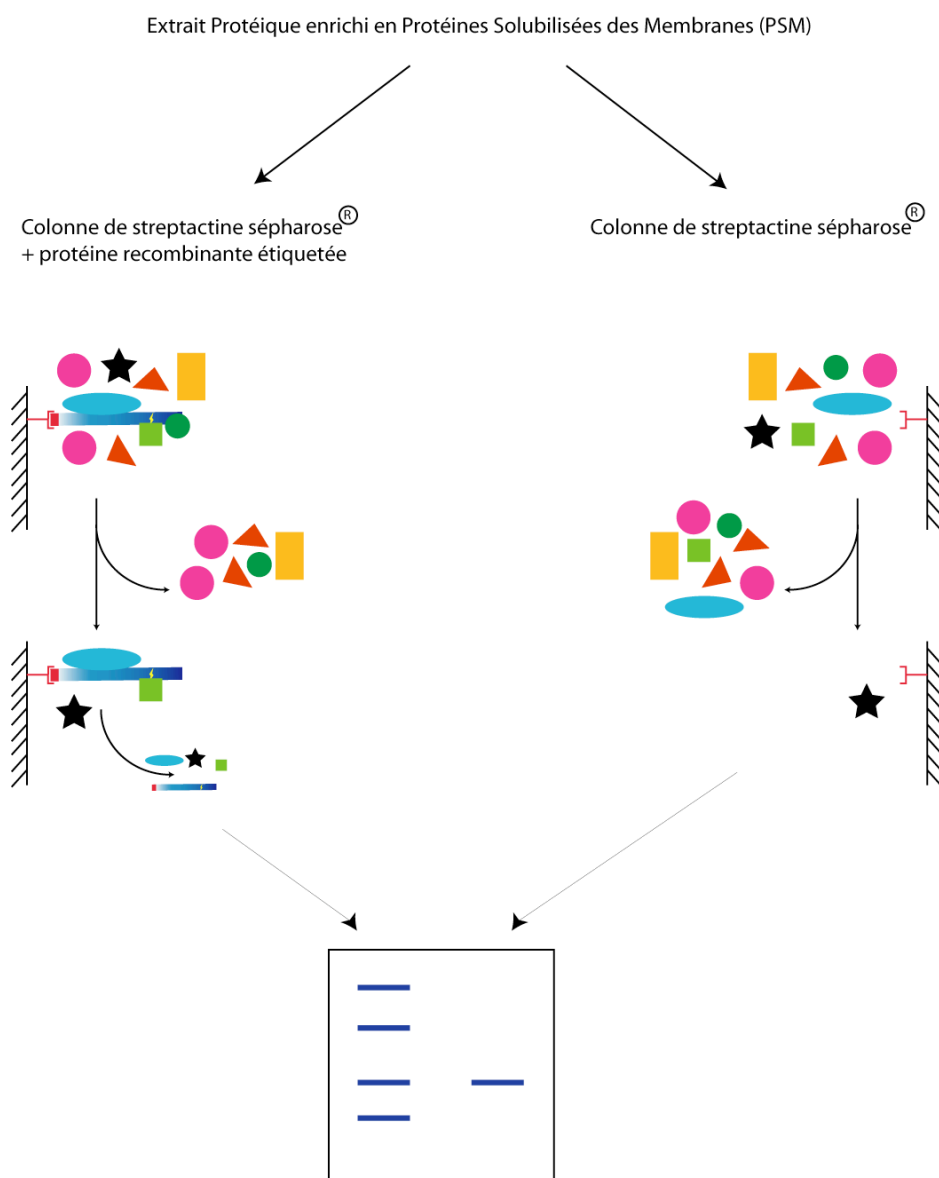


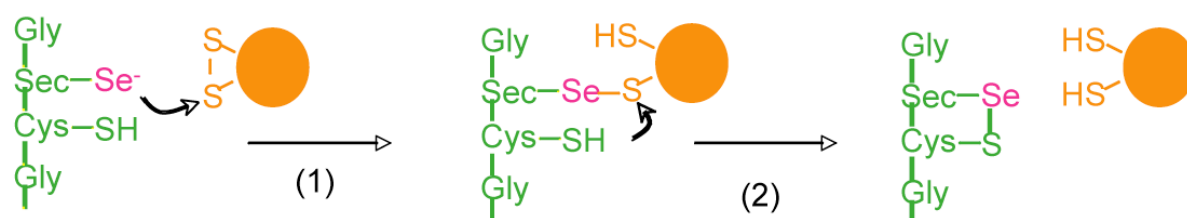
Figure 30: Principe de la purification par chromatographie d'affinité

Une protéine recombinante, présentant une étiquette de purification, est incubée en présence d'un extrait protéique. Le mélange est ensuite soumis à purification sur une colonne permettant de retenir spécifiquement la protéine d'intérêt par son étiquette, ainsi que les protéines lui étant associées. Après élimination des protéines contaminantes par des étapes de lavage, l'élution permet la récupération de la protéine-appât et de ses interactants, qui sont visualisés sur gel. Une expérience témoin (à droite), est réalisée en parallèle, en déposant sur la colonne le même extrait protéique, incubé cette fois en l'absence de la protéine recombinante d'intérêt. La comparaison des profils permet alors de déterminer quels sont les interactants spécifiques: certaines protéines peuvent être retrouvées aspécifiquement lors de l'élution, lorsque la protéine étiquetée n'est pas présente. Cette technique présente deux limites majeures. Elle peut ne pas être assez sensible pour identifier des partenaires putatifs présents en quantités limitantes dans l'extrait, ou ne pas permettre de voir les partenaires de la protéine d'intérêt lorsque l'interaction avec celle-ci est transitoire ou faible.

western, nous avons réussi à mettre en évidence au moins un partenaire spécifique de la sélénoprotéine N. Sa faible abondance dans l'extrait cellulaire n'a pas permis sa purification à homogénéité et son identification. Nous avons alors opté pour une technique plus fine de purification de complexes par chromatographie d'affinité (Figure 30). Une nouvelle forme recombinante de SePN, avec une étiquette strep-tag® à l'extrémité N-terminale, est exprimée dans des cellules HeLa par transfection (Figure 27). Les extraits protéiques enrichis en protéines membranaires, contenant SePN, sont alors déposés sur une colonne de streptactine-sépharose® capable de retenir spécifiquement la sélénoprotéine N et ses partenaires associés grâce à son étiquette. L'élution permet de récupérer les complexes partiellement purifiés et l'identification des interactants est possible par spectrométrie de masse après séparation des différentes protéines sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu colloïdal. Dans ces conditions, cette technique ne nous a pas permis d'identifier la nature des protéines co-retenues avec la sélénoprotéine N, toujours du fait de leur trop faible abondance ou de l'instabilité du complexe. Pour résoudre ce problème, nous avons eu recours à une astuce qui s'appuie sur un mécanisme de catalyse possible pour SePN. Dans les sélénoprotéines de fonction enzymatique connue, le résidu sélénocystéine fait partie intégrante du site catalytique. Sa position permet dès lors de localiser le site actif dans la molécule. En ce qui concerne SePN, le site actif putatif correspond à un motif SCUG, similaire au site actif GCUG de la thiorédoxine réductase (Budde et coll., 2003; Gromer et coll., 2003; Lee et coll., 2000). La réaction catalytique de cette enzyme a été étudiée en détail et permet de prédire que la mutation de la cystéine adjacente au résidu sélénocystéine, en sérine ou glycine, empêche la réduction d'un pont sélényl-sulfure formé entre l'enzyme et son substrat. En conséquence, il se forme une liaison covalente qui permet un pontage de l'enzyme au substrat *in vivo* (Figure 31). Une mutation similaire a été introduite dans le site actif d'une nouvelle forme recombinante étiquetée de SePN. L'expression de cette construction dans des cellules HeLa en culture a permis la mise en évidence des complexes membranaires formés avec SePN. Plusieurs bandes sont détectées sur gel, correspondant à SePN dans sa forme libre ou complexée. Toutefois, dans un premier temps, seul le complexe majoritaire a pu être analysé par spectrométrie de masse après purification, pour des raisons de quantités insuffisantes des autres complexes. Ce complexe correspond à un dimère de SePN. Pour compenser les quantités trop faibles des autres interactants potentiels présents dans les extraits membranaires de cellules HeLa, nous avons choisi de travailler avec des extraits de protéines solubilisées préparées à partir de microsomes issus de muscles, plus riches, et de la protéine SePN mutée

et étiquetée surproduite dans les bactéries. La quantité d'extraits disponibles à partir de muscles de souris étant trop faible, et un grand nombre de protéines de lapin réagissant de façon croisée avec l'anticorps de lapin dirigé contre SePN, nous avons choisi de travailler dorénavant avec des préparations protéiques issues de muscles de rat. Cette dernière approche a permis, après résolution sur gel des complexes purifiés, de caractériser de nombreux interactants potentiels, partenaires ou substrats. Leur spécificité et signification biologique possibles doivent maintenant être précisés par de nouvelles expériences.

A.



B.

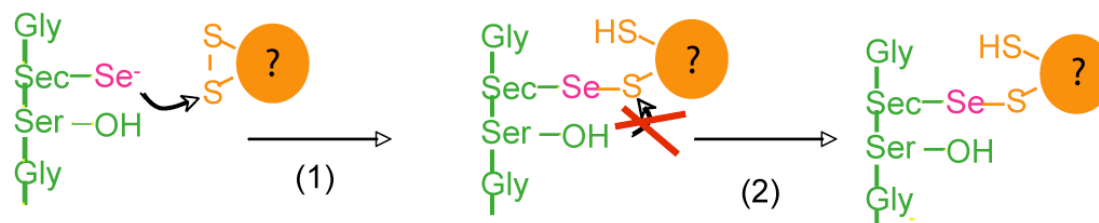


Figure 31: Mécanisme proposé pour la réduction de la thiorédoxine par la thiorédoxine réductase (Gromer et coll., 2003) et principe du cross-link *in vivo*

Le mécanisme catalytique de la thiorédoxine réductase est connu. Elle présente un site actif contenant le motif GCUG. Une première attaque nucléophile a lieu entre le groupement sélénol de l'enzyme et un pont disulfure du substrat, conduisant à la formation d'un intermédiaire réactionnel enzyme-substrat. Une seconde attaque nucléophile, par l'intermédiaire du groupement thiol de la cystéine adjacente, permet de réduire le pont sélényl-sulfure formé à l'étape précédente. Ceci entraîne la libération du substrat. Si le résidu cystéine adjacente est muté en sérine ou en glycine, la deuxième étape de la réaction n'est plus possible et le substrat reste lié de façon covalente à l'enzyme. Cette liaison covalente peut être rompue par l'ajout de réducteur au milieu réactionnel. Le même mécanisme est possible pour la sélénoprotéine N, dont le motif SCUG du site actif putatif présente de fortes similitudes avec celui de la thiorédoxine réductase.

3.3.2. Biochemical studies of selenoprotein N: looking for interactants

We showed previously that SePN is a membrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum (Petit et coll., 2003), but no function could be attributed yet. Sequence analysis showed the presence of several PXXP motifs within the SePN amino acid sequence. These motifs constitute the signature of an interaction domain with SH3 domain proteins. Identification of SePN interacting proteins of known function would help unraveling its own biochemical role. Here, we report the strategies developed to characterize the SePN putative partners in order to get better insights its molecular function.

Results

Observation of SePN partners by far-western. To characterize putative interacting partners of SePN in protein extracts, the following strategy was developed. First, we determined a sub-cellular fraction in which SePN was enriched. This fraction corresponds to a membrane protein extract in which membrane associated proteins were solubilized using medium detergent conditions (1% Triton X-100). As shown on Figure 32, after removal of all the cytoplasmic proteins, most of SePN was solubilized in this membrane associated protein fraction (MAP fraction) (lane 6). In parallel, we engineered a SePN probe which can be radio-labeled by introduction at its N-terminus of a sequence specifically recognized by the protein kinase catalytic subunit from bovine heart. This probe was used to perform far-western experiments (Figure 32), and the specificity of the signal was tested under competitive conditions. Several signals were detected in the SePN enriched MAP fraction. Only one of them disappeared under competitive conditions in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled SePN probe, reflecting the specificity of the signal (compare lanes 10 to 8). This potential SePN interacting protein was about 70 kDa in size (lane 8). The signal obtained showed clear enrichment of the interacting protein in the MAP extract compared to the total membrane protein fraction (compare lanes 7 and 8). However, the composition of this MAP fraction was too complex and its resolution on the gel was not sufficient to allow direct identification of this candidate (Figure 32, lane 3). Thus, the MAP extract was submitted to an additional purification step by centrifugation on a 10-30% glycerol gradient. The resulting fractions were analyzed by western-blot or far-western techniques to determine the fractions containing SePN and the SePN-interacting protein. Both signals were detected within the same fraction (data not shown). The resulting far-western signal demonstrates additional

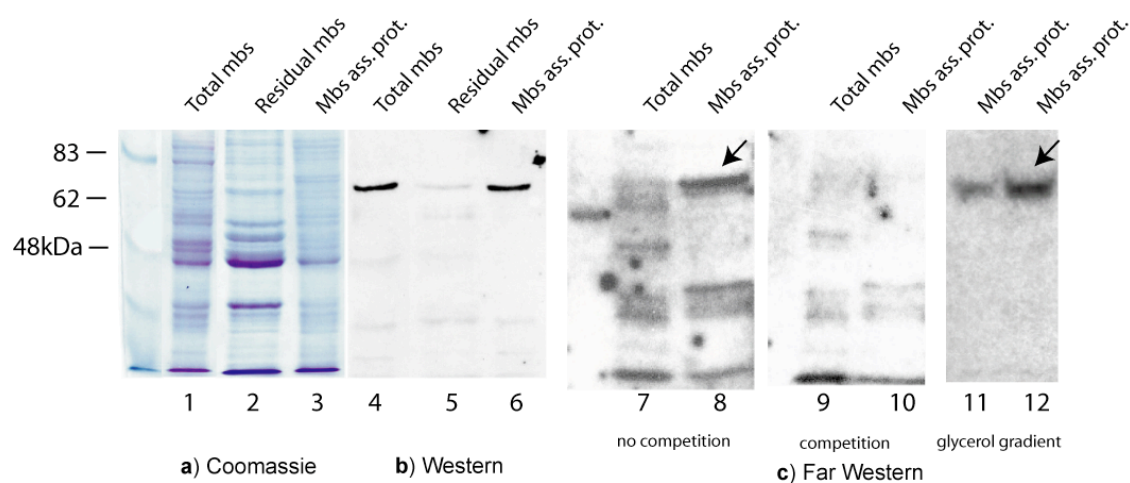


Figure 32: Observation of SePN interacting partners by far-western experiments

HeLa protein fractions were enriched in SePN and the resulting extracts were characterized: **a)** Coomassie staining of the membrane associated proteins after enrichment steps. **b)** Western blot analysis shows that SePN is efficiently solubilized in the membrane associated protein fraction (lane 6). **c)** Far-western experiments: the arrows indicate the position of at least one candidate partner (lane 8) whose specificity is proven by the disappearance of the signal under competitive condition (compare lane 10 to 8). Competition is realized with a 100-fold excess of unlabelled probe. The signal is further enriched after glycerol gradient centrifugation (lanes 11 and 12).

enrichment (lanes 11 and 12). However, the amount of protein recovered was insufficient to allow mass spectrometry analysis and the subsequent identification of the protein.

Purification of the SePN partners by in vivo cross-linking. A new recombinant SePN construct, introducing a strep-tag® at the N-terminus, was engineered to perform affinity chromatography purification of the SePN complex. Expression of the strep-tag®-SePN protein was obtained upon transfection of this construct into HeLa cells. MAP fraction was prepared and applied onto a streptactin sepharose® column. Elution of SePN should allow identification of the interacting proteins which are co-retained on the column. No complex could be directly isolated through this method: after elution, similar profiles were observed in the assays realized from cells transfected with the tagged SePN or the mock control. Actually, only SePN was detected, no additional band corresponding to co-retained partners was observed (data not shown). Two possible reasons were envisaged: either the putative interacting partners are present in limiting quantities in the cellular extract compared to the overproduced

SePN, or the interaction between SePN and its partners is too weak to allow co-retention on the column. One should mention that the presence of the detergent used to extract the protein from the membrane might destabilize the SePN complex. Therefore, we developed an alternative strategy to trap a SePN complex, by *in vivo* cross-linking. This strategy is based on the presumed catalytic activity of SePN, by analogy with the known enzymatic mechanism of thioredoxin reductase. In selenoproteins, the selenocysteine residue is generally considered as a hallmark of the catalytic site. Based on this criterion, the predicted active site of SePN corresponds to a SCUG motif, which is similar to the GCUG found in thioredoxin reductase (Figure 33). The enzymatic mechanism of thioredoxin reductase can be divided in two steps: the selenol group of the selenocysteine residue forms a disulfide bond with a thiol of its substrate, thioredoxine. A second nucleophilic attack by the adjacent cysteine thiol results in the reduction of the formed bond and release of the substrate. Mutation of this adjacent cysteine to a serine or glycine prevents the second nucleophilic attack and the reduction of the selenyl-sulfide bond. As a result, a covalent bond is formed between the enzyme and the substrate, cross-linking the two proteins. The same mutations were introduced into the active site of the strep-tag®-SePN. The different recombinant proteins were expressed in HeLa cells and the complexes formed were analyzed on SDS-PAGE under non-reducing conditions, to preserve the selenyl-sulfide bond. Several bands were revealed by western-blot. The most intense one corresponds to the free form of SePN, and upper bands might represent complexes of lower mobility (Figure 34, lanes 2 to 5). Different complexes are formed that varied depending on the mutation introduced into SePN. Chemistry of the reaction predicted that

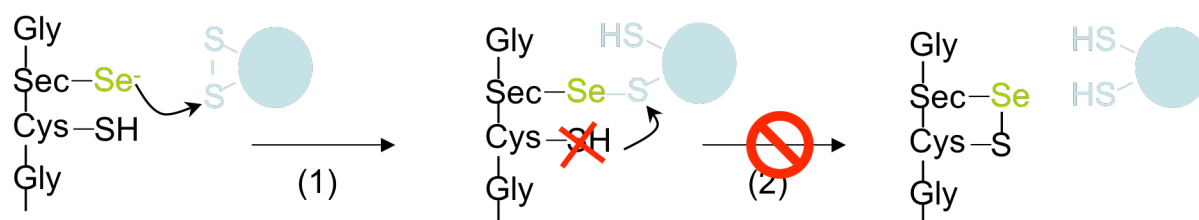


Figure 33: A strategy for substrate cross-linking to SePN

A putative mechanism is proposed for SePN, based on the similarity of the selenocysteine environment with the active site of thioredoxin reductase (TrxR). The catalytic mechanism for thioredoxin (Trx) reduction by TrxR was studied in detail (Gromer et coll., 2003). It is expected that mutation of cysteine to serine or glycine will abrogate the second nucleophilic attack, preventing the release of the substrate. Therefore, the second step of the reaction cannot take place and SePN will be covalently bound to its substrates. These complexes can be isolated and partners identified.

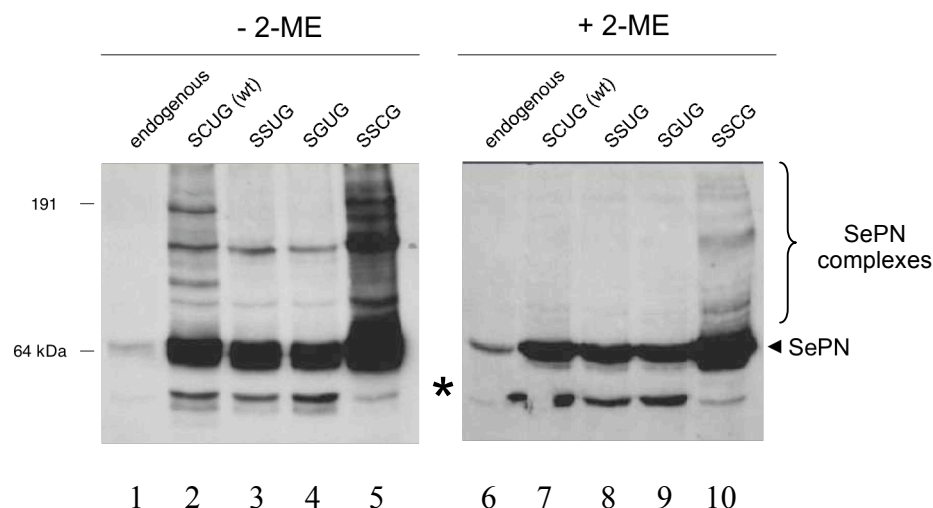


Figure 34: Identification of SePN cross-linked complexes

Different recombinant SePN proteins, mutated in their putative active sites, were expressed in HeLa cells. Membrane enriched protein extracts containing SePN were prepared, separated on SDS-PAGE under non-reducing (without 2-mercaptoethanol, - 2-ME) or reducing (with 2-mercaptoethanol, + 2-ME) conditions, and transferred onto a membrane analyzed by immuno-detection. In the absence of reducing agent, several higher signals are observed, corresponding to SePN alone or present in a complex (left panel). After addition of reducing agent, only the signal corresponding to SePN alone remains (right panel). Over-expression of selenoproteins results in partial premature termination at the selenocysteine position, as can be seen on these experiments (*).

addition of a reducing reagent should reduce the selenyl-sulfide bond formed in the SePN complex. Indeed, addition of 2-mercaptoethanol resolved the previously observed complexes (Figure 34, lanes 7 to 10).

Next, they were purified by applying the MAP extracts of the transfected cells onto a streptactin-sepharose[®] column. The eluted fractions were analyzed on a SDS-PAGE under both reducing and non-reducing conditions. Sufficient quantity compatible with mass spectrometry was obtained for the SSCG mutant only. In the absence of 2-mercaptoethanol, one major complex and several fainter bands of lower mobility were detected by both silver staining and western-blot (Figure 35, lanes 2 and 4). Surprisingly, addition of the reducing agent did not result in the appearance of bands other than SePN, despite the disappearance of the previously characterized complexes, and increased intensity of the free SePN band (Figure 35, compare lanes 2 and 3). The corresponding band in the major complex (lane 2, upper signal) was cut out of the gel and submitted to classical and tandem mass spectrometry analysis. Apart from SePN, no other protein was identified. Therefore we deduced that the major complex corresponded to a SePN dimer. The quantities of the minor complexes were too limiting to be analyzed by mass spectrometry. It is possible that formation of the SePN

dimer was artifactual due to over-expression of the recombinant SePN protein compared to the limited amounts of interacting proteins available *in vivo*.

Identification of the SePN putative substrates by affinity chromatography purification.

To avoid predominance of the SePN dimer formation, or to prevent the loss of the minor SePN complexes formed with limiting proteins, we made use of larger enriched protein fraction corresponding to MAP extract, prepared from rat muscle microsomes. A strep-tag®-SePN SSCG mutant overproduced in *E. coli* was bound to a streptactin sepharose® column and incubated with the microsomes protein extract. The purified complexes were eluted and fractionated on reducing or non-reducing gels. In this experiment, resolution of the complexes was accompanied by the appearance of additional lower bands, as revealed by colloidal blue staining (Figure 36). Individual bands were submitted to mass spectrometry (Table 6). The

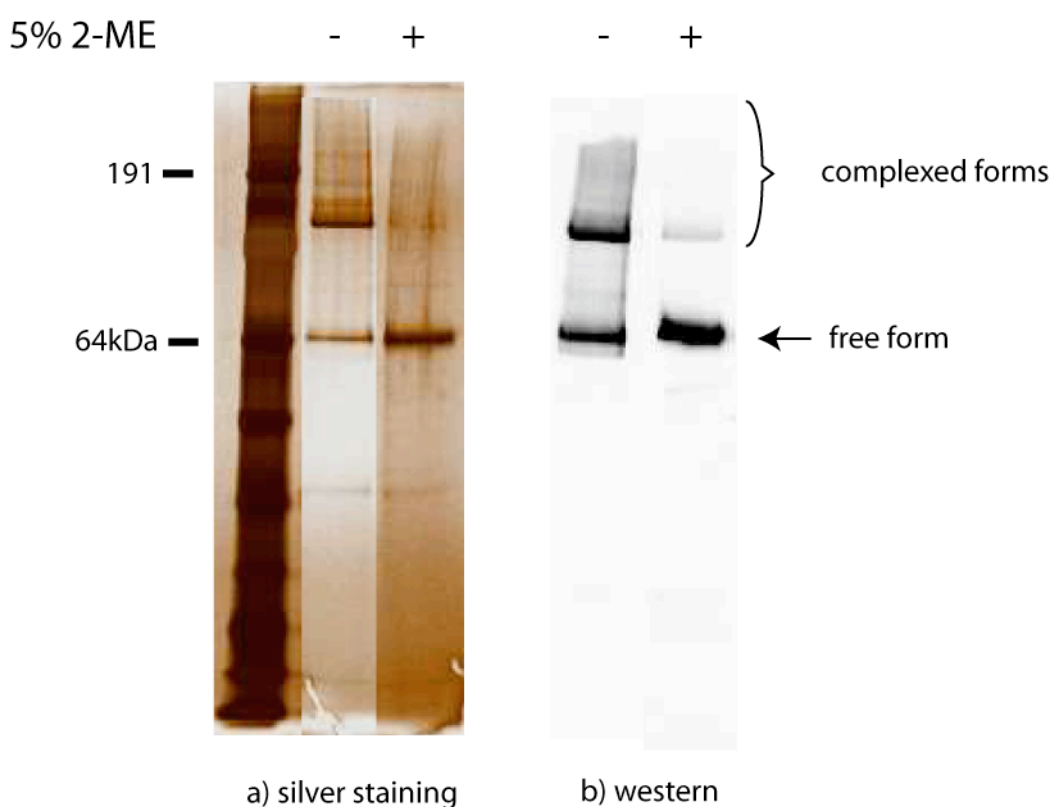


Figure 35: Purification of the cross-linked SePN complexes

The SSUG tagged SePN mutant expressed in HeLa cells was purified by affinity chromatography. The protein fraction obtained was analyzed by silver staining (a) and western blot (b), in the presence or absence of a reducing reagent. Both the free and complexed forms of SePN were observed (arrows). Tandem mass spectrometry identified the upper band as a SePN dimer.

sizes of the protein identified corresponded to the expected sizes from the migration on the gel. Surprisingly, SePN identity, which should correspond to bands 1 and 2, could not be confirmed. However, some bands that became more intense (compare bands 5 and 6) or that appeared (bands 9, 10, 13, 16, 18) under reducing conditions might be sources for future investigations.

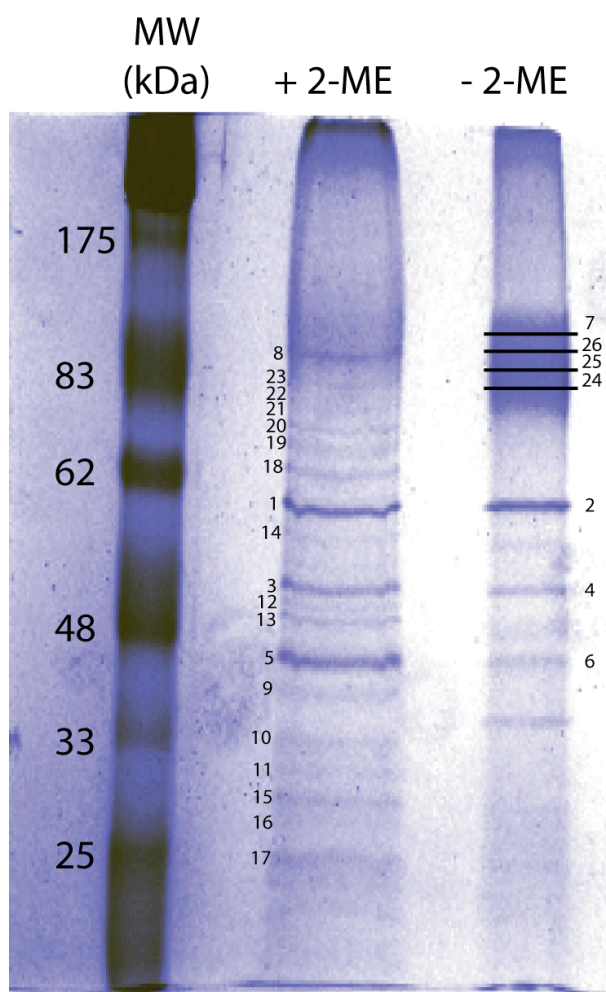


Figure 36: Colloidal blue staining of the putative SePN interactants

The recombinant SePN cross-linked complexes were purified as described in the text and loaded on a SDS-PAGE with or without 2-mercaptoethanol (2-ME). The electrophoresis profile in the presence of the reducing agent (+ 2-ME) shows the apparition of several additional bands compared to the sample loaded on the gel without reducing agent (- 2-ME), corresponding to the proteins released from the SePN cross-linked complexes. Different bands that appeared interesting were cut out of the gel and submitted to mass spectrometry. Results are collected in Table 6.

Sample	Identification	Fonction	Expected MW (kDa)	Observed MW (kDa)
1/2/11/12/14/ 15/17/19-21	Non determined	/	/	/
3/4	ATP synthase beta chain	Mitochondrial: ATP synthesis; ATP binding; Calcium binding; Ion transport	50	56
5/6	Muscle creatine kinase	Cytoplasmic: Reversibly catalyzes the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens (e.g. creatine phosphate)	46	43
7/8/22-26	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum : calcium-transporting ATPase; Contributes to calcium sequestration involved in muscular excitation/contraction	100	111
9	Fructose-biphosphate aldolase A	Cytoplasmic: muscle glycolytic enzyme	45	40
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasmic: glycolysis control	33	36
13	Beta-enolase	Cytoplasmic: muscle glycolytic enzyme	50	47
16	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Mitochondrial: forms a channel through the mitochondrial outer membrane and also the plasma membrane. The channel allows diffusion of small hydrophilic molecules	30	31
18	Serum albumine precursor	Plasmatic: regulation of the colloidal osmotic pressure of blood	60	71

Table 6: Identity of the putative SePN interactants

The identity of the possible SePN interacting proteins determined by mass spectrometry was collected. The corresponding molecular weights are indicated. The numbers corresponding to the bands that were cut out of the gel depicted on Figure 36 are shown in the first column. Some bands composition, for which the amounts of proteins were too low, could not be determined.

Interestingly, three kind of proteins can be distinguished in our study (Table 6): (i) the calcium dependent ATPase1, an endoplasmic reticulum protein found several times and reminiscent of the protein RYR1 (samples 7, 8, 22-26); (ii) a non ER membrane protein, the mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (sample 16); (iii) several cytoplasmic, sometimes muscle specific, enzymes, involved in metabolism (samples 5, 6, 9, 10, 13). These experiments must be reproduced with improvement of the extract enrichment. To reduce the number of irrelevant candidates, we attempted an additional step of protein extract purification using a discontinuous sucrose gradient starting from the microsome preparation. However, the quantity of proteins recovered from these fractions was too low to permit protein identification.

Discussion

It was recently demonstrated that mutations in the SePN gene were the cause for different congenital muscular diseases, featuring similar, sometimes overlapping phenotypes (Rederstorff et coll., 2006). These diseases are now commonly regarded as different expressions of a same pathological entity, and are classified together in the SePN-related myopathy family. SePN was identified in 1999 as a new entity of the selenoprotein family (Lescure et coll., 1999). We showed that it is a glycoprotein localized within the endoplasmic reticulum membrane and that the protein accumulates to a higher extent in the fetal tissues compared to the adult ones (Petit et coll., 2003). However, no function could be attributed yet to the protein. Thus, we tried to characterize the function of SePN, using different biochemical approaches. Inspection of SePN amino-acid sequence revealed the existence of several motifs characteristic of protein-protein interaction domains. Therefore, we tried to identify SePN molecular partners.

First, far-western experiments visualized at least one specific partner in an enriched fraction corresponding to a membrane associated protein extract prepared from HeLa cells. Unfortunately, the amounts and purity of the enriched fraction did not allow its identification. In view of these results, we concluded that SePN interacts with other proteins whose low availability in the cell might require more sophisticated biochemical techniques for their identification.

Combination of an affinity chromatography purification method to an original *in vivo* cross-link strategy led to the observation and purification of several SePN containing

complexes. The major one was easily isolated and, unexpectedly, tandem mass spectrometry identified it as a SePN dimer. The significance of this observation has to be considered. Even though the SePN dimerization might be artifactual, due to the high reactivity of the over-expressed protein, its observation may be functionally relevant. Indeed, it is possible that the catalytic activity of SePN requires a dimer. This hypothesis is supported by an interesting observation made during the sequence analysis of the peptides obtained by tandem mass spectrometry: several peptide peaks disappeared in the profile of the dimer compared to the monomer spectra. The missing peptides could not be identified in any other form among the non-attributed peptide peaks. Their disappearance might result from protection of this region of the protein from tryptic digestion, relevant of an interaction domain. Interestingly, the peptides absent in the dimer were clustered in a region of SePN in which several pathological mutations were found, suggesting the fundamental role of this domain for protein function (Rederstorff et coll., 2006). Other minor complexes obtained in this experiment could not be identified by mass spectrometry, because they were represented in very limited amounts. To increase the yield of the SePN complexes, we prepared microsomal extracts from rat muscles. These enriched extracts contained large amounts of SePN. They were used in cross-linking experiments with a recombinant tagged SePN mutant. Purification of the complexes allowed characterization of several proteins (Figure 36 and Table 6). The results obtained and presented here are preliminary and need further investigations to confirm the relevance of the proteins observed and their association to SePN. For this purpose, these experiments must be reproduced with improvement of the extract enrichment.

Material and Methods

Constructions. The complete cDNA constructs of SePN, the pSelN6 and pXJSelN6 plasmids, were previously described (Petit et coll., 2003). The construct allowing production of the far-western SePN probe in *E. coli* was performed as follows. The selenocysteine codon TGA in pSelN6 was mutated to a TGC cysteine codon by site directed mutagenesis using oligonucleotide AL 276: 5'-CAGTCCTGCTGcGGTTCAGGGC-3', to get pSelN6cys. A specific phosphorylation site by the Heart-Muscle-Kinase (HMK) was introduced by PCR upstream of exon 2, using oligonucleotides AL 145: 5'-GGATCCGGAACATCACAGTG-3' and AL 281: 5'-CGgaattc/cgtcgtgcatctgttGCGCTGAAGAACCTG-3'. The resulting 600 bp *EcoRI*-*BamHI* fragment, avoiding the first exon, was cloned into pASK-IBA7 downstream of the strep-tag[®] 2 sequence. Next, SePN was reconstituted by cloning the 1058 bp *BamHI*-*NcoI*

fragment from pSelN6cys, into the previous construct, to yield to the HMK1 plasmid. A 1761 bp blunt-ended *XbaI-HindIII* fragment from HMK1, containing the gene coding for the entire SePN fusion protein was sub-cloned into the blunt-ended *EcoRI-HindIII* sites of a second bacterial expression vector, pQE32, to get the QN1 construct. To express the strep-tag[®]-SePN fusion in eukaryotic cells, the 956 bp *EcoRI-BamHI* fragment from pXJSeIN6 was cloned into pSK(-). Next, a strep-tag[®] 2 sequence was introduced into the *NcoI* site of the *EcoRI-BamHI* fragment, by cloning of a *NcoI* compatible fragment resulting from the hybridization of the two oligonucleotides MR41: 5'-CATGGGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAGAG-3' and MR42: 5'-CCGACCTCGGTGGGCGTCAAGCTCTTCTCGTAC-3'. The resulting 987 bp *EcoRI-BamHI* fragment was then reintroduced into the *EcoRI-BamHI* linearized pXJSeIN6 vector to yield the pXJStrep-tag[®]-SeIN6 construct. In pXJStrep-tag[®]-SeIN6, the putative SCUG active site of SePN was mutated to SSUG, SGUG and SSCG by site directed mutagenesis using oligonucleotides MR43: 5'-GATGACCAGTCCaGCTGAGGTTTCAGGG-3', MR44: 5'-GATGACCAGTCCgGCTGAGGTTTCAGGG-3' and MR45: 5'-GATGACCAGTCCaGCTGcGGTTCAGGG-3'.

Cell culture. HeLa cell culture and transfections were performed as described in Material and Methods.

Western-blots. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and electrophoretically transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). Westerns-blots were hybridized with the antibody Ac168. For further details, see Material and Methods.

Far-western experiments. Far-western experiments were performed according to Burgess (Burgess et coll., 2000), with the recombinant SePN probe featuring a RRASV motif, which is specifically phosphorylated on the serine residue by the protein kinase catalytic subunit from bovine heart (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. HeLa cells were collected, pelleted and suspended in 100 mM Tris-HCl pH8. Cells were lysed by freeze and thaw four times in liquid nitrogen to get a total protein extract. Extracts were centrifuged, supernatant discarded, and solubilization of the membrane associated proteins (MAP) was performed by incubating the pellet for 30 min at 4°C in the MAP extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 1,25 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1% Triton X-100; proteases inhibitor cocktail 1 X, Sigma-Aldrich). Supernatant was centrifuged at 13000 rpm for 30 min at 4°C and subjected to SDS-PAGE. Total protein extracts were run on a 10-30% continuous

glycerol gradient for 14 hr at 21000 rpm at 4°C in a SW41 rotor prior to protein solubilization as mentioned.

Microsomes preparation. Microsomes from HeLa cells or rat muscles were prepared according to (Zorzato et coll., 2000). Further purification by discontinuous sucrose gradient was performed where mentioned, as described by Saito (Saito et coll., 1984). Extraction of the membrane associated proteins was performed as described in the far-western paragraph.

Affinity purifications. For the preclear step, 500 µl of MAP extract were incubated at 25°C for 2 hr under mild rotation with 100 µl of streptactin sepharose[®] slurry previously equilibrated with the MAP extraction buffer. Beads were washed with 2 ml of the same buffer and 25 µg of the SePN recombinant protein were bound to the column for 2 hr at 25°C under rotation. The control experiment was realized in identical conditions, but omitting the recombinant protein. Beads were washed with 2 ml of the MAP extraction buffer and 500 µl of MAP extract were added to the beads for 2 hr at 25°C under rotation. Beads were washed with 2 ml of the MAP extraction buffer and complexes were eluted by 7 times 100 µl of elution buffer (0,54 g/l of desthiobiotin in the MAP extraction buffer). Aliquots were submitted to SDS-PAGE, with or without 2-mercaptoethanol. When the strep-tag[®] SePN was expressed in HeLa cells, the resulting extracts was directly added to the beads, without prior fixation of the bacterial recombinant protein.

4. Les modèles animaux

4.1. Modèle murin des myopathies associées à SePN

4.1.1. Avant-propos: principes d'obtention d'un modèle animal

Depuis plusieurs années, l'utilisation de modèles animaux pour mieux comprendre divers mécanismes biologiques est de plus en plus répandue. De plus, lorsque ces mécanismes sont reliés à des pathologies, le recours à ces modèles s'avère quasiment indispensable pour appréhender les processus à l'origine de la maladie. L'animal modèle permet notamment d'étudier le développement de la pathologie, y compris à des stades embryonnaires précoces qui sont souvent très informatifs mais non exploitables chez l'homme ou par l'analyse clinique. Ces modèles permettent aussi une étude physiologique des processus biologiques, complémentaire des approches biochimiques, cellulaires et moléculaires classiques. Dans ce sens, nous avons choisi au cours de ma thèse, en complément des études fonctionnelles de SePN, de développer un modèle murin des pathologies musculaires provoquées par son dysfonctionnement. Au laboratoire, un autre modèle a été développé: le poisson zèbre. Ce modèle animal permet l'étude de l'inactivation du gène au cours du développement embryonnaire précoce. Il sera évoqué plus loin. L'invalidation de gènes de sélénoprotéines chez la souris a été décrit pour nombre d'entre elles (Schweizer et Schomburg, 2005), mais n'était pas disponible pour SePN. Pourtant le dysfonctionnement de ce gène est la cause de graves myopathies chez l'homme. Le modèle murin constitue une base intéressante pour des études cliniques et pharmacologiques. Le principe général d'invalidation d'un gène chez la souris est décrit sur les Figures 37 et 38. Il faut noter que chez l'homme, plusieurs mutations pathologiques décrites dans le gène SEPNI conduisent à l'absence totale de protéine chez l'individu. Cet événement génétique n'est pas létal. Malgré tout, nous avons décidé de recourir à une stratégie particulière d'invalidation conditionnelle de gène, afin de prévenir la létalité possible du phénotype chez la souris. Pour cela, nous tirons avantage du système Cre-Lox du phage P1 (Metzger et Chambon, 2001; Nagy, 2000), permettant l'invalidation sélective de gène. Ce système nous a permis d'obtenir des souris invalidées pour le gène, soit dans tout l'organisme, soit spécifiquement dans les muscles. Dans ce dernier cas, la disruption peut se faire de façon contrôlée dans le temps, permettant l'excision du gène dès la naissance ou uniquement chez l'adulte (Figure 39).

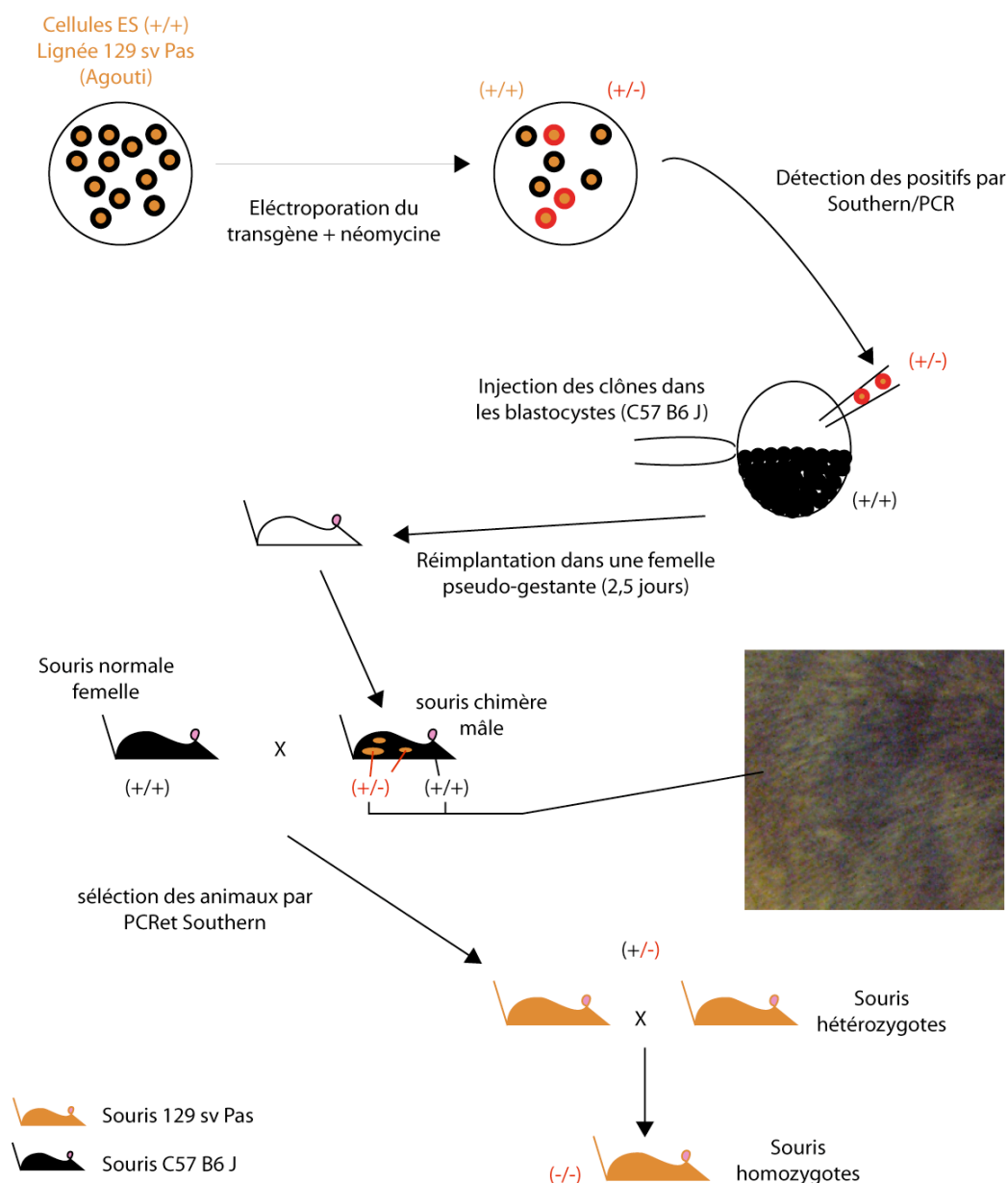


Figure 37: Méthode générale pour l'obtention d'une souris invalidée

Des cellules souches embryonnaires (ES) d'une lignée de souris 129 Sv Pas, de pelage agouti, sont cultivées sur un tapis de fibroblastes. Un fragment homologue au gène à inactiver est modifié pour y insérer des sites de recombinaison homologue et un marqueur de sélection conférant la résistance à la néomycine. Ce fragment d'ADN recombinant est électroporé dans les cellules et incorporé au génome par recombinaison homologue, en remplacement d'un des deux allèles sauvages. Des expériences de Southern-blot et de PCR permettent de sélectionner, parmi les clones résistants à la néomycine, ceux pour lesquels la recombinaison homologue a eu lieu aux sites attendus. Ces cellules sont amplifiées et injectées dans un blastocyste sauvage de la lignée C57 B6 J (pelage noir), qui est réimplanté dans une femelle pseudo-gestante. Cet embryon va donner naissance à un animal chimérique composé à la fois de cellules sauvages de lignée C57 B6 J et de cellules 129 Sv Pas modifiées, faisant apparaître quelques taches agouties sur le pelage majoritairement noir de l'animal (voir le carré correspondant à la photographie du pelage d'un animal chimérique). De telles cellules modifiées peuvent être représentées au niveau de la lignée germinale chez certaines chimères, qui pourront transmettre le transgène à leur descendance. On obtient ainsi par croisement des animaux hétérozygotes pour le gène d'intérêt. Le croisement des animaux hétérozygotes entre eux permet finalement d'obtenir l'animal homozygote, invalidé pour le gène, c'est-à-dire présentant deux allèles non fonctionnels.



Figure 38: Cellules souches embryonnaires et blastocystes

Ces photographies nous ont été aimablement procurées par A. Dierich et Y. Huss, service des cellules ES, Institut Clinique de la Souris, Illkirch. **A:** Des cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES) sont cultivées sur un tapis nourricier de fibroblastes. **B:** Blastocyste de souris. La masse cellulaire interne, composée des cellules ES, est visible dans la moitié supérieure gauche du blastocyste. **C:** Réinjection de cellules ES recombinantes sélectionnées par l'intermédiaire d'un marqueur de résistance et après des criblages successifs par PCR et Southern-blot. Ces cellules, issues de la lignée 129 Sv Pas, sont réintroduites dans un blastocyste de lignée C57 B6 J.

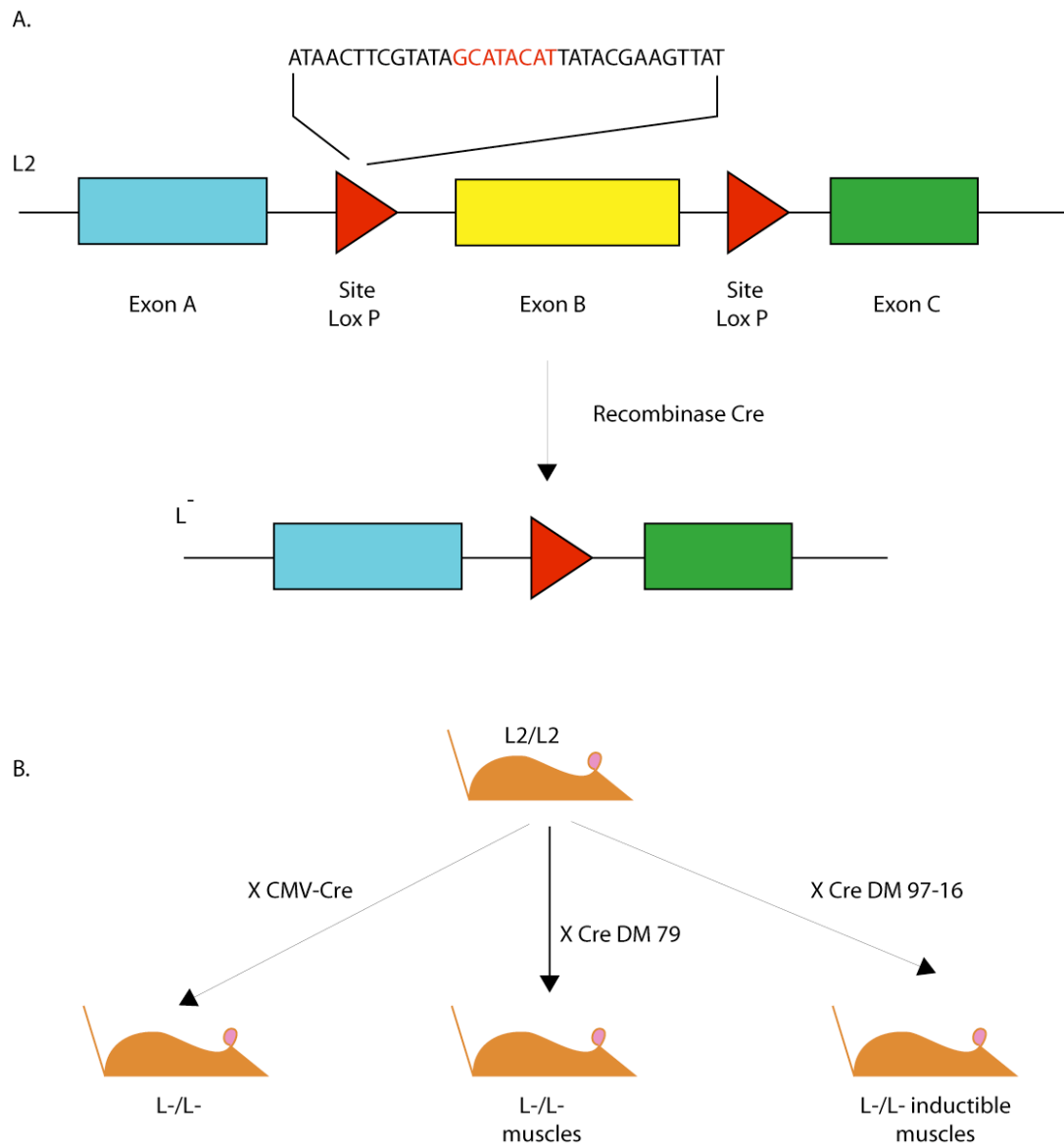


Figure 39: Principe de l'invalidation conditionnelle d'un gène par le système Cre-Lox

A: Le système Cre-Lox du phage P1 est utilisé pour réaliser l'invalidation conditionnelle d'un gène. Deux sites de recombinaison Lox P sont clonés de part et d'autre d'un exon. On parle d'exon floxé. L'expression de la recombinaise Cre permet ensuite d'exciser la région localisée entre les sites Lox, par recombinaison homologue des sites entre eux, conduisant à l'invalidation du gène. Les sites Lox sont des séquences de 34 pb, composées d'une région centrale de 8 pb entourée par deux séquences palindromiques de 13 pb chacune. Pour la recombinaison de deux sites Lox, quatre molécules d'enzymes sont nécessaires, reconnaissant chacune un des palindromes. Une souris homozygote (L2/L2), dont les deux allèles sont floxés, est parfaitement normale. En effet, les sites Lox, localisés dans les introns, n'interfèrent pas avec l'expression du gène. **B:** L'inactivation du gène est conditionnée par le promoteur dont dépend l'expression de la recombinaise Cre. Nous avons utilisé 3 types de souris transgéniques (don gracieux de D. Metzger et P. Chambon). Les souris CMV-Cre permettent l'expression constitutive de la recombinaise, donnant lieu après croisement à un animal totalement invalidé pour le gène. Les lignées DM 79 et DM 97.16 possèdent une Cre sous la dépendance d'un promoteur actine musculaire, permettant l'invalidation conditionnelle du gène dans le muscle. Pour la dernière lignée, l'expression de la recombinaise est en plus inducible par le tamoxifène, permettant ainsi le contrôle temporel de l'excision.

4.1.2. Résumé

La sélénoprotéine N est une sélénoprotéine de fonction inconnue récemment identifiée. C'est également la première sélénoprotéine à avoir été associée à une maladie héréditaire. Dans cet article, nous décrivons la mise au point d'un modèle murin des pathologies musculaires reliées à la sélénoprotéine N. Le système Cre-Lox nous a permis d'obtenir des souris invalidées pour le gène SEP1, ou des souris pour lesquelles le gène est invalidé de façon conditionnelle dans les muscles uniquement. Aucun phénotype évident n'a été observé: les animaux présentent une mobilité normale, ils sont fertiles et il n'y a pas de modifications du comportement par rapport aux animaux hétérozygotes ou sauvages issus de la même portée. Cependant, des analyses histologiques ont permis d'observer des profils dystrophiques localisés. En outre, les souris invalidées sont particulièrement sensibles au stress oxydatif engendré par l'injection de paraquat. Enfin, une relation fonctionnelle entre SePN et la vitamine E, un des principaux anti-oxydants membranaires, a été suspectée. Cette relation pourra être étudiée à l'aide de ces animaux modèles.

4.1.3. Conditional targeted disruption of the SEPNI gene in mouse: a new model to study selenoprotein N related myopathies

Abstract

Selenoprotein N (SePN), a newly identified selenoprotein of unknown function, was the first selenoprotein described to be involved in an inherited disease. Mutations in its gene (SEPNI) were associated to several congenital muscular disorders, now collectively named SePN related myopathies. Here we describe the development of a SEPNI knockout mouse. Taking advantage of the Cre-Lox system, we obtained alternatively the total or conditional targeted disruption of the selenoprotein N gene in muscles. Mice are apparently healthy but feature dystrophic histological patterns as well as a higher sensitivity to paraquat induced oxidative stress. Our model will be a valuable tool to decipher SePN function. Particularly, its role in muscle function and maintenance will be investigated. Also it will provide precious information concerning the role of selenium in humans, as well as its possible link to the other anti-oxidant vitamin E.

Introduction

Selenium is a trace element whose major biological form is selenocysteine, the 21st proteogenic amino acid. Selenocysteine is co-translationally incorporated into proteins in response to a UGA codon. Reprogrammation of this opal codon is performed owing to a dedicated translation machinery, involving different specific proteins and a conserved stem loop structure, located in the mRNA of all selenoproteins (Allmang et Krol, 2006b). Selenium is of fundamental importance to human health. Its implication in prevention of cancer, viral infections, fertility or aging are now clearly documented (Rayman, 2000). Moreover, it was shown that selenium dietary deficiencies, sometimes associated to simultaneous lack of vitamin E, were the cause for different muscular pathologies (Rederstorff et coll., 2006). Five years ago, mutations in the Selenoprotein N (SePN) encoding gene (SEPNI) were associated to a muscular syndrome named rigid spine muscular dystrophy (RSMD1) (Moghadaszadeh et coll., 2001). Since then, mutations in the SEPNI gene were shown to be also involved also in the classical form of the Multimanicore Disease (MmD) (Ferreiro et coll., 2002b), in the Desmin Related Myopathy with Mallory Body like inclusions (MB-DRM) (Ferreiro et coll., 2004), Congenital Fiber Type Disproportion (CFTD) (Clarke et coll., 2006) and cases of Dropped-head syndrome (D'Amico et coll., 2005). These pathologies are now classified into

the SePN related disorders family, and are suggested to correspond to the different etiologies of a same disease. Their particular and sometimes overlapping phenotype is characterized by an early onset of hypotonia, axial muscle weakness leading to spinal rigidity, scoliosis and life threatening respiratory insufficiency. SePN was the first selenoprotein described to be involved in a congenital disorder (Moghadaszadeh et coll., 2001). It is a reticulum endoplasmic transmembrane glycoprotein of 70 kDa (Petit et coll., 2003), but it has no function attributed yet. SePN is ubiquitously expressed in all the tissues examined (Lescure et coll., 1999) but is found at much higher levels in foetal tissues compared to adult ones (Petit et coll., 2003), reflecting an early developmental function for the protein. This observation was confirmed in zebrafish embryo, where SePN is highly expressed in the notochord and the somites, from which muscles and spine differentiate (Thisse et coll., 2003). In zebrafish as well, loss of selenoprotein N function owing to an antisense morpholino strategy provoked disruption of muscle architecture (Deniziak et coll., 2006). Here, we set up a mouse model to study selenoprotein N function and involvement in related myopathies. Taking advantage of the Cre-Lox system (Metzger et Chambon, 2001; Nagy, 2000), we could generate either the complete knock-out of the gene in mice or the conditional targeted disruption of the SEPNI gene in muscle only (Schuler et coll., 2005). Both models look apparently healthy. However, histological studies showed that they featured dystrophic muscular fibers patterns. In addition, we showed that SEPNI knockout mice were more sensitive to oxidative stress. These results stress again the role of selenoproteins in prevention of oxidative damages (Fu et coll., 1999b; Gromer et coll., 2005). Our model will be used as a tool to identify SePN role, and to understand the possible pathological mechanisms precluding the emergence of SePN related myopathies.

Results and Discussion

Disruption of the SEPNI gene in mouse ES cells

A mouse genomic fragment homologous to the human SEPNI gene was obtained by screening a mouse 129 Sv Pas genomic library with two probes corresponding to either the 5' or 3' part of the human SEPNI cDNA (Figure 40). One single spot was reproducibly detected after the first screen using the 5' probe. No positive clone was obtained by hybridization of the 3' probe. The single identified clone was amplified through two additional rounds of selection. Sequencing and mapping showed that it contained a 7 kb DNA fragment, spanning exons 1 to 6 of SEPNI. Luckily, the size of this fragment was sufficient for homologous

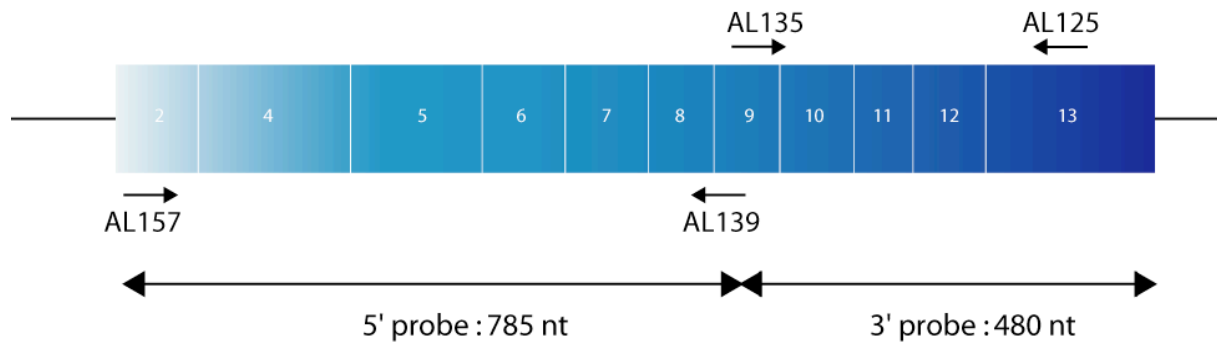


Figure 40: Probes used for screening the mouse genomic library

Two heterologous probes corresponding to the 5' or 3' parts of the human SEPN1 cDNA, were synthesized by PCR using primers AL157-AL139 or AL135-AL 125, respectively. The template used for the PCR was pSelN6. The two probes were ^{32}P -labelled using random priming.

recombination in mouse ES cells. In addition, it corresponded to the 5' part of the gene, a favorable situation for disruption of upstream exons, which is more likely to produce a non-functional gene. Next, we developed a strategy to knockout the SEPN1 gene in mice, taking advantage of the conditional gene targeting Cre-Lox system (Metzger et Chambon, 2001; Schuler et coll., 2005). The genomic fragment was modified to flox exon 4 and to introduce a neomycin marker, to select for recombinant mouse embryonic stem (ES) cells (Figure 41). Exon 4 was selected because its removal by Cre-recombinase-induced homologous recombination will induce a frameshift, changing the coding frame downstream of exon 2 and introducing a premature termination codon within exon 7 (Figure 41). Therefore, the resulting protein would be reduced to the corresponding exons 1 and 2, and it is very unlikely that this recombinant protein will retain its catalytic activity. The targeted disrupting fragment was electroporated into the ES cell line derived from a male 129 Sv embryo. Transformed cells were subjected to G418 selection to screen the clones in which the disrupting fragment was stably inserted. Next, 450 G418 resistant clones were screened by PCR with primers MR4 and MR9, to verify the correct recombination of the targeted disrupting fragment at the expected position within the genome (Figure 42). The presence of the Neo cassette downstream of the SEPN1 exon 4 increased the size of the PCR product by 1800 bp. The expected 5 kb fragment was observed in thirteen clones, in addition to the 3,2 kb wild type signal. Because the recombination took place in one allele only, both fragments were detected for the positive clones. Therefore, the recombinant ES cells were heterozygous for the modification.

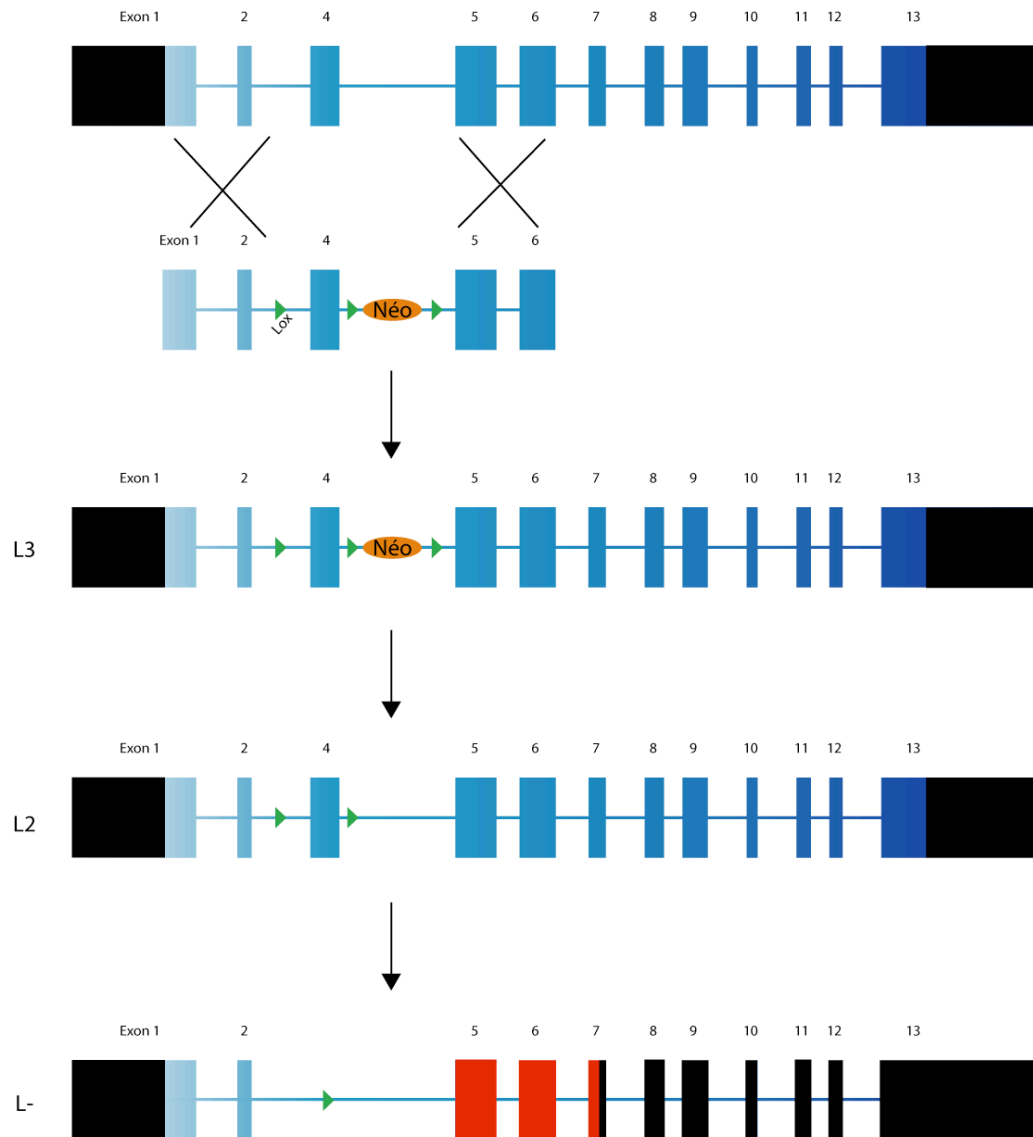


Figure 41: Strategy for SEPNI gene disruption in mice

The mouse SEPNI gene is composed of 12 exons, as exon 3 is only represented in humans. We screened a mouse genomic DNA library and obtained a 7 kb fragment corresponding to the 5' part of the gene. As exon 4 was located in the middle of the fragment, and as 3 kb homologous regions are necessary on each side of the targeting fragment to perform proper recombination, we proposed a strategy consisting in selective excision of exon 4. We verified that this would generate a frameshift and a premature stop codon in exon 7. No predicted alternative splicing between exon 2 and 5 could preserve the reading frame. In the targeting fragment, LoxP sites were incorporated on each side of exon 4 (floxed exon 4), together with a floxed neomycin cassette. Targeting fragment was electroporated into ES cells and Neo resistant clones featuring homologous recombination were selected. They contained 3 LoxP sites (L3). *In vivo* or *ex vivo* Cre induced excision of floxed regions led to several situations. Two of them are of particular interest: exon 4 flanked with 2 LoxP sites (L2) or complete excision (L-).

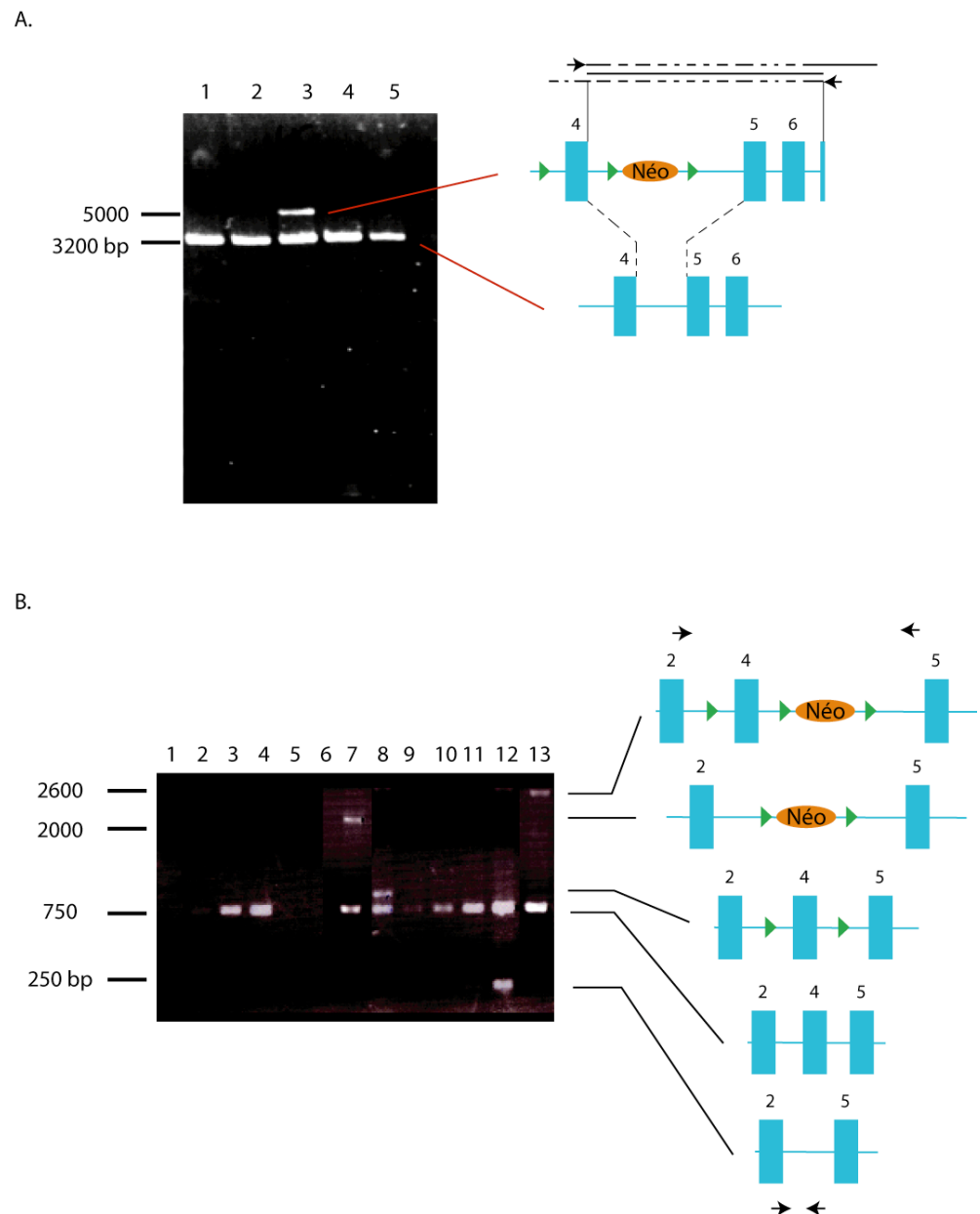


Figure 42: Screening procedure for identification of recombinant modified alleles

A: A PCR screen using primers MR4 and MR9 (arrows) was used to identify the ES cell clones in which one of the two SEPNI alleles was modified by homologous recombination. The wild type signal has a size of 3.2 kb, whereas the recombinant allele produce a fragment of 5 kb, due to the addition of the 1.8 kb neomycin cassette. Lane 3 illustrates a positive clone, which features the heterozygous allelic status. **B:** Selection of Cre induced excision of floxed regions was performed with several primers pairs. Results are shown for primers MR32 and MR33 (arrows): wild type allele produces a 750 bp fragment, L3 situation to a 2600 bp fragment, L2 to a 950 bp fragment and L- to a 250 bp signal. L2/+ cell lines were selected and allele composition was confirmed by Southern blots.

To check that those clones underwent a single homologous recombination event at the expected site, Southern-blot analysis with different enzymatic digestions and different probes corresponding to the 5' and 3' of the SEPNI gene, or to the neomycin gene, was carried out for ten of the positive clones. Genomic DNA, digested by *Bam*HI and hybridized with the 5' probe, showed two bands in all the clones analyzed: a 7 kb fragment corresponding to the wild type allele, and a 5.5 kb fragment at the expected size for the recombinant allele, featuring the introduction of an additional *Bam*HI site included in the neomycin cassette. This result indicated that the recombinant fragment was indeed integrated into the ten clones (data not shown). The same probe was used to examine the *Bam*HI-*Bgl*III digested genomic DNA. The 7kb *Bam*HI-*Bam*HI signal described previously for the wild-type fragment was observed for all the clones. However, digestion at the additional *Bgl*III site introduced together with the LoxP site upstream of exon 4 was supposed to produce a 3.2 kb fragment. This band is observed in four out of the ten clones tested (Figure 43A, lanes 1, 3, 7 and 9). In the 6 remaining cases, a 5.5 kb fragment was observed (Figure 43A, lanes 2, 4, 5, 6, 8 and 10), indicative that homologous recombination did not occur as expected at the 5' extremity, excluding the first LoxP site. To check for the unique integration of the targeted fragment into the genome, DNA was digested with *Sca*I and analyzed with a probe complementary to the sequence of the neomycin gene. The 12 kb expected signal was observed in all the cases (Figure 43B), only clone 6 featured an additional band and was thus discarded. Therefore, among the ten clones analyzed, only four of them featured unique homologous recombination at the correct site. On the basis of the caryotype analysis, only two of these cell lines were selected: K51-53 and K51-326. They were transfected with a Cre expression vector to remove the Neo cassette, while maintaining the floxed exon 4. Correct excision of the Neo cassette alone was attested by PCR using primers MR32 and MR33. The wild type allele produced a 750 bp fragment. Additional fragments of 2600, 2000, 950 or 250 bp were expected, depending on the LoxP sites used for recombination, as described in Figure 42B. The correctly floxed exon 4, generating a PCR fragment of 950 bp, was identified in several clones, corresponding to the L2/+ cell line, which harbored only two LoxP sites on the recombinant allele. Correct organization of the recombinant allele was further confirmed by Southern-blot (data not shown). Normal caryotype was verified in at least one clone: K51-326-L2.

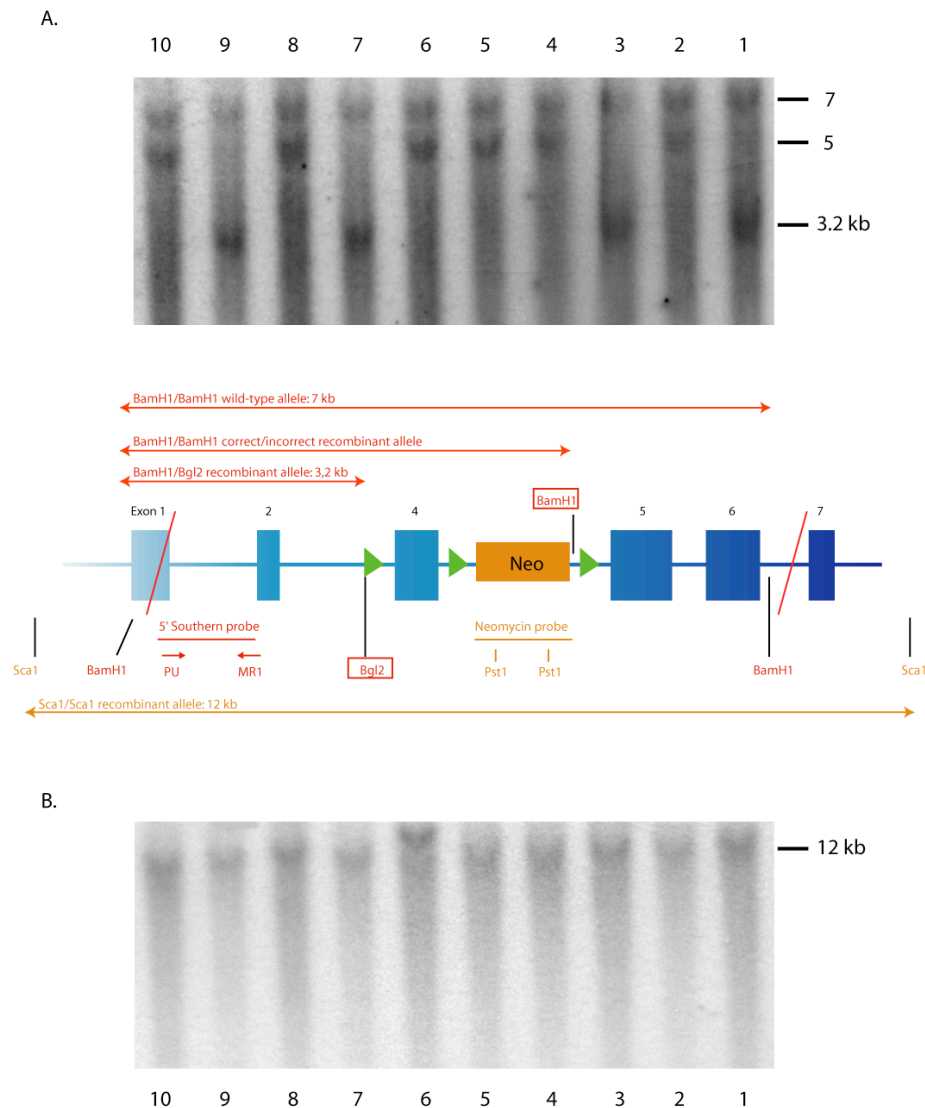


Figure 43: Southern-blot confirmation of the allelic organization after homologous recombination

A: Screening for complete insertion of the targeted disrupting fragment: *Bam*H1-*Bgl*2-digested ES cell genomic DNA was hybridized with the 5' probe. The wild type *Bam*H1-*Bam*H1 fragment corresponds to a size of 7 kb. If homologous recombination occurred as expected, the second fragment size should be of 3.2 kb because of the insertion of a new *Bgl*2 restriction site together with the upstream LoxP site (lanes 1, 3, 7 and 9). The 5.5 kb *Bam*H1-*Bam*H1 fragment corresponds to incomplete insertion of the targeted disrupting fragment, including the Neo cassette but excluding the *Bgl*2 and the third LoxP sites (lanes 2, 4, 5, 6, 8 and 10). **B:** Screening for insertion of a single targeted disrupting fragment in the genome, at the SEPNI locus: *Sca*1-digested ES cell genomic DNA was hybridized with the neo probe. One single signal with a 12 kb size is expected. Clone number 6, which differs, was therefore excluded. Thus, only 4 clones were selected (lanes 1, 3, 7 and 9) and submitted to caryotype verifications. Clone 1 and 9 were correct, corresponding to colonies K51-53 and K51-326 of the initial 96-well plates screen. Restriction sites used for the Southern-blot experiments are indicated on the diagram. Additional sites introduced with the targeted disrupting fragment are boxed.

Engineering of the SEPNI knockout mice

Each of the three genetically modified ES cell lines, K51-53, K51-326 and K51-326-L2, were injected into about 60 blastocysts arising from a pseudo-pregnant C57 B6 J host female. Ultimately, heterozygous mice derived from these cells will bear one recombinant allele carrying either three (L3/+) or two (L2/+) LoxP sites depending on the injected ES cell line. In a first step, several chimeric males were obtained for both L2 and L3 transgenes and crossed with C57 B6 J females. In order to get a mouse strain with a pure genetic background, the L3 chimeras were also mated with 129 Sv Pas females. The offsprings were genotyped for germline transmission of the recombinant allele, by PCR on DNA isolated from tail tips. The PCR profile obtained is similar to that observed for the ES cell screening (data not shown). Mice heterozygous for the L2 or L3 alleles, L2/+ or L3/+, were intercrossed and the homozygous offspring was identified. L3 homozygous mice did not feature any pseudo-knockout phenotype which could have resulted from the insertion of the neomycin gene into the SEPNI gene. To obtain homozygous L-/L- mice, the L3 homozygous strain was crossed to CMV-Cre transgenic mice (for details, see experimental procedures). In parallel, to obtain the conditional knockout of SEPNI, L2 homozygous mice were bred to Actin-Cre or Actin-Cre-ER^{T2} transgenic mice (generous gift of D. Metzger and P. Chambon, IGBMC, Illkirch, France). (L2/L2, Actin-Cre) and (L2/L2, Actin-Cre-ER^{T2}) mice were obtained. In these two strains, muscle specific expression of the Cre-recombinase induced excision of the floxed exon 4 in muscles only. In addition, in the Actin-Cre-ER^{T2} strain, muscle disruption of the gene was controlled by tamoxifen injections. At each successive breeding step, the genotype of the offspring was analyzed by a PCR procedure on genomic DNA extracted from tail tips (lanes 1 to 12) or muscle tissue (lanes 13 and 14), and using different oligonucleotides pairs. Primers pair MR32, MR33 defined the allelic status at the SEPNI exon 4 locus: wild-type, L2 and L- generated 750 bp, 950 bp and 250 bp fragments, respectively (Figure 44). Detection of a 400 bp PCR product with primer pair TK139, TK141 determined the presence of the Cre gene in the genome (Figure 44). Analysis of the offsprings of a (L-/+, Cre⁰) animal intercrossing is shown in Figure 44 (lanes 1 to 5). Mouse 1, featuring a single 750 bp signal, was homozygous wild-type. Mouse 2, presenting two fragments of 750 and 250 bp, is heterozygous (L-/+), whereas mice 3 to 5, featuring a single 250 bp signal, are homozygous for exon 4 deletion (L-/L-). As expected, no signal was detected for the Cre gene (Figure 44, lower panel, lanes 1 to 5). The offsprings of a (L2/+, Actin-Cre) crossed to a (L2/L2, Cre⁰) were tested (lanes 6 to 12).

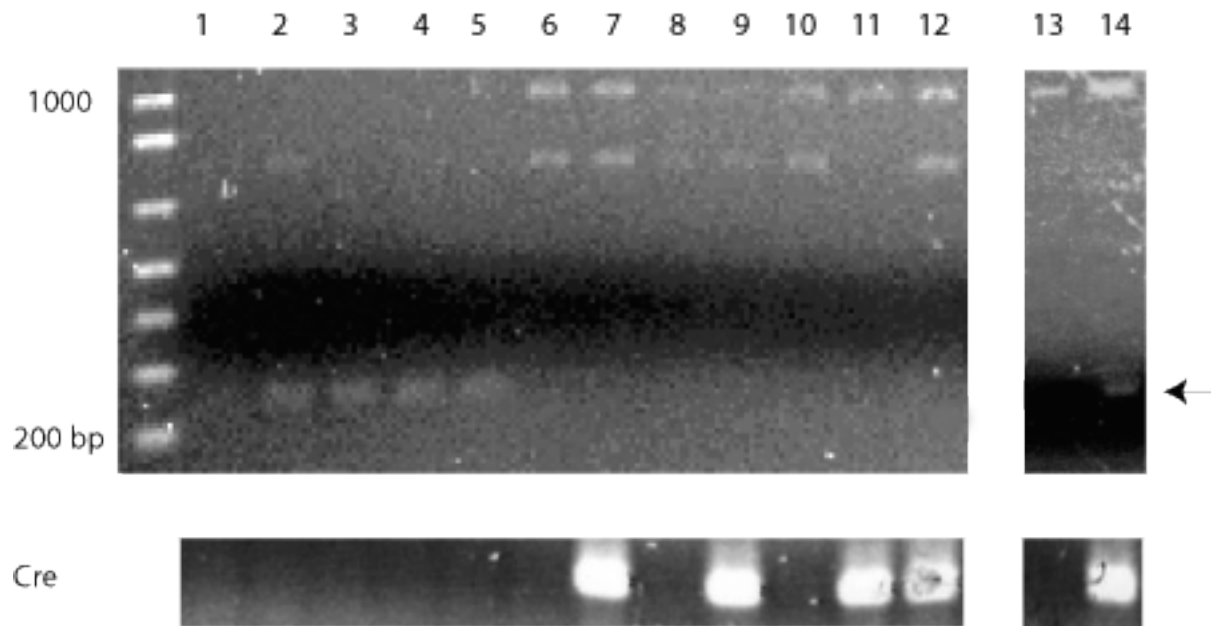


Figure 44: Heterozygous and homozygous mice genotyping for the different allelic situations

PCR 1 to 12 were performed on tail tips DNA; 13 and 14 on muscle DNA. Offspring genotyping of a ($L^{-/+}$, Cre^0) intercrossing is shown from lanes 1 to 5. Lane 1 corresponds to a wild type animal, with a unique 750 bp signal. Lane 2 corresponds to a heterozygous animal, with an additional 250 bp signal, representative of the L^{-} allele. Lanes 3-5 correspond to (L^{-}/L^{-}) animals. Lanes 6-12 represent the genotyping of the offspring of the ($L2/L2$, Cre^0) mice bred with ($L2/+$, Actin-Cre) mice. The $L2$ allele produces a 950 bp PCR product. Lane 11 corresponds to a ($L2/L2$, Actin-Cre) mice. In the ($L2/L2$, Actin-Cre) animals, the Cre-recombinase is expressed in the muscle, leading to specific excision of exon 4 (allele L^{-}) only in this tissue. This excision process is limited (lane 14).

Three different situations are depicted in Figure 44: ($L2/+$, Cre^0) (lanes 6, 8 and 10); ($L2/+$, Actin-Cre) (lanes 7, 9 and 12); ($L2/L2$, Actin-Cre) (lane 11). In this last strain, a single band at 950 bp, corresponding to the $L2$ allele, was observed from tail tips DNA, because the Cre recombinase is expressed in the muscle, therefore inducing recombination in this tissue only. PCR analysis was performed on muscle tissue from a ($L2/L2$, Actin-Cre) mouse (lane 14), and compared to the signal obtained from a ($L2/L2$, Cre^0) mouse (lane 13). Only in presence of the Cre, a weak signal at 250 bp corresponding to the L^{-} allele was detected (arrow in lane 14). As expected, recombination of the LoxP sites occurred *in vivo* in the muscles, but only partial disruption of the gene was observed. One possible explanation for the low disruption efficiency in the muscle tissue is that recombinant cells harboring the L^{-}/L^{-} alleles were counter-selected, because SEPNI is important for muscle cells maintenance or formation.

Phenotypic analysis of the SEPNI gene knockout in the mouse strains

Mice homozygous for the null allele, SEPNI^{-/-}, in the entire organism or in muscle only, were viable, healthy, fertile and displayed normal comportment. From birth up to five months, both entire or muscle specific SEPNI^{-/-} appeared to be indistinguishable from wild type and heterozygous littermate, exception made to a certain degree of skin hyper-laxity that can be sensed when mice are handled. No significant body weight difference was observed between SEPNI^{-/-} and control mice (data not shown). This result was surprising since SEPNI impairments, due to diverse nonsense, missense or frameshift mutations in humans, are the cause for severe muscular disorders (Rederstorff et coll., 2006). To get more insight into this issue, expression pattern of the SePN protein was analyzed.

Selenoprotein N expression was tested by western-blot using antibody Ac168 (Petit et coll., 2003) directed against the part of the protein spanning exons 2 to 10, in both (L-/L-) and (L2/L2, Actin-Cre) animals, compared to the respective controls. In the L-/L- mice, no SePN expression could be detected in the liver, even in conditions where protein extract was overloaded on the gel (Figure 45, compare lane 1 and 2). Similar data were obtained for other tissues (data not shown). Concerning the (L2/L2, Actin-Cre) mice, where partial excision of exon 4 was observed in muscles only (Figure 44, lane 14), SePN level was examined in this tissue. The band observed is about half the intensity of the wild-type control (Figure 45, compare lane 3 and 4). These results verify that exon 4 excision disabled SePN accumulation in the tissues as expected from the initial strategy. The healthy phenotype of the SEPNI^{-/-} mice could not be attributed to an inaccurate gene deletion strategy. These observations led us to suspect the implication of other environmental factors in the emergence of the disease. This statement is in agreement with a variable degree of expression of the pathologic phenotype between patients carrying an identical mutation, even within the same family (P. Guicheney and A. Ferreiro, personal communications). Implication of another genetic factor can be excluded, because of the clear monogenic transmission pattern of the muscular disease in humans. Though no evident phenotype could be observed, histological analysis might reveal latent conditions.

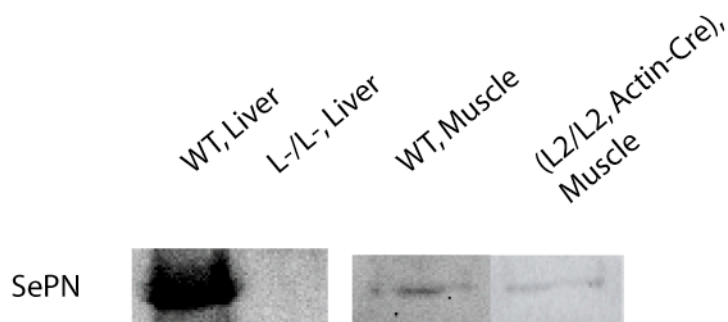
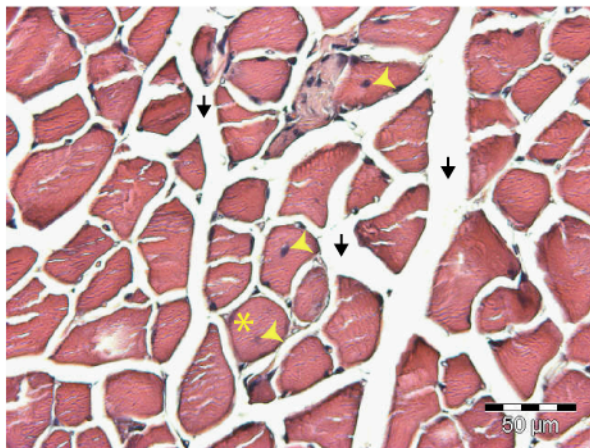


Figure 45: Selenoprotein N expression in transgenic mice

Western-blot analysis was performed using the polyclonal antibody 168 directed against SePN. In L^{-}/L^{-} mice, the protein product was not observed, even under conditions where the gel was overloaded with protein extract compared to control (compare lanes 1 and 2). In ($L2/L2$, Actin-Cre) mouse muscle, SePN could still be detected (Lane 4), with a 60% decrease compared to control (Lane 3). Quantification was performed using the Quantity One software (Biorad).

An initial set of histological investigations was performed on the $SEPNI^{-/-}$ mice to look for muscular disorganizations displaying classical dystrophic or myopathic patterns. Hematoxylin-Eosin staining from $SEPNI^{-/-}$ muscles showed some differences in the fiber sizes, dilated inter-fiber spaces and several centrally located nuclei (Figure 46). These three features are characteristics of DMC muscles. Considering this observation, it is rather surprising that the mice appeared healthy. One possible explanation is that the global muscle integrity is preserved due to their limited physical activity in their actual housing conditions. Exercise tolerance tests will be performed that should bring more insight into muscular issues. Additional histological specific stainings will also be performed to detect other physiological or structural defects in the muscle fibers. Cytoplasmic glycogen accumulation (PAS staining), presence of cores featuring absence of mitochondrial catalytic activity (NADH, COX stainings), or disequilibrium in fiber I, fiber II type ratios (ATPase staining), are characteristics often observed in muscles of SePN related disorders patients. These aspects will be investigated in the near future in the framework of our collaboration with the groups of P. Guicheney and A. Ferreiro at the Institut de Myologie, Paris.

A.



B.

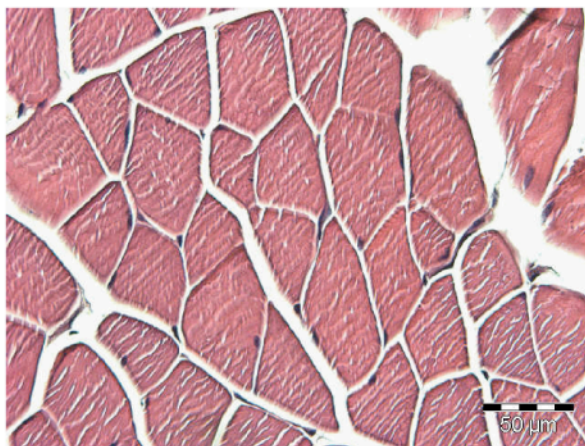


Figure 46: Hematoxylin-Eosin stainings of mice tibialis transversal sections

A: SEPN1^{-/-} animal. Muscle shows a dystrophic pattern, featuring several central nuclei (yellow arrow heads), increased inter-fiber spaces (black arrows) and fiber size variation, with some smaller round shaped fibers (yellow asterisk). **B:** Wild-type control mouse.

Differential sensitivity of SEPN1^{-/-} mice to oxidative stress

Most of the selenoproteins of known function are involved in oxidation-reduction reactions, justifying the presence of the selenium atom which confers higher redox catalytic activities. Accordingly, it was shown that intraperitoneal injections of paraquat or diquat, two active oxidative stress inducers, provoked much more deleterious effects in selenium-deficient or GPx1 knockout mice than in control animals (Burk et coll., 1980; Fu et coll., 1999b).

Moreover, it was shown that selenoprotein P in addition to glutathione peroxidase protects against lipid peroxidation in case of such a stress in a selenium-dependent dose (Burk et coll., 1995). For these reasons, we decided to investigate the (L-/L-) or (L2/L2, Actin-Cre) mice sensitivity to paraquat induced oxidative stress. Both (L-/L-) or (L2/L2, Actin-Cre) mice were injected with a dose of paraquat below the injurious amount. Preliminary data showed an increased sensitivity of animals with a disabled SEPNI gene to induced oxidative stress (Figure 47). However, the number of animals tested so far is too limited to conclude to a relation between the sensitivity and the heterozygous/homozygous allelic status. Surprisingly, the more dramatic effect was obtained in the (L2/L2, Actin-Cre) mice. It is possible that in the constitutive L-/L- mice, complete absence of SePN might be compensated for by overexpression of other selenoproteins or proteins involved in the oxidative stress response.

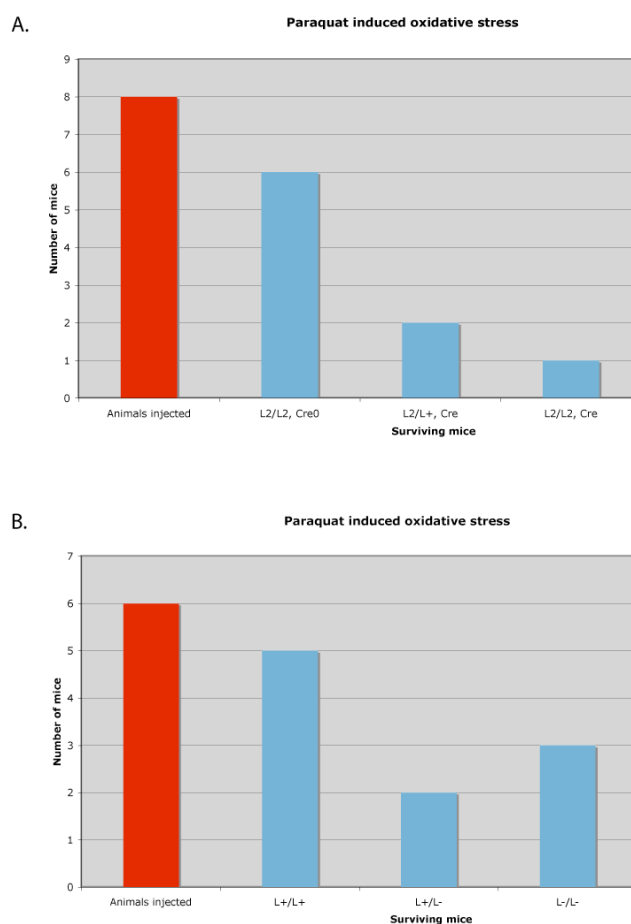


Figure 47: Sensitivity to paraquat induced oxidative stress of the different knock-out mice strains

Mice were injected with paraquat at a concentration of 50 mg/kg, in one single injection. Control mice, (L+/L+) and (L2/L2, Cre⁰), show no or limited sensitivity to paraquat induced oxidative stress. Heterozygous and homozygous mice of both strains, (L2, Cre) (A) and L- (B) shows an increased sensitivity to paraquat. Animals died within 2 to 72 hr post injection.

Interestingly, one should remind that early observations reported that stiff/rigid lamb syndrome was related to both selenium and vitamin E nutritional deficiencies. Other data established a connection between selenium and vitamin E synergistic effects on muscle physiology (Rederstorff et coll., 2006). Therefore, vitamin E appears as a factor exacerbating the lack of selenium by an unknown mechanism. Vitamin E or α -tocopherol is a liposoluble antioxidant. These anti-oxidative properties suggest it is involved in the prevention of oxidative stress, but vitamin E functions are clearly undervalued, and this molecule might be involved in more specific reactions remaining to be characterized (Brigelius-Flohe et coll., 2002). For these reasons, SEPNI^{-/-} mice are currently fed a vitamin E deficient diet, and are monitored for muscle phenotype appearance, compared to control mice. This study will be further investigated in the framework of collaborative efforts with the laboratories of U. Schweizer and R. Brigelius-Flohé in Berlin.

Experimental procedures

Construction of the targeted disrupting vector

A genomic clone containing part of the SEPNI gene was obtained by screening a 129 Sv Pas mouse genomic library (generous gift of JM. Garnier, IGBMC, Illkirch, France: Mouse genomic fragments of about 15 kb are cloned into the *NotI* site of λ ZAP II bacteriophage, Stratagene) with two non-overlapping ³²P-labelled probes corresponding to the 5' or 3' parts of the human SEPNI cDNA (Figure 40). One single clone out of 5.10⁵ could be obtained by hybridization of the 5' probe and was amplified by two additional rounds of screening. Excision of the λ ZAP II phagemid produced a 7 kb fragment, inserted in the *NotI* site of the pSK(-) vector. PCR reactions performed on the clone using primers located at the exon boundaries, showed that the obtained genomic fragment corresponded to a region including exons 1 to 6 (Figure 48 and Table 7). The clone was sequenced and its restriction map established (Figure 48A). It was used to engineer the disruption strategy (Figure 41): in the absence of unique sites, the fragment was split into four constructs: *EcoRI-SpeI*, *SpeI-SmaI*, *SmaI-XbaI* and *XbaI-NotI* (Figure 49). A first LoxP site flanked by a *BglII* restriction site, to be used Southern analysis, was inserted upstream of exon 4 by site directed mutagenesis with oligonucleotide AL182. The floxed neomycin cassette was PCR amplified from the pGKneo vector (generous gift of D. Metzger, IGBMC, Illkirch, France) using primers AL283 and AL287. This amplification concomitantly introduced a *NsiI* restriction

site at each end of the fragment. The *NsiI*-*NsiI* fragment was subcloned in the *PstI* site downstream of exon 4. The four subfragments were assembled to get the final targeted disrupting vector. The sequence of this final construct was verified and the digested *EcoRI*-*AflIII* fragment was recovered and purified on a 15 % sucrose gradient.

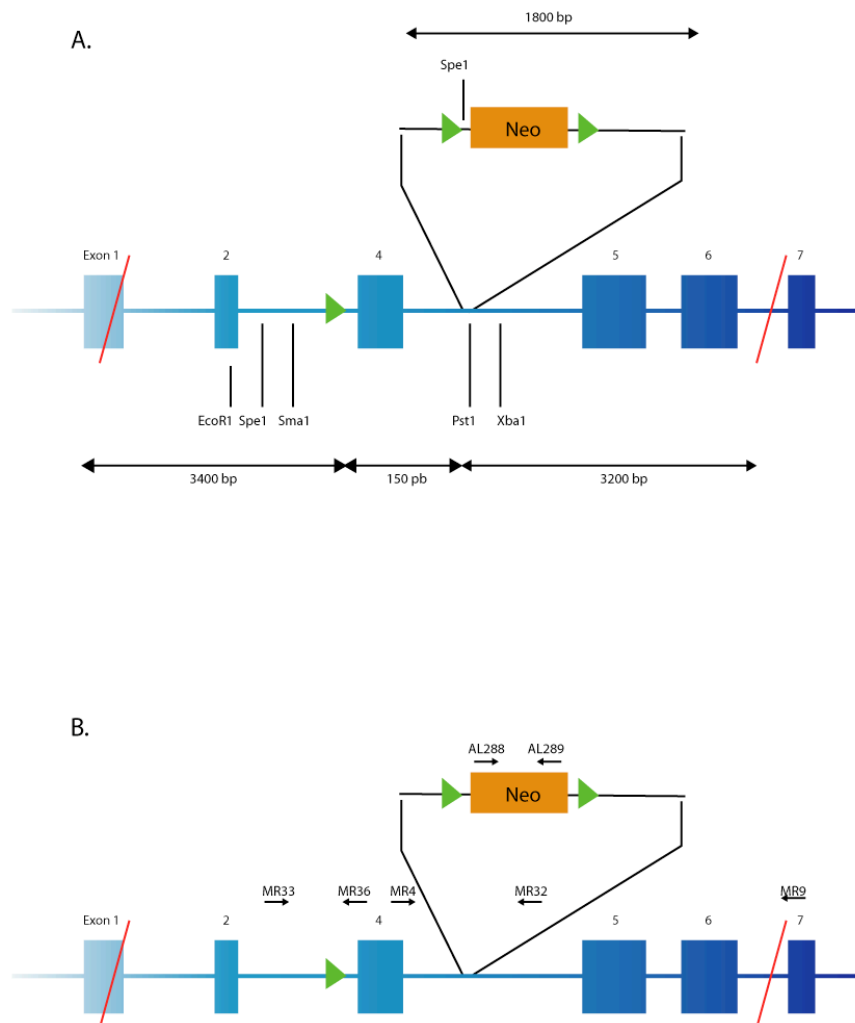


Figure 48: Organization of the mouse genomic fragment obtained after DNA library screening and engineering of the targeted disrupting fragment

A: The 7 kb fragment obtained, which spans exons 1 to 6, is delimited by red bars. Restriction map of the targeted disrupting fragment was established by sequencing in order to develop the cloning strategy. The neomycin cassette was PCR amplified from the pGKneo vector, using *NsiI* containing primers AL283-AL287. The floxed Neo gene was inserted into the compatible *PstI* site downstream of exon 4. A third LoxP site and a *BglII* restriction site were inserted upstream of exon 4 by site directed mutagenesis using oligonucleotide AL282. The sizes of the major fragments used are indicated. **B:** Primers used for the screening strategy of the different recombination events are indicated. Complete list of the sequencing primers can be found in table 7. LoxP sites are represented by green triangles.

Name	Nature	Sequence 5'→3'	Role
AL125	PCR	GATTTCCTGGGGCTTCACGGAAG	3' probe obtention for mouse genomic library screening
AL135	PCR	CCCCTGCAGTTTGTGTTGAG	3' probe obtention for mouse genomic library screening
AL139	PCR	CATCCAGGATCACGGAAGGCACAGA	5' probe obtention for mouse genomic library screening
AL157	PCR	CGGGCGGGGGGCAAGCTTACATCAGCCCC	5' probe obtention for mouse genomic library screening
AL279	PCR	TGATTCTCGCCCGGCCAGTTACCC	3' probe obtention for southern-blot
AL280	PCR	CCCACCAAGACCCTATGATGTCGTG	3' probe obtention for southern-blot
AL282	Mutagenesis	CTGGATCTTAGGCTACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATggtctGGAAACGCAGTCAAGG	LoxP site and BglII site insertion downstream exon 4
AL288	PCR	CGACTGCAAGCCAATATGGG	Neomycin cassette detection
AL289	PCR	CTGCAGACTTACAGCGGATC	Neomycin cassette detection
TK139	PCR	/	Cre recombinase gene detection
TK141	PCR	/	Cre recombinase gene detection
MR1	Sequencing/PCR	CCCCAGGACCTTTAATGC	Hybridization at the 5' and 3' extremities of exon 2
MR2		GGAATTCAAACCCATTGC	
MR3		TGGCCACAGGAACGTGACG	
MR4		AAAGCAAGATGGCTTCC	
MR5		AGAGCGAGGCGGGAGACC	
MR6		CACCGCCCAAGGCAAGG	
MR7		ATGCTTAACAGGCGCATGG	
MR8		ACTACACCGTGATGTCC	
MR9		AGCTGAACCTCCGGGTGG	
MR10		ACTTCAGGCTGTTGTGC	
MR11		TCCATGTCACATTCAAG	
MR12		TGGACATTGGCTACGTCC	
MR32	Sequencing/PCR	GGATCAGTAGAAAGTACC	Mice genotyping
MR33	Sequencing/PCR	TCCATGACGTCAGGCTGTGACTTGC	Mice genotyping
MR36	Sequencing/PCR	CCCTAGGAAGCCATCTTTGC	Mice genotyping
PU	Sequencing/PCR	GTAAACGACGGCCAGT	Hybridization in the pSK(-) vector
RPU	Sequencing/PCR	GGAAACAGCTATGACCATG	Hybridization in the pSK(-) vector

Table 7: Sequence and functions of the oligonucleotides used

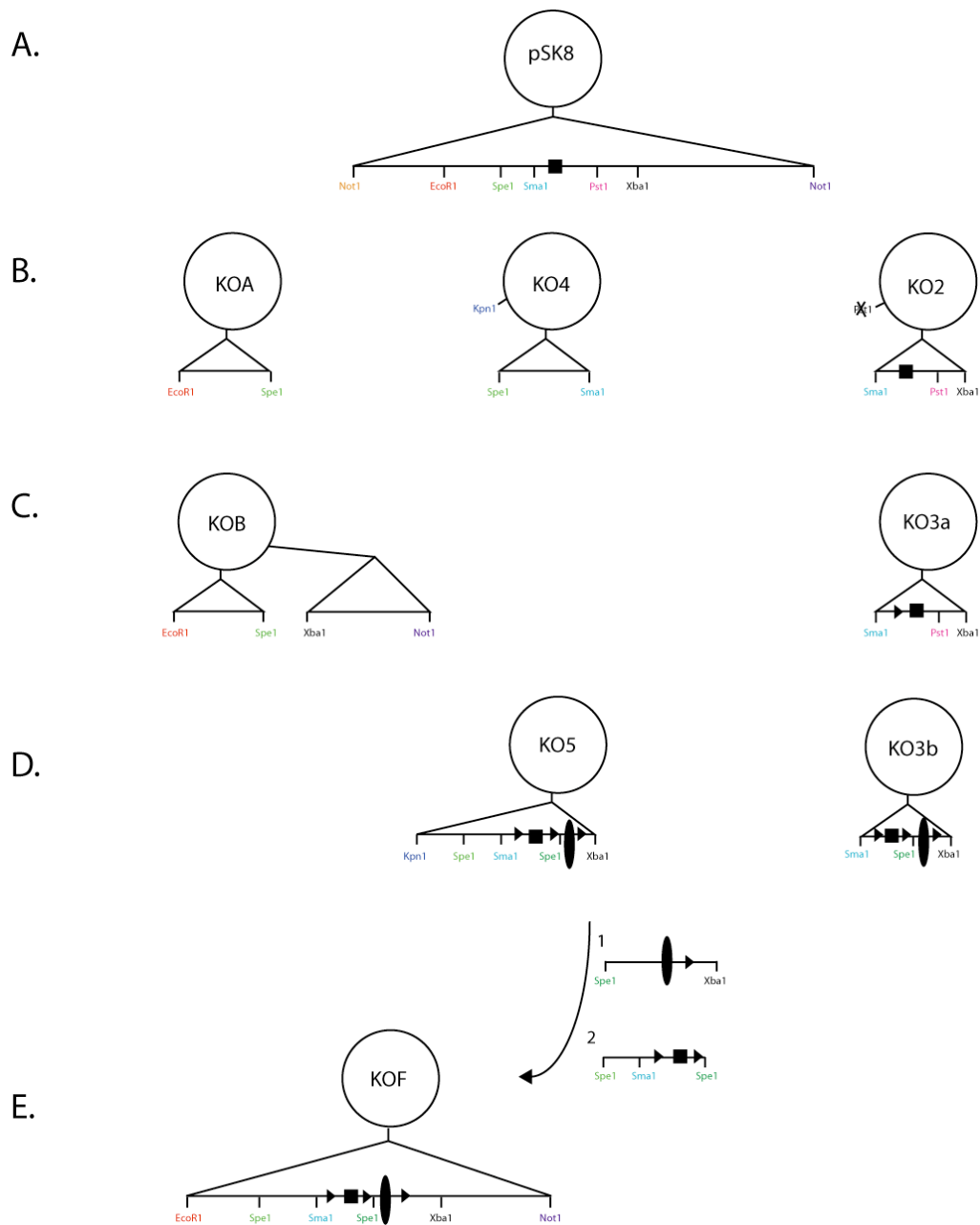


Figure 49: Cloning strategy for obtaining the SEPNI gene targeted disrupting fragment

A: The *NotI-NotI* fragment excised from the λ phage clone was cloned into the *NotI* site of pSK (-) vector, generating plasmid pSK8. **B/C:** Lack of unique sites forced us to sub-clone the fragment into four sub-fragments: *EcoRI-SpeI*, *XbaI-NotI*, *SpeI-SmaI* and *SmaI-XbaI* forming KOA, KOB, KO4 and KO2 plasmids, respectively. The endogenous *PstI* site of the latter vector was previously deleted. One *LoxP* site, schematized by a black triangle, was inserted by site directed mutagenesis upstream of exon 4, depicted as a black square in KO3a, using the oligonucleotide AL282. **D:** The *NsiI-NsiI* PCR amplified neomycin cassette (depicted by a black oval shape) was inserted in the KO3a *PstI* site to obtain KO3b and KO5 by joining the fragments contained in KO4 and KO3b. As the neomycin cassette introduced a new *SpeI* site, the final KOF construct was obtained after a final 2-step cloning of the *SpeI-XbaI* and *SpeI-SpeI* fragments from KO5 into KOB.

ES cell culture and transfection to generate L3/+ ES cell clones

This part of the work was conducted in partnership with the Mouse Clinic Institute (Illkirch, France), according to previously described protocols (Cosgrove et coll., 1991).

Briefly, mouse embryonic stem cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 15% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 0,1 mM 2-mercaptoethanol, 1000 U/ml leukemia inhibitory factor and 400 µg/ml gentamycin sulfate. Cells were cultured at 37°C, 10% CO₂ in humid air, routinely carried on gelatinized plates and passaged by trypsinization with Hank's balanced salt solution supplemented with 0,25% trypsin and 0,04% EDTA. Thirty-five micrograms of the linearized 7 kb targeting fragment was electroporated into 2.10^7 ES cells suspended in 500 µl of growth medium, at 125 µF, 1000 V/cm (Biorad gene pulser). After 5 min at room temperature, the cells were diluted and 2.10^6 cells were distributed on 10 cm plates. After 2 h, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 150 µg/ml of genitcin (G418) and 2 µM gancyclovir. The medium was changed every 2 days throughout the 10 day selection period. Four hundred and fifty G418 resistant clones were isolated and amplified in duplicate in 96-well plates. Next, the clones obtained were tested for homologous recombination at the expected size by PCR screening. Colonies were resuspended in 100 µl lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 250 µg/ml Proteinase K (Roche)) and incubated overnight at 55°C. The DNA was denatured for 3 min at 85°C and 1 or 10 µl were subjected to PCR amplification using primers MR4 / MR9 (Figure 48B and Table 7) and long range PCR Dnzyme EXT (Finnzymes) on a Peltier Thermo Cycler 200 (MJ Research). PCR cycles were programmed as follows: after 2 min denaturation at 94°C, the first 10 cycles were performed (94°C for 10 sec, 52°C for 30 sec, 70°C for 3.5 min); next, 20 additional cycles were done (94°C for 10 sec, 52°C for 30 sec, 70°C for 3.5 min with a 20 sec increment at each cycle); PCR was terminated by a 7 min final elongation at 70°C. Wild type signal produced a band at 3.2 kb. Insertion of the Neo cassette between exons 4 and 5 of SEPNI generated a 5 kb fragment (Figure 42A). Among the clones screened, thirteen displayed a double band at 3.2 and 5 kb, representative of the heterozygote insertion of the Neo cassette at the expected site. In these cells, one of the two SEPNI alleles incorporates three LoxP sites (L3) organized as follows: LoxP-Exon 4-LoxP-Neo cassette-LoxP. This allelic situation is named L3/+. To confirm these results, the clones were submitted to Southern-blot analysis (see next paragraph). The DNA was digested by *BamHI* or *BamHI-BglII* and, after transfer,

the blot was hybridized with a 400 nucleotide probe complementary to the 5' end of the disruption fragment. This probe was obtained by PCR amplification of the pSK8 vector using universal primer and MR1. In parallel, *NcoI* or *EcoRI-BglII* digested genomic DNA was hybridized with a 600 nucleotide probe corresponding to the 3' end of the disruption fragment. This second probe was obtained by PCR using primers AL279 and AL280 on the pSK8 vector. Finally, *BamHI* or *ScaI* digested DNA was analyzed with a 600 nucleotide probe complementary to the Neo cassette. This probe was prepared by *PstI* digestion of the pGKneo vector.

Southern analysis

Fifteen micrograms of genomic DNA prepared from ES cells were digested overnight at 37°C in a total volume of 50 µl, with different enzymes as described before. The fragments were fractionated on 0.7% (w/v) agarose gel in TBE 1 X, for 4 h at 40V. Next, the gel was treated with 0.2 N HCl for 15 min, washed 3 times with water for 10 min and twice with 0.5 M NaOH, 1M NaCl for 15 min. DNA was transferred by capillarity overnight onto Hybond-N⁺ membranes (Amersham Biosciences). Hundred nanograms of each of the three probes, obtained as previously described, were (α -³²P) dCTP labeled using the Prime It II random priming kit (Stratagene), according to the manufacturer protocol. Non-incorporated radioactive nucleotides were removed by exclusion filtration on a G50 column. Blots were equilibrated for 15 min in SSC 6 X buffer (58.4 g/l NaCl; 29.4 g/l sodium citrate) and pre-hybridized for at least 6 hours at 42°C in the hybridization buffer (50 mM phosphate buffer pH 6.5; 0.9 M NaCl; 2 mM EDTA; 40% formamide; 0.8 g/l Ficoll 400; 0.8 g/l BSA; 0.8 g/l polyvinylpyrrolidone; 50 g/l dextran sulfate; SDS 1%) plus 50 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Hybridization was performed overnight in the same buffer with 10⁶ cpm/ml of pre-denatured probe under gentle rotation at 42°C. Blots were washed at room temperature 4 times for 15 min in wash buffer (SSC 2 X; 0.1% SDS) and whenever required, in the higher stringency buffer (SSC 0.2 X; 0.1% SDS) at 42°C. Blots were autoradiographed using Kodak Biomax MS films (Sigma-Aldrich). Blots were stripped for 10 min in 0.1% SDS at 65°C, and re-hybridized with different probes.

Obtention of heterozygote L2/+ ES cell clones

The Neo cassette can be removed by Cre induced homologous recombination, leaving two LoxP sites (L2) flanking exon 4. One of the selected L3/+ clones was transfected with a

Cre expressing plasmid (according to the MCI protocols). The Cre-recombinase induced excision of a region between two random LoxP sites. The four possible situations could be distinguished by PCR using primers MR32 / MR33 (Figure 48B): no excision (2600 bp signal), excision of the Neo cassette only (950 bp), excision of the exon 4 only (2000 bp) or excision of both exon 4 and Neo cassette (250 bp) (Figure 42B). Thus, clones containing the remaining floxed exon 4 (L2) were selected. These heterozygous clones are named L2/+. Confirmation of accurate excision was obtained from Southern-blot analysis.

Genesis of chimeric and disrupted mice

Wild type 129 Sv Pas and C57 B6 J mice were obtained from Harlan, France and Charles River laboratories, France. Mice were kept at constant temperature with equal periods of darkness and light. They had free access to fresh water and a standard chow (SAFE), except when mentioned. Vitamin E deficient diet was obtained from GENESTIL, France. Procedures involving animals and their care were conducted according to the European Union guidelines for animal care.

All embryo manipulations were performed essentially as described by Robertson (Robertson, 1987). L2/+ and L3/+ selected ES cell clones were microinjected into 60 mature blastocysts obtained from superovulated C57 B6 J female mice at day 3.5 of pregnancy. Between 8 and 12 ES cells were injected into the blastocoel cavity. Successfully injected blastocysts were cultured for 3 h at 37°C to allow repair of the membrane prior surgically re-implantation into the uteri of pseudo-pregnant C57 B6 J females. Chimeric mice were scored by looking at coat color. Chimeras should present streaks of 129-derived agouti hair on the normally black hair of B6 mice (129 Sv Pas X C57 B6 J). Chimeric males obtained were initially crossed with C57 B6 J females. In parallel, they were bred with 129 Sv Pas females in order to get the mutation on a pure genetic background. Offspring was tested for germline transmission of the recombinant alleles, by PCR on DNA isolated from the tail tips. PCR conditions are detailed hereafter. Heterozygous animals L3/+ or L2/+ were intercrossed and, homozygous L3/L3 or L2/L2 animals were identified by PCR screening. For knockout of the SEPN1 gene, L3/L3 homozygous animals were bred with CMV-Cre mice (generous gift of D. Metzger and P. Chambon, IGBMC, Illkirch, France) to get (L3/+, CMV-Cre). Constitutive expression of the Cre-recombinase in these animals led to the complete excision of both exon 4 and Neo cassette (L-). The (L-/+, CMV-Cre) animals were backcrossed to wild type animals to remove the Cre gene. The (L-/+, CMV-Cre⁰) animals were intercrossed to obtain the

homozygous (L-/L-) animals, entirely disrupted for the SEPNI gene. For the conditional knockout, L2/L2 homozygous animals were bred with Actin-Cre (DM 79) or Actin-Cre-ER^{T2} mice (DM97-16) (generous gift of D. Metzger and P. Chambon, IGBMC, Illkirch, France) to obtain (L2/+, Actin-Cre) or (L2/+, Actin-Cre-ER^{T2}) animals. Those were intercrossed to obtain (L2/L2, Actin-Cre) or (L2/L2, Actin-Cre-ER^{T2}) mice. Disruption of the SEPNI gene (L-) occurs specifically in muscles in the (L2/L2, Actin-Cre) line or is temporally induced in muscles by injection of tamoxifen to the (L2/L2, Actin-Cre-ER^{T2}) mice (Schuler et coll., 2005).

PCR analysis

PCR on genomic DNA from ES cells, tail tips or different organs was carried with a set of different primers (Figure 48B and Table 7). Primers MR33 associated to MR32 aimed at verifying the presence of the neomycin cassette and/or exon 4. Primer MR36 associated to MR33 was used to check the presence of the downstream LoxP site. Primers MR32 associated to AL288 served to check the presence of the Neo cassette. Primers TK139 and TK141 were used to verify the presence of the Cre recombinase gene. Small organ pieces, ten days old mice tail tips or ES cells were digested overnight at 60°C in 500 µl digestion mix (100 mM Tris-HCl pH 8.5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.2% SDS; 200 µg/ml Proteinase K (Roche)). Samples were phenol-extracted. RNase A digestion (40 µg/ml) was performed in 500 µl for 30 min at 37°C. After phenol-extraction, phenol traces were removed by a final chloroform extraction. DNA was ethanol-precipitated and pellets were re-suspended in distilled water. DNA concentration was measured by OD_{260 nm} and adjusted to 0.5 µg/µl. Standard 50 µl PCR reaction mixtures contained: 250 ng genomic DNA (25 ng for MR33-MR32 and MR33-MR36 primer pairs), 10 pmol of each primer, 200 µM of each dNTP, 0.5 U of DNAzyme EXT (Finnzymes) in a 1 X DNAzyme EXT buffer containing 1.5 mM MgCl₂. After a 3 min denaturation step at 94°C, 35 cycles were programmed as follows on a Robocycler 96 (Stratagene): 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, 2 min at 72°C. The reaction was terminated by a final elongation step of 5 min at 72°C. PCR with primers TK139 and TK141 were performed in conditions provided by D. Metzger, IGBMC, Illkirch, France. PCR products were loaded onto 1% agarose (w/v) gel, excepted for the PCR products of primer pair MR33-MR36 which were loaded on a 8% native polyacrylamide gel.

Western analysis

Organ or muscle fractions were ground at 4°C into small pieces and homogenized in 2 ml of extraction buffer (0.3M Sucrose; 10 mM Hepes pH 7.2; Protease Inhibitor Cocktail 1 X (Sigma-Aldrich)) using a Polytron PT3000 (Kinematica) for 1 min at 25000 rpm. The homogenate was centrifuged for 5 min at 4°C in a Sigma-202-MK (Bioblock Scientific) at 13000 rpm. Fifteen microliters of the supernatant were fractionated on a 8% SDS-PAGE and proteins were electro-transferred onto an immobilon-PVDF membrane (Millipore). Blots were incubated overnight at 4°C in PBS-T solution (150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20) containing 3% skimmed milk, followed by 2 hrs incubation at room temperature with a 1/2000 dilution of the primary anti-human SePN polyclonal antibodies, Ac168 (Petit et coll., 2003), in PBS-T/milk solution. Blots were washed 3 times for 10 min in PBS-T, incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (BioRad) 1/10000 dilution in PBS-T/milk for 1 hr and then washed 3 times for 10 min in PBS-T and twice for 10 min in PBS. Peroxidase activity was detected with ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences). Sequence conservation between human and mouse SePN was sufficient to allow heterologous detection by Ac168.

Drug injections to the mice

Paraquat (Sigma-Aldrich) was dissolved in 150 mM NaCl and injected intra-peritoneally in mice at doses varying from 10 to 50 mg/kg and according to a defined schedule. Tamoxifen solution was prepared as follows: fifty milligrams of tamoxifen (Sigma-Aldrich) are solubilized in 200 µl ethanol and mixed to 4.8 ml of sterile sunflower seed oil. Homogenate is sonicated 5 times for 1 minute on ice and the 10 mg/ml stock solution obtained can be stored at -20°C. One hundred microliters of the solution are injected intra-peritoneally after sonication to obtain a clear homogenate.

Histological analysis

Hind leg muscles (e.g. tibialis) were dissected in 0.9% NaCl and fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C. Samples were rapidly washed in 0.1 M phosphate buffer pH 7 and next in distilled water. Muscles pieces were then dehydrated by incubation for one night in 70% ethanol, 3 times for 8 hours in 95% ethanol, at least 6 times for 8 hours in 100% ethanol and at least 6 times for 8 hours in 100% butanol. Samples were then impregnated in paraffin

(Histotec without DMSO, Merck) 3 times for 24 hours at 62°C and paraffin was hardened at room temperature. Five micron thick transversal sections were cut with a microtome and deposited on glass slides.

For stainings, all the steps were performed in coloration boxes with 150 ml of the different solutions. Hematoxylin-eosin staining was performed. Slides were heated overnight at 62°C and stained as follows: slides were incubated for 10 min in toluene, 2 min in 100% ethanol, 1 min in 95% ethanol, 5 min in distilled water and 5 min in filtered Harris Hematoxylin solution (Sigma-Aldrich). Slides were rinsed under tap water until water became clear and incubated for 3 min in water containing 5 ammoniac drops, 4 min in distilled water, 5 min in 1% eosin (Sigma-Aldrich), 10 sec in water, 1 min in 100% ethanol and 10 min in toluene. Slides were sealed with Eukitt mounting medium (Calibrated Instruments, Inc.).

For Schiff Periodic Acid staining, slides were heated overnight at 62°C and stained as follows: slides were incubated for 10 min in toluene, 2 min in 100% ethanol, 1 min in 95% ethanol, 5 min in distilled water and 10 min in 0.5% periodic acid. Slides were rinsed for 15 min under tap water and incubated for 15 min in Schiff reactive. Slides were rinsed for 10 min under warm tap water and 10 min under cold tap water. Slides were incubated for 5 min in filtered Harris Hematoxylin solution and rinsed under tap water until water became clear. Slides were rinsed for 10 sec in distilled water, 1 min in 100% ethanol, 10 min in toluene and sealed with Eukitt mounting medium (Calibrated Instruments, Inc.).

Acknowledgements

We are grateful to D. Metzger and P. Chambon for providing us with CMV-, Actin- and Actin-ER^{T2}-Cre mice. We want to thank JM. Garnier for the mouse genomic DNA library and D. Metzger for the pGKneo vector. We want to thank D. Metzger and JM. Bornert for their advises, as well as Y. Huss, A. Dierich and all the people of the Mouse Clinical Institute, Illkirch, France, who were involved in the project. We want to thank C. Loegler and A. Schweigert for technical assistance. A special thank goes to Marion Decossas for her very appreciated skills in tissue embedding and staining. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, Ministère de l'Enseignement, de la Recherche et de la Technologie, Université Louis Pasteur and the Association Française contre les Myopathies.

4.2. Inhibition de l'expression du gène SEPN1 chez le poisson-zèbre

4.2.1. Résumé

Le poisson zèbre (*danio rerio*) possède de nombreuses caractéristiques dont on peut facilement tirer avantage pour étudier le développement des muscles squelettiques. Les embryons de poisson zèbre sont transparents et leur développement est externe, les rendant accessibles à diverses manipulations. De ce fait, ils peuvent constituer un modèle pour différentes maladies musculaires humaines. Dans cet article, le poisson zèbre a été utilisé pour étudier le rôle de la sélénoprotéine N au cours du développement embryonnaire précoce, notamment à des stades qui ne peuvent être étudiés ni chez l'homme, ni chez la souris. L'expression de la sélénoprotéine N a ainsi été inhibée par l'injection d'oligonucléotides antisens modifiés (morpholinos), et le phénotype des poissons a été étudié. Le phénotype des embryons auxquels le morpholino a été injecté présente de nombreuses similitudes avec les patients atteints de maladies musculaires liées à SePN. L'architecture musculaire est très désorganisée et la mobilité des poissons fortement réduite. L'analyse ultrastructurale des myotomes révèle des défauts dans l'organisation sarcomérique du muscle, ainsi que dans l'ancrage des fibres musculaires. Ces études permettent une nouvelle fois de démontrer l'importance du rôle de SePN pour l'organisation des muscles au cours du développement embryonnaire précoce. En outre, les altérations observées au niveau de l'architecture des myofibrilles dans les embryons dépourvus de SePN pourraient fournir de nouveaux indices quant aux mécanismes pathologiques mis en jeu lors de maladies musculaires liées à cette protéine.

4.2.2. « Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo »

Marzanna Deniziak, Christine Thisse, Mathieu Rederstorff, Colette Hindelang, Bernard Thisse et Alain Lescure

2006, Experimental Cell Research, sous presse

LOSS OF SELENOPROTEIN N FUNCTION CAUSES DISRUPTION OF MUSCLE ARCHITECTURE IN THE ZEBRAFISH EMBRYO

**Marzanna Deniziak ^a, Christine Thisse ^b, Mathieu Rederstorff ^a, Colette Hindelang ^b,
Bernard Thisse ^b, Alain Lescure ^{a*}**

*^a Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR “ARN” du CNRS/Université Louis Pasteur,
15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France*

*^b Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université Louis
Pasteur, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, CU de Strasbourg, 67404 Illkirch, France*

* Corresponding author.

Email address: a.lescure@ibmc.u-strasbg.fr

Phone: 33 3 88 41 70 80, Fax: 33 3 88 60 22 18

Abstract

Mutations in the gene coding for selenoprotein N (SelN), a selenium containing protein of unknown function, are the cause for different forms of congenital muscular dystrophy in humans. These muscular diseases are characterized by early onset of hypotonia and predominant affection of axial muscles. We have used the zebrafish as a model system to understand the function of SelN in muscle formation during embryogenesis. Zebrafish SelN is highly homologous to its human counterpart and the amino acids corresponding to the mutated positions in human muscle diseases are conserved in the zebrafish protein. The *sepn1* gene is highly expressed in the somites and notochord during early development. Inhibition of the *sepn1* gene by injection of antisense morpholinos does not alter the fate of the muscular tissue, but causes muscle architecture disorganization and greatly reduced motility. Ultrastructural analysis of the myotomes reveals defects in muscle sarcomeric organization and in myofibers attachment, as well as altered myoseptum integrity. These studies demonstrate the important role of SelN for muscle organization during early development. Moreover, alteration of myofibrils architecture and tendon-like structure in embryo deficient for SelN function provide new insights into the pathological mechanism of SelN-related myopathy.

Keywords: Selenoprotein N; Selenocysteine; Congenital muscular dystrophy; Zebrafish; Muscle; Myoseptum

Introduction

Selenium is an essential trace element. Identification of pathologies due to its dietary restriction or malabsorption pointed to its vital nutrient function, first in livestock and next in humans. Indeed, deficiencies stressed the important role of selenium in prevention of cancer, cardiovascular diseases and viral infections, as well as in thyroid or immune system functions, fertility and aging [1]. In addition, compiling clinical reports demonstrated that selenium deficiencies are the cause for both cardiac and skeletal muscle diseases, defining a new syndrome called nutritional muscular dystrophy (reviewed in [2]). In general, the molecular mechanisms underlying the emergence of these disorders remain elusive. The first indication of the molecular defects causing selenium related muscular diseases was provided by identification of mutations in the *SEPNI* gene encoding a novel selenium containing protein, the selenoprotein N (SelN), in patients presenting different forms of congenital muscular dystrophy (CMD). CMD are a heterogeneous group of inherited neuromuscular disorders, presenting characteristic, sometimes overlapping phenotypes. At present, their classification is based on a combination of clinical descriptions and characterized protein defects [3]. It was shown that mutations in the human *SEPNI* gene are the cause for Rigid Spine Muscular Dystrophy (RSMD1) [4], the “classical form” of Multiminicore Disease (MmD) [5], rare cases of Desmin-Related Myopathy with Mallory Body-like inclusions (MB-DRM) [6] and Congenital Fiber Type Disproportion (CFTD) [7]. These four muscular diseases, now collectively categorized as *SEPNI*-related myopathy, are characterized by an early onset of hypotonia and weakness, with predominant affection of the axial muscles leading to neck weakness, scoliosis, respiratory insufficiency and a variable degree of spinal rigidity.

Unlike the large majority of trace elements, selenium is not coordinated to proteins, but covalently attached in the form of a selenocysteine residue, and co-translationally inserted into the polypeptide chain. This particular amino acid, the 21st of the genetic code, is inserted in response to a reprogrammed UGA triplet located within the open reading frame [8]. Distinction between the UGA selenocysteine and termination codon requires a dedicated translation machinery and the Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS), a cis-acting RNA structure located in the 3' untranslated region of the messenger RNA [9]. Twenty-seven different selenoproteins were identified in higher eukaryotes, though the function of many of them remains unknown [10]; reviewed in [11]. Regarding selenoproteins of known function, most of them are oxidation-reduction enzymes; the selenocysteine residue located in their catalytic site confers higher enzymatic reactivity [12].

SelN was the first human selenoprotein known to be involved in an inherited disorder. Yet, no molecular or cellular function was attributed to this protein. It was shown that SelN is a 65 kDa transmembrane glycoprotein associated to the endoplasmic reticulum [13]. Analysis of its expression pattern in adults revealed that SelN is ubiquitously expressed in all tissues examined [13, 14], an observation difficult to reconcile with the muscle specific phenotype linked to mutations in the gene. However, its expression level was much higher in fetal than adult tissues, and cellular studies showed that the high SelN expression found in proliferating fibroblasts decreases progressively during the differentiation steps of myogenesis [13]. Moreover, studies in zebrafish embryo demonstrated that SelN is expressed during early development within the muscle forming structures [15]. Collectively, these observations suggest an early developmental function of SelN, consistent with the early onset of the muscular disease observed in infants carrying mutations in the *SEPNI* gene.

Zebrafish provides a readily accessible model for human muscle disease [16]. Muscle speciation and differentiation follow a well-characterized time course and allow detailed analysis [17]. Here, we made use of the zebrafish model system to address the role of SelN during early development, at stages which cannot be investigated in human. Expression of the *sepn1* gene was impaired by injection of antisense morpholinos - MOs (modified oligonucleotides), and the resulting phenotype was analyzed. Injected embryos reproduced most of the phenotypic features observed in the patients with *SEPNI*-related myopathies, therefore morpholino inactivation of SelN in zebrafish appeared to be a well suited model for this muscular disease. We showed that SelN inhibition causes defects in the correct organization and attachment of myofibrils, and in the integrity of the myoseptum, a structure related to the human myotendinous junction. Our results demonstrate the important role of SelN for muscle development and maintenance, and provide an initial model for the possible pathological mechanism of *SEPNI*-related myopathy.

Materials and methods

Fish strains and maintenance

The wild-type strain used in this study is a cross between *AB and Tüb. Zebrafish were raised at 28.5 °C on a 14/10 hour light/dark cycle [18]. Embryos were collected from our breeding colony according to standard procedures and staged in hours or days post fertilization (hpf or dpf).

sepn1 cDNA cloning

The complete cDNA sequence of SelN was reconstructed *in silico* by alignment of contiguous EST and genomic fragments, identified by homology of the translated sequences to

the human SelN amino acid sequence (EST AI544993). The following primers were designed to amplify partial cDNA clones: 5'sepn-forward 5'-GCCGCTACGATGTAACGGCTCACT-3'; 5'sepn-reverse 5'-GATGACAGGAATAGCAGCAATGATGAA-3'; 3' sepn-forward 5'-ATGAAGGGCCAGGTCTTAGTTTCTCAGCAGGTTTT-3'; 3' sepn-reverse 5'-CTAACTGACCATTCTGCATCTCCTCCCTCTGACAA-3'. The three DNA fragments were ligated together using the unique NotI and BamHI sites within the coding sequence.

Morpholino injections

Antisense morpholino oligonucleotides (GeneTools, LLC) were complementary to the region of the start of translation (MOsepn1: 5'-UAAAGUAUGGCCGCAGACGUGGAUA-3' and MOsepn2: 5'-GCCCAGUCGUGAUUUACAAAGACAU-3'), first exon-intron splice donor (MOsepn3: 5'-GAAACGACACGUAAGUUCACAAUUCGCU-3') or splice acceptor site (MOsepn4: 5'-TTCAGTCCTGCCTCCTACAATAGAG-3'). Control morpholino sequence was derived from MOsepn1 and contained 5 base mismatches (MOsepnC: 5'-TATgCagGTCTaCGGCgATAgTTTA-3'). MOs were injected into the yolk of one- to four-cell stage embryos, which were then cultured at 28.5°C in Danieau 0.3x supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140-122). Embryos were injected with MOs at following concentrations: MOsepn1: 250 µM and 500 µM; MOsepn2, MOsepn3 and MOsepn4: 250 µM, 500 µM, 750 µM and 1000 µM; MOsepnC was injected at 1000 µM. Morpholinos were resuspended in 1x Danieau (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES; pH7.6) with phenol red as an injection indicator. Injections were performed with FemtoJet Microinjection system (Eppendorf).

Whole-mount in situ hybridization

Antisense probe synthesis and *in situ* hybridizations were conducted as described [19]. The following markers were used to probe the patterning of MOsepnl injected embryos at 24 hpf: *notail*, labelling notochord and tail bud [20, 21, 22]; *spadetail*, specific of paraxial mesoderm and tail bud [22, 23]; *fgf8*, expressed in telencephalon, dorsal diencephalon, midbrain hindbrain boundary and tail bud [22]; *pax2.1*, expressed in optic stalks, midbrain hindbrain boundary, hindbrain, spinal chord neurons and pronephric ducts [22, 24]; *myogenin*, specific of the developing somites and skeletal muscles [22]; *CB306*, novel zinc finger protein - specific of telencephalon and pronephric ducts [22]; *neurogenin*, specific of neurons [22]; *draculin*, specific of hematopoietic cells [22, 25]. Detailed expression and data for synthesis of antisense probes are available in <http://zfin.org/> in gene expression section.

RT-PCR

The expression of *sepnl* gene in SelN morphants versus wild type was assessed in RT-PCR reaction performed on total RNA samples isolated from 24 hpf embryos (n = 30). Total RNA was obtained using the MELT™ Total RNA Isolation System (Ambion) according to the manufacturer instruction. Reverse transcription was performed using 200 u of RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 2 µg of each total RNA matrix and 20 pmoles of AL 299 reverse primer hybridizing in the 3' region of SelN coding sequence (5'-GAGAGCTCTTGACAGAGG-3'). Reaction was conducted at 45°C during 60 min, in 20 µl reaction mix containing 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM DTT, 1 mM dNTPs mix and 20 u RNasin (Promega). For each RNA sample a “- RT control” (reaction without reverse transcriptase) was performed. Reverse transcribed cDNAs (5 µl) were then amplified in 50 µl PCR reaction containing 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM

MgCl₂, 0.1% Triton X100, 0.2 mg/ml BSA, 200 µM each dNTP, 20 pmoles of each primer and 1 u Taq Polymerase (Qbiogene). PCR was led in following conditions: one cycle of denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 45 sec, 65°C for 1 min and 72°C for 2 min; amplification was terminated by one cycle of 10 min elongation at 72°C. The following oligonucleotides were used in PCR reaction: sepn-ex1, hybridizing to the 3' region of exon 1 (5'-GGGACTCCATCCAGCAGACG6-3'), sepn-ex3, a reverse primer complementary to exon 3 (5'-TGCAGGGTCAGCGTCTCTCC-3'). Amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel.

Preparation of polyclonal antibodies specific of zebrafish SelN

A 1045 bp DNA fragment, coding for amino acids E92 to C430 of zebrafish SelN, was obtained by EcoRI – XhoI digestion and cloned into the pQE-TriSystem Vector (Qiagen). The C-ter 8xHis-tagged SelN protein was overexpressed in the TG1 *E. coli* strain and purified under denaturing conditions, according to the manufacturer instruction. The recombinant protein was injected to mice and presence of SelN specific antibodies in the sera was assayed by Elisa test and Western Blot immunodetection.

Western Blot immunodetection

Total zebrafish protein extract was prepared according to The Zebrafish Book protocol (http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt9/9.2.html) with the following modifications. Deyolked embryos (n=100) were homogenized on ice in 200 µl of extraction buffer (200 mM NaCl, 1,25 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) supplemented with protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma P2714). Samples were then centrifuged at 13 000 rpm, 4°C for 30 minutes. The concentration of protein in recovered supernatant was assessed by

Bradford method (Bio-Rad Protein Assay). Twenty μg of protein extract was separated on a 10% SDS-PAGE. Proteins were subsequently electrotransferred onto PVDF transfer membrane (Immobilon-P, pore size 0.45 μm , Millipore) in transfer buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine and 20% ethanol. Blots were incubated overnight at 4°C in PBS-T solution (150 mM NaCl, 25 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM KH_2PO_4 , 0.1% Tween 20) containing 3% (wt/vol) of skimmed milk, followed by 1.5 h of incubation at room temperature with a 1/2 000 dilution of the primary anti-SelN or anti-AspRS (control) polyclonal antibodies in PBS-T/milk solution. Blots were washed 3x for 10 min in PBS-T, incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1/10 000 dilution in PBS-T/milk) for 1 h and then washed 3x for 10 min in PBS-T and 2x 10 min in PBS. Peroxidase activity was detected with ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) on X-ray film, exposed for 15 sec to 5 min. Signals were quantified by scanning of the films and tiff files analysis using QuantityOne software (BioRad). Data were standardized relative to the expression of the housekeeping protein AspRS.

Whole-mount antibody immunofluorescence

This method was used to study the distribution of several zebrafish proteins localized at the transverse myosepta. We used rabbit anti-laminin (Sigma, L-9393, 1:200), anti-fibronectin (Sigma, F-3648, 1:200) and mouse anti-dystroglycan antibodies (Novocastra, NCL-b-DG, 1:50). Embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 hours at room temperature, then dehydrated in 100% methanol and stored at -20°C. They were brought into PBST (PBS, 0.1% Tween 20) by progressively decreasing the percentage of methanol. They were rinsed in PBDT (1% BSA, 1% DMSO, 0.1% Triton X-100 in PBS) and then blocked in PBDT with 5% BSA at room temperature for 2 hours. After overnight incubation with primary

antibodies at 4°C, they were washed several times in PBDT and incubated during 2 hours with secondary antibodies (goat anti-mouse Alexa-488, Invitrogen, 1:250 or goat anti-rabbit CY3, Jackson ImmunoResearch, 1:500) at room temperature. Stained embryos were washed in PBDT, mounted in glycerol and visualized using a Leica M420 fluorescent macroscope and a coolsnap digital camera.

Evans Blue Dye (EBD) labeling

Evans Blue Dye (Fluka) injections were performed as previously described [26], with the following modifications. Anaesthetized embryos at 3 and 4 dpf were injected with a 1 mg ml⁻¹ EBD solution, and visualized by fluorescence 4-6 hours later.

Semi-thin sections

Semi thin sections of trunk muscles were obtained from 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 6 dpf or 9 dpf embryos. They were fixed in a solution containing 4% paraformaldehyde and 3% glutaraldehyde in phosphate buffer for O/N at 4°C and stained with 0.5% toluidine blue in 5% sodium tetraborate, prior to analysis.

Electron microscopy

Zebrafish embryos used for ultrastructure analysis were fixed as described above and post fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. After dehydration in ethanol, samples were embedded in Araldite-Epon mixture. Ultrathin sections (40-50nm) of muscle tissue were stained with 5% uranyl acetate, followed by lead citrate, and examined with use of CM12 transmission electron microscope (Philips).

Results

*Genomic organization and expression of the zebrafish *sepn1**

The cDNA and gene coding for the zebrafish homolog of human SelN were identified. The complete cDNA sequence was recovered from contiguous EST and cDNA sequences, and the *sepn1* gene structure was determined through *Danio rerio* genome searches, using the Ensembl and GoldenPath browsers. The gene is located on chromosome 17. The 1673 bp coding sequence consists of 12 exons, with an in-frame UGA selenocysteine codon located in exon 9 (Fig. 1A). This genomic organization is highly conserved among vertebrates. In *H. sapiens*, two isoforms of the *sepn1* cDNA are transcribed, but only the major form, lacking the Alu-like pseudoexon 3, was proven to be translated into a protein [13]. The structure of the zebrafish *sepn1* gene is colinear to the active isoform of its human counterpart. The SECIS element, allowing translation of the in frame UGA codon into selenocysteine, was identified within the 3'UTR of zebrafish SelN mRNA. It harbors all the conserved features of a classical type II SECIS structure (Fig. 1B) [27-29], but it is one of the rare variants containing a G 5' of the quartet of non-Watson-Crick base pairs ([30]; reviewed in [29]).

The zebrafish *sepn1* gene encodes a 557 aa protein, highly conserved from fish to man, with 65% identity and 76% amino acid sequence similarity between the two proteins (see Supplementary Material, SM1). Most of the amino acid changes are located in the N-terminal part which corresponds to a transmembrane domain [13]. The selenocysteine residue, which is a hallmark of the putative catalytic site, is part of a 31 amino acid block entirely conserved between human and fish. Sixteen mutations in the human *SEPNI* gene causing congenital muscular

dystrophies, have been reported to date (reviewed in [2]). Interestingly enough, all of these occurring within the coding sequence affect residues that are conserved in both human and zebrafish.

Previous analysis of the *sepn1* gene expression pattern in zebrafish embryo showed abundant transcription during early stages of development [15]. During somitogenesis, *sepn1* is expressed in somites and notochord, which are the precursors of skeletal muscles and vertebrae, respectively (Fig. 1C). Expression is also detected within the ventral mesoderm, the polster and the tail bud. Twenty-four hours post fertilization, the *sepn1* gene was predominantly expressed in caudal somites, whereas it has rapidly disappeared from differentiated myotomes (Fig. 1C). At later stages, *sepn1* was found to be widely expressed in the brain, branchial arches and pectoral fins [15].

sepn1 knockdown induces morphological changes in the tail and somites

SelN function was investigated by a morpholino knock-down strategy [31]. In order to disrupt SelN translation, we designed two non-overlapping morpholinos: one complementary to the region of the translation start site (MOsepn1) and a second one hybridizing 17 nt upstream of the initiator AUG codon (MOsepn2) (Fig. 1A). In addition, two morpholinos targeting splicing of the first intron were used: MOsepn3 hybridizing to the splice donor sequence of the first exon-intron junction and MOsepn4 designed against the intron 1–exon 2 splice acceptor site (Fig. 1A). To rule out possible unspecific morpholino effects, we performed parallel injections with control MO designed on the basis of a degenerated MOsepn1 nucleotide sequence (MOsepnC). Following injection of the different MOs at the one- to four-cell stage, embryos were analyzed morphologically until 9 days post fertilization (dpf). Consistent defects were observed with all

four MOs, although they were more severe with MOsepn1 and MOsepn4. In addition, the severity of the defects correlated with the concentration of MO injected (Table 1). At 24 hpf, morpholino injected embryos displayed mild defects and showed delayed development compared to wild type or to control MO injected embryos (not shown). At 48 hpf, SelN morphants exhibited morphological alterations characterized by curved tail (Fig. 2A-C). In addition, injection of high doses of MOsepn1 or MOsepn4 led to embryos displaying cardiac edema and a slowing of the blood flow. In the trunk, the somites appeared U shaped or blocky instead of chevron shaped (Fig. 2D-I). The integrity of the myotomes was affected as well in a dose dependent manner. Myotome boundaries in the morphants were not clearly delimited (Fig. 2H). Most of the affected embryos displayed muscular lesions observed as cell free areas (Fig. 2F, I). The majority of SelN morphants responded to touch, but they were less motile and moved in an uncoordinated fashion, compared to the controls. However, the most affected embryos often exhibited no escape response. By 4 dpf, morphant larvae lacked swim bladders.

Embryos injected with the morpholinos targeting the splice site donor (MOsepn3) or hybridizing upstream to the translation start site (MOsepn2) were less severely affected (not shown). Sepn3 morphants exhibited wild type-like morphology up to 6 dpf. They further developed defects comparable to other morphants, e.g. muscle alterations. All injected embryos died within the first two weeks of development. Considering the loss of potency and dilution of morpholino oligonucleotides with time, we believe that the later phenotypic disturbances observed at 9 dpf are likely due to the early reduction of SelN, at the stages when the gene is highly and specifically expressed. Interestingly, the morphological changes observed in the MOsepn injected embryos are reminiscent to the phenotypes reported for morpholino knockdown of other muscle function related genes such as *dystrophin*, *periostin*, *caveolin-3* and *dystroglycan* [26, 32-35].

Efficient inhibition of SelN translation in morpholino injected embryos

Because SelN is a rare intraluminal protein of the endoplasmic reticulum, it could not be detected by immunochemistry either in human cell culture or whole zebrafish embryos, using presently available specific antibodies. Therefore, SelN inhibition in MO-injected embryos was analyzed by RT-PCR (Fig. 3A) or Western Blot immunodetection (Fig. 3B, C). RT-PCR analysis of total RNA obtained from wild type embryos produced a specific band of 318 bp (Fig. 3A) and sequencing confirmed that this amplification product corresponded to the correctly spliced SelN mRNA. Similar analysis using total RNA from embryos injected with MOsep4 directed against splice-site, displayed a dose-dependent disappearance of the wild-type band and a concomitant increased amplification of two other bands (Fig. 3A), suggesting the use of alternate cryptic splice-sites and resulting in aberrant translation products. Similar results were obtained with MOsep3 injected embryos (not shown).

To complete our expression analysis of the translation inhibition promoted by MOsep1, we analyzed SelN protein levels in 24 hpf embryos. Protein extracts prepared from non-injected and morpholino injected embryos were analyzed by immunodetection using polyclonal antibodies directed against the zebrafish SelN. Two bands were detected (Fig. 3B), the upper one being of the expected size for SelN, the lower one likely representing a cleavage product. The aspartyl-tRNA synthetase (AspRS), a housekeeping protein, was used as an internal control (Fig. 3B, lower panel). Total SelN expression was impaired in all injected embryos. To clarify the origin of the degradation, wild type embryos from different early stages were tested. SelN clearly accumulated from early somitogenesis to 48 hpf, together with accumulation of the degradation

product (Fig. 3C). Whether this problem was due to protein extraction conditions or endogenous proteolysis was not further investigated.

*Knockdown of *sepn1* disrupts muscle architecture*

To analyze the consequence of SelN inactivation on zebrafish morphogenesis, whole-mount *in situ* hybridization was performed at 24 hpf on MO-seln embryos using tissue-specific markers (see Materials and methods). This analysis did not reveal any general patterning defects in MOsepn1 injected embryos (not shown). The main alterations in morphant embryos were observed at the level of the myotomes architecture. We therefore further investigated this alteration by the use of different markers specific of slow or fast muscles fibers: *zgc:86932*, a novel Troponin-C slow muscle fiber isoform and the myosin heavy chain, fast skeletal muscle respectively, as well as the expression of a marker delineating the myoseptum and whose transcripts accumulate at the extremity of muscle fibers (*CB1045*) [22]. At 24 hpf, the expression pattern of these markers was not significantly modified and the metameric structure of the somites was preserved (see Supplementary Material, SM2), suggesting that slow and fast muscle cells specification was not impaired. Examination of transversal sections of the trunk showed correct localization of the slow and fast muscle fibers in the morphants (not shown). Later at 5 dpf, MOsepn1 injected embryos displayed irregular and discontinuous myosepta that were locally interrupted with striated myofibers extending over two adjacent somites (Fig. 4).

The components of dystrophin-glycoprotein complex (DGC), which are mutated in different forms of congenital muscular dystrophy, localize at the transverse myosepta. The disruptions in the myotome boundary and the phenotypical resemblance between *sepn* morphants and DGC mutants, prompted us to examine the consequence of SelN depletion on the distribution

of some DGC proteins. At 24 hpf, immunodetection of β -dystroglycan, expressed at the extremities of muscle fibers, or laminin and fibronectin – two glycoproteins of the extracellular matrix – showed that, despite of the somite shape alteration, all these proteins still localize to the somite boundaries (see Supplementary Material, SM3).

Further morphological and histological examination of the myotomes of MOs injected embryos at 24 hpf revealed that not only their chevron shape was altered but morphant muscle fibers were disorganized compared to wild-type. Longitudinal sections depicted a high number of round-shape, centrally located nuclei and alteration of segmental organization of the sarcomeres within the morphant fibers, suggesting retarded muscle formation (Fig. 5B). Enlarged intercellular spaces can be detected, together with a clear contracture at the myoseptum level. Disorganization of the myotome became even more evident by 72 hpf (Fig. 5C, D). Instead of being regular and homogeneous, the muscle fibers of MOsepnl injected embryos appeared irregular, twisted, with several nuclei remaining centrally located. At 6 days of development, toluidine blue staining detected short interlacing muscle fibers, while in wild-type they extend the entire length of the somite (Fig. 6A, B). At 9 dpf, severe disorganizations of the muscle structure occurred. The somites were constituted of detached fibers with numerous free intercellular spaces (Fig. 6E, F).

Muscle tissue of SelN deficient embryos displays disorganization of the sarcomere and myofiber attachment defects

In order to understand the cellular mechanisms underlying the muscular lesions, we examined the ultrastructural changes produced by *sepnl* knockdown in fully differentiated muscles using electron microscopy. Six days post-fertilization, myofibrils from wild type control

formed regular sarcomeric banding with triad junctions, characteristic of mature muscles (Figs 7A, 8A). In contrast, MOsepnl injected embryos displayed various degrees of disorganization of the fibers structure, increasing in a morpholino dose-dependent manner (Fig. 7B, C). 250 μ M MOsepnl led to muscles showing a mosaic of myofibrils, composed of well organized wild-type fibers directly adjacent to collapsed or disorganized sarcomeres (Fig. 7B, D). Disorganized regions showed discontinuous banding (Fig. 7C, F) interspaced with proliferating membranes of the sarcomeric reticulum and granular material (Fig. 8B). Collapsed sarcomeres are likely to correspond to retractions of the contractile network, consequent to mechanical injury of the muscle fiber, and resulting from either separation of the terminal sarcomeres from the fiber membrane or tearing and detachment of the sarcolemma from the myoseptum [26, 36]. Light microscopy inspection of SelN morphant muscles did not show terminal ends of retracted fibers detached from the myoseptum as described for zebrafish dystrophin knockdown [26]. More general myofilament disorganization was observed in embryos injected with 500 μ M MOsepnl. The sarcomeric banding was disrupted and triad junctions were absent, especially in the terminal zones of the myofibers, at the myotome boundaries, leaving partially or totally disorganized filaments (Fig. 7C, F). Integrity of the sarcolemma was investigated by injection of Evans Blue Dye in the pericardiac sinus of wild type and morphant embryos at 3 and 4 dpf. This intravital stain of myofiber permeability accumulates within cells with compromised plasma membrane. Therefore, it is particularly useful in the identification of the onset of muscle damage [37]. Only a very limited number of cells appeared to be EBD-labeled in SelN-deficient embryos, suggesting that the integrity of the membrane was generally preserved, despite the clear disorganization of the muscular tissue (Supplementary Material, SM4).

Another consistent feature observed in the myotome boundary region was the discontinuous structure of the myosepta in SelN-deficient embryos (Fig. 7D-F). The myoseptum

is a connective tissue layer involved in contractility transmission and movement [38, 39]. In control embryos, it forms a dense continuous line containing endoplasmic reticulum membranes, and to which the sarcomeres are regularly connected (Fig. 7A). In morpholino injected embryos, it appeared locally torn apart, leaving empty spaces containing residual membranes (Fig. 7D), or as a disrupted irregular structure with concentric coiled membranes (Fig. 7E). From place to place, myofilaments passed through resulting gap spaces entering the neighboring myotome (Fig. 7F). At 9 dpf, embryos injected with the anti splice-site morpholino displayed clearly detached myofibrils in opposition to the densely packed ones in the wild-type zebrafish myotome (Fig. 8C, D). The mitochondria were found alongside of the myofibers, being shifted towards the extracellular spaces (Fig. 8D). The mitochondria structure seemed affected as well, presenting dilated inner membranes. We also noticed an increased number of mitochondria located at the extremity of the fibers as a characteristic feature of morpholino injected embryo muscle at early stages (data not shown).

Altogether, these observations demonstrate the strong effect of the inhibition of SelN function on the structural organization of zebrafish muscles and suggest cell–myoseptum anchoring and cell to cell attachment defects.

Discussion

This study reports for the first time that inhibition of the synthesis of selenoprotein N, a protein of unknown function, causes muscular disorders in zebrafish. A morpholino approach allowed us to follow the consequences of SelN disruption at early steps of vertebrate embryogenesis, under conditions relative to these originating *SEPNI*-related congenital muscular dystrophy in human. First, we demonstrated by two different ways, that morpholino injection

specifically inhibits SelN expression. Second, we examined the impact of SelN deficiency on muscle structure and development. We showed that *sepn1* knockdown does not affect muscle specification, but rather leads to the disruption of the muscular architecture, in agreement with clinical observations made on patients with mutated *SEPN1* gene. Other tissues were affected as well, like the heart, but muscles disorganization cannot be considered as a secondary defect since disruption of hemoglobin oxygen transport has been shown not to affect oxygen-dependent physiological processes in developing zebrafish embryos. Indeed, there is compelling evidence that oxygen and nutrients supply is maintained by diffusion rather than blood convection [40, 41]. Finally, we provided a description of the structural and ultrastructural changes occurring in the myotome of SelN-deficient embryos. Combination of electron microscopy and Evans Blue staining suggests that the connection of the cytoskeleton to the extracellular matrix is impaired, without disruption of sarcolemma integrity. Our results provide *in vivo* evidence for SelN requirement for the correct organization and attachment of the myofibrils, as well as for the continuity and integrity of the connective tissue that forms the myoseptum.

A growing number of reports made use of the zebrafish model to functionally characterize proteins related to human myopathy syndromes [16, 42]. Interestingly, many morphological and ultrastructural alterations consecutive to the disruption of their genes overlap with our observations on SelN morphants. Zebrafish mutants or morphants deficient in proteins of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC), like dystrophin and dystroglycan, displayed similar curved body, blocky somites and low motor activity [26, 32, 33]. These proteins are part of a membrane protein complex of the sarcolemma, accumulating at the level of the transverse myoseptum and involved in the connection of the actin cytoskeleton to the extracellular matrix [32, 33, 43]. At the molecular level, it was demonstrated that the *sapje* mutation of the dystrophin gene led to the failure of the embryonic myofibrils end attachment. This in turn caused the

collapse of the contractile intracellular apparatus, preceding progressive muscle degeneration [26]. Loss of muscle integrity and sarcomeric disorganization, followed by necrosis, was also observed in dystrophic zebrafish morphants with disrupted dystroglycan [32]. Periostin is another structural protein expressed at the surface of the myoseptum. Downregulation of periostin in zebrafish, resulted in alteration of somites segmentation, delay of myofibrils differentiation and disruption of the muscle fibers adhesion to the myoseptum [34]. More recently, studies demonstrated a crucial role of the muscle specific caveolar protein, caveolin3 (Cav3) in muscle development. In mature muscle fibers, Cav3 is predominantly located at the sarcolemma and interacts with the DGC [44]. Cav3 inhibition by morpholino injection induced an important reduction in embryos movement and blocky somites. Moreover, the developing muscles presented disorganized fibrils and large intercellular spaces, due to reduced myoblast fusions [35].

These related phenotypic and ultrastructural changes occurring in dystrophic zebrafish brought us to raise the question as to the possible connection between selenoprotein N and other proteins crucial for the structure and functioning of the contractile apparatus. This relationship is not obvious to establish since the molecular function of SelN is unknown. In summary, all the proteins cited above are part of a protein network which participates in the connection of the actin cytoskeleton to the extracellular matrix. Therefore, these proteins are important for the anchoring of adjacent myofibrils and muscle attachment to the transverse myoseptum. In our study, we demonstrated, that localization of some of these proteins was not perturbed in SelN morphants suggesting that the DGC complex localization is not disrupted. Other factors play an important role in the assembly and connection of the actin cytoskeleton, as mutations in their genes cause CMD. These proteins, like POMT1 or POMGnT1, are enzymes of the endoplasmic reticulum involved in post-translational modifications of DGC components (reviewed in [3]). They catalyze

O-glycosylations that are essential for the interactions and cohesion of the proteins constituting the connective network. With regard to its localization in the endoplasmic reticulum, SelN might be involved in a similar process, modifying proteins during their transition through the ER to the sarcolemma or their secretion to the extracellular matrix [2]. Nevertheless, defect in the modification of these structural proteins will not necessarily affect their expression or localization profile, even if their physico-chemical properties or catalytic activities are lost.

Another significant defect pointed out by the zebrafish model for SelN-related myopathy concerns the myoseptum. The myoseptum of fish is a connective tissue layer forming a dense area of extracellular matrix between metameric somites of the trunk [34, 45-47]. It is a tendon like structure involved in the transfer of the force generated to bones and adjacent muscles. Therefore, the myoseptum is essential to muscle attachment and movement of the vertebrate body [38, 39]. Myotome boundaries formation has been studied in detail [48, 49] and is defined by three steps: epithelial somite boundary formation, slow and fast twitch muscle fiber elongation and migration, and maturation of the myotome boundary by accumulation of the extracellular matrix proteins. Because slow and fast muscle territories were not altered and myoseptum disruptions were observed at 4 dpf, we made the assumption that later steps of myoseptum formation are more likely to be impaired by SelN depletion. Fish myoseptum organization and function is similar to those of the mammalian muscle myotendinous junctions (MTJs) [50]. Myoseptum alteration in *sepn1* knockdown zebrafish is reminiscent of the MTJ defects observed in dystrophic mouse models bearing severe mutations in the components of the DGC, notably the laminin- α 2 (*dy*), dystroglycan and *mdx*/utrophin double mutants (reviewed in [51]). To our knowledge, there is no published evidence for MTJ defects in biopsies from patients presenting *SEPN1*-related myopathy, but one can argue that muscle biopsy samples are generally taken from muscles at a distance from the tendon (see also [51]). In addition, the MTJ structure of distal

muscles is likely to differ from axial muscles of the trunk. This observation might provide initial hints as to why central muscles are predominantly affected in patients presenting *SEPNI*-related myopathy.

In conclusion, our analysis conducted on SelN-deficient zebrafish embryos stresses the importance of SelN for muscle integrity and maintenance, and provides novel information concerning a possible pathological mechanism underlying the onset of the disease.

Acknowledgements

We are grateful to Yannick Schwab and Danièle Spehner for electron microscopy expertise. We would like to thank Valérie Allamand, Ana Ferreira, Pascale Guicheney and Michel Fardeau for fruitful discussion. Alain Krol is acknowledged for providing lab space and financial support. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Association Française contre les Myopathies and by the European Community (ZF-MODEL). M.D. is supported by a post-doctoral fellowship provided by the Association Française contre les Myopathies (AFM).

References

1. Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-41.
2. Rederstorff, M., Krol, A., and Lescure, A. (2006). Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci* **63**, 52-9.
3. Jimenez-Mallebrera, C., Brown, S. C., Sewry, C. A., and Muntoni, F. (2005). Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* **62**, 809-23.
4. Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., Brockington, M., Roy, S. Q., Merlini, L., Romero, N., Estournet, B., Desguerre, I., Chaigne, D., Muntoni, F., Topaloglu, H., and Guicheney, P. (2001). Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* **29**, 17-8.
5. Ferreira, A., Quijano-Roy, S., Pichereau, C., Moghadaszadeh, B., Goemans, N., Bonnemann, C., Jungbluth, H., Straub, V., Villanova, M., Leroy, J. P., Romero, N. B., Martin, J. J., Muntoni, F., Voit, T., Estournet, B., Richard, P., Fardeau, M., and Guicheney, P. (2002). Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimimic disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* **71**, 739-49.
6. Ferreira, A., Ceuterick-de Groote, C., Marks, J. J., Goemans, N., Schreiber, G., Hanefeld, F., Fardeau, M., Martin, J. J., Goebel, H. H., Richard, P., Guicheney, P., and Bonnemann, C. G. (2004). Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* **55**, 676-86.
7. Clarke, N. F., Kidson, W., Quijano-Roy, S., Estournet, B., Ferreira, A., Guicheney, P., Manson, J. I., Kornberg, A. J., Shield, L. K., and North, K. N. (2006). SEPN1: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol* **59**, 546-52.
8. Lescure, A., Fagegaltier, D., Carbon, P., and Krol, A. (2002). Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr Protein Pept Sci* **3**, 143-51.
9. Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* **22**, 3565-76.
10. Castellano, S., Lobanov, A. V., Chapple, C., Novoselov, S. V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V. N., and Guigo, R. (2005). Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16188-93.
11. Driscoll, D. M., and Chavatte, L. (2004). Finding needles in a haystack. In silico identification of eukaryotic selenoprotein genes. *EMBO Rep* **5**, 140-1.
12. Johansson, L., Gafvelin, G., and Arner, E. S. (2005). Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta*.
13. Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U. M., and Guicheney, P. (2003). Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* **12**, 1045-53.
14. Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol, A. (1999). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* **274**, 38147-54.
15. Thisse, C., Degraeve, A., Kryukov, G. V., Gladyshev, V. N., Obrecht-Pflumio, S., Krol, A., Thisse, B., and Lescure, A. (2003). Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns* **3**, 525-32.
16. Bassett, D. I., and Currie, P. D. (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R265-70.

17. Devoto, S. H., Melancon, E., Eisen, J. S., and Westerfield, M. (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* **122**, 3371-80.
18. Westerfield, M. (1993). The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*).
19. Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J. P., and Thisse, C. (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol* **77**, 505-19.
20. Halpern, M. E., Ho, R. K., Walker, C., and Kimmel, C. B. (1993). Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation. *Cell* **75**, 99-111.
21. Schulte-Merker, S., van Eeden, F. J., Halpern, M. E., Kimmel, C. B., and Nusslein-Volhard, C. (1994). no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development* **120**, 1009-15.
22. Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X. Q., and Thisse, C. (2001). Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. <http://zfin.org>. *Gene expression section*.
23. Griffin, K. J., Amacher, S. L., Kimmel, C. B., and Kimelman, D. (1998). Molecular identification of spadetail: regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development* **125**, 3379-88.
24. Lun, K., and Brand, M. (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **125**, 3049-62.
25. Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* **126**, 3735-45.
26. Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G., and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851-60.
27. Grundner-Culemann, E., Martin, G. W., 3rd, Harney, J. W., and Berry, M. J. (1999). Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Rna* **5**, 625-35.
28. Fagegaltier, D., Lescure, A., Walczak, R., Carbon, P., and Krol, A. (2000). Structural analysis of new local features in SECIS RNA hairpins. *Nucleic Acids Res* **28**, 2679-89.
29. Krol, A. (2002). Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. *Biochimie* **84**, 765-74.
30. Lambert, A., Lescure, A., and Gautheret, D. (2002). A survey of metazoan selenocysteine insertion sequences. *Biochimie* **84**, 953-9.
31. Nasevicius, A., and Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-20.
32. Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M., and Stemple, D. L. (2002). Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* **129**, 3505-12.
33. Guyon, J. R., Mosley, A. N., Zhou, Y., O'Brien, K. F., Sheng, X., Chiang, K., Davidson, A. J., Volinski, J. M., Zon, L. I., and Kunkel, L. M. (2003). The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* **12**, 601-15.

34. Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K., and Kudo, A. (2004). Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* **267**, 473-87.
35. Nixon, S. J., Wegner, J., Ferguson, C., Mery, P. F., Hancock, J. F., Currie, P. D., Key, B., Westerfield, M., and Parton, R. G. (2005). Zebrafish as a model for caveolin-associated muscle disease; caveolin-3 is required for myofibril organization and muscle cell patterning. *Hum Mol Genet* **14**, 1727-43.
36. Tidball, J. G., and Chan, M. (1989). Adhesive strength of single muscle cells to basement membrane at myotendinous junctions. *J Appl Physiol* **67**, 1063-9.
37. Hamer, P. W., McGeachie, J. M., Davies, M. J., and Grounds, M. D. (2002). Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat* **200**, 69-79.
38. Gemballa, S., and Vogel, F. (2002). Spatial arrangement of white muscle fibers and myoseptal tendons in fishes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 1013-37.
39. Long, J. H., Adcock, B., and Root, R. G. (2002). Force transmission via axial tendons in undulating fish: a dynamic analysis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 911-29.
40. Pelster, B., and Burggren, W. W. (1996). Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*). *Circ Res* **79**, 358-62.
41. Burggren, W. W. (2004). What is the purpose of the embryonic heart beat? Or how facts can ultimately prevail over physiological dogma. *Physiol Biochem Zool* **77**, 333-45.
42. Collins, C. A., and Morgan, J. E. (2003). Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* **84**, 165-72.
43. Chambers, S. P., Dodd, A., Overall, R., Sirey, T., Lam, L. T., Morris, G. E., and Love, D. R. (2001). Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 478-83.
44. Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S., and Lisanti, M. P. (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* **271**, 15160-5.
45. Dubois, G. M., Haftek, Z., Crozet, C., Garrone, R., and Le Guellec, D. (2002). Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene* **294**, 55-65.
46. Parsons, M. J., Pollard, S. M., Saude, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E. M., and Stemple, D. L. (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* **129**, 3137-46.
47. Weber, P., Montag, D., Schachner, M., and Bernhardt, R. R. (1998). Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol* **35**, 1-16.
48. Henry, C. A., McNulty, I. M., Durst, W. A., Munchel, S. E., and Amacher, S. L. (2005). Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev Biol* **287**, 346-60.
49. Koshida, S., Kishimoto, Y., Ustumi, H., Shimizu, T., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Integrin alpha5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell* **8**, 587-98.

50. Summers, A. P., and Koob, T. J. (2002). The evolution of tendon--morphology and material properties. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 1159-70.
51. Bassett, D., and Currie, P. D. (2004). Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, 537-40.

MO	Conc. (μ M)	WT like	Cardiac edema	Curved tail	Somite disor- ganiza- tion	Total
Uninjected		513 (99%)	1 (<1%)	2 (<1%)	0	520
MOsepnC	1000	377 (99%)	0	1 (<1%)	0	380
MOsepn1	250	48 (10%)	382 (83%)	359 (78%)	373 (81%)	460
	500	23 (5%)	409 (95%)	383 (89%)	404 (94%)	430
MOsepn2	500	102 (33%)	95 (31%)	96 (31%)	84 (27%)	310
MOsepn3	750	339 (87%)	31 (8%)	3 (<1%)	31 (8%)	390
	1000	266 (72%)	78 (21%)	85 (23%)	74 (20%)	370
MOsepn4	250	214 (93%)	4 (2%)	8 (4%)	0	230
	500	84 (31%)	150 (65%)	130 (48%)	46 (17%)	270
	750	53 (17%)	239 (77%)	167 (54%)	143 (46%)	310
	1000	17 (5%)	307 (93%)	201 (61%)	182 (55%)	330

Table 1. Phenotypic analysis of MOsepn injected embryos. Frequency of phenotypic alterations observed at 48 hpf, according to the injected morpholino and its concentration. Results were obtained from at least three independent experiments. Total number of embryos analyzed in each experiment is scored in the last column. Somite disorganization refers to phenotypes displayed in Figure 2.

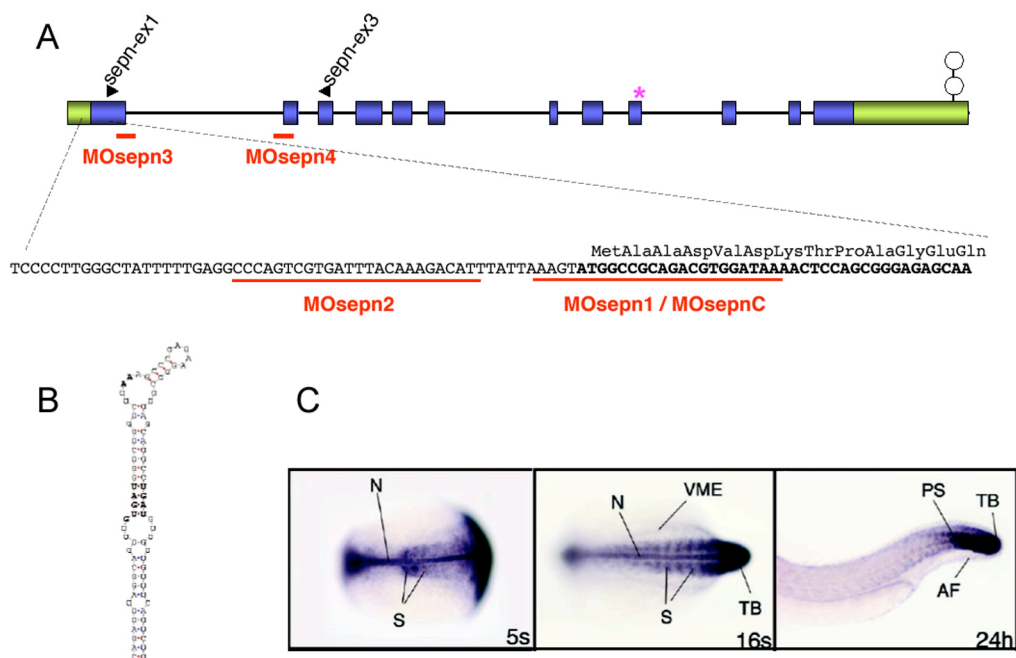


Figure1, Deniziak et al.

Figure 1: Organization and expression of selenoprotein N gene during zebrafish development. (A) Structure of the *sepn1* gene: coding exons and untranslated regions are depicted as blue and green boxes, respectively. Position of the selenocysteine codon is marked with an asterisk. The selenocysteine insertion sequence element (SECIS) located within 3' UTR is drawn in black. The positions and names of morpholinos injected into the embryos and oligonucleotides used in the RT-PCR analysis are marked. (B) The secondary structure of the SECIS element was determined using the SECISearch browser (<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>). The conserved quartet of non-Watson-Crick base pairs and the apical loop AA pair, two essential sequence motifs mediating selenoprotein synthesis, are indicated in bold. C, Expression of *sepn1* analyzed by whole mount *in situ* hybridization at 5 somites (5s), 16 somites (16s) and 24 hpf stages, reveals high transcription in the notochord (N), somites (S) and tail bud (TB). Other tissues are indicated as follow: AF – axial fin fold; PS – posterior somites; VME – ventral mesoderm [15].

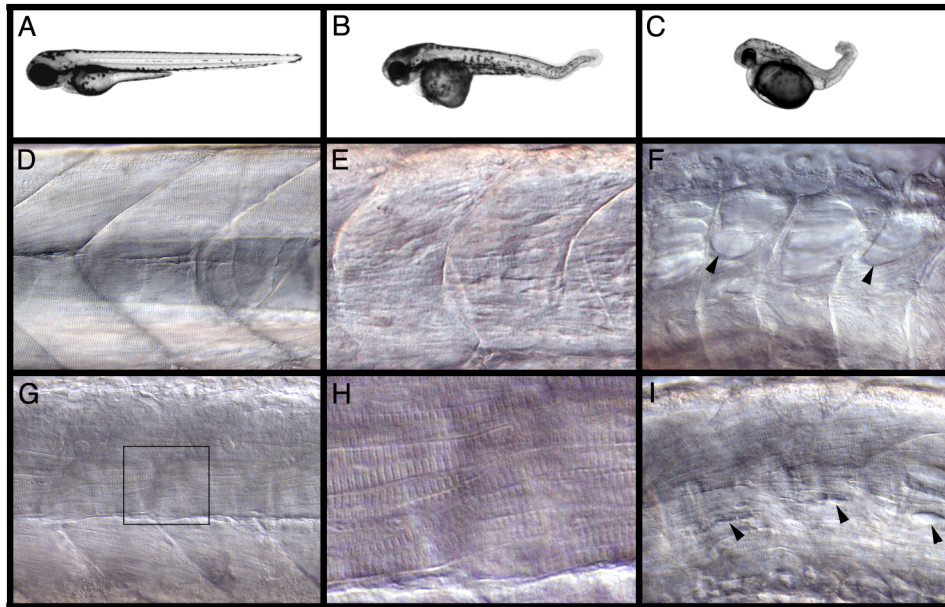


Figure 2, Deniziak et al.

Figure 2: SeIN knockdown induces morphological alterations and muscle abnormalities. Lateral views of 48 hpf wild type control (A), embryo injected with 250 μ M (B) and 500 μ M (C) of MOsepn1. Embryos injected with the control morpholino, MOsepnC, were identical to the wild type (not shown). Morphants exhibit dose dependent tail malformation and defects in notochord extension. (D-I) Differential interference contrast microscopic images of the trunk region of 48 hpf embryos injected with different morpholinos. Wild-type (D) is compared to embryos injected with 250 μ M (E) or 500 μ M (F) MOsepn1, 500 μ M (G, H) or 750 μ M (I) MOsepn4. Morphants show diverse degree of somite disorganization, alteration of the typical somite chevron shape and lesions in skeletal muscles visible as cell free spaces (arrowheads). (H) is a higher magnification of the somite border area boxed in (G).

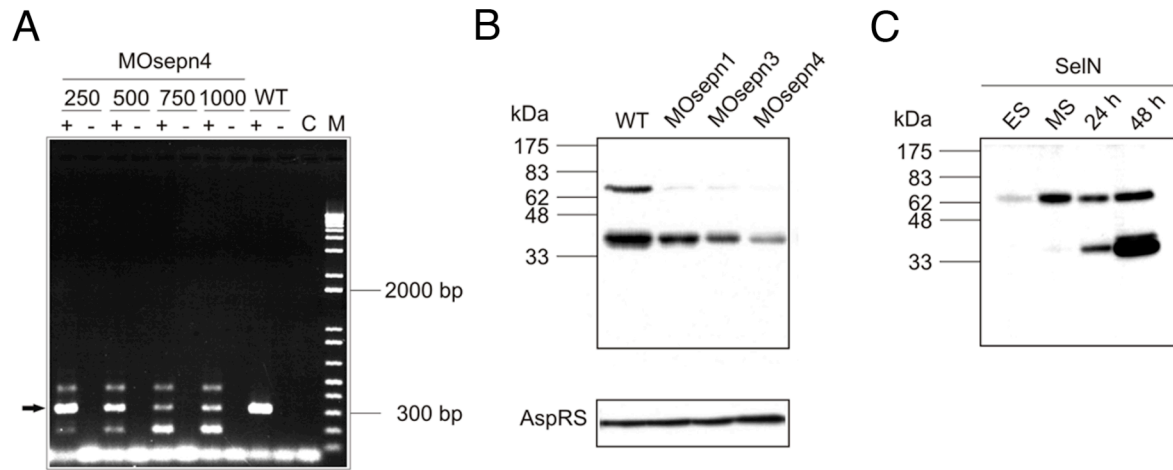


Figure 3, Deniziak et al.

Figure 3: SelN expression in *sepn1* morphants. (A) Analysis of *Sepn1* mRNA by RT-PCR demonstrates dose-dependent splicing perturbation in response to morpholino injection. The concentrations of MOsepn4 (in μ M) are given on top of each lane. The decrease in the intensity of the 318 bp band corresponding to correctly spliced mRNA (arrow) and the use of cryptic splice-sites are observed. Each reaction was performed with (+) or without (-) reverse transcriptase; C stands PCR control in absence of DNA; M – DNA molecular weight marker. (B) SelN protein level was analyzed in total protein samples of 24 hpf MOsepn injected embryos by Western Blot immunodetection using a zebrafish SelN specific antibody, and compared to wild-type (WT) control embryos. The morpholino injected is indicated at the top of each lane. Two bands are detected, the lower one likely corresponding to a cleavage product. Signal quantification to aspartyl-tRNA synthetase (AspRS) control (lower panel) shows that the total SelN protein level decreases in response to morpholino injection. (C) a time course of SelN synthesis in non-injected embryos of various developmental stages (ES - early somitogenesis, MS – middle somitogenesis, 24 or 48 hours post-fertilization) was assayed. SelN undergoes a progressive proteolytic cleavage.

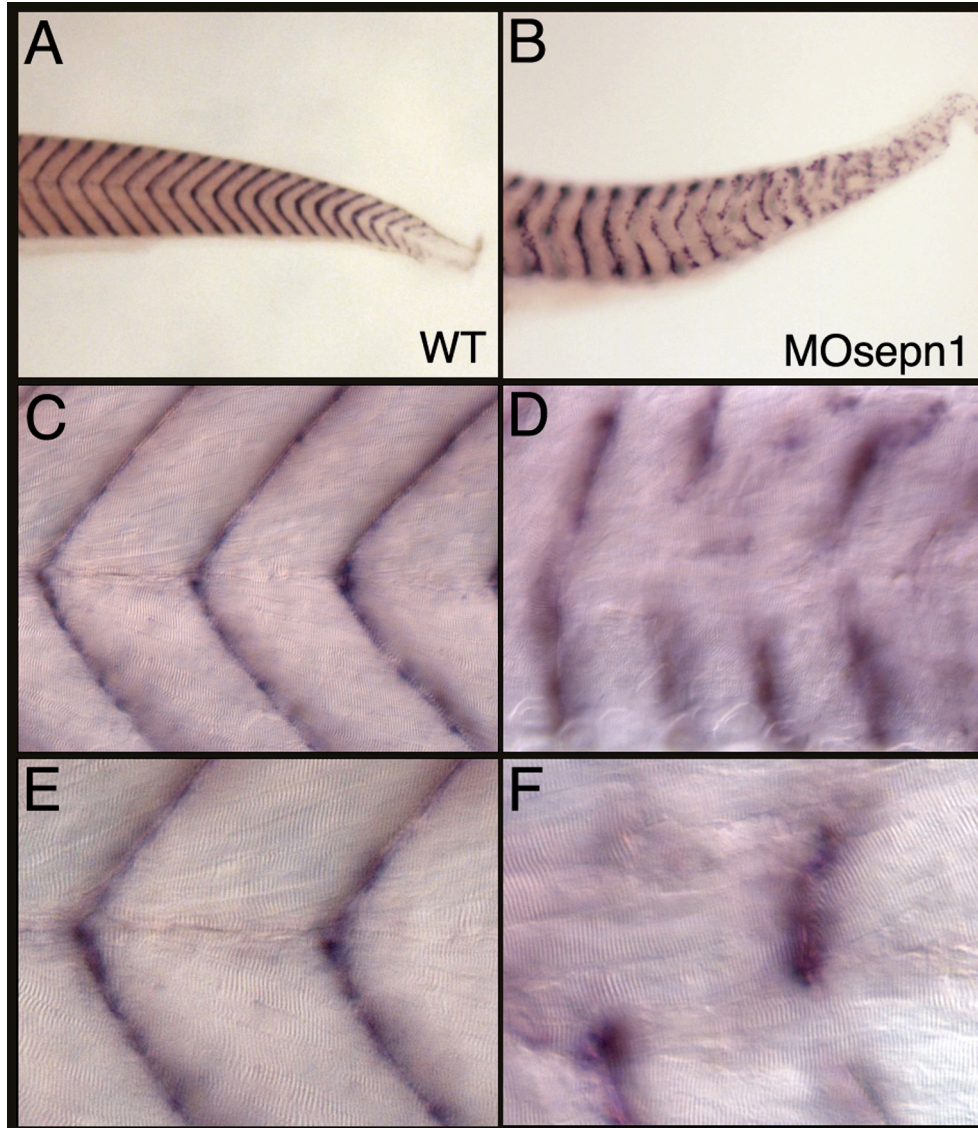


Figure 4, Deniziak et al.

Figure 4: Somite borders disorganization in *sepn1* morphants. The expression pattern of *CB1045* [19], a marker specific of the myoseptum, was examined by whole-mount *in situ* hybridization in 5 dpf embryos. It was used to compare wild-type control (WT; A, C, E) and MOsepn1 injected embryos (B, D, F). *CB1045* expression pattern in MOsepn1 morphants shows deformations and discontinuities of the somite borders, especially in the caudal region (A, B). (C-F) Higher magnification of the disrupted myosepta reveals the presence of the striated myofibrils progressing into the adjacent somite (DIC images).

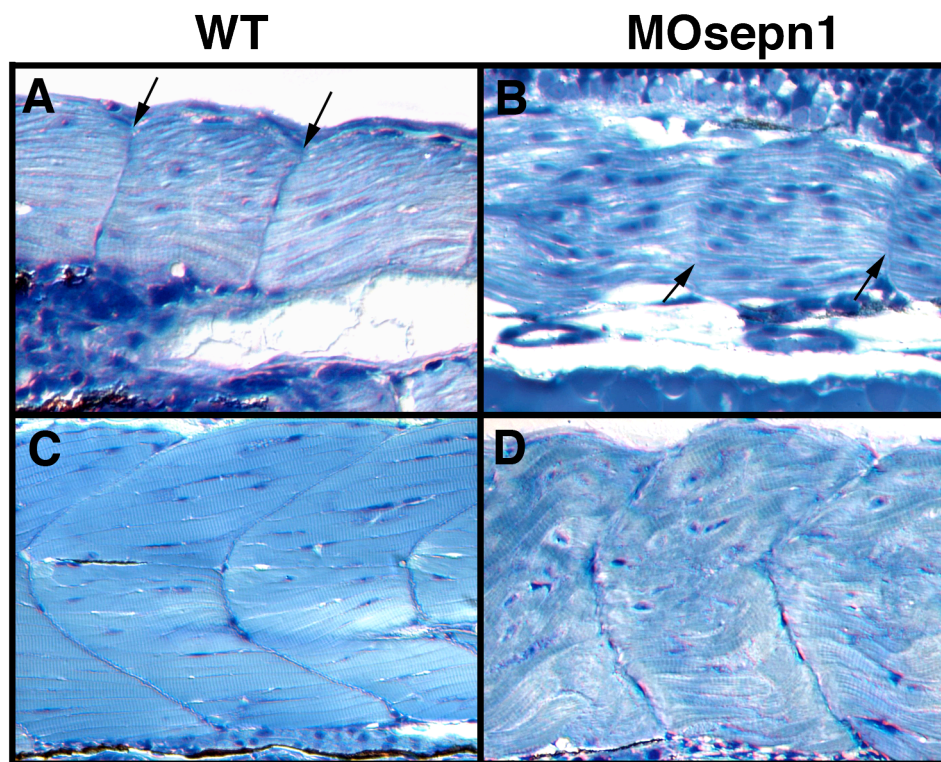


Figure 5, Deniziak et al.

Figure 5: Alterations of developing muscles in SelN deficient embryos. Trunk somites of wild-type (A, C) or MO-sepn1 injected embryos (B, D) at 24 hpf (A, B) or 72 hpf (C, D) were examined by light microscopy. Longitudinal sections show retarded differentiation of the myofibers at 24 hpf and abnormal fiber arrangement at 72 hpf. The positions of the myosepta in (A) and (B) are indicated (arrows).

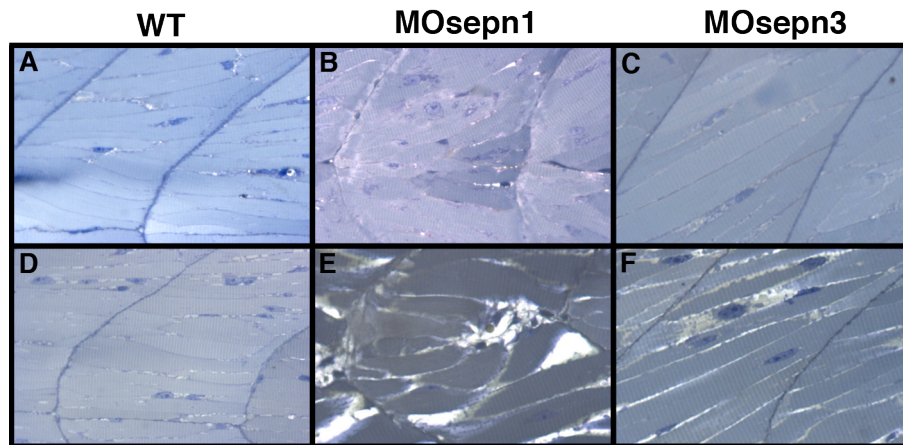


Figure 6, Deniziak et al.

Figure 6: Progressive muscle defects in SelN deficient embryos. Analysis of para-sagittal sections through dorso-lateral myotomes in 6 dpf (A – C) or 9 dpf (D – F) embryos. Fibers of the wild-type (A, D) or sepn3 morphants (C, F) span the entire somite, while fibers of sepn1 morphants are clearly disorganized and interlaced (B, E). Nine days post-fertilization embryos show more severe somite structure defects, notably enlarged interfiber spaces and a number of centrally located nuclei.

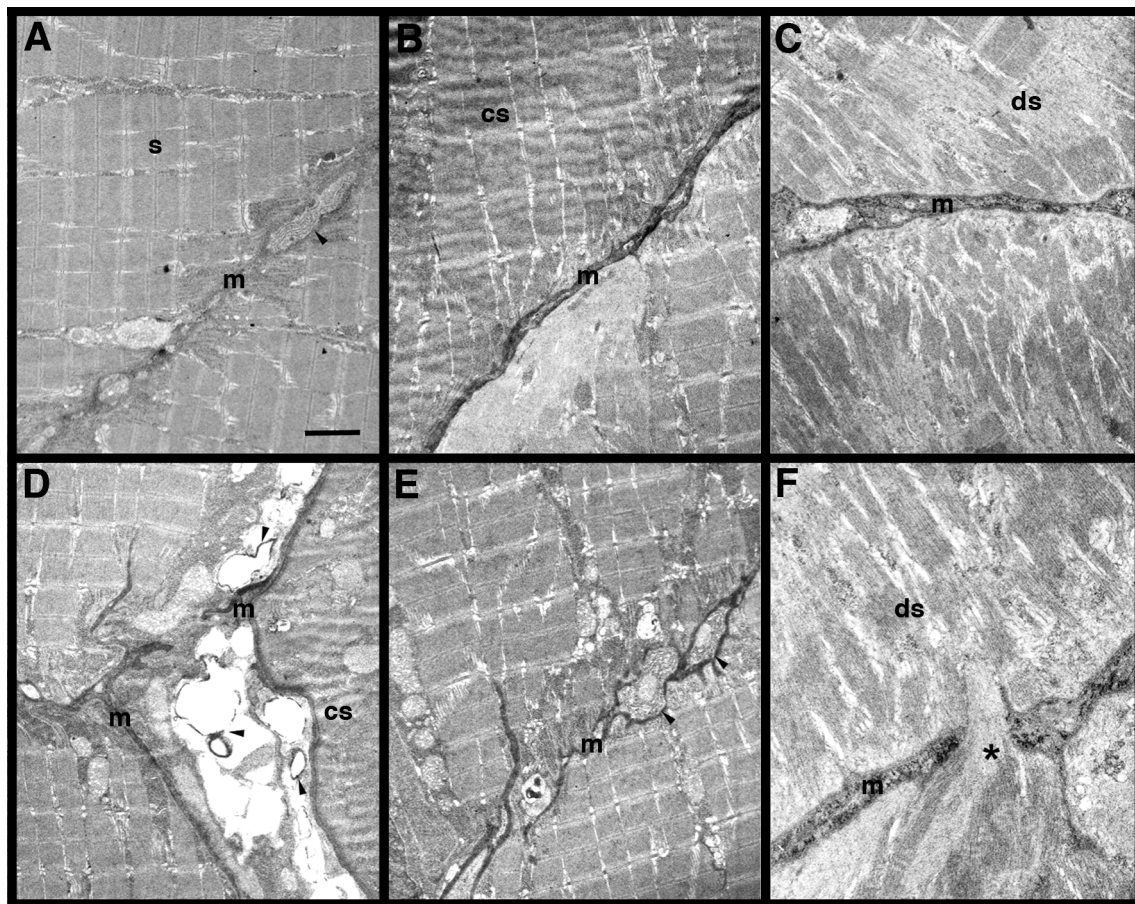


Figure 7, Deniziak et al.

Figure 7: Electron microscopy analysis of muscular tissue of embryos at 6 dpf. Para-sagittal sections of wild-type (A) and *sepn* morphant (B-F) myotomes in the region of the somite boundary. (A-C), Regular sarcomeric (s) array of wild-type myofibrils is perturbed by MO*sepn* injection. Affected muscle fibers display disorganized sarcomeres (ds) or irregular banding corresponding to collapsed sarcomeres (cs). (D-F) Structure and integrity of myosepta (m) are altered, with local myofilaments crossing the somite boundaries (asterisk). Membranous structures within the myosepta (arrowheads) present different aspects in the injected embryo compared to the wild-type. Scale bar, 2.5 μ m.

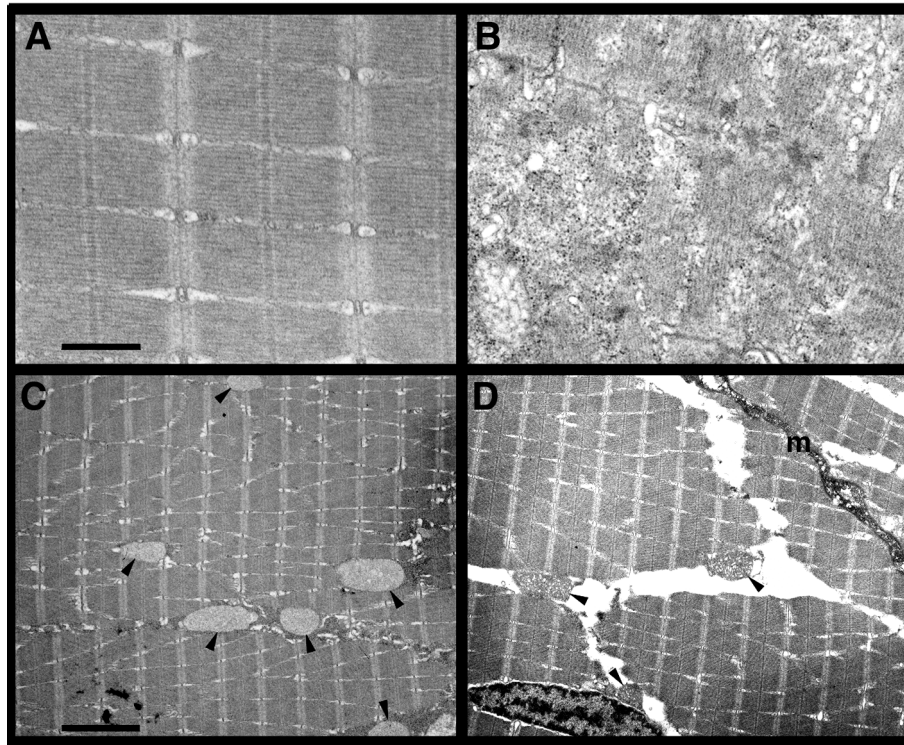


Figure 8, Deniziak et al.

Figure 8: Myofibril ultrastructure in embryos at 9 dpf. (A) The regular sarcomeric organization of wild-type myofibrils with visible triad structures is severely perturbed in MOsepn1-injected embryos (B). (C) In the wild-type tissue, the mitochondria (arrowheads) are located between well organized and tightly packed myofibrils. (D) In MOsepn3 morphants, the sarcomeric structure is well preserved, but myofibrils are detached with peripheral mitochondria (arrowheads) suspended in the free intercellular spaces. Scale bars, 1 μm in A and B, 5 μm in (C) and (D).

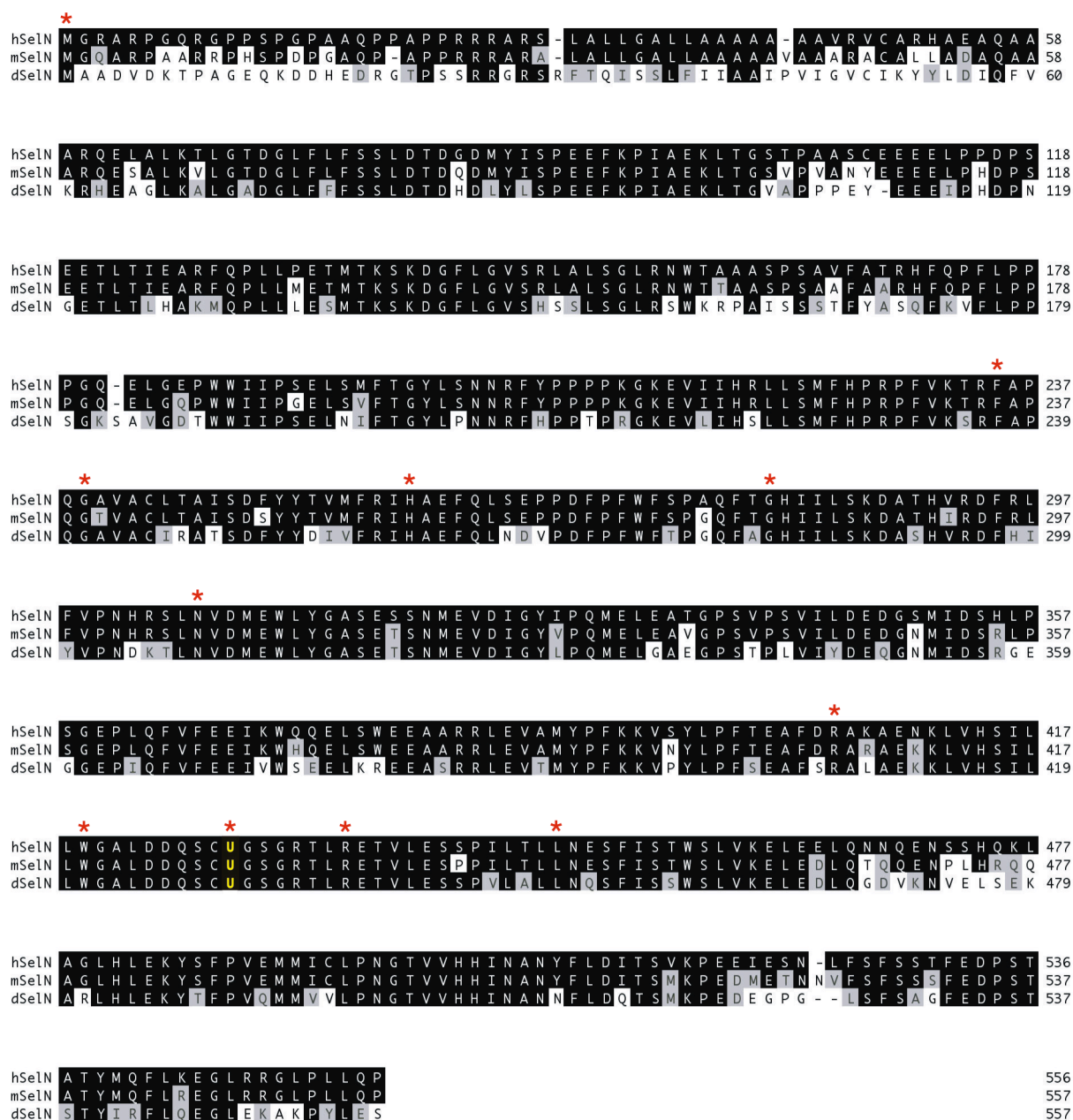


Figure SM1, Denziak et al.

Figure SM1: Comparative alignment of *Homo sapiens* (hSelN), *Mus musculus* (mSelN) and *Danio rerio* (dSelN) selenoprotein N amino acid sequences. Amino acids identical to the human sequence are boxed in black and similar positions are marked with shadowed boxes. The conserved position of the selenocysteine residue (U) is indicated in yellow. All positions corresponding to pathological mutations in patients with SelN-related myopathy (red asterisks) are entirely conserved from zebrafish to humans.

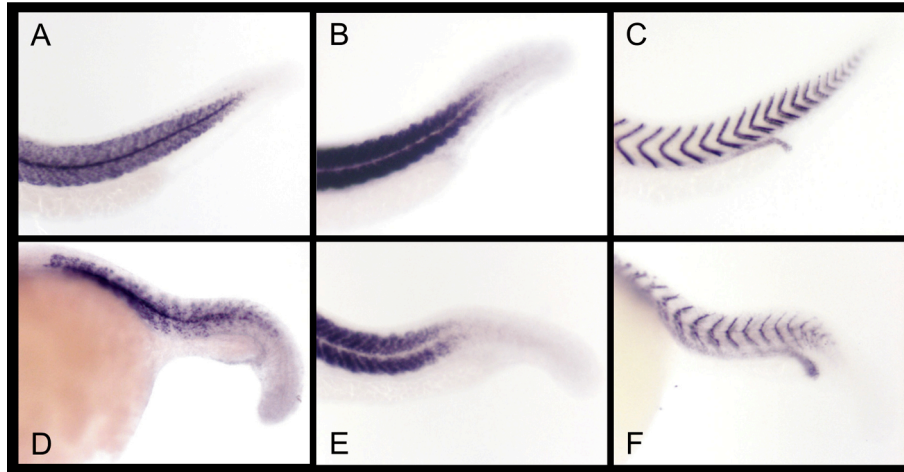


Figure SM2, Deniziak et al.

Figure SM2: Muscle morphogenesis in 24 hpf SelN morphants. Markers for slow muscle (*zgc:86932*, Troponin-C slow muscle fiber isoform; A, D), fast muscle (myosin heavy chain; B, E) or somite borders (*CB1045*; C, F) were used to compare controls (A, B, C) and MOsepnl injected embryos (D, E, F).

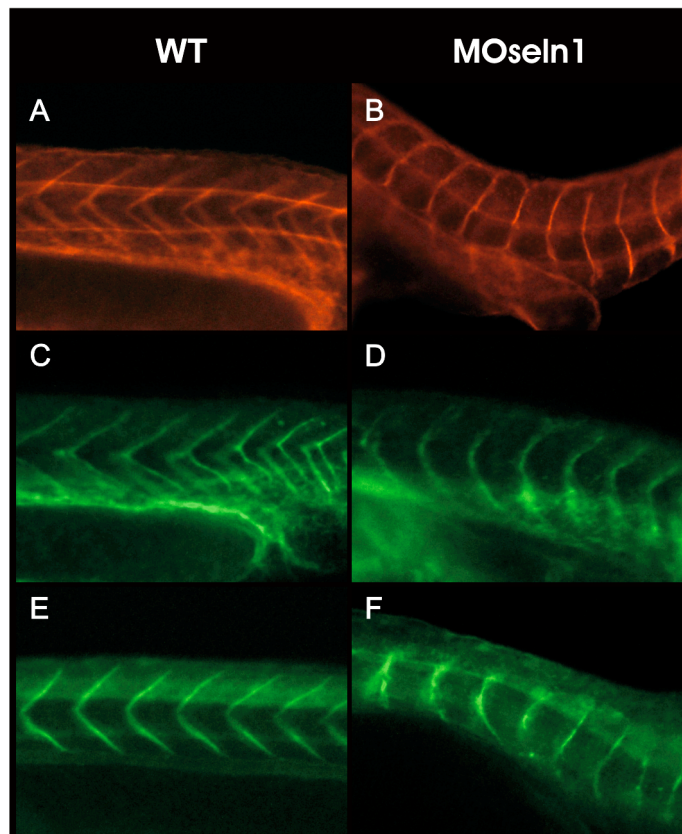


Figure SM3, Deniziak et al.

Figure SM3: Distribution of dystrophin-glycoprotein complex (DGC) components is preserved in *SeIN*-deficient embryos. Lateral views of 24 hpf embryos (dorsal up), labeled with antibodies directed against laminin (A, B), fibronectin (C, D) or β -dystroglycan (E, F). Somite shape is affected in *MOsepn1* injected embryos (B, D, F), but localization of the proteins is comparable to the wild type (A, C, E).

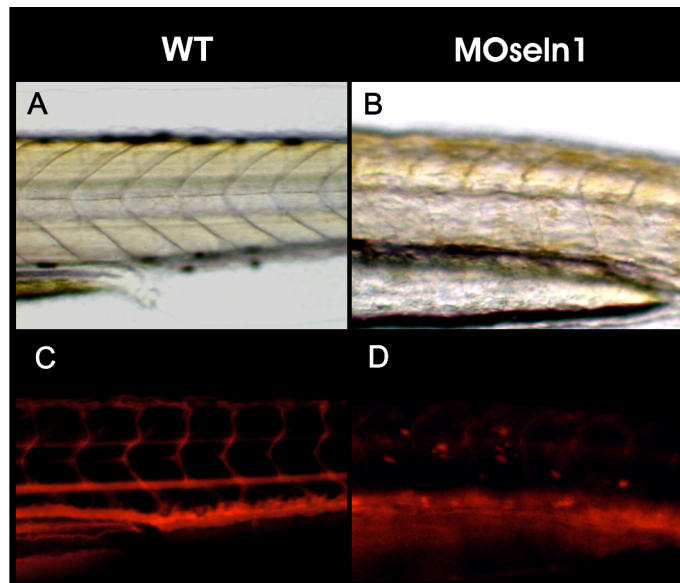


Figure SM4, Deniziak et al.

Figure SM4: Integrity of sarcolemma in SelN depleted zebrafish embryos. SelN morphants at 3 dpf display myotome disorganization as compared to the wild type (A, B). Evans Blue Dye (EBD, red fluorescence), distributed to the cells with blood albumin, stains the vascular system of the wild type embryo (C). In the morphant, EBD accumulates only in a limited number of muscle fibers (D), indicative of few cells with compromised membrane.

4.2.3. Contributions

Mes contributions à ce travail ont principalement consisté en l'identification et au clonage des séquences 5' d'initiation de la traduction du mRNA de la sélénoprotéine N du poisson zèbre qui ont notamment permis de générer les morpholinos dirigés contre le site d'initiation de la traduction. J'ai également participé à montrer qu'il n'y a qu'un seul gène pour la sélénoprotéine N chez le poisson zèbre.

5. Annexe

5.1. Tentative de correction génique

5.1.1. Résumé

Certains patients atteints de dystrophie musculaire congénitale à rigidité du rachis présentent une mutation ponctuelle convertissant le codon UGASec en un codon UAAS_{Stop}. L'apparition de la pathologie est certainement due à une perte de fonction de SePN liée à un arrêt prématuré de la traduction. Plutôt que de corriger la mutation ponctuelle dans SePN1, nous proposons une stratégie de correction génique utilisant l'apport en *trans* d'un ARNt^{Sec} modifié capable de reconnaître le codon muté UAA. Cet ARNt^{Sec} modifié présente une mutation dans la séquence de l'anticodon qui permet de restaurer la complémentarité de bases avec le codon UAA. Ainsi, la translecture du codon UAA et l'insertion concomitante de sélénocystéine permet la synthèse d'une protéine complète et fonctionnelle. L'intérêt de cette stratégie, par rapport à la correction génique directe, est d'utiliser les particularités de la machinerie de synthèse des sélénoprotéines, à savoir: l'introduction et l'expression du gène de l'ARNt^{Sec} dans des cellules de mammifères est plus facile que celle d'un gène SEP1 corrigé, car les mécanismes de contrôles transcriptionnel et post-transcriptionnel de l'ARNt sont beaucoup plus simples. Il faut rappeler que contrairement à tous les autres ARNt, l'ARNt^{Sec} est codé par un gène unique et que les mécanismes qui contrôlent sa transcription ont été étudiés en détail (Carbon et Krol, 1991; Schuster et coll., 1995); la mutation ponctuelle introduite dans l'anticodon de l'ARNt^{Sec} n'affecte en rien la charge par la sérine et sa modification ultérieure en sélénocystéine; l'expression *in vivo* de l'ARNt^{Sec} modifié n'interfère pas avec la machinerie générale de traduction parce qu'il n'est pas reconnu par le facteur général d'élongation eEF1A, mais par un facteur d'élongation spécialisé, EFSec. Il n'interfère pas non plus avec la traduction normale des autres sélénoprotéines car le codon UAA n'est représenté que sur le messenger SEP1 muté. Enfin, la machinerie d'incorporation de sélénocystéine recrutant l'ARNt^{Sec} uniquement sur les messagers codant pour les sélénoprotéines, elle empêche l'ARNt^{Sec} d'agir comme un suppresseur des codons UAAS_{Stop} classiques dans les autres protéines.

Nos expériences ont permis de vérifier que des cellules HeLa co-transfectées avec le gène SEP1-UAA et le gène de l'ARNt^{Sec} modifié, conduisent à la synthèse d'une protéine

SePN entière. De plus la translecture du codon UAA, induite par l'ARNt^{Sec} modifié, est bien dépendante de la présence de l'élément SECIS dans la séquence 3'UTR, ce qui démontre l'implication de la machinerie d'insertion de sélénocystéine. Nous avons montré également que la transfection de l'ARNt^{Sec} modifié, dans des fibroblastes obtenus à partir de patients porteurs de la mutation UAA, permet de restaurer la production de la protéine SePN entière.

5.1.2. « Rescue of a selenoprotein N mutation causing congenital dystrophies »

Valérie Allamand*, Mathieu Rederstorff*, Pascale Guicheney, Alain Krol and Alain Lescure

2006, en préparation

Introduction

There is an emerging feature that efficient gene therapy will arise from dedicated strategies derived from the detailed knowledge of the molecular dysfunction causing inherited diseases. This is particularly factual for muscular diseases where the mutated genes are usually very long, encoding large proteins, and for which the simple transfection of a transgene is very unlikely to permit suppression of the genetic defect. Indeed, expression of the curative gene will be highly dependent on the genomic context in which it will be inserted, and other post-transcriptional regulations which are difficult to control.

Mutations in the *SEPN1* gene coding for selenoprotein N (SePN) were shown to cause different forms of autosomal recessive muscular disorders: congenital muscular dystrophy with spinal rigidity (RSMD1, [MIM *602771]; (Dubowitz, 1973; Moghadaszadeh et al., 2001a), multiminicore myopathy (MmD, [MIM *607552]; (Ferreiro et al., 2002), desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions (MB-DRM [MIM 253850]; (Ferreiro et al., 2004)), and a recessive form of congenital fiber-type disproportion myopathy (CFTD; [MIM 255310]; (Clarke et al., 2006). Although the histopathological description of these different disorders are distinct, clinical reevaluation of patients with these diagnoses showed that they share essentially identical clinical features characterized by early weakness of axial muscles, scoliosis and severe respiratory insufficiency. These phenotypes are now classified under the generic term of SEPN1-related myopathies.

Indeed, with the accurate knowledge of the molecular dysfunction causing these disorders, therapeutic avenues may now be envisioned. Over the last decade or so, a lot of effort has been targeted towards the development of cell- or gene-based therapies. However, these approaches present a number of hurdles for muscular diseases, mainly due to the size and distribution of the target tissue.

Here we propose a correction strategy based on the use of a modified tRNA^{Sec} to force the recognition of a mutated Sec codon in a RSMD1 patient with a homozygous UaA point mutation at the UGA selenocysteine codon (c.1385G>A, p.U462X; (Moghadaszadeh et al., 2001b)). The UGA Sec codon is therefore changed to a UAA stop codon. In this case, the disease is very likely caused by the loss of SePN function because of the premature arrest of

translation. The rationale of our strategy is thus not intended to correct the SEPNI point mutation itself but rather to provide the patient in trans with a mutant tRNA^{Sec} gene able to recognize the SePN UAA point mutation. We engineered a mutant tRNA^{Sec} gene carrying a point mutation in the anticodon, thereby restoring the base pair complementarity with the *SEPNI* UAA codon. We demonstrated, both in HeLa cells and in patient-derived primary fibroblasts, that the corrector tRNA^{Sec} indeed allowed readthrough of the UAA stop codon, thus enabling synthesis of the full-length SePN protein. Indeed, the specificities of the molecular mechanisms of the selenoprotein synthesis machinery constitute an invaluable asset rendering this strategy feasible and avoiding cross-effects on the normal synthesis of other cellular proteins.

Material & Methods

Cloning and plasmid constructs

The gene coding for the human tRNA^{Sec} was PCR amplified from human genomic DNA, using primers AL290 5'-GGGTCGACGGGGCCAGGGTGAATCAGACTCTAACAGGA-3' and AL291 5'-GGGTCGACCCGGAGGGGGAAATAAGTAACGACAATCAG-3'. The resulting 678 bp fragment spans positions -420 to +257 relative to the 5' extremity of the tRNA and includes the transcript region and all upstream promoter regions required for efficient tRNA^{Sec} transcription (Myslinski et al., 1992). A *Sall* restriction site was concomitantly introduced at both ends of the PCR fragment that was subcloned into a *Sall* digested pSK(-) vector to generate tRNA^{Sec} wt. The TCA to TtA mutation in the anticodon was engineered by site directed mutagenesis, using oligonucleotide AL292 5'-GGTGCAGG-CTTtAAACCTGTAGC-3', yielding tRNA^{Sec} uua. The pXJSeIN6 construct encoding SePN, was described in (Petit et al., 2003). It was used as SePN wt. Construct SePNΔSECIS was obtained by removing 1609 bp downstream of the unique *NheI* site located within the 3'UTR, 200 bp upstream of the SECIS element. For this purpose, pXJSeIN6 was digested by *NheI* and *KpnI*, blunt-ended and religated. Mutations of the UGA Sec to UaA stop or gGA glycine codons were introduced into both pXJSeIN6 and pXJSeIN6ΔSECIS by site directed mutagenesis, using oligonucleotides AL294 5'-CAGTCCTGCTaAGGTTCAGGGC-3' and AL295 5'-CAGTCCTGCgGAGGTTCAGGGC-3' respectively, generating constructs SePN^{uua}, SePN^{gga}, SePN^{uua}ΔSECIS and SePN^{gga}ΔSECIS.

Cell culture and transfection

HeLa cells (ATCC) were cultured in 10 mm tissue culture plates in DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum, 20U/ml streptomycin and penicillin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. At 70-80% culture confluence, cells were transfected by calcium phosphate precipitation with 1 µg of the different pXJSePN constructs and cotransfected with 1 µg of the different pSKtRNA^{Sec} variants. After 16 h incubation, cells were rinsed and further incubated for 20 h, or defined periods, as indicated in the Figures. Cells were harvested by scrapping.

Primary fibroblasts were obtained from a skin biopsy of patient 14961 (Moghadaszadeh et al., 2001b). Cells were grown as previously described (Petit et al., 2003). Following detachment using trypsin-EDTA (Gibco), 5x10⁵ cells (about 60-70% confluent) were transfected with 2µg of tRNA^{Sec} wt or tRNA^{Sec} uua, using the Normal Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ kit (NHDF-Adult, Amaxa) according to the manufacturer recommendations. Briefly, cells were resuspended in 100µl of pre-warmed Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ solution and subjected to the U-23 program for high transfection efficiency. Re-expression of SePN was investigated 24, 48, 72 and 96 h post-nucleofection. As a control, cells were mock-transfected, meaning that no DNA was added but that electric pulses were performed. As a control of transfection efficiency, a GFP reporter plasmid was co-transfected with the tRNA^{Sec} constructs. GFP-fluorescence was monitored 24 to 96 h post-transfection.

Protein extraction and immunodetection

Transfected HeLa cells were lysed by freeze-thaw procedure in 100 mM Tris-HCl, pH 8. The lysate was centrifuged at 13,000 rpm for 20 min, and the SePN protein was extracted from the membranous insoluble fraction. The pellet was resuspended in 25-50 µl extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 1.25 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) and incubated for 20 min at 4°C. After centrifugation for 15 min at 13,000 rpm, 5 µg of protein extract were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVF membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were stained with Ponceau red to verify blotting efficiency. Blots were incubated overnight at 4°C in PBS-T solution (150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20) containing 3% skimmed milk, followed by 2 h incubation at room temperature with a 1/2 000 dilution of the primary anti-SePN polyclonal antibodies, Ac168, in PBS-T/milk solution. Blots were washed 3x for 10 min in PBS-T, incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (BioRad) 1/10 000 dilution in PBS-T/milk for 1 h

and then washed 3x for 10 min in PBS-T and 2x 10 min in PBS. Peroxidase activity was detected with ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences).

Total proteins from confluent human fibroblasts were obtained as previously described (Allamand et al., 2006). Twenty μg of total proteins were transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore) which were hybridized with polyclonal antibody R139 against the C-terminus of the protein. For loading control, blots were subsequently stained with a monoclonal antibody against α -tubulin (Sigma). HRP-conjugated secondary antibodies were used at a dilution of 1/1000.

Detection of the different tRNA^{Sec} variants by chain termination primer extension

A total RNA fraction was prepared from transfected HeLa cells by Tri ReagentTM (Euromedex) extraction, according to the manufacturer procedure. A deoxyoligonucleotide complementary to a portion of the tRNA^{Sec} sequence, AL317b 5'-TGTCGCTAGACAGCTACAGG-3', was ³²P labeled at the 5' end using T4 polynucleotide kinase. Four μg of total cellular RNAs were hybridized to 2.10⁵ cpm of the labeled AL317b oligonucleotide in a total volume of 8 μl , by heating at 90°C for 2 min, followed by immediate freezing in dry-ice. Next, 2 μl of 5x RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM DTT) was added directly on top of the frozen reaction medium, and incubated at room temperature for 3 min. Primer extension was performed in a 15 μl reaction volume in RT buffer 1x, containing 2U AMV Reverse Transcriptase (QBiogen). To monitor the tRNA^{Sec} wt/tRNA^{Sec} uua ratio, a nucleotide mix containing 0.5 mM dATP/dTTP and 2.5 mM ddGTP, was included. As a control, the total amount of tRNA^{Sec} was measured by adding 0.5 mM dATP/dTTP/dGTP and 0.25 mM ddCTP. Extension was performed for 30 min at 42°C. The reaction mix was ethanol precipitated, the pellet was resuspended in 6 μl TE plus 4 μl sequencing dye mix (20 mM EDTA, pH 8, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol, 96% formamide). The reaction mix was heated for 3min at 90°C and fractionated on a 10% acrylamide:bisacrylamide (19:1) polyacrylamide gel, 8M urea, 1x TBE. The gel was dried and exposed overnight for autoradiography.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from cultured skin fibroblasts with Trizol as previously described (Allamand et al., 2006). First strand cDNA was prepared in a 20 μl final volume reaction from 1 μg of total RNA using oligo(dT)₁₈ and Superscript II RT as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Quantitative real time PCR was carried out by amplifying

fragment between exons 9 and 11 using the following oligonucleotides: ex9F 5'-GCAGTT-TGTGTTTGAGGAGAT-3' and ex11R 5'-ACCAGGGACCAGGTGCTGATG-3'. The reference housekeeping gene HPRT was amplified with primer pair (HPRThu587F 5'-ACCCACGAAGTGTTGGATA-3'; HPRThu834R 5'-AAGCAGATGGCCACAGAACT-3'), on the LightCycler real-time PCR machine (Roche Diagnostics, Germany) using SyBR Green.

Results

Expression of two pathological mutants of the SEPNI gene carrying a mutation in the selenocysteine codon

Various mutations were characterized in the *SEPNI* gene by sequencing the cDNAs obtained from patients with *SEPNI*-related myopathy. Many of them are clustered in the vicinity of the putative catalytic site, as deduced from the position of the selenocysteine residue. Among them, two affect the selenocysteine codon directly. The first one consists in a TGA to TaA point mutation, introducing a stop triplet which cannot be decoded by the selenocysteine insertion machinery. The second one converts the TGA selenocysteine to a gGA glycine codon. To test the effects of the mutations on SePN expression, the changes were introduced separately into the *SePN* cDNAs. Each construct was transiently expressed into HeLa cells. The expression profiles were compared to the wild-type SePN (SePNwt) (Figure 1, lane 2) or to the translation product arising from a construct in which the SECIS element was deleted (SePN Δ SECIS). As expected, the absence of the SECIS element resulted in the synthesis of a truncated SePN protein (Figure 1, lane 3). As predicted from the coding potentials of the two constructs, expression of SePN_{gga} produced a full-length protein while UAA in SePN_{uua} was recognized as a stop codon (Figure 1, lanes 4 and 6). In addition, translation of the full length protein from SePN_{gga} was no longer dependent on the presence of the SECIS element (Figure 1, lane 5). SePN_{gga} accumulated at a higher level than SePNwt, presumably because of the low efficiency of selenocysteine incorporation compared to that of other amino acids. Since the SePN_{gga} protein is highly expressed and because this mutation has a dramatic incidence on muscle activity, one can infer that substitution of glycine for selenocysteine is highly deleterious to SePN activity *in vivo*. Surprisingly, the expression level of the truncated SePN_{uua} product was lower than that obtained with the UGA containing

SePN Δ SECIS construct. In addition, removal of the 3' UTR domain which contains the SECIS motif in both SePNgga Δ SECIS and SePNuua Δ SECIS led to increased expression levels (Figure 1, compare lanes 4 to 5 and 6 to 7). It is likely that in addition to the SECIS, other RNA regulation motifs, such as RNA destabilizing elements or translation inhibitor sequences, were removed.

Expression of a corrector tRNA^{Sec} transgene rescues expression of the SEPNI-UAA mutant

We next tested a strategy for correcting the UAA mutation in SePNuua by expressing in HeLa cells a tRNA^{Sec} gene harboring a compensatory mutation in the anticodon, which changes the wt UCA to UUA sequence, in order to match the UAA codon. The corrector transgene is tRNA^{Sec} uua. Co-expression of the wild-type tRNA^{Sec} with SePNwt and SePNuua slightly stimulated expression of SePNwt, but had no effect on the translation of SePNuua (Figure 1, compare lanes 9, 10 and 11, 12). However, co-expression of the SePNuua mutant construct and its cognate corrector tRNA^{Sec} uua produced a band at the expected size for the full-length SePN protein (Figure 1, lane 13). Interestingly, correction of the SePNuua mutant by tRNA^{Sec} uua was obtained only in presence of the SECIS element (Figure 1, lane 15). This observation demonstrated that decoding of the UAA codon by the corrector tRNA^{Sec} uua is dependent on the selenocysteine insertion machinery, strongly suggesting that a selenocysteine residue is incorporated at the expected position. Additional experiments showed that expression of tRNA^{Sec} uua did not alter expression of both SePNwt and SePNgga, demonstrating that the correction is specific for the UAA mutant (see Supplementary Data).

Accumulation of the corrector tRNA^{Sec} uua in HeLa cells allows high expression of the SePN protein from the mutated gene

The amount of full length SePN recovered by co expression of the SePNuua mutant and the corrector tRNA^{Sec} uua was rather low compared to the wild type protein. We hypothesized that this might reflect a delay in the accumulation of the corrector tRNA^{Sec} uua within the intracellular tRNA pool. To test this hypothesis, we made a kinetic analysis of the expression of SePNwt or SePNuua in the presence of the cognate tRNA^{Sec} wt or tRNA^{Sec} uua (Figure 2A). Both in the presence or absence of tRNA^{Sec} wt, expression of SePNwt reached a maximum value 22 h after removal of the transfection reagent. As for co-transfection of SePNuua and tRNA^{Sec} uua, the highest expression level was achieved only 32 h post-

transfection. At 72 h, the SePN level dropped in all cases, most probably indicative of the loss of the expression vector.

In parallel, the level of the different tRNA^{Sec} species in the transfected cells was evaluated by chain termination primer extension. An oligonucleotide probe complementary to a portion of both wild-type and tRNA^{Sec} uua was hybridized to total cellular RNAs. Primer extension was performed with a mixture of dATP, dTTP and ddGTP as the single dideoxynucleotide. In tRNA^{Sec} wt, extension stopped at the first C residue which corresponds to the C of the UCA anticodon sequence. Because of the C to U mutation at this position in the tRNA^{Sec} uua, the polymerisation was further extended for three additional nucleotides. Therefore, the differential extension products were used to monitor expression of both tRNA^{Sec} wt and tRNA^{Sec} uua in the cells at different time points (Figure 2B). As an internal control, the total tRNA^{Sec} level was measured by performing primer extension under conditions in which the extension proceeds up to the first G residue in the tRNA^{Sec} anticodon loop. This position is common to both tRNA^{Sec} wt and tRNA^{Sec} uua. Transfection of the tRNA^{Sec} wt plasmid in HeLa cells did not lead to an increase of the tRNA^{Sec} level which remained stable over time (Figure 2B, compare left and central panels). This is likely due to saturation of the tRNA processing machinery which might regulate the intracellular pool of each tRNA species. In contrast, the corrector tRNA^{Sec} uua clearly accumulated in a manner which parallels the accumulation of SePN arising from the SePNuua construct (Figure 2A and 2B, compare right panels). This observation further reinforced the notion that the correction of SEPNUAA by tRNA^{Sec} uua is specific. Because the primer extension was conducted in the presence of an excess of oligonucleotide probe, the profiles obtained allowed direct quantification of each tRNA^{Sec} entity. Noteworthy, the tRNA^{Sec} uua was efficiently expressed and accumulated in the transfected cells to a level equivalent to the endogenous pool of tRNA^{Sec}.

Transient expression of the corrector tRNA^{Sec} uua in patient fibroblasts restores SePN expression from the mutated gene

The last question asked whether the corrector tRNA^{Sec} uua would have the ability to enable expression of the full-length SePN form in patients carrying the mutated SePNuua gene. This analysis was conducted *ex vivo*, using cultured fibroblasts originating from the patients. Western blot analysis performed with the extract from affected fibroblasts did not detect any band at the position equivalent to that obtained with control fibroblasts (Figure 3, compare lanes 7 and 8). No shorter product could be either detected in the mutant fibroblasts. This might be due to either instability of the truncated protein expressed in these fibroblasts or

destabilization process of the SePNuua mRNA due the presence of an in frame premature termination codon (PTC). PTC containing mRNAs are recognized by the nonsense mediated decay (NMD) pathway and degraded (Maquat, 2004).

Next, the patients fibroblasts were transiently transfected with the plasmid expressing either the tRNA^{Sec} wt or the tRNA^{Sec} uua. The transfection efficiency was monitored by co-transfection of a GFP reporter gene. It showed that 1/3 of the cells were fluorescent and that both tRNA^{Sec} wt and tRNA^{Sec} uua were transfected with similar efficiencies (Figure 3A). A band corresponding to SePN could be detected in the mutated fibroblasts transfected with the corrector tRNA^{Sec} uua (Figure 3, lanes 10-13). This correction was specific for the tRNA^{Sec} uua, since no equivalent band was observed in the mock transfected mutant fibroblasts (Figure 3, lane 14) or upon transfection of the tRNA^{Sec} wt (lanes 2 to 5). The intensity of this band increased with time as expected from the previous experiments. However, the intensity of the band did not reach the level observed in the wild-type control fibroblasts, even 96 h post-transfection (compare lanes 13-16). Two explanations can be proposed. One considers that the tRNA^{Sec} uua expression plasmid could be lost over time because it was not integrated into the genome and therefore the pool of corrector tRNA formed is not sufficient to allow maximum expression of the SEPNUua gene. Alternatively, the SEPNUua mRNA was destabilized because of the presence of the in frame UAA codon.

Discussion

The experiments presented here correspond to an attempt toward a possible gene therapy for some SePN-RM patients. Gene therapy is classically envisaged under two aspects: expression of a transgene to compensate for a mutation in an autosomal recessive disease or a gene correction based on the cell repair potential. Here we propose an alternative solution that will act post-transcriptionally on the translation of an mRNA arising from a gene carrying a point mutation. It was reported previously that the UGA codon is not strictly required for Sec incorporation into proteins, and that others stop codons could be used as well, provided that codon/anticodon complementarity is maintained (Berry et al., 1994). Taking advantage of the selenoprotein dedicated translation machinery, our strategy features several advantages to restore the expression of a UGA Sec to UAA Stop mutated SEP1 gene: (i) the corrector

tRNA^{Sec} transgene used for this purpose, as the tRNA^{Sec} wt gene, harbors a very compact promoter region lying upstream of the transcribed region. Besides, the transcription mechanism controlling its expression have been studied in great detail (Myslinski et al., 1992); (ii) mutations within the tRNA^{Sec} anticodon do not interfere with the charge of serine and subsequent selenocysteine synthesis; (iii) expression of the mutated tRNA^{Sec} will interfere neither with normal protein synthesis, because this tRNA is not recognized by the general translation factor EF1-A nor with the translation of other selenoproteins, since it decodes a codon different from UGA Sec. In addition, as the selenocysteine translation machinery recruits the tRNA^{Sec} to selenoprotein mRNAs only, the tRNA^{Sec} uua will not recognize normal UAA stop codons in all other mRNAs and thus cannot suppress them.

It was previously shown that in the patients bearing the UAA missense mutation in place of the UGA selenocysteine codon, mRNA levels dropped to 37% compared to control mRNA level (Allamand et al., 2006). This drop is likely due to recognition of the UAA triplet as a premature termination codon, leading to instability of the transcript after its detection by the nonsense mediated decay mechanism (NMD) or other related machinery. It will be interesting to test whether expression of the corrector tRNA can stabilize the mutated mRNA to a significant manner. One last issue to solve is to establish whether expression of the transgene tRNA^{Sec} uua is stable over time in the whole organism. The efficiency of its expression will be highly dependent on the strategy and the integrative or retroviral vector used.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies. We are thankful to the Plate-forme de Post- génomique de la Pitié-Salpêtrière. We are grateful to Karine Parrain for purification of antibody R139.

References

- Allamand, V., Richard, P., Lescure, A., Ledeuil, C., Desjardin, D., Petit, N., Gartioux, C., Ferreira, A., Krol, A., Pellegrini, N., Urtizberea, J.A. and Guicheney, P. (2006) A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep*, 7, 450-454.
- Berry, M.J., Harney, J.W., Ohama, T. and Hatfield, D.L. (1994) Selenocysteine insertion or termination: factors affecting UGA codon fate and complementary anticodon:codon mutations. *Nucleic Acids Res*, 22, 3753-3759.
- Clarke, N.F., Kidson, W., Quijano Roy, S., Estournet, B., Ferreira, A., Guicheney, P., Manson, J.I., Kornberg, A.J., Shield, L.K. and North, K.N. (2006) *SEPNI*: Associated with congenital fiber type disproportion & insulin resistance. *Ann Neurol*, 59, 546-552.
- Dubowitz, V. (1973) Rigid spine syndrome: a muscle syndrome in search of a name. *Proc R Soc Med*, 66, 219-220.
- Ferreiro, A., Ceuterick-de Groote, C., Marks, J.J., Goemans, N., Schreiber, G., Hanefeld, F., Fardeau, M., Martin, J.J., Goebel, H.H., Richard, P., Guicheney, P. and Bonnemann, C.G. (2004) Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol*, 55, 676-686.
- Ferreiro, A., Quijano-Roy, S., Pichereau, C., Moghadaszadeh, B., Goemans, N., Bonnemann, C., Jungbluth, H., Straub, V., Villanova, M., Leroy, J.P., Romero, N.B., Martin, J.J., Muntoni, F., Voit, T., Estournet, B., Richard, P., Fardeau, M. and Guicheney, P. (2002) Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet*, 71, 739-749.
- Maquat, L.E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 89-99.
- Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., Brockington, M., Quijano Roy, S., Merlini, L., Romero, N., Estournet, B., Desguerre, I., Chaigne, D., Muntoni, F., Topaloglu, H. and Guicheney, P. (2001a) Mutations in *SEPNI* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat. Genet.*, 29, 17-18.
- Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., Brockington, M., Roy, S.Q., Merlini, L., Romero, N., Estournet, B., Desguerre, I., Chaigne, D., Muntoni, F., Topaloglu, H. and Guicheney, P. (2001b) Mutations in *SEPNI* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet*, 29, 17-18.
- Myslinski, E., Krol, A. and Carbon, P. (1992) Optimal tRNA((Ser)Sec) gene activity requires an upstream SPH motif. *Nucleic Acids Res*, 20, 203-209.
- Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U.M. and Guicheney, P. (2003) Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet*, 12, 1045-1053.

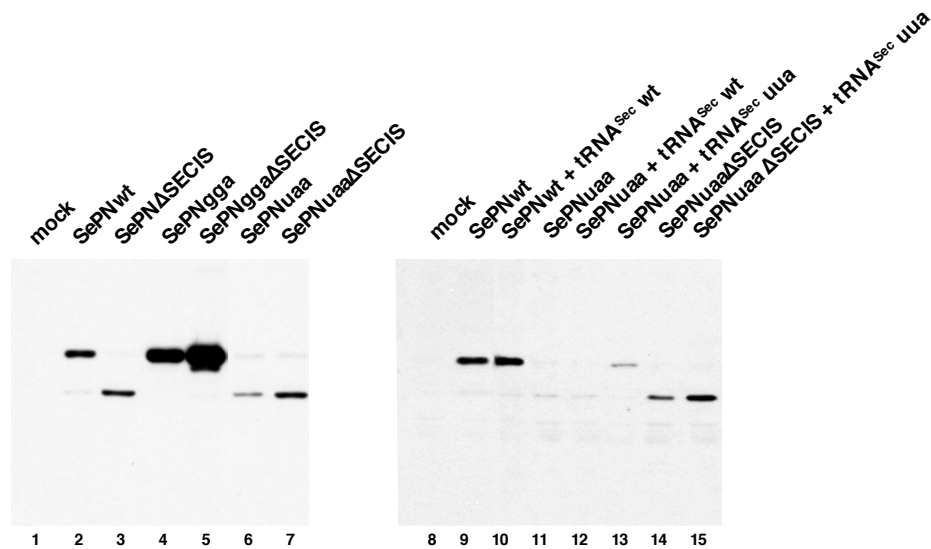


Figure 1: Expression of different SePN mutants and rescue of a SEPN1 stop mutation by a corrector tRNA^{Sec} in HeLa cells

SePN expression from transfected HeLa cells was analyzed by western blot using a SePN polyclonal antibody (Ac168). (Lanes 1-7) Different mutants of the SePN Sec codon (SePNgga; SePNuua) were transfected and the expression profiles were compared to the wild-type (SePNwt), each construct including the SECIS element or not (Δ SECIS). The upper band corresponds to the full-length SePN protein. The lower band, which is obtained in absence of the SECIS element (SePN Δ SECIS), corresponds to the premature stop of translation at the UGA/UAA selenocysteine position (Lanes 8-15). Co-expression of the SePNuua mutant (SePNuua) and a corrector tRNA^{Sec}, mutated in its anticodon sequence UCA>uua (tRNA^{Sec} uua), allows recovery of the full-length SePN protein (lane 13). Co-expression of the wild-type tRNA^{Sec} has no effect (lane 12). The rescue of the SePNuua mutant is specific of the selenocysteine insertion machinery, since it depends on the presence of the SECIS element (lane 15).

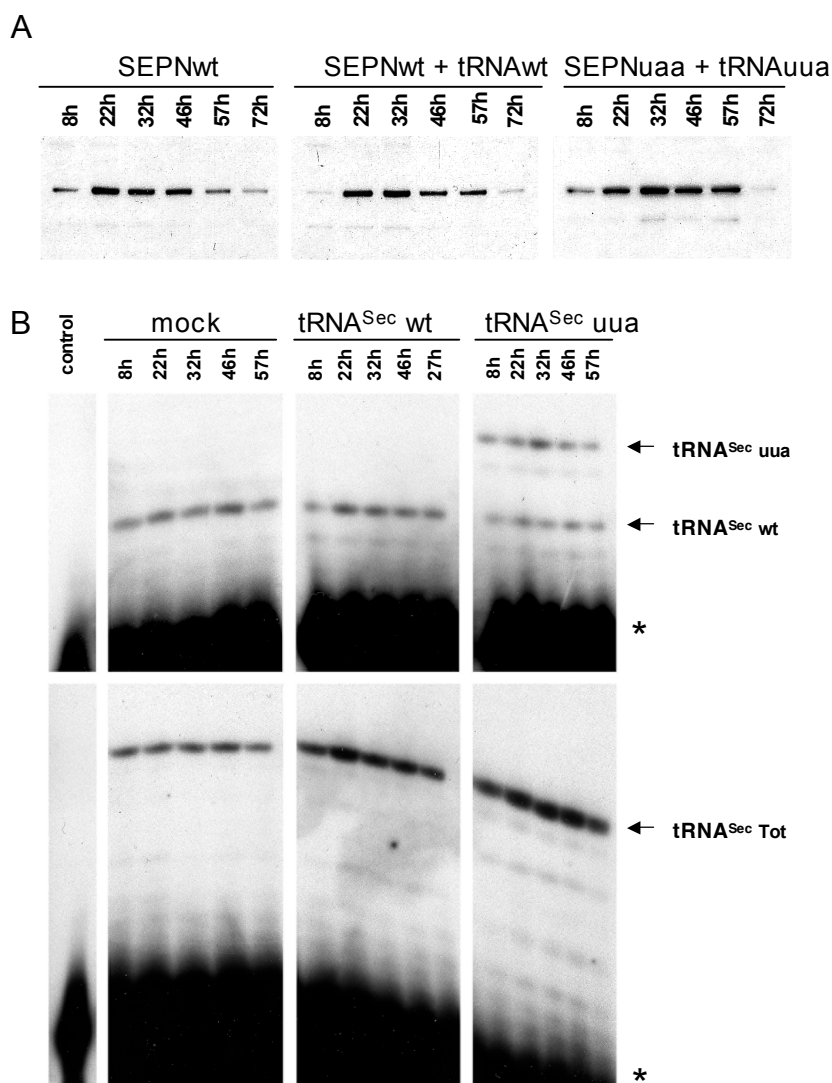


Figure 2: Kinetic expression of the different SePN or tRNA forms in transfected HeLa cells

(A) The accumulation of the wild-type SePN (SEP^{Nwt}) or its mutated form (SEP^{Nuaa}) co-expressed with their cognate tRNAs (tRNA^{Sec} wt or the Sec corrector tRNA^{Sec} uua) were analyzed by western blot analysis at different time points indicated at the top of the panels. SEP^{Nwt} saturates at 22 h, as the SEP^{Nuaa} mutant continues to accumulate up to 32 h. **(B)** In parallel, the level of the different tRNA^{Sec} forms was analyzed by chain termination primer extension. Because of the sequence difference between the wild-type and the mutated tRNA^{Sec}, primer extension stops at different positions for the two forms; +4 or +7 for the wild-type and the mutant tRNA^{Sec} respectively (higher panels). Total amount of tRNA^{Sec} was addressed using a different terminator dideoxynucleotide giving raise to a specific band at +8 (lower panels). Accumulation of both wild-type (tRNA^{Sec} wt) and corrector (tRNA^{Sec} uua) tRNA^{Sec} was analyzed at different time points and compared to the endogenous stock (mock transfected). In the control, primer extension was performed under similar conditions, but omitting the addition of cellular tRNAs (left columns). This control was used to identify the migration of the probe (*) and possible unspecific reactions.

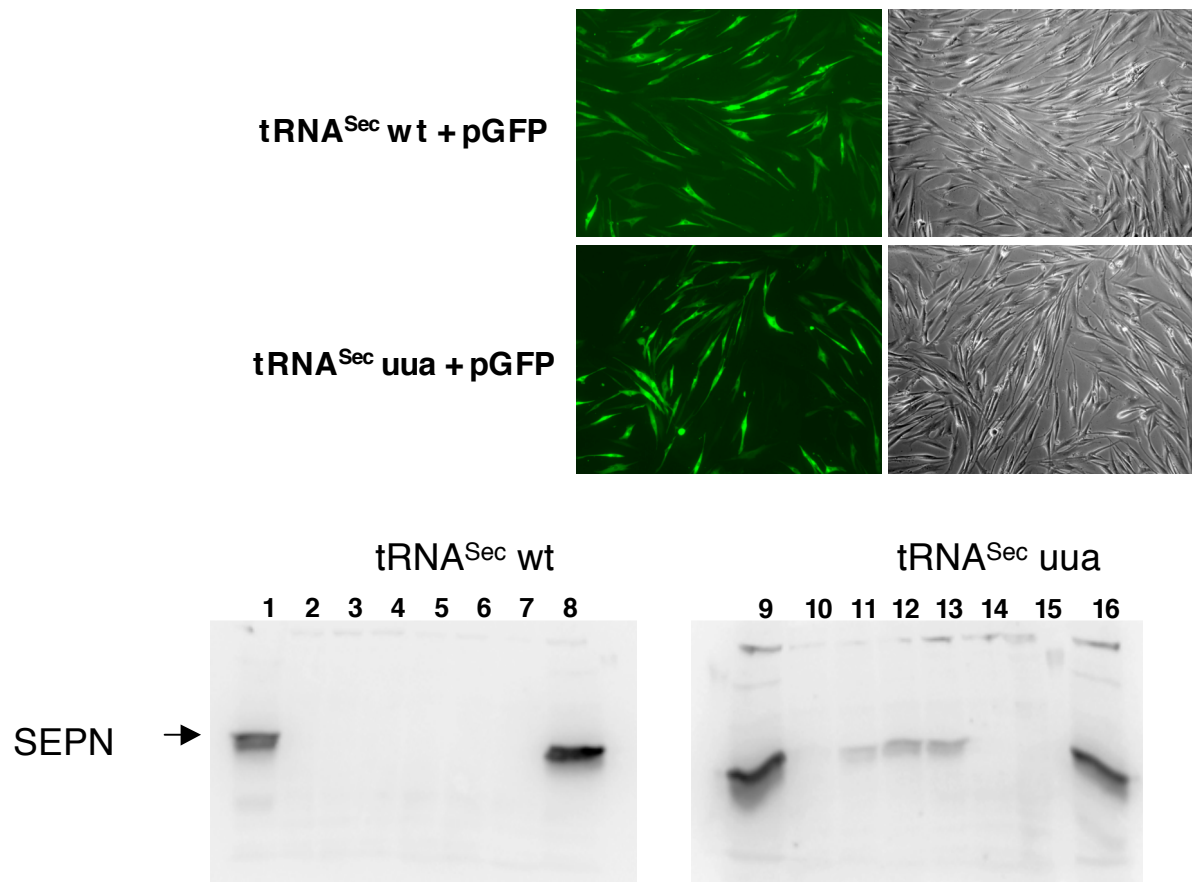


Figure 3: Expression of the corrector, but not wild-type, tRNA^{sec} rescues SePN expression in fibroblasts from patient with the SePNuua mutation

Both wild-type and mutated forms of tRNA^{Sec} were transfected into cultured fibroblasts from patients carrying the SePNuua mutation (lanes 2 to 7 and 10 to 15) and controls (lanes 1, 8, 9, 16). **(A)** The efficiency of transfection was assayed by co-expression of a GFP reporter protein. At 96 h, the transfected cells were visualized using fluorescent microscopy (right panels). Transfection efficiency of both tRNAs was similar. **(B)** Expression of SePN was determined by western blot analysis in transfected fibroblast at 24 h (lanes 2 and 10), 48 h (lanes 3 and 11), 72 h (lanes 4 and 12) or 96 h (lanes 5 and 13), and compared to mock transfected at 96 h (lanes 6 and 14), non transfected cells (lanes 7 and 15) or control fibroblasts issued from non affected patients (lanes 1, 8, 9, 16). As shown on the top of each panel, either the wild-type (lanes 1 to 8) or the corrector tRNA^{Sec} (lanes 9 to 16) were expressed.

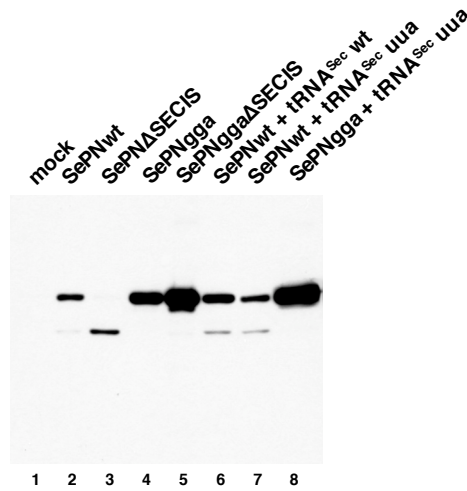


Figure S1: The expression of the wild-type or a non Sec containing SePN protein is not affected by expression of the Sec corrector tRNA^{Sec} uua

Either wild-type (SePNwt) or a Sec>Gly mutant of SePN (SePNgga) were expressed with or without the Sec corrector tRNA^{Sec} (tRNA^{Sec} uua). SePN expression was analyzed by western blot. No change in the expression profile is observed compared to the control in absence of tRNA^{Sec} uua.

5.1.3. Contributions

Cet article en préparation nécessite quelques expériences complémentaires dont les résultats sont en attente. Toutefois, sa forme incomplète telle qu'elle est présentée ici permet déjà d'entrevoir les résultats qui ont été obtenus. Ma participation à cette étude a principalement consisté aux clonages, mutagenèses et transfections des différentes constructions (SePN et ARNt) dans les cellules HeLa, ainsi qu'à la réalisation de tests de transfection dans les fibroblastes humains.

Un nombre croissant de pathologies musculaires apparentées à un dysfonctionnement de la sélénoprotéine N (SePN-RM) a été identifié (Rederstorff et coll., 2006). En 2006, il s'élève à cinq syndromes, de phénotypes proches et parfois chevauchants, que l'on considère dorénavant comme les expressions différentes d'une même maladie. Pour expliquer ces différences d'expressions, la prise en compte de facteurs additionnels, génétiques ou environnementaux, est indispensable. Il faut noter que ces syndromes peuvent également être associés à la mutation d'autres gènes que SEPN1, comme les gènes codant pour le récepteur ryanodine de type 1, la desmine, la lamine A/C ou l'actine $\alpha 1$. Par conséquent, une association génétique et fonctionnelle entre ces différents gènes peut être proposée. Toutefois, c'est l'identification de la fonction de SePN qui demeure l'objectif essentiel à atteindre pour comprendre les mécanismes donnant lieu à l'apparition de ces maladies.

Au cours de ma thèse, nous avons tenté de déterminer la fonction catalytique de SePN, afin de mieux comprendre son implication dans la physiologie musculaire. Pour cela, nous avons eu recours à plusieurs approches complémentaires, qui ont permis d'étayer nos connaissances sur la protéine. Ainsi, ces travaux apportent des outils fondamentaux pour la poursuite de l'élucidation de la fonction de SePN dans la formation et le maintien de l'activité musculaire.

Contributions à la caractérisation fonctionnelle de la sélénoprotéine N

Tout d'abord, nous avons déterminé la localisation intracellulaire de SePN. Des expériences d'immunolocalisation ont permis d'observer que la protéine s'accumule dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans la membrane périnucléaire. Le peptide N-terminal riche en acides aminés hydrophobes est nécessaire et suffisant pour permettre l'adressage de la protéine vers ce compartiment cellulaire et nous avons montré que sa partie soluble C-terminale est localisée dans la partie luminale du compartiment. Ensuite, pour appréhender la

fonction de SePN, nous avons souhaité mettre en évidence son association à des partenaires cellulaires.

L'identification d'interactants de fonction connue apporterait des indices précieux pour la détermination de la fonction propre de SePN. Par des approches successives, nous avons pu mettre en évidence l'association de SePN à d'autres protéines au sein de la membrane du réticulum endoplasmique. Contrairement à nos hypothèses de départ, déduites de l'observation de nombreux résidus proline dans la séquence de SePN, aucune des protéines identifiées ne présente de domaine de type SH3. Plusieurs candidats ont été obtenus, mais dont la signification biologique n'est pas évidente. Ces expériences sont encore préliminaires. Elles doivent maintenant être reproduites et améliorées afin de valider les interactants caractérisés. Deux facteurs ont contribué à la complexité de ces expériences. Le premier réside dans la difficile solubilisation de la protéine associée à la membrane du réticulum endoplasmique. La deuxième difficulté résulte de la faible représentativité de SePN dans la cellule. Au vu de nos résultats et des activités des sélénoprotéines de fonction connue, une autre explication pourrait être apportée: il est possible que la sélénoprotéine N possède divers substrats auxquels elle s'associe transitoirement plutôt qu'un nombre restreint de protéines auxquelles elle serait liée de façon stable.

Les premiers modèles physiologiques de la fonction de la sélénoprotéine N

Dans un deuxième temps, le développement et l'étude de deux modèles animaux des myopathies apparentées à un dysfonctionnement de la sélénoprotéine N ont permis et permettront encore de mieux comprendre la fonction de SePN et son rôle dans l'apparition des maladies musculaires. Le profil d'expression de la sélénoprotéine N au cours du développement embryonnaire chez le poisson zèbre, son expression plus importante dans les tissus fœtaux humains comparés aux tissus adultes et l'apparition précoce de la maladie en cas de mutations dans le gène SEPNI suggèrent un rôle important pour la protéine dans la morphogenèse. Cette hypothèse a pu être confirmée par l'inhibition de l'expression du gène au cours du développement du poisson zèbre par injection d'analogues stables d'ARN complémentaires à l'ARN messager SEPNI. Les effets délétères observés chez les poissons

injectés sont nombreux: développement anormal, notamment de l'axe vertébral et de la queue; altération de la formation du muscle; retard de différenciation des fibres musculaires; désorganisation des myofibres; perturbation des structures sarcomériques; discontinuités et déformations des myosepta. L'effet observé sur l'organisation des myosepta est particulièrement intéressant. Ces régions correspondent aux jonctions myotendineuses chez l'homme. L'implication de SePN dans la formation et le maintien de l'intégrité de ces structures permettrait d'expliquer l'affection prépondérante des muscles centraux chez les patients atteints de maladies musculaires apparentées à un dysfonctionnement de SePN.

Nous avons également développé et obtenu le modèle murin des myopathies liées à un dysfonctionnement de SePN. Les souris obtenues présentent une invalidation soit totale du gène dans tout l'organisme, soit sélective dans le muscle. Les études entreprises chez ces souris vont contribuer à répondre à de nombreuses questions. Les analyses histologiques initiales semblent indiquer que les souris présentent des profils musculaires dystrophiques, bien que ne présentant pas de symptômes apparents. Cette constatation surprenante pourrait s'expliquer par l'activité limitée des animaux dans les conditions d'élevage. Une étude approfondie, comportant notamment des tests de résistance à l'effort ou des analyses morphométriques et de comportement au cours du vieillissement, devra être menée sur des effectifs représentatifs. Très prochainement, ces tests seront réalisés à l'Institut de Myologie du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de P. Guicheney. En parallèle, nous poursuivrons l'analyse de la morphologie musculaire de ces souris par différentes approches. Des études histologiques plus poussées seront réalisées. Elles auront pour but de confirmer les profils dystrophiques déjà observés et d'identifier des modifications structurales éventuelles du tissu musculaire, comme la présence de « cores », fréquemment observés dans les myopathies associées à SePN. En parallèle, des analyses biochimiques mesurant par exemple l'activité créatine kinase musculaire, seront entreprises. Des tests d'exercice seront également réalisés sur des muscles isolés, afin de déterminer chez les animaux invalidés une éventuelle intolérance à l'effort ou une altération de la réponse musculaire consécutive à une stimulation électrique.

Parallèlement, l'étude de la sensibilité des animaux au stress oxydatif induit sera poursuivie. Les expériences préliminaires réalisées sur un nombre restreint d'animaux ont

montré leur sensibilité accrue au stress oxydant induit par l'injection de paraquat. Une étude sur des effectifs plus importants permettra de confirmer cette observation. Il semblerait en outre que les animaux invalidés uniquement dans le muscle soient plus sensibles aux injections de paraquat que les animaux totalement invalidés pour SePN. Ce résultat suggère qu'un mécanisme de compensation apparaît chez la souris totalement invalidée. Il pourrait s'agir de l'expression plus importante d'autres sélénoenzymes, comme les glutathion peroxydases ou d'autres sélénoprotéines du réticulum endoplasmique telles que SeP15 ou SePM. Si la sensibilité des animaux au paraquat est confirmée, cette dernière hypothèse pourrait être validée par une mesure des activités enzymatiques chez les animaux invalidés. De façon plus générale, une analyse comparative des protéomes du muscle de souris invalidées et saines pourrait permettre d'identifier des modifications d'activité. En complément de cette étude, des analyses statistiques plus poussées des animaux dont l'alimentation est carencée en vitamine E seront réalisées. Il semble en effet que l'absence de vitamine E accentue les effets délétères d'une carence en sélénium. Il serait donc également intéressant de tester l'effet de carence en sélénium sur les animaux invalidés pour le gène SEPNI. Ces études seront menées en collaboration avec les groupes de R. Brigelius-Flohé et d'U. Schweizer des universités de Potsdam et Berlin. Un autre aspect qu'il serait intéressant d'explorer concerne l'effet de la déplétion de SePN sur la prolifération et la différenciation cellulaires, notamment de fibroblastes en culture.

Vers une stratégie originale de correction d'une mutation pathologique du gène SEPNI

Le dernier volet prometteur qui a été abordé au cours de mon travail de thèse correspond à une stratégie proposée pour la correction d'une mutation particulière dans le gène SEPNI. Cette stratégie tire avantage du mécanisme particulier d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines, en ayant recours à une petite molécule d'ARNt plutôt qu'à un gène de protéine plus difficile à manipuler. Cette stratégie expérimentale mise au point sur des cultures de cellules HeLa a été confirmée *ex vivo* sur des fibroblastes de patients. Ces résultats très encourageants permettent d'envisager maintenant une thérapie génique chez les patients.

Il reste à résoudre le problème complexe de la vectorisation et de l'adressage de la molécule *in vivo*.

Prospectives

L'étude des modèles physiologiques poissons et murins nous ont apporté les informations les plus poussées en ce qui concerne la fonction possible de SePN. On notera une convergence des défauts musculaires observés dans ces différents modèles, en accord avec les pathologies humaines. Des différences existent qui peuvent résulter de spécificités d'espèces ou de l'effet combiné de facteurs environnementaux. La compréhension de ces différences permettra également de mieux appréhender la fonction de SePN et son contexte biologique. Toutefois, nos expériences ne nous ont pas permis de déterminer l'activité moléculaire de la protéine. Plusieurs rôles peuvent être imaginés pour SePN permettant d'expliquer son implication directe ou indirecte dans l'apparition des maladies musculaires. Ces hypothèses ont été largement présentées et discutées dans ce document (Figure 50). Selon le schéma émergent, l'activité redox importante de SePN, observée par exemple sur le réactif de Bradford, pourrait intervenir dans la régulation des statuts oxydés ou réduits de protéines impliquées notamment dans le fonctionnement correct des muscles. Cette activité au niveau du réticulum pourrait également participer au repliement correct ou à la mise en place de modifications post-traductionnelles de protéines en cours de synthèse. Le dysfonctionnement de ces processus a déjà été associé à de graves pathologies, par exemple dans le cas des dystroglycanopathies (Jimenez-Mallebrera et coll., 2005).

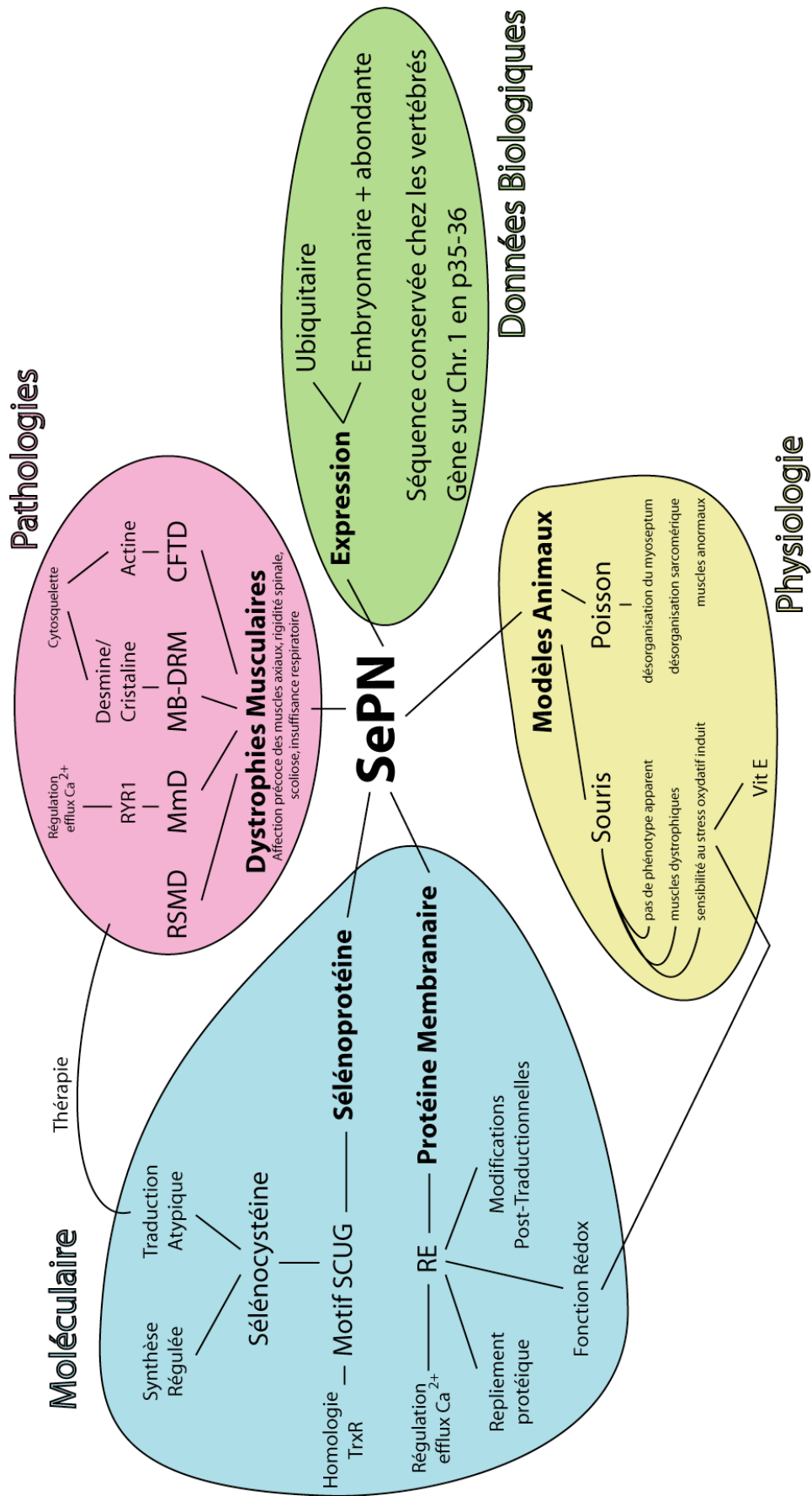


Figure 50: La sélénoprotéine N: bilan et perspectives
RYR1 : récepteur ryanodine de type 1 ; RSMD : Rigid Spine Muscular Dystrophy; MB-DRM: Mallory Body like-Desmin Related Myopathy; CFTD: Congenital Fiber Type Disproportion; SePN: sélénoprotéine N; Vit E: vitamine E; TrxR: thioredoxine réductase; RE: réticulum endoplasmique.

L'ensemble de nos travaux a contribué à mieux comprendre le rôle de la sélénoprotéine N, en particulier, dans la fonction musculaire, mais également d'augmenter nos connaissances sur le rôle biologique de l'oligo-élément sélénium dans la physiologie du muscle. L'identification de la fonction de SePN et de ses substrats apportera des informations fondamentales. L'étude en cours des souris invalidées devrait permettre de mieux comprendre les aspects physiologiques de ces pathologies, notamment aux stades embryonnaires précoces. Les expériences d'ores et déjà réalisées sur les animaux constituent les premières étapes de cette exploration fonctionnelle. La suite de ces études permettra d'aborder le rôle de la vitamine E dans ces pathologies et pourrait avoir des conséquences thérapeutiques intéressantes. Si un apport alimentaire de vitamine E diminuait la gravité des symptômes, cela permettrait d'entrevoir une amélioration des conditions de vie des patients par un traitement extrêmement simple et dont l'innocuité est avérée. Le but ultime de l'ensemble de ces travaux est de développer des outils de diagnostic, tels que des tests enzymatiques basés sur l'activité catalytique de SePN ou l'analyse de ses substrats, ainsi que des approches thérapeutiques ciblées qui dérivent de nos modèles prédictifs, comme illustré par cette première approche décrite dans cette thèse pour une mutation particulière du gène SEPN1.

1. MATERIELS

1.1. Souches bactériennes: *E.coli*

- **TG2:** souche utilisée pour les expériences de clonage et d'amplification de plasmides.
- **CJ236:** souche délétée des gènes DUT1 (dUTPase) et UNG1 (uracyl N-glycosylase) qui permet l'incorporation statistique de désoxyuraciles à la place de thymines dans l'ADN. Elle est utilisée pour la mutagenèse dirigée selon la technique de Kunkel.
- **MV1190:** souche dut⁺ ung⁺ qui permet la contre sélection du brin parental uracilé lors des expériences de mutagenèse dirigée selon la technique de Kunkel.
- **BL21 RIL:** souche utilisée pour la surproduction de protéines. Elle possède un plasmide codant pour 3 ARNt isoaccepteurs eucaryotes Arginine (R), Isoleucine (I), Leucine (L), ce qui permet à la bactérie de compenser le biais d'utilisation de codons entre procaryotes et eucaryotes.
- **TAP90:** souche utilisée pour l'amplification et le criblage de banques. Elle possède les gènes permettant l'expression des pili nécessaires à l'infection par le phage λ .

1.2. Vecteurs de clonage

- **pSK(-):** ce phagemide comporte une cassette de clonage à l'intérieur du gène LAC Z, une origine de répllication bactérienne et une origine fl permettant la production d'ADN simple brin.
- **pASK-IBA7 (IBA, Bioanalytik):** ce vecteur permet l'expression de protéines de fusion avec une étiquette de type strep-tag[®] 2. Il possède en effet, en amont de sa cassette de clonage, une séquence nucléotidique codant pour un peptide de 8 acides aminés, analogue de la biotine, qui permet la purification rapide de la protéine surexprimée par chromatographie d'affinité sur des billes de sépharose substituées par de la streptactine, un analogue de la streptavidine. En amont de cette séquence, on trouve un site de liaison des ribosomes et le promoteur transcriptionnel inductible par la tétracycline.

- **pQE32 (Qiagen):** ce vecteur d'expression permet la surproduction d'une protéine, grâce à son promoteur inductible par l'IPTG, situé en amont de sa cassette de clonage.
- **pGEM-T easy (Promega):** ce vecteur permet le clonage aisé des produits de PCR, auxquels la Taq polymérase ajoute systématiquement un résidu adénosine terminal en 3'. Le vecteur linéaire possède un résidu thymidine protrudant à ses extrémités 3', permettant l'insertion facile du produit d'amplification.
- **pXJ41:** ce vecteur permet l'expression de protéines recombinantes dans les cellules eucaryotes, sous la dépendance du promoteur HCMV. Il possède deux éléments nécessaires à l'expression de l'ADN complémentaire du gène d'une protéine: en amont de sa cassette de clonage, l'intron II de la β -globine de lapin et, en aval, le site de polyadénylation du SV40. Ce vecteur possède également une origine de réplication f1 permettant la synthèse d'ADN simple brin.
- **pTf16:** ce vecteur commercial (Takara) permet la surexpression chez *E. coli* d'une protéine chaperonne bactérienne, le « trigger factor ». Cette protéine est une proline isomérase, qui favorise le bon repliement des protéines surproduites chez *E. coli*, en permettant l'isomérisation correcte des résidus proline.

1.3. Phages

- **Phage assistant R408:** ce phage permet la synthèse d'ADN simple brin en infectant des cellules *E. coli* transformées par un plasmide possédant une origine de réplication et d'encapsidation phagique. Il comporte une mutation de sa propre origine de réplication, entraînant une synthèse plus importante d'ADN simple brin d'origine plasmidique, plutôt que phagique.
- **Banque d'ADN génomique de souris:** la banque que nous avons utilisée nous a été fournie par JM. Garnier (IGBMC, Strasbourg). Les fragments d'ADN génomique de souris d'environ 15 kb sont clonés dans le site *NotI* du bactériophage λ ZAP-II (Stratagene).

1.4. Anticorps anti-SEPN1

Cet anticorps polyclonal de lapin obtenu au laboratoire est dirigé contre la région N-terminale de SEPN1, localisée en amont du codon sélénocystéine UGA. Il est révélé par un

anticorps secondaire de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort qui permet d'oxyder le luminol (Petit et coll., 2003).

2. METHODES

2.1. Méthodes relatives à l'ADN

2.1.1. Techniques de clonage

2.1.1.a. Digestion par les enzymes de restriction

Chaque enzyme nécessite pour un fonctionnement optimal des conditions précises de force ionique, de pH et de température, ainsi que la présence ou non de BSA. Nous utilisons 3 à 5 unités d'enzymes par μg d'ADN dans le tampon approprié. Après 90 min de digestion, la taille des fragments obtenus est déterminée sur gel d'agarose, par comparaison avec des marqueurs de taille.

2.1.1.b. Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse

Les gels d'agarose sont utilisés de manière analytique pour séparer les fragments d'ADN et déterminer leur taille, ou de manière préparative, pour les purifier. Le pourcentage d'agarose utilisé varie selon la taille des fragments à séparer, de 0,5 à 2%, dans du tampon TBE (89 mM Tris-acide borique pH 8,3; 2 mM EDTA) et contenant 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BEt. Avant dépôt sur gel, les échantillons sont repris dans la solution de dépôt (solution de type III 6 X: 0,25% bleu de bromophénol; 0,25% xylène cyanol; 30% glycérol). La migration est effectuée dans le tampon TBE, sous un courant d'intensité constante de 70 mA pendant 45 min. Les fragments d'ADN sont visualisés par fluorescence sur une table à ultra-violets.

2.1.1.c. Récupération des fragments d'ADN après migration

Cette étape est réalisée à l'aide d'un kit (Qiaquick, QIAGEN). Le morceau d'agarose excisé contenant le fragment d'ADN d'intérêt identifié sous UV est incubé pendant 10 min à 50°C dans 3 volumes de tampon de dissolution. Après fusion complète de l'agarose, un volume d'isopropanol est ajouté et le mélange est appliqué sur une mini-colonne permettant la rétention de l'ADN. La colonne est rincée par 0,75 ml de tampon de lavage puis l'ADN est élué dans 30 μl d'eau. Les étapes de fixation de l'ADN, lavage et élution se font par centrifugation de la colonne à 13000 rpm pendant 1 min.

2.1.1.d. Formation d'extrémités franches

Cette étape permet d'obtenir des extrémités franches à partir d'extrémités cohésives. La T4 ADN polymérase possède une activité polymérase 5'→3' lui permettant de remplir les extrémités 5' sortantes et une activité exonucléase 3'→5' qui élague les extrémités 3' sortantes. L'ADN, à raison de 1 µg, est incubé pendant 20 min à 12°C avec 3 à 5 U de T4 ADN polymérase dans le tampon de digestion, en présence ou non de 100 µM de dNTP adéquats.

2.1.1.e. Déphosphorylation de l'extrémité 5' phosphate de l'ADN du vecteur

Cette étape permet de limiter la recircularisation des vecteurs linéarisés. La réaction s'effectue dans un rapport de 1 U de Calf Intestinal Phosphatase pour 3 µg de vecteur dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8,5 et 10 mM MgCl₂. Le mélange est incubé pendant 15 min à 37°C, 15 min à 56°C, puis 1 U de CIP est rajoutée, et le même cycle est répété.

2.1.1.f. Elimination des protéines

La plupart des réactions enzymatiques sont suivies d'une étape d'élimination des protéines enzymatiques. L'ADN est extrait par un volume de phénol-chloroforme (50% phénol; 46% chloroforme; 4% alcool isoamylique), puis précipité dans la carboglace en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et de 3 volumes d'éthanol absolu. Après 10 min de centrifugation à 13000 rpm, le culot est rincé avec 200 µl d'éthanol 70%, séché, et repris dans un volume adéquat de tampon TE pH 8 (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA).

2.1.1.g. Ligation

Vecteur et insert pourvus d'extrémités compatibles sont incubés dans le rapport 1/3 dans le tampon ligase (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 10 mM DTT) en présence de 1 U de T4 ADN ligase. La ligation s'effectue à une température de 4 à 22°C, pendant 1 à 16 heures, selon la taille de l'insert et la nature des extrémités.

2.1.1.h. Transformation de bactéries par la technique du chlorure de calcium

Les bactéries sont rendues compétentes par un traitement aux ions calcium qui perméabilisent les membranes. Une préculture de 4 ml de milieu 2YT (10 g/l extraits de levure; 16 g/l tryptone; 5 g/l NaCl),ensemencée avec une colonie, est incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation. Un volume de 50 ml de milieu 2YT est ensuite ensemencé avec 2

ml de préculture jusqu'à obtention d'une DO_{550} comprise entre 0,3 et 0,6 (phase exponentielle de croissance). Le culot de bactéries, obtenu après une centrifugation de 7 min à 3000 rpm, est repris dans 10 ml d'une solution stérile (10 mM PIPES-NaOH pH 7; 60 mM $CaCl_2$; 15% glycérol). Après une heure à 4°C, les bactéries devenues compétentes sont à nouveau centrifugées à 2500 rpm pendant 5 min, puis reprises dans 4 ml de la même solution. Des aliquotes de 100 μ l sont conservées à -80°C. La réaction de transformation s'effectue dans la glace lorsque 100 μ l de bactéries compétentes décongelées rapidement sont mises en présence de 10 μ l de mélange de ligation pendant 10 min. Après incubation de 2 min à 42°C, puis de 3 min dans la glace (choc thermique), les bactéries sont étalées sur milieu 2YT gélosé (2YT + 15 g/l bacto-agar) contenant un antibiotique approprié permettant la sélection des bactéries transformées (100 μ g/ml d'ampicilline ou 30 μ g/ml de chloramphénicol).

2.1.1.i. Préparation fraîche de bactéries compétentes au $CaCl_2$

Il s'avère parfois nécessaire d'utiliser des cellules préparées extemporanément. Trente millilitres de milieu 2YT sontensemencés avec 1 ml de culture saturante dans un tube Falcon 50 ml, et incubés sous agitation pendant environ 1 heure de façon à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,6. La culture est centrifugée pendant 10 min à 3000 rpm à 4°C. Le culot est repris stérilement dans 15 ml de $CaCl_2$ 50 mM, et laissé pendant 20 min dans la glace. L'opération est renouvelée et le culot repris cette fois dans 3 ml de $CaCl_2$ 50 mM, conservé dans la glace pendant 20 min et jusqu'à 24h. Trois-cent microlitres de cellules compétentes sont ajoutés au milieu de ligation, et laissés pendant 45 min dans la glace. Le choc thermique court (45 sec à 42°C) est suivi d'une incubation pendant 5 min dans la glace, avant étalement.

2.1.1.j. Préparation de bactéries électrocompétentes

Cinq-cent millilitres de milieu 2YT sontensemencés avec 5 ml de préculture saturante d' *E.coli*. La culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre une valeur de DO_{600} allant de 0,5 à 0,8. La culture est alors fractionnée dans 10 tubes Falcon de 50 ml pré-refroidis, que l'on placera dans la glace pendant 30 min. Les cellules sont ensuite concentrées par des centrifugations successives pendant 10 min à 4000 rpm. Chaque culot est repris successivement dans 50 ml, 25 ml, 10 ml, enfin 1 ml d'eau distillée stérile, après une centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm. Les cellules peuvent ainsi être congelées sous la forme d'aliquotes de 50 μ l, et stockées à -80°C. Les sels, provoquant une augmentation de la conductivité électrique, doivent être éliminés du milieu de ligation, tout comme les éléments

pouvant diminuer le taux de transformation. L'ADN est extrait du milieu de ligation au phénol-chloroforme, puis précipité et lavé à l'éthanol 70%. Le culot, repris dans 10 µl d'eau stérile, est mis en présence de 50 µl de cellules électrocompétentes dans une cuve d'électroporation pré-refroidie de 0,2 cm. Les cellules subissent alors un choc électrique lorsque la cuve est placée sous une tension de 2,4 kV, avec une résistance de 200 Ω, et une capacité de 25 µF. Deux-cent microlitres de milieu 2YT sont rajoutés immédiatement. Les cellules transformées sont ensuite étalées sur un milieu 2YT + antibiotique.

2.1.2. Préparation d'ADN double brin à partir d'*E.coli*

2.1.2.a. Minipréparation d'ADN plasmidique par la technique de lyse alcaline

Cette méthode permet d'obtenir entre 5 et 15 µg de plasmide pour 1 ml de culture à partir d'un clone d'*E.coli* transformé. Cet ADN plasmidique peut ensuite être utilisé pour des expériences de séquençage ou de clonage. Le culot correspondant à une culture saturante de 1,5 ml de bactéries cultivées dans du milieu 2YT avec antibiotique est repris dans 100 µl de solution minipréparation (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucose; 10 mM EDTA; 4 mg/ml lysozyme), puis additionné de 200 µl de solution de lyse (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Les protéines, ARN de grande taille et ADN génomique sont précipités par adjonction de 150 µl d'acétate de potassium 3 M. Après incubation pendant 5 min dans la glace et centrifugation de 5 min à 13000 rpm, les protéines du surnageant sont extraites par 450 µl de phénol-chloroforme. L'ADN plasmidique de la phase aqueuse est ensuite précipité par 900 µl d'éthanol absolu, lavé, séché et repris dans 30 µl de tampon TE additionné de RNase A (20 µg/ml), pour une incubation d'une heure à 37°C.

2.1.2.b. Midipréparation d'ADN plasmidique

Pour cette technique, nous avons utilisé le kit Jetstar (GENOMED) qui permet de produire de 100 à 500 µg d'ADN plasmidique purifié à partir de 50 ml de culture. La première étape de lyse des bactéries et de neutralisation à l'acétate de potassium est identique à la méthode ci-dessus. Le surnageant est ensuite déposé sur une colonne préalablement équilibrée avec le tampon E4 (acide acétique pH 5; 100 mM acétate de sodium; 600 mM NaCl; 0,15% Triton X-100). Après 2 étapes de lavage par 10 ml de solution E5 (acide acétique pH 5; 100 mM acétate de sodium; 800 mM NaCl), l'ADN plasmidique retenu est élué par 5 ml de tampon E6 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 1250 mM NaCl) puis précipité par 3,5 ml d'isopropanol. Repris dans 500 µl de TE, il est reprécipité dans 1,5 ml d'éthanol absolu et

50 µl d'acétate de sodium 3 M. Après lavage et séchage, le culot est resuspendu dans 200 µl de TE. La concentration en ADN est déterminée par spectrophotométrie: une unité d'absorption à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin ou 40 µg/ml d'ADN simple brin. Le degré de pureté (c'est-à-dire l'absence de protéines), est évalué par le rapport DO_{260}/DO_{280} qui doit être proche de 1,8.

2.1.2.c. Maxipréparation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium

Cette technique est utilisée afin d'obtenir un DNA plasmidique en grande quantité et d'un degré de pureté maximum permettant de transfecter efficacement des cellules eucaryotes. Cinquante millilitres de milieu 2YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline sontensemencés avec 500 µl d'une préculture saturante de bactéries TG2 recombinantes, et incubés pendant 16 heures à 37°C, sous agitation forte. La culture saturante est centrifugée pendant 15 min à 3000 rpm. Les cellules sont lavées dans 5 ml de Tris-HCl pH8 10 mM, et centrifugées pendant 2 min à 7000 rpm. Le culot soigneusement séché subit ensuite les étapes de lyse suivantes:

- Ajouter 2,5 ml de solution de lyse contenant 4 mg/ml de lysozyme. Vortexer en laissant la pipette de 2 ml dans le tube Falcon. Incuber pendant 5 min à température ambiante en agitant de temps en temps.
- Ajouter 5 ml de NaOH 0,2N, SDS 1%. Mélanger par 5 inversions, puis placer le tube pendant 5 min dans la glace.
- Neutraliser le milieu en ajoutant 3,75 ml d'AcK 3M (conservé au froid), agiter vigoureusement, et incubé pendant 5 min dans la glace. Centrifuger pendant 10 min à 7000 rpm, et transférer le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml.
- Rajouter 7 ml d'isopropanol, et laisser précipiter pendant 1 min à température ambiante. Centrifuger 10 min à 3000 rpm, puis rincer le culot avec 2 ml d'éthanol 70%.
- Sécher le culot et le reprendre dans 5 ml de solution de CsCl +TE (1,08 g/ ml de TE pH8). Ajouter 150 µl de BEt (bromure d'éthidium) à 10 mg/ml.
- Homogénéiser doucement et placer le tube dans la glace pendant 5 min. Centrifuger 15 min à 3000 rpm. Remplir un tube Beckmann avec le surnageant, et compléter avec une solution de CsCl de même densité. Le tube scellé est ultracentrifugé pendant 2h30 à 90 000 rpm à 18°C. Le gradient établi permet de séparer ADN plasmidique et ADN génomique en deux bandes. Les ARN sédimentés apparaîtront sous la forme d'une traînée sur la paroi du tube. La bande inférieure correspondant à l'ADN plasmidique (0,5 ml) est prélevée à l'aide d'une seringue et transférée dans un microtube de 2 ml. Le BEt est ensuite extrait 5 fois par 1 volume d'isopropanol

additionné de 60 µl de TE si un précipité de CsCl est observé. La phase inférieure propre est ensuite précipitée à l'éthanol 70%, centrifugée pendant 10 min, puis le culot est repris dans 300 µl de TE pH8 et précipité à nouveau dans 30 µl d'AcNa 3 M pH6 et 3 volumes d'éthanol. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, et repris dans un volume minimum de TE pH8. On détermine ensuite la concentration du plasmide et la pureté de la préparation par une lecture de la densité optique à 260 nm et 280 nm. La préparation sera d'autant plus pure, c'est-à-dire dépourvue de contaminants protéiques ou RNA, que le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} est proche de 1,8.

2.1.3. Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) permet d'amplifier de manière exponentielle une séquence d'ADN particulière, à l'aide d'oligonucléotides situés de part et d'autre de cette séquence, grâce à une Taq polymérase thermostable. Une colonie bactérienne, ou 50 ng d'ADN, est placée dans 30 µl de tampon PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,9; 50 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,25 mM dNTP; 0,2 µM de chaque primer; NP40 0,5%; gélatine 1 mg/ml; 0,5 U Taq polymérase). Après homogénéisation et une première étape de dénaturation de 3 min à 94°C, 25 cycles de 3 fois 1 min à 94°C, 45°C et 72°C sont effectués, puis terminés par une dernière phase d'élongation de 5 min à 72°C. Le nombre de cycles, les températures et le temps de chaque étape sont choisis en fonction de la quantité, la nature et la taille de la matrice à amplifier. Pour l'analyse, 10 µl du mélange sont additionnés de 2 µl de bleu de dépôt de type III (paragraphe 1.1) et déposés sur gel d'agarose.

2.1.4. Mutagenèse dirigée par la technique de Kunkel

La première étape consiste à produire de l'ADN simple brin désoxyuracylé. Pour cela, une culture d'un clone d'E.coli CJ236, transformé par le plasmide portant la séquence à muter, est incubée à 37°C jusqu'à une $DO_{600} = 0,5$. Ensuite, $15 \cdot 10^{10}$ pfu (plaque forming unit) de phage assistant R408 sont ajoutés et l'incubation se poursuit pendant 7 heures sous forte agitation. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 2800 rpm et le surnageant contenant les phages collectés est soumis à une nouvelle centrifugation de 10 min à 7000 rpm. Les particules phagiques du surnageant sont alors précipitées dans 5 ml d'une solution (PEG 20%; NaCl 2,5 M) pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugées pendant 10 min à 10000 rpm. Le culot est repris dans 500 µl de TE pH 8. L'ADN désoxyuracylé est alors extrait au phénol-chloroforme et précipité comme précédemment décrit. Sa concentration est déterminée par spectrophotométrie et sa qualité vérifiée sur gel d'agarose 1%. Cinquante

picomoles d'oligonucléotide porteur de la mutation sont phosphorylés par 2,5 U de T4 polynucléotide kinase dans 30 µl de tampon de phosphorylation (70 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 5 mM DTT) pendant 30 min à 37°C puis 10 min à 70°C, pour inactiver l'enzyme. L'hybridation de 200 ng d'ADN simple brin à 2,5 pmol d'oligonucléotide phosphorylé est réalisée dans 10 µl d'un milieu réactionnel contenant 1 µl de tampon d'hybridation 10 X (200 mM Tris-HCl pH 7,4; 20 mM MgCl₂; 500 mM NaCl) par une incubation de 10 min à 70°C, 30 min à 37°C puis 5 min dans la glace. La synthèse du second brin s'effectue alors par adjonction de 2 U de T4 ADN ligase, 1 U de T4 ADN polymérase, 1 µl d'ATP 10 mM et 1 µl de tampon de synthèse 10 X (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM MgCl₂; 5 mM dNTP; 20 mM DTT) et une incubation de 5 min dans la glace, 5 min à 25°C puis 1h30 à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 90 µl de tampon stop (10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA). Des cellules *E.coli* MV1190 compétentes sont transformées avec 10 µl de mélange final. Les clones mutants sont identifiés par séquençage ou digestion par enzyme de restriction (si un nouveau site est créé) après préparation d'ADN plasmidique.

2.1.5. Séquençage de l'ADN à la T7 ADN polymérase

Cette technique repose sur l'incorporation de didésoxyribonucléotides, et par conséquent sur l'arrêt statistique de l'élongation de la chaîne d'ADN (Sanger et coll., 1977). Deux microgrammes d'ADN double brin sont dénaturés pendant 10 min dans 10 µl de NaOH 0,2 N puis précipités, centrifugés et rincés comme décrit plus haut. Le culot obtenu est repris dans 10 µl d'eau, auxquels sont ajoutés 2 µl de tampon d'hybridation (280 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 350 mM NaCl) et 2 pmol d'oligonucléotide amorce. Après incubation pendant 10 min à 60°C puis 10 min à température ambiante, 6 µl de mélange d'extension (2 µM dCTP; 2 µM dGTP; 2 µM dTTP; 50 mM DTT; 3 µCi [α -³⁵S] dATP à 3000 Ci/mmol; 2 U Séquenase) sont ajoutés et l'incubation se poursuit pendant 3 min à température ambiante. Dans 4 puits d'une microplaque, 4,5 µl de mélange réactionnel sont additionnés de 3,5 µl de tampon de terminaison (40 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 40 mM MgCl₂; 150 µM dNTP; 15 µM d'un des 4 ddNTP), et incubés pendant 5 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 4 µl de dye-mix (10 ml formamide; 10 mg xylène cyanol; 10 mg bleu de bromophénol; 400 µl EDTA 500 mM). Trois microlitres de chaque réaction sont alors déposés, après dénaturation de 5 min à 90°C, sur un gel de polyacrylamide 6% (acrylamide/bisacrylamide 19:1; urée 8 M; TBE) et la migration s'effectue à 65 W constants dans le même tampon TBE, pendant 90 min à 4 heures selon la distance de lecture souhaitée.

Le gel est ensuite fixé à l'acide acétique 10%, séché sous vide pendant 1 heure et révélé par autoradiographie.

2.1.6. Criblage d'une banque d'ADN génomique de souris

2.1.6.a. Titration de la banque

Pour déterminer la concentration en phage de la banque λ ZAP-II, et permettre ensuite de réaliser le criblage dans des conditions optimales, 5 dilutions en cascade au dixième de la solution stock du phage sont effectuées dans du tampon SM (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; gélatine 0,01%). Cinq ou dix microlitres de chaque dilution de phage sont ensuite mélangés à 200 μl de cellules tapis préparées comme suit: une colonie TAP90 est cultivée à 30°C dans 20 ml de milieu de culture (2YT + 0,2% maltose), puis reprise, après centrifugation, dans 10 mM de MgSO_4 , de façon à obtenir 2 unités de $\text{DO}_{600}/\text{ml}$. Le mélange cellules/phages est incubé pendant 20 min à 37°C, puis 2,5 ml de NZY top-agarose 0,7% (7 g/l agarose; 21 g/l NZY broth; 5 g/l NaCl; 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5 g/l yeast extract; 10 g/l NZ amine) à 55°C sont ajoutés. Le mélange est étalé sur NZY gélosé (21 g/l NZY broth; 15 g/l bacto-agar) et incubé à 37°C pendant 8 à 10 heures. Le titre du phage est déterminé par comptage des plages de lyse sur les boîtes correspondant aux différentes dilutions.

2.1.6.b. Préparation de la sonde marquée

Les 2 sondes utilisées ont été obtenues par PCR, à partir de la construction pSelN6. La sonde 5' est obtenue avec les oligonucléotides AL157 et 139, la sonde 3' avec AL135 et 125. Leur marquage s'effectue par la technique du random-priming, à l'aide du kit Prime-It II de Stratagene. Une quantité de 25 ng de fragment d'ADN est incubée pendant 5 min à 100°C, en présence de 10 μl de nonanucléotides de séquence aléatoire, dans un volume total de 34 μl . Après une brève centrifugation, 10 μl de solution dCTP 5 X (0,1 mM dATP; 0,1 mM dGTP; 0,1 mM dTTP), 5 μCi [α - ^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmol) et 5 U du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I sont ajoutés, et l'incubation se poursuit pendant 10 min à 37°C. L'ajout de 2 μl de solution stop (EDTA 0,5 M) et de 2 μl d'ARNt total de levure (10 mg/ml) permet d'arrêter la réaction. Les nucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés par passage du milieu réactionnel sur colonne Séphadex G25. L'efficacité du marquage est déterminée par comptage de la radioactivité. La sonde est dénaturée pendant 5 min à 100°C avant d'être ajoutée au milieu d'hybridation.

2.1.6.c. Criblage de la banque

A 600 µl de cellules tapis préparées comme décrit précédemment sont ajoutés 50000 pfu de phages de la banque pour une incubation de 20 min à 37°C. Après ajout de 6,5 ml de NZY top-agarose 0,7% à 55°C, l'ensemble est étalé sur des grandes boîtes NZY. Après 10 heures à 37°C, les boîtes sont placées pour une heure à 4°C, puis 2 filtres (Optitran, Schleicher & Schüll) y sont déposés successivement, pendant 1 ou 3 min. Les filtres sont ensuite déposés, face vers le haut, chacun pendant 5 min sur 5 ml de solution de dénaturation (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), 5 min sur 5 ml de tampon de neutralisation (1 M Tris-HCl pH 8; 1,5 M NaCl), et enfin 3 min sur 5 ml de solution d'équilibrage (1,5 M NaCl; 82,2 g/l citrate de sodium). L'ADN est alors fixé aux membranes par pontage aux UV, puis celles-ci sont préhybridées pendant 6 heures dans 37,5 ml de solution de préhybridation contenant 50% formamide désionisée, SSC 6 X (58,4 g/l NaCl; 29,4 g/l citrate de sodium), Denhardt 5 X (1 g/l Ficoll 400; 1 g/l polyvinylpyrrolidone; 1 g/l BSA), 0,1% SDS et 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Enfin, l'hybridation de 10⁶ cpm/ml de sonde dénaturée s'effectue pendant une nuit dans 12 ml de la même solution. Préhybridation et hybridation s'effectuent sous rotation douce à 42°C. Les filtres sont ensuite rincés, puis lavés 3 fois pendant 15 min à 42°C dans la solution de lavage 1 (SSC 2 X; SDS 0,1%). Si la décroissance de la radioactivité résiduelle sur les filtres n'est pas assez importante, deux lavages supplémentaires de 10 min à 65°C dans la solution de lavage 2 (SSC 0,2 X; SDS 0,1%) sont possibles. Les filtres sont alors placés pendant une nuit sous autoradiographie à -80°C, avec écran intensificateur. La position des clones positifs est identifiée par superposition des repères des films et des boîtes. Le carré de gélose correspondant à une plage est découpé stérilement puis immergé dans 500 µl de tampon SM additionné de 10 µl de chloroforme. Les phages ainsi élués sont titrés, puis utilisés pour le criblage secondaire puis tertiaire, jusqu'à obtention d'un clone isolé. Un même filtre peut être criblé par plusieurs sondes. Il suffit pour cela de le traiter pendant 10 min avec une solution de déshybridation (0,1 % SDS) bouillante.

2.1.6.d. Préparation d'ADN phagique

Un volume de phages obtenu après élution d'une plage de lyse isolée est étalé sur une petite boîte NZY en présence de tapis bactérien, jusqu'à confluence des plages de lyse. La boîte est placée sous agitation légère pendant 5 heures après addition de 2,5 ml de tampon SM. Le tampon est collecté et additionné de 20 µl de chloroforme pour lyser les bactéries. Après titration de la suspension phagique obtenue, 200 µl de cellules TAP90 tapis à 2

DO₆₀₀/ml dans 10 mM MgSO₄ sont incubées pendant 20 min à 37°C en présence de 4.10⁶ pfu, puis le mélange est incubé pendant une nuit à 37°C, dans 25 ml de milieu 2YT + 10 mM MgSO₄ + 0,2% maltose. Si la lyse est incomplète, on ajoute 20 ml de milieu préchauffé et on poursuit l'incubation pendant 3 heures. Les bactéries restantes sont lysées par addition de 1/10 de volume de chloroforme, et après 30 min d'agitation forte le mélange est centrifugé pendant 15 min à 5000 rpm. Vingt millilitres du surnageant sont incubés pendant 60 min à 37°C en présence de 20 µl de DNase (10 mg/ml) et 20 µl de RNase (10 mg/ml). Dix millilitres de PEG-NaCl (30% PEG 600; 2,5 M NaCl) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 1 heure dans la glace. Après une centrifugation de 20 min à 10000 rpm, le culot est repris dans 400 µl de TE pH 8, en présence de 10 µl SDS 10%, 10 µl EDTA 0,5 M et 7 µl de protéinase K (7,5 mg/ml) pendant 30 min à 37°C. Deux extractions successives au phénol-chloroforme sont alors effectuées, puis l'ADN est précipité et lavé comme décrit plus haut. Après solubilisation dans 100 µl de TE pH 8, l'ADN phagique ainsi préparé peut être utilisé pour des réactions de digestion, sous-clonage ou amplification par PCR.

2.2. Méthodes relatives aux protéines

2.2.1. Surproduction de protéine

2.2.1.a. Surproduction d'une protéine en fusion avec l'étiquette strep-tag[®] 2

Une colonie BL21 RIL transformée par la construction clonée dans pASK-IBA7 est cultivée pendant une nuit à 37°C dans 5 ml de milieu 2YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 30 µg/ml de chloramphénicol. Un volume de 2,5 ml de cette préculture sert à ensemercer 250 ml. Lorsque la culture atteint une DO₆₀₀ = 0,6, la synthèse protéique est induite par 25 µl d'anhydrotétracycline (2 mg/ml), un analogue stable de la tétracycline, et l'incubation est poursuivie pendant 4 heures. Les cellules sont alors récoltées par centrifugation pendant 15 min à 3500 rpm et les culots congelés à -80°C.

2.2.1.b. Préparation d'extraits protéiques cytoplasmiques

Les culots décongelés rapidement sont repris dans 5 ml de tampon W (100 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA), et soniqués dans la glace pendant 10 fois 10 sec à 120 W, puis 6 fois 10 sec à 80 W, par aliquotes de 750 µl. Les tubes sont centrifugés pendant 30 min à 13000 rpm. Le surnageant est collecté et le culot est resuspendu dans 1 volume de tampon W. Un volume équivalent de chacune de ces fractions est dénaturé pendant 5 min à

100°C, en présence d'un quart de volume de tampon de charge 4 X (250 mM Tris-HCl pH 8; 8% SDS; 20% β -mercaptoéthanol; 40% glycérol; 0,02% bleu de bromophénol). Les protéines sont fractionnées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8%, en présence de SDS, appelé SDS-PAGE (gel de séparation: 1,33 ml Rotiphorèse gel 30; 1,87 ml Tris-HCl 1 M pH 8,9; 1,67 ml H₂O; 50 μ l SDS 10%; 50 μ l persulfate d'ammonium 10%; 5 μ l TEMED / gel de concentration: 0,83 ml Rotiphorèse gel 30; 0,63 ml Tris-HCl pH 6,7; 3,42 ml H₂O; 100 μ l SDS 10%; 100 μ l persulfate d'ammonium 10%; 10 μ l TEMED). La migration est effectuée pendant 70 min à 120 V constants dans le tampon de migration Tris-glycine pH 8 (3 g/l Tris; 14,5 g/l glycine; 1 g/l SDS). Afin de révéler les protéines, le gel est coloré pendant 1/2 heure dans la solution de coloration (50% éthanol; 10% acide acétique; 0,03% bleu de Coomassie), puis décoloré dans une solution contenant 25% éthanol et 10% acide acétique.

2.2.1.c. Préparation d'extraits protéiques périsplasmiques

Le protocole est identique à celui de la préparation d'extraits protéiques cytoplasmiques, à la seule différence que les culots décongelés sont repris dans 5 ml de tampon P (100 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM saccharose; 1 mM EDTA) et incubés pendant 30 min dans la glace. Les cellules non lysées sont sédimentées par centrifugation et le surnageant correspond à la fraction périsplasmique libérée.

2.2.1.d. Purification d'une protéine surproduite

Un volume de 5 ml d'extrait protéique total est mélangé à 1 ml de billes de Sépharose substituées par la streptactine préalablement équilibrée 2 fois avec 5 ml de tampon W. La suspension est mise en rotation pendant une heure à 4°C dans un support de chromatographie, puis les billes sont sédimentées pendant 10 min. Le volume mort est récupéré, puis la colonne est lavée 5 fois avec 1 ml de tampon W. La protéine est ensuite éluée avec 7 fois 500 μ l de tampon E (tampon W + 2,5 mM desthiobiotine). La colonne est régénérée par 10 ml de tampon R (tampon W + 1 mM acide hydroxyazobenzène carboxylique). Une aliquote de 15 μ l de chaque fraction est analysée sur SDS-PAGE pour suivre les différentes étapes de la purification. Les fractions contenant la protéine d'intérêt éluée sont rassemblées et dialysées 2 fois pendant 1 heure dans le tampon de dialyse (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 120 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 20 % glycérol).

2.2.2. Analyse des protéines par immuno-détection (Western blot)

2.2.2.a. Transfert des protéines sur membrane

Après fractionnement sur SDS-PAGE comme décrit plus haut, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). Une membrane préalablement immergée dans le méthanol puis équilibrée dans le tampon de transfert pH 8 (3 g/l Tris; 14,4 g/l glycine; 20% éthanol) est disposée sur le gel, entre 2 fois 2 feuilles de papier Whatman. Le transfert s'effectue dans ce tampon pendant 2 heures à 4°C avec agitation, sous une intensité de 200 mA. La membrane est séchée, colorée pendant 15 sec au Rouge Ponceau (0,5% dans 1% acide acétique) puis lavée dans l'eau, et enfin équilibrée dans le tampon PBS pH 8 (4 mM KH_2PO_4 ; 16 mM Na_2HPO_4 ; 115 mM NaCl).

2.2.2.b. Révélation avec l'anticorps de lapin anti-SEPN1

La membrane, sur laquelle les protéines ont été transférées, est saturée par incubation pendant 1 heure dans le tampon de blocage (PBS; 3% lait en poudre; 0,1 % Tween-20), puis hybridée pendant 2 heures dans 10 ml du même tampon en présence de l'anticorps anti-SEPN1 dilué au 1/2000. La membrane est alors lavée pendant 3 fois 15 min dans le tampon de lavage (PBS; 0,1% Tween-20), et l'hybridation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (dilué au 1/10000) s'effectue pendant une heure dans 15 ml de tampon de blocage. La membrane est alors lavée pendant 2 fois 15 min dans le tampon de lavage, puis 2 fois 5 min dans du PBS. La réaction antigène/anticorps est révélée par chimioluminescence. La membrane est mise en contact pendant une minute avec un mélange de 2 ml de chacun des réactifs du kit de détection ECL d'Amersham, puis révélée en chambre noire pendant 1 à 5 min.

2.2.3. Dosage des protéines par la technique de Lowry, selon le protocole Pierce

Il s'agit d'une réaction colorimétrique basée sur la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. Cette réaction est mesurée par l'absorption à 562 nm. Un volume de 1 ou 5 μl de protéine à doser est mis en présence de 500 μl de mélange réactionnel (25 volumes de réactif A; 25 volumes de réactif B; 1 volume de réactif C du protein quantitation kit d'Uptima, Pierce), et incubés pendant 1 heure à 37°C. Les DO sont mesurées et la concentration de la protéine est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage.

2.2.4. Marquage radioactif de la protéine

Dix microlitres de protéines recombinantes (5 µg), portant le pentapeptide spécifiquement reconnu et phosphorylé par la heart-muscle-kinase (HMK) de bœuf, sont incubés pendant 30 min à 4°C dans 50 µl de tampon de phosphorylation (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 12 mM MgCl₂; 50 µCi [γ -³²P] ATP à 3000 Ci/mmol, 10 U de HMK). La réaction est arrêtée par adjonction de 500 µl de tampon stop (10 mM phosphate de sodium pH 8; 10 mM pyrophosphate de sodium; 10 mM EDTA; 1 mg/ml BSA) et les nucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés par filtration sur colonne Séphadex G50. L'efficacité du marquage est déterminée par comptage de la radioactivité.

2.2.5. Technique du far-western

Une membrane sur laquelle des extraits protéiques ont été transférés, est saturée pendant au moins une nuit dans le tampon de blocage (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 75 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 1,25 mM CaCl₂; 5% lait en poudre; 1% Tween-20), puis hybridée pendant une nuit dans 20 ml du même tampon additionné de 2,5 µg de protéine-sonde marquée. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois pendant 30 minutes à température ambiante dans le même tampon sans lait. Les membranes sont alors mises en exposition autoradiographique pendant 12 heures ou plus si le signal est trop faible.

2.2.6. Préparation de microsomes à partir de cellules en culture

Les cellules récoltées dans du PBS (25 mM Na₂HPO₄; 2,5 mM KH₂PO₄; 150 mM NaCl) à partir de 20 boîtes, sont rincées une fois dans le même tampon, reprises dans 1 ml de tampon HEPES (10 mM Hepes, pH 7,2; inhibiteurs de protéases 1 X (cocktail Sigma-Aldrich)) puis cassées par quatre-vingts mouvements de va-et-vient dans un potter verre/verre à 4°C. Un millilitre de tampon saccharose A (10 mM HEPES, pH 7,2; 0,5 M saccharose; inhibiteurs de protéases 1 X) est ajouté et l'ensemble est homogénéisé par 10 va-et-vient de potter supplémentaires, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant 1 (SN1) est collecté et le culot est repris dans 1 ml de tampon sucrose B (10 mM HEPES, pH 7,2; 0,25 M sucrose; inhibiteurs de protéases) et homogénéisé par quatre-vingts mouvements de potter. L'homogénat ainsi obtenu et le SN1 sont centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les deux surnageants sont rassemblés et centrifugés dans un rotor à angle fixe à 100000 g pendant 60 min à 4°C. On obtient des culots blanchâtres correspondant aux microsomes, qui sont resuspendus dans 1 ml de tampon saccharose A par dix

mouvements de potter. Enfin, les microsomes sont lavés par 1 ml de KCl 1,2 M afin d'éliminer les protéines associées aux microsomes, sans décrocher les protéines membranaires. Le mélange est recentrifugé à 100000 g pendant 30 min à 4°C pour obtenir un culot de « clear microsomes ». Ceux-ci sont repris dans le tampon saccharose A, aliquotés puis stockés à -80°C.

2.2.7. Préparation de microsomes à partir de muscles

Ce protocole est décrit par (Zorzato et coll., 2000). Les muscles des pattes postérieures de lapins, rats ou souris, fraîchement tués, sont prélevés et congelés immédiatement dans la glace carbonique. Le jour de la préparation, les muscles sont hachés finement sur la glace avec un scalpel et répartis par aliquotes d'environ 5 ml dans des tubes Falcon de 50 ml. Trente millilitres de tampon saccharose (10 mM HEPES, pH 7,2; 0,3 M saccharose; inhibiteurs de protéases 1 X) sont ajoutés et l'ensemble homogénéisé avec un Polytron PT3000 (Kinematica) pendant 1 min à 25000 rpm. L'homogénat est filtré sur 3 couches de gaze, sous aspiraton avec une trompe à vide. Le filtrat est centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant 1 (SN1) est conservé. Le culot est repris dans environ 30 ml de tampon saccharose B. Le SN1 et l'homogénat ainsi obtenus sont centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les deux surnageants sont collectés puis centrifugés à 100000 g pendant 60 min à 4°C. Chaque culot, correspondant aux microsomes, est repris dans 3 ml de tampon saccharose C (10 mM HEPES, pH 7,2; 300 mM KCl; 0,25 mM saccharose; inhibiteurs de protéases 1 X). Les suspensions sont rassemblées et recentrifugées à 100000 g pendant 30 min à 4°C. Cette étape permet d'éliminer la myosine. Chaque culot, correspondant aux « clear microsomes », est repris dans 3 ml de tampon saccharose C. Des aliquotes des différentes étapes de la préparation sont analysées en Western-blot après dosage des protéines par la méthode de Bradford.

2.2.8. Extraction des protéines associées aux membranes

Cinq cents microlitres de « clear microsomes » ou d'extraits bruts de cellules transfectées sont centrifugés à 13000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot est repris dans le même volume de tampon PAMS (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 1,25 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1% Triton X-100; inhibiteurs de protéases 1 X) et incubé pendant 30 min dans la glace ou sous agitation lente sur la roue à température ambiante. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 30 min à 4°C, le surnageant, correspondant aux Protéines Solubilisées des

Membranes (PSM), est prélevé. Le culot correspondant aux membranes résiduelles est conservé également. Les mêmes expériences ont été réalisées en substituant le Triton par d'autres détergents: CHAPS ou Digitonine. Pour certaines expériences, une étape supplémentaire de dialyse de ces extraits de protéines associées aux membranes solubilisées ont été réalisées dans le tampon adéquat ne contenant plus que 0,1% de détergent.

2.2.9. Purification par chromatographie d'affinité sur billes de streptactine-sépharose®

Cent microlitres de protéines associées aux membranes, solubilisées à partir d'extraits de cellules transfectées par différentes constructions permettant l'expression de formes recombinantes et étiquetées de la sélénoprotéine N, sont additionnées de 400 µl de tampon PAMS. Ce mélange est placé dans une mini-colonne et incubé sous rotation pendant 1 heure à 20°C en présence de 30 µl de billes de streptactine-sépharose® préalablement équilibrées dans le même tampon. L'effluent est récupéré par centrifugation rapide et les billes sont lavées trois fois pendant 15 min dans 500 µl de tampon PAMS à température ambiante. Les tampons de lavage sont récupérés par centrifugation et sont conservés. L'élution est réalisée par trois à cinq étapes de 15 min chacune en présence de 60 µl de tampon PAMS contenant 54 mg de desthiobiotine pour 100 ml (tampon d'élution). Les éluats sont récupérés par centrifugation. Les billes sont conservées. Des aliquotes des différentes étapes de la purification sont analysées sur SDS-PAGE. Les gels sont colorés à l'argent ou transférés sur membranes Immobilon-P (Amersham) pour des expériences de Western-blot. Une expérience témoin est réalisée en parallèle avec des extraits de cellules transfectées par une construction vide (contrôle) ou donnant lieu à l'expression d'une forme recombinante de la sélénoprotéine N non étiquetée.

2.2.10. Purification par chromatographie d'affinité sur billes de streptactine-sépharose® substituées

Cent microlitres de billes de streptactine-sépharose® sont équilibrés par deux lavages successifs dans 500 µl de tampon PAMS. Vingt-cinq microlitres de sélénoprotéine N recombinante étiquetée purifiée, surproduite chez *E. coli*, sont dilués dans 500 µl de tampon PAMS et ajoutés aux billes. L'ensemble est incubé sous rotation pendant deux heures à température ambiante. Après trois lavages par 500 µl de tampon PAMS, 500 µl d'extraits de PSM sont incubés en présence des billes. Ceci est réalisé sous rotation pendant deux heures à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C. Les billes sont ensuite lavées trois fois par

500 µl de tampon PAMS, puis l'élution est réalisée après 30 min d'incubation avec 100 µl du tampon d'élution desthiobiotine. Des aliquotes des différentes étapes sont analysées sur gel et en Western-blot. L'expérience témoin est réalisée en l'absence de protéine recombinante surproduite substituée sur les billes. Une étape de « preclear » peut-être incluse avant l'étape de fixation de la protéine recombinante surproduite sur les billes, par une pré-incubation avec des extraits de PSM. Une variante de cette technique consiste à préincuber la protéine recombinante surproduite avec les extraits PSM, afin de former les complexes, avant l'addition des billes de streptactine-sépharose®.

2.2.11. Co-immuno précipitation

Six cents microlitres de la fraction PSM sont incubés en présence de 15 µl de protéine A sépharose, préalablement lavée dans l'eau milliQ et équilibrée dans le tampon PAMS. Ce mélange est mis en rotation pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant est collecté et incubé en présence de 10 µl d'anticorps dirigés contre la protéine entière ou un peptide de SePN pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, 15 µl de protéine A sépharose sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 4 heures sous rotation à 4°C. Les billes sont lavées trois fois pendant 15 min avec 600 µl de tampon PAMS sous rotation à 4°C. L'élution est réalisée par l'addition d'un excès de peptide (0,6 mg/ml) pendant 1 heure à 4°C ou en chauffant les billes pendant 5 min à 95°C. Des aliquotes des différentes étapes sont analysées sur gel. Une variante de cette technique consiste à incuber l'extrait PSM avec les billes sur lesquelles l'anticorps a été préalablement fixé.

2.2.12. Coloration à l'argent des gels SDS-PAGE

Toutes les étapes sont réalisées sous agitation. Après migration, le gel de polyacrylamide est fixé pendant 30 min dans la solution 1 (50% éthanol; 10% acide acétique; 0,025% formaldéhyde). Après trois étapes de lavage de 10 min dans une solution à 50% d'éthanol, le gel est incubé pendant exactement 1 min dans la solution 3 (0,02% Na₂S₂O₃), puis lavé 2 fois pendant 15 sec dans l'eau distillée. Le gel est ensuite incubé pendant 15 min dans la solution 5 (0,2% AgNO₃; 0,025% formaldéhyde; stockage à l'obscurité). Après deux nouvelles étapes de lavage de 10 sec dans de l'eau distillée, la révélation s'effectue à l'aide de la solution 7 (6% Na₂CO₃; 0,05% formaldéhyde; 2% solution 3) pendant 1 à 5 min. La réaction est arrêtée en plaçant le gel dans la solution 8 (40 mM EDTA) lorsque le niveau de coloration souhaité est atteint.

2.2.13. Coloration des gels au bleu colloïdal, compatible avec la spectrométrie de masse

Toutes les étapes sont réalisées sous agitation. Après migration, le gel de polyacrylamide est fixé trois fois pendant 30 min dans la solution 1 (30% éthanol; 2% acide phosphorique). Après trois étapes de rinçage de 20 min chacune dans la solution 2 (2% acide phosphorique), le gel est équilibré pendant 30 min dans la solution 3 (18% éthanol; 2% acide phosphorique; 15% sulfate d'ammonium). Un millilitre de solution 4 (2% bleu brillant G-250; 0,02% azide de sodium) est ajouté à 50 ml de solution 3 et la coloration s'effectue pendant 1 à 72 heures. Une décoloration à l'eau est possible si le bruit de fond apparaît trop important. Les bandes d'intérêt sont ensuite découpées au scalpel, en évitant toute contamination par la kératine, puis transmises au service de spectrométrie de masse.

2.2.14. Expériences de protection à la trypsine

Trois constructions de SePN ont été transfectées dans des cellules HeLa selon la technique décrite précédemment: pXJ-SelN6, pXJ-SelN6cys-(His)₆ et pXJ-streptag[®]-SelN6cys. Les deux dernières constructions possèdent respectivement une étiquette C-terminale de type 6-Histidine et une étiquette N-terminale de type strep-tag[®] 2. Ces constructions, associées à des expériences de digestion à la trypsine, vont permettre de déterminer quelles régions de la protéine sont protubérantes du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique. Les cellules transfectées sont grattées dans du TBS-CM (25mM Tris-HCl pH 7,4; 0,75mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; 5mM KCl; après autoclavage, rajouter 1 mM CaCl₂ et 0,5 mM MgCl₂), centrifugées, resuspendues dans 100 µl de tampon A (5 mM Hepes pH 7,4; 0,25 M sucrose), et lysées par une étape de congélation/décongélation dans l'azote liquide. Les extraits sont ensuite congelés à -80°C, après dosage de leur concentration en protéines. Cent microlitres d'extraits sont incubés en présence de 10 µl (27 U) de DNase 1 pendant 30 min à 30°C. On ajoute alors 0,5 µg de trypsine par µg de protéine et le mélange est incubé pendant 1 heure à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de 9,8 ml de tampon A froid, 100 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases 1 X (Sigma-Aldrich) et 50 µl de PMSF 100 mM. L'ensemble est centrifugé à 100000 g (40000 rpm) pendant 1 h à 4°C dans un rotor de type 70.1 Ti. Les culots obtenus sont resuspendus dans 30 µl de tampon A et déposés sur gel. Après transfert, les membranes sont analysées par western avec différents anticorps. En parallèle, un témoin est réalisé. Cent microlitres d'extraits sont centrifugés pendant 20 min à 13000 rpm et le culot obtenu est resuspendu dans 60 µl de tampon A en

présence de 6 μ l de désoxycholate 5%. Le mélange est incubé dans la glace pendant 20 min pour permettre la dissociation des membranes. Chaque tube est alors divisé en deux. Pour le témoin initial, 33 μ l sont prélevés et déposés sur gel. Les 33 μ l restants sont additionnés de 0,5 μ g de trypsine par μ g de protéine et incubés pendant 1 heure à température ambiante avant dépôt sur gel.

2.3. Culture cellulaire

2.3.1. Décongélation de cellules

Dans une petite flasque de culture de 25 cm^2 , un tube de cellules stock est décongelé rapidement dans la main, et ajouté à 4 ml de milieu DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal et 1% de gentamycine. L'ensemble est placé pendant 24 heures à l'étuve à 37°C, sous atmosphère humide et 5% de CO_2 .

2.3.2. Amplification des cellules

Lorsque les cellules arrivent à confluence, le milieu de culture est aspiré. La boîte est rincée avec 500 μ l de trypsine-EDTA 1 X (Gibco) pour éliminer le reste de milieu. Après aspiration, 500 μ l de la même solution sont ajoutés et laissés en contact pendant 5 min à 37°C jusqu'à ce que les cellules se détachent. Cinq millilitres de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de gentamycine sont ajoutés pour arrêter l'action de la trypsine. Les cellules sont homogénéisées et individualisées par dix aspirations et refoulements successifs. Dans une nouvelle flasque de 75 cm^2 , les 5 ml de cellules trypsinisées sont ajoutés à 5ml du même milieu puis l'ensemble est incubé pendant 2 à 3 jours à 37°C.

Lorsque les cellules ont atteint au moins 80% de confluence, le milieu est aspiré et les cellules sont rincées par un millilitre de trypsine-EDTA. Elles sont ensuite détachées par incubation pendant 5 min à 37°C en présence de 1 ml de trypsine-EDTA. Dix millilitres de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de gentamycine sont ajoutés pour stopper la réaction et les cellules sont individualisées par dix aspirations et refoulements successifs. Les cellules sont diluées cinq fois dans un volume final de 10 ml, ce qui correspond à environ 0,5 millions de cellules par flacon. Elles sont incubées pendant 2 à 3 jours à l'étuve à 37°C.

2.3.3. Congélation de cellules

Comme précédemment, les cellules sont trypsinisées et reprises dans 10 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal par flasque. Le contenu des différentes flasques est rassemblé et les cellules sont dénombrées à l'aide d'un hématimètre de Neubauer. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min à température ambiante. Le culot de cellules est repris dans un volume de milieu DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal et 10% de DMSO, de façon à ce que la concentration finale soit égale à 5 millions de cellules par ml. Les cellules sont aliquotées par fractions de 1 ml dans des tubes Eppendorf à congélation, puis placés dans la boîte de congélation contenant le volume adéquat d'isopropanol. La boîte est ensuite placée au moins 48 heures à -80°C, puis les tubes de cellules sont conservés dans l'azote liquide.

2.3.4. Transfection de cellules eucaryotes au phosphate de calcium

Les flasques de cellules sont trypsinisées comme décrit précédemment et les cellules sont collectées dans un Falcon de 50 ml. Après homogénéisation de l'ensemble par aspiration et refoulement, le nombre de cellules est estimé à l'aide d'une cellule de comptage de Neubauer. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans le volume adéquat de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal et de 1% de gentamycine. Environ 300000 cellules sont distribuées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre qui contiendront un volume final de 6 ml du même milieu. Les cellules sont ensuite incubées 24 heures à 37°C. Pour trois boîtes de cellules à transfecter, 1,5 ml de tampon HEPES 2 X (50 mM HEPES pH 7,1; 1,5 mM Na₂HPO₄ pour culture cellulaire; 140 mM NaCl pour culture cellulaire; H₂O ultrapure à peser; vérifier le pH de la solution: 7,05 à 7,1) est aliquoté dans des tubes à hémolyse. D'autre part, 3 µg de vecteur pour l'expression d'une forme recombinante de la sélénoprotéine N, 3 µg de plasmide exprimant l'ARN de transfert sélénocystéine, 3 µg de plasmide témoin Lac Z, et 21 µg de plasmide pBS vide (pour ajuster à 10 µg d'ADN total par boîte de transfection) sont ajoutés à 1,32 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) dilué au dixième et 0,15 ml de CaCl₂ 2,5M. Les boîtes de Pétri sont rincées deux fois dans du tampon TBS-CM (25mM Tris-HCl pH 7,4; 0,75mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; 5mM KCl; après autoclavage, rajouter 1 mM CaCl₂ et 0,5 mM MgCl₂), puis incubées pendant 20 min à 37°C dans 5 ml de milieu DMEM frais contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de gentamycine, ainsi que 10 µM de Na₂SeO₃ si nécessaire pour l'expérience. Le mélange ADN et phosphate de calcium est ajouté goutte à goutte dans le tube contenant l'HEPES 2 X tout en

vortexant à vitesse réduite pendant 30 à 40 sec. Lorsque tout est mélangé, après exactement 1 min, 980 μ l sont distribués dans chacune des trois boîtes. Le milieu de culture est ensuite homogénéisé en agitant les boîtes avec des mouvements d'avant en arrière puis de gauche à droite. La taille des grains de phosphate de calcium formés est observée au microscope. Les boîtes sont incubées de 16 à 20 heures maximum à 37°C avant d'être rincées deux fois pendant 5 min à 37°C avec 6 ml de TBS-CM par boîte. Les cellules sont alors incubées pendant 24 heures à 37°C dans 6 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de gentamycine par boîte, avec 10 μ M de Na_2SeO_3 si nécessaire. Les cellules sont rincées deux fois pendant 5 min à 37°C avec 6 ml de TBS-CM par boîte. Après le deuxième rinçage, le tampon est conservé dans les boîtes qui sont alors traitées une par une. Le milieu de rinçage est aspiré, puis 1,2 ml de tampon TBS-CM est ajouté. Les cellules sont détachées de la boîte à l'aide d'un râteau de grattage et transférées dans un tube Eppendorf. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est homogénéisé dans 50 μ l de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH8). Les cellules sont remises en suspension et lysées par quatre étapes de congélation/décongélation dans l'azote liquide. Les extraits cellulaires sont stockés à -20°C.

2.3.5. Mesure de l'activité β -Gal par la méthode de Miller

Cette technique permet d'estimer l'efficacité relative de transfection des échantillons. La β -galactosidase, dont le vecteur a été cotransfecté, est un enzyme qui hydrolyse les β -D-galactosides. Elle hydrolyse l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) incolore en galactose et en orthonitrophénol (jaune). Son activité peut donc être mesurée, en conditions saturantes en ONPG, en déterminant la concentration de chaque échantillon en produit coloré par une lecture spectrophotométrique à DO = 420 nm.

Cen microlitres d'ONPG (4 mg/ml) sont ajoutés à 5 μ l d'extrait brut de cellules HeLa et 500 μ l de tampon Z (NaH_2PO_4 40 mM, Na_2HPO_4 60 mM pH7, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, β -ME 50 mM). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 20 min. Une coloration jaune apparaît, révélant le clivage du substrat. La réaction est arrêtée par addition de 500 μ l de Na_2CO_3 1 M qui inactive l'enzyme par une augmentation du pH. Une mesure de la densité optique de la solution colorée à 420 nm permet de comparer les différents échantillons.

2.4. Divers

2.4.1. Préparation de tamoxifène pour l'injection aux souris

Cinquante milligrammes de tamoxifène ou de 4-hydroxytamoxifène sont solubilisés dans 200 µl d'éthanol 100% puis mélangés avec 4,8 ml d'huile de graines de tournesol préalablement autoclavée. L'ensemble est agité vigoureusement, puis soniqué cinq fois pendant 1 min dans la glace afin d'obtenir une suspension fine à 10 mg/ml. La solution ainsi obtenue est conservée à -20°C pendant la période des injections. Après décongélation et sonication de quelques secondes, des doses de 100 µl de la solution sont injectées intrapéritonéalement aux souris selon un calendrier établi.

- Akesson, B., Bellew, T. et Burk, R.F. (1994) Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim Biophys Acta*, **1204**, 243-249.
- Akterin, S., Cowburn, R.F., Miranda-Vizueté, A., Jimenez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B. et Cedazo-Minguez, A. (2005) Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.*
- Allamand, V., Richard, P., Lescure, A., Ledeuil, C., Desjardin, D., Petit, N., Gartioux, C., Ferreira, A., Krol, A., Pellegrini, N., Urtizberea, J.A. et Guicheney, P. (2006) A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep*, **7**, 450-454.
- Allmang, C., Carbon, P. et Krol, A. (2002) The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p proteins share the same RNA binding domain: identification of SBP2 amino acids important to SECIS RNA binding. *Rna*, **8**, 1308-1318.
- Allmang, C. et Krol, A. (2006a) *SECIS RNA and K-turn binding proteins. A survey of evolutionary conserved RNA and protein motifs*. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Allmang, C. et Krol, A. (2006b) Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie*.
- Amberg, R., Mizutani, T., Wu, X.Q. et Gross, H.J. (1996) Selenocysteine synthesis in mammalia: an identity switch from tRNA(Ser) to tRNA(Sec). *J Mol Biol*, **263**, 8-19.
- Andreesen, J.R. et Ljungdahl, L.G. (1973) Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol*, **116**, 867-873.
- Andreesen, J.R., Wagner, M., Sonntag, D., Kohlstock, M., Harms, C., Gursinsky, T., Jager, J., Parther, T., Kabisch, U., Grantzdorffer, A., Pich, A. et Sohling, B. (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic gram-positive, amino acids-utilizing bacteria. *Biofactors*, **10**, 263-270.
- Araki, O., Murakami, M., Morimura, T., Kamiya, Y., Hosoi, Y., Kato, Y. et Mori, M. (1999) Assignment of type II iodothyronine deiodinase gene (DIO2) to human chromosome band 14q24.2-->q24.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **84**, 73-74.
- Arnold, S.M., Fessler, L.I., Fessler, J.H. et Kaufman, R.J. (2000) Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity. *Biochemistry*, **39**, 2149-2163.
- Arteel, G.E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J. et Sies, H. (1998) Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem*, **379**, 1201-1205.
- Arthur, J.R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1825-1835.
- Arthur, J.R., McKenzie, R.C. et Beckett, G.J. (2003) Selenium in the immune system. *J Nutr*, **133**, 1457S-1459S.
- Atkinson, J.C., Ruhl, M., Becker, J., Ackermann, R. et Schuppan, D. (1996) Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res*, **228**, 283-291.

- B**aker, R.D., Baker, S.S., LaRosa, K., Whitney, C. et Newburger, P.E. (1993) Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. *Arch Biochem Biophys*, **304**, 53-57.
- Banker, B. (1994) *The congenital muscular dystrophies*. Dans *Myology*. McGraw-Hil, New-York, 1275-1289.
- Baron, C. et Bock, A. (1991) The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA(Sec) of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *J Biol Chem*, **266**, 20375-20379.
- Baron, C., Sturchler, C., Wu, X.Q., Gross, H.J., Krol, A. et Bock, A. (1994) Eukaryotic selenocysteine inserting tRNA species support selenoprotein synthesis in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2228-2233.
- Barrington, J.W., Lindsay, P., James, D., Smith, S. et Roberts, A. (1996) Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol*, **103**, 130-132.
- Batten, F. (1904) Case of myositis fibrosa with pathological examination. *Trans Clin Soc Lond*, **37**, 12-22.
- Baum, M.K., Shor-Posner, G., Lai, S., Zhang, G., Lai, H., Fletcher, M.A., Sauberlich, H. et Page, J.B. (1997) High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **15**, 370-374.
- Bauman, A.T., Malencik, D.A., Barofsky, D.F., Barofsky, E., Anderson, S.R. et Whanger, P.D. (2004) Selective production of rat mutant selenoprotein W with and without bound glutathione. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 308-313.
- Beck, M.A. (2001) *Selenium as an antiviral agent*. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 236-246.
- Beck, M.A., Esworthy, R.S., Ho, Y.S. et Chu, F.F. (1998) Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *Faseb J*, **12**, 1143-1149.
- Beck, M.A., Shi, Q., Morris, V.C. et Levander, O.A. (1995) Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat Med*, **1**, 433-436.
- Behne, D. et Kyriakopoulos, A. (1993) Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr*, **57**, 310S-312S.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Kalcklosch, M., Weiss-Nowak, C., Pfeifer, H., Gessner, H. et Hammel, C. (1997) Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei. *Biomed Environ Sci*, **10**, 340-345.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H. et Kohrle, J. (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**, 1143-1149.
- Behne, D., Weiler, H. et Kyriakopoulos, A. (1996) Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil*, **106**, 291-297.
- Beltran-Valero de Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., van Beusekom, E., van der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W.B., Cormand, B., Lehesjoki, A.E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C.A., van Bokhoven, H. et Brunner, H.G. (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*, **71**, 1033-1043.
- Benton, D. et Cook, R. (1991) The impact of selenium supplementation on mood. *Biol Psychiatry*, **29**, 1092-1098.
- Berg, B.L. et Stewart, V. (1990) Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, **125**, 691-702.

- Berry, M.J. (2005) Insights into the hierarchy of selenium incorporation. *Nat Genet*, **37**, 1162-1163.
- Berry, M.J., Banu, L., Chen, Y.Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W. et Larsen, P.R. (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, **353**, 273-276.
- Berry, M.J., Banu, L., Harney, J.W. et Larsen, P.R. (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *Embo J*, **12**, 3315-3322.
- Berry, M.J., Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Martin, G.W., 3rd, Low, S.C., Mansell, J.B., Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., Driscoll, D.M. et Hatfield, D.L. (2001) Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *Biofactors*, **14**, 17-24.
- Biaglow, J.E. et Miller, R.A. (2005) The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, **4**, 6-13.
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J. et Larsen, P.R. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, **23**, 38-89.
- Bjornstedt, M., Kumar, S. et Holmgren, A. (1992) Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, **267**, 8030-8034.
- Bock, A. (2001) *Selenium metabolism in bacteria*. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 7-22.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J. et Baron, C. (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci*, **16**, 463-467.
- Bock, A. et Stadtman, T.C. (1988) Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. *Biofactors*, **1**, 245-250.
- Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. et Branlant, G. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*, **1703**, 231-238.
- Bosl, M.R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. et Taketo, M.M. (1997) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5531-5534.
- Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. et Sun, P.D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science*, **275**, 1305-1308.
- Brigelius-Flohe, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, **27**, 951-965.
- Brigelius-Flohe, R., Friedrichs, B., Maurer, S., Schultz, M. et Streicher, R. (1997) Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J*, **328** (Pt 1), 199-203.
- Brigelius-Flohe, R., Kelly, F.J., Salonen, J.T., Neuzil, J., Zingg, J.M. et Azzi, A. (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*, **76**, 703-716.
- Brigelius-Flohe, R., Muller, C., Menard, J., Florian, S., Schmehl, K. et Wingler, K. (2001) Functions of GI-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization. *Biofactors*, **14**, 101-106.

- Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C.A., Guicheney, P. et Muntoni, F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*, **69**, 1198-1209.
- Bruns, R.R., Press, W., Engvall, E., Timpl, R. et Gross, J. (1986) Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, **103**, 393-404.
- Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B. et Nimtz, M. (2003) Verification of the interaction of a tryparedoxin peroxidase with tryparedoxin by ESI-MS/MS. *Biol Chem*, **384**, 1305-1309.
- Buettner, C., Harney, J.W. et Berry, M.J. (1999) The *Caenorhabditis elegans* homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differs from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. *J Biol Chem*, **274**, 21598-21602.
- Buettner, C., Harney, J.W. et Larsen, P.R. (1998) The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J Biol Chem*, **273**, 33374-33378.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S. et Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.
- Burgess, R.R., Arthur, T.M. et Pietz, B.C. (2000) Mapping protein-protein interaction domains using ordered fragment ladder far-western analysis of hexahistidine-tagged fusion proteins. *Methods Enzymol*, **328**, 141-157.
- Burk, R.F. et Hill, K.E. (1992) Some properties of selenoprotein P. *Biol Trace Elem Res*, **33**, 151-153.
- Burk, R.F. et Hill, K.E. (1993) Regulation of selenoproteins. *Annu Rev Nutr*, **13**, 65-81.
- Burk, R.F. et Hill, K.E. (2005) Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*, **25**, 215-235.
- Burk, R.F., Hill, K.E., Awad, J.A., Morrow, J.D., Kato, T., Cockell, K.A. et Lyons, P.R. (1995) Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology*, **21**, 561-569.
- Burk, R.F., Lawrence, R.A. et Lane, J.M. (1980) Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. Effect of selenium deficiency. *J Clin Invest*, **65**, 1024-1031.
- Burkin, D.J. et Kaufman, S.J. (1999) The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res*, **296**, 183-190.

Caban, K. et Copeland, P.R. (2006) Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 73-81.

Calvo, A., Xiao, N., Kang, J., Best, C.J., Leiva, I., Emmert-Buck, M.R., Jorcyk, C. et Green, J.E. (2002) Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. *Cancer Res*, **62**, 5325-5335.

- Camacho Vanegas, O., Bertini, E., Zhang, R.Z., Petrini, S., Minosse, C., Sabatelli, P., Giusti, B., Chu, M.L. et Pepe, G. (2001) Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7516-7521.
- Canani, L.H., Capp, C., Dora, J.M., Meyer, E.L., Wagner, M.S., Harney, J.W., Larsen, P.R., Gross, J.L., Bianco, A.C. et Maia, A.L. (2005) The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 3472-3478.
- Carbon, P. et Krol, A. (1991) Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA(Ser)Sec gene: a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *Embo J*, **10**, 599-606.
- Carlson, B.A. (2001) *Mammalian selenocysteine tRNA*. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 23-32.
- Carlson, B.A., Xu, X.M., Gladyshev, V.N. et Hatfield, D.L. (2005) Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem*, **280**, 5542-5548.
- Carlson, B.A., Xu, X.M., Kryukov, G.V., Rao, M., Berry, M.J., Gladyshev, V.N. et Hatfield, D.L. (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12848-12853.
- Castellano, S., Lobanov, A.V., Chapple, C., Novoselov, S.V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V.N. et Guigo, R. (2005) Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16188-16193.
- Castellano, S., Morozova, N., Morey, M., Berry, M.J., Serras, F., Corominas, M. et Guigo, R. (2001) In silico identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *EMBO Rep*, **2**, 697-702.
- Castellano, S., Novoselov, S.V., Kryukov, G.V., Lescure, A., Blanco, E., Krol, A., Gladyshev, V.N. et Guigo, R. (2004) Reconsidering the evolution of eukaryotic selenoproteins: a novel nonmammalian family with scattered phylogenetic distribution. *EMBO Rep*, **5**, 71-77.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. et Harrison, P.R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J*, **5**, 1221-1227.
- Chariot, P. et Bignani, O. (2003) Skeletal muscle disorders associated with selenium deficiency in humans. *Muscle Nerve*, **27**, 662-668.
- Chariot, P., Dubreuil-Lemaire, M.L., Zhou, J.Y., Lamia, B., Dume, L., Larcher, B., Monnet, I., Levy, Y., Astier, A. et Gherardi, R. (1997) Muscle involvement in human immunodeficiency virus-infected patients is associated with marked selenium deficiency. *Muscle Nerve*, **20**, 386-389.
- Chavatte, L., Brown, B.A. et Driscoll, D.M. (2005) Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 408-416.
- Chen, J. et Berry, M.J. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem*, **86**, 1-12.
- Chen, Y.J., Spence, H.J., Cameron, J.M., Jess, T., Ilsley, J.L. et Winder, S.J. (2003) Direct interaction of beta-dystroglycan with F-actin. *Biochem J*, **375**, 329-337.
- Cheng, Y.Y. et Qian, P.C. (1990) The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed Environ Sci*, **3**, 422-428.

- Ching, W.M. et Stadtman, T.C. (1982) Selenium-containing tRNA^{Glu} from *Clostridium sticklandii*: correlation of aminoacylation with selenium content. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 374-377.
- Clark, L.C., Cantor, K.P. et Allaway, W.H. (1991) Selenium in forage crops and cancer mortality in U.S. counties. *Arch Environ Health*, **46**, 37-42.
- Clark, L.C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Witherington, R., Herlong, J.H., Janosko, E., Carpenter, D., Borosso, C., Falk, S. et Rounder, J. (1998) Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol*, **81**, 730-734.
- Clarke, N.F., Kidson, W., Quijano-Roy, S., Estournet, B., Ferreira, A., Guicheney, P., Manson, J.I., Kornberg, A.J., Shield, L.K. et North, K.N. (2006) SEPNI: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol*, **59**, 546-552.
- Cohen, I., Boya, P., Zhao, L., Metivier, D., Andreau, K., Perfettini, J.L., Weaver, J.G., Badley, A., Taylor, E.W. et Kroemer, G. (2004) Anti-apoptotic activity of the glutathione peroxidase homologue encoded by HIV-1. *Apoptosis*, **9**, 181-192.
- Cohn, R.D., Henry, M.D., Michele, D.E., Barresi, R., Saito, F., Moore, S.A., Flanagan, J.D., Skwarchuk, M.W., Robbins, M.E., Mendell, J.R., Williamson, R.A. et Campbell, K.P. (2002) Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell*, **110**, 639-648.
- Cognato, H. et Yurchenco, P.D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, **218**, 213-234.
- Combs Jr., G.F. et S.B., C. (1986) *The role of selenium in nutrition*. Academic press, INC, Orlando.
- Commans, S. et Bock, A. (1999) Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiol Rev*, **23**, 335-351.
- Cone, J.E., Del Rio, R.M., Davis, J.N. et Stadtman, T.C. (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2659-2663.
- Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M. et Bornkamm, G.W. (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol*, **25**, 7637-7644.
- Contempre, B., de Escobar, G.M., Denef, J.F., Dumont, J.E. et Many, M.C. (2004) Thiocyanate induces cell necrosis and fibrosis in selenium- and iodine-deficient rat thyroids: a potential experimental model for myxedematous endemic cretinism in central Africa. *Endocrinology*, **145**, 994-1002.
- Copeland, P.R., Fletcher, J.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. et Driscoll, D.M. (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *Embo J*, **19**, 306-314.
- Cosgrove, D., Gray, D., Dierich, A., Kaufman, J., Lemeur, M., Benoist, C. et Mathis, D. (1991) Mice lacking MHC class II molecules. *Cell*, **66**, 1051-1066.
- Costa, M., Rodriguez-Sanchez, J.L., Czaja, A.J. et Gelpi, C. (2000) Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol*, **121**, 364-374.
- Cox, J.C., Edwards, E.S. et DeMoss, J.A. (1981) Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **145**, 1317-1324.

- Curran, J.E., Jowett, J.B., Elliott, K.S., Gao, Y., Gluschenko, K., Wang, J., Abel Azim, D.M., Cai, G., Mahaney, M.C., Comuzzie, A.G., Dyer, T.D., Walder, K.R., Zimmet, P., MacCluer, J.W., Collier, G.R., Kissebah, A.H. et Blangero, J. (2005) Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet*, **37**, 1234-1241.
- D'**Amico, A., Haliloglu, G., Richard, P., Talim, B., Maugendre, S., Ferreira, A., Guicheney, P., Menditto, I., Benedetti, S., Bertini, E., Bonne, G. et Topaloglu, H. (2005) Two patients with 'Dropped head syndrome' due to mutations in LMNA or SEPN1 genes. *Neuromuscul Disord*, **15**, 521-524.
- Dear, T.N., Campbell, K. et Rabbitts, T.H. (1991) Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*, **30**, 10376-10382.
- Demir, E., Ferreira, A., Sabatelli, P., Allamand, V., Makri, S., Echenne, B., Maraldi, M., Merlini, L., Topaloglu, H. et Guicheney, P. (2004) Collagen VI status and clinical severity in Ullrich congenital muscular dystrophy: phenotype analysis of 11 families linked to the COL6 loci. *Neuropediatrics*, **35**, 103-112.
- Deniziak, M., Thisse, C., Rederstorff, M., Hindelang, C., Thisse, B. et Lescure, A. (2006) Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo, submitted to Experimental Cell Research.
- Diamond, A.M., Choi, I.S., Crain, P.F., Hashizume, T., Pomerantz, S.C., Cruz, R., Steer, C.J., Hill, K.E., Burk, R.F., McCloskey, J.A. et al. (1993) Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J Biol Chem*, **268**, 14215-14223.
- Diamond, A.M., Hu, Y.J. et Mansur, D.B. (2001) Glutathione peroxidase and viral replication: implications for viral evolution and chemoprevention. *Biofactors*, **14**, 205-210.
- Dickson, R.C. et Tomlinson, R.H. (1967) Selenium in blood and human tissues. *Clin Chim Acta*, **16**, 311-321.
- Ding, F. et Grabowski, P.J. (1999) Identification of a protein component of a mammalian tRNA(Sec) complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. *Rna*, **5**, 1561-1569.
- Diwadkar-Navsariwala, V., Prins, G.S., Swanson, S.M., Birch, L.A., Ray, V.H., Hedayat, S., Lantvit, D.L. et Diamond, A.M. (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8179-8184.
- Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. et Huber, R. (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcyteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8884-8889.
- Driscoll, D.M. et Chavatte, L. (2004) Finding needles in a haystack. In silico identification of eukaryotic selenoprotein genes. *EMBO Rep*, **5**, 140-141.
- Dubowitz, V. (1997) 50th ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy. 28 February 1997 to 2 March 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **7**, 539-547.
- Dubowitz, V. et Fardeau, M. (1995) Proceedings of the 27th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy. 22-24 April 1994, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **5**, 253-258.
- Dumitrescu, A.M., Liao, X.H., Abdullah, M.S., Lado-Abeal, J., Majed, F.A., Moeller, L.C., Boran, G., Schomburg, L., Weiss, R.E. et Refetoff, S. (2005) Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet*, **37**, 1247-1252.

- Eberle, B. et Haas, H.J. (1993) Purification of selenoprotein Ph from human plasma. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, **7**, 217-221.
- Emery, A. (1999) Dans *Neuromuscular disorders: Clinical and Molecular Genetics*. John Wiley and Sons.
- Endo, T. (1999) O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim Biophys Acta*, **1473**, 237-246.
- Engelberg-Kulka, H., Liu, Z., Li, C. et Reches, M. (2001) An extended Escherichia coli "selenocysteine insertion sequence" (SECIS) as a multifunctional RNA structure. *Biofactors*, **14**, 61-68.
- Enoch, H.G. et Lester, R.L. (1974) The role of a novel cytochrome b-containing nitrate reductase and quinone in the in vitro reconstruction of formate-nitrate reductase activity of E. coli. *Biochem Biophys Res Commun*, **61**, 1234-1241.
- Esapa, C.T., Benson, M.A., Schroder, J.E., Martin-Rendon, E., Brockington, M., Brown, S.C., Muntoni, F., Kroger, S. et Blake, D.J. (2002) Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet*, **11**, 3319-3331.
- Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S. et Meissner, G. (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*, **102**, 499-509.
- Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P. et Krol, A. (2000) Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *Embo J*, **19**, 4796-4805.
- Falbe, J. et Regitz, M. (1999) *Römpp kompakt Basislexicon Chemie*. Thieme, Stuttgart.
- Fan, A.M. et Kizer, K.W. (1990) Selenium. Nutritional, toxicologic, and clinical aspects. *West J Med*, **153**, 160-167.
- Fang, J., Lu, J. et Holmgren, A. (2005) Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J Biol Chem*, **280**, 25284-25290.
- Ferguson, A.D., Labunskyy, V.M., Fomenko, D.E., Arac, D., Chelliah, Y., Amezcua, C.A., Rizo, J., Gladyshev, V.N. et Deisenhofer, J. (2006) NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family. *J Biol Chem*, **281**, 3536-3543.
- Ferreiro, A., Ceuterick-de Groote, C., Marks, J.J., Goemans, N., Schreiber, G., Hanefeld, F., Fardeau, M., Martin, J.J., Goebel, H.H., Richard, P., Guicheney, P. et Bonnemann, C.G. (2004) Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol*, **55**, 676-686.
- Ferreiro, A., Monnier, N., Romero, N.B., Leroy, J.P., Bonnemann, C., Haenggeli, C.A., Straub, V., Voss, W.D., Nivoche, Y., Jungbluth, H., Lemainque, A., Voit, T., Lunardi, J., Fardeau, M. et Guicheney, P. (2002a) A recessive form of central core disease, transiently presenting as multi-minicore disease, is associated with a homozygous mutation in the ryanodine receptor type 1 gene. *Ann Neurol*, **51**, 750-759.
- Ferreiro, A., Quijano-Roy, S., Pichereau, C., Moghadaszadeh, B., Goemans, N., Bonnemann, C., Jungbluth, H., Straub, V., Villanova, M., Leroy, J.P., Romero, N.B., Martin, J.J., Muntoni, F., Voit, T., Estournet, B., Richard, P., Fardeau, M. et Guicheney, P. (2002b) Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet*, **71**, 739-749.
- Flohe, L., Foresta, C., Garolla, A., Maiorino, M., Roveri, A. et Ursini, F. (2002) Metamorphosis of the selenoprotein PHGPx during spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 287-288.

- Flohe, L., Gunzler, W.A. et Schock, H.H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, **32**, 132-134.
 - Flohe, L., Wingender, E. et Brigelius-Flohe, R. (1997) *Oxidative stress and signal transduction*. H.J. Forman and E. Cadenas, Chapman & Hall, New-York.
 - Florian, S., Winkler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O.J., Meyerhof, W. et Brigelius-Flohe, R. (2001) Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res*, **35**, 655-663.
 - Fomenko, D.E. et Gladyshev, V.N. (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry*, **42**, 11214-11225.
 - Forchhammer, K., Leinfelder, W. et Bock, A. (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature*, **342**, 453-456.
 - Forstrom, J.W., Zakowski, J.J. et Tappel, A.L. (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, **17**, 2639-2644.
 - Foster, S.J., Kraus, R.J. et Ganther, H.E. (1986) The metabolism of selenomethionine, S-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Arch Biochem Biophys*, **251**, 77-86.
 - Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal, Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G. et Ben-Hayyim, G. (2002) A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, **277**, 25983-25991.
 - Fu, Y., Cheng, W.H., Porres, J.M., Ross, D.A. et Lei, X.G. (1999a) Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **27**, 605-611.
 - Fu, Y., Cheng, W.H., Ross, D.A. et Lei, X. (1999b) Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**, 164-169.
 - Fujii, M., Saijoh, K., Kobayashi, T., Fujii, S., Lee, M.J. et Sumino, K. (1997) Analysis of bovine selenoprotein P-like protein gene and availability of metal responsive element (MRE) located in its promoter. *Gene*, **199**, 211-217.
-
- G**abbita, S.P., Aksenov, M.Y., Lovell, M.A. et Markesbery, W.R. (1999) Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*, **73**, 1660-1666.
- Gao, Y., Feng, H.C., Walder, K., Bolton, K., Sunderland, T., Bishara, N., Quick, M., Kantham, L. et Collier, G.R. (2004) Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett*, **563**, 185-190.
- Gao, Y., Hannan, N.R., Wanyonyi, S., Konstantopoulou, N., Pagnon, J., Feng, H.C., Jowett, J.B., Kim, K.H., Walder, K. et Collier, G.R. (2006) Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells. *Cytokine*, **33**, 246-251.
- Gao, Y., Walder, K., Sunderland, T., Kantham, L., Feng, H.C., Quick, M., Bishara, N., de Silva, A., Augert, G., Tenne-Brown, J. et Collier, G.R. (2003) Elevation in Tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells. *Diabetes*, **52**, 929-934.

- Garbisu, C., Gonzalez, S., Yang, W.H., Yee, B.C., Carlson, D.L., Yee, A., Smith, N.R., Otero, R., Buchanan, B.B. et Leighton, T. (1995) Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*. *Biofactors*, **5**, 29-37.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Volbeda, A., Frey, M. et Fontecilla-Camps, J.C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, **7**, 557-566.
- Gartner, R., Albrich, W. et Angstwurm, M.W. (2001) The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. *Biofactors*, **14**, 199-204.
- Ge, K. et Yang, G. (1993) The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr*, **57**, 259S-263S.
- Gelpi, C., Sontheimer, E.J. et Rodriguez-Sanchez, J.L. (1992) Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9739-9743.
- Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V. et Stadtman, T.C. (1996) Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. *Biochemistry*, **35**, 212-223.
- Gladyshev, V.N. et Kryukov, G.V. (2001) Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *Biofactors*, **14**, 87-92.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J.K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P.J. et Barras, F. (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem*, **276**, 48915-48920.
- Gromer, S., Eubel, J.K., Lee, B.L. et Jacob, J. (2005) Human selenoproteins at a glance. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 2414-2437.
- Gromer, S., Johansson, L., Bauer, H., Arscott, L.D., Rauch, S., Ballou, D.P., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H. et Arner, E.S. (2003) Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12618-12623.
- Gromer, S., Urig, S. et Becker, K. (2004) The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev*, **24**, 40-89.
- Grundner-Culemann, E., Martin, G.W., 3rd, Tujebajeva, R., Harney, J.W. et Berry, M.J. (2001) Interplay between termination and translation machinery in eukaryotic selenoprotein synthesis. *J Mol Biol*, **310**, 699-707.
- Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B.G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ferrick, D.A., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. et Zlotnik, A. (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15086-15091.
- Guo, L.T., Zhang, X.U., Kuang, W., Xu, H., Liu, L.A., Vilquin, J.T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Ruegg, M.A., Wewer, U.M. et Engvall, E. (2003) Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscul Disord*, **13**, 207-215.

Halboth, S. et Klein, A. (1992) *Methanococcus voltae* harbors four gene clusters potentially encoding two [NiFe] and two [NiFeSe] hydrogenases, each of the cofactor F420-reducing or F420-non-reducing types. *Mol Gen Genet*, **233**, 217-224.

Halic, M., Becker, T., Frank, J., Spahn, C.M. et Beckmann, R. (2005) Localization and dynamic behavior of ribosomal protein L30e. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 467-468.

- Hall, L., Williams, K., Perry, A.C., Frayne, J. et Jury, J.A. (1998) The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J*, **333** (Pt 1), 5-9.
- Han, H.M., Wei, R.S., Lai, A.F. et Yin, C.C. (2006) Molecular nature of sulfhydryl modification by hydrogen peroxide on type 1 ryanodine receptor. *Acta Pharmacol Sin*, **27**, 888-894.
- Hatfield, D., Diamond, A. et Dudock, B. (1982) Opal suppressor serine tRNAs from bovine liver form phosphoseryl-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 6215-6219.
- Hatfield, D.L. (2001) Introduction to selenium. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-4.
- Hawkes, W.C. et Hornbostel, L. (1996) Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry*, **39**, 121-128.
- Hayashi, Y.K., Chou, F.L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B.L., Kramer, R.H., Kaufman, S.J., Ozawa, E., Goto, Y., Nonaka, I., Tsukahara, T., Wang, J.Z., Hoffman, E.P. et Arahata, K. (1998) Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet*, **19**, 94-97.
- Hernandez, A., Park, J.P., Lyon, G.J., Mohandas, T.K. et St Germain, D.L. (1998) Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics*, **53**, 119-121.
- Hill, K.E. et Burk, R.F. (1997) Selenoprotein P: recent studies in rats and in humans. *Biomed Environ Sci*, **10**, 198-208.
- Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., Motley, A.K., Atkins, J.F., Gesteland, R.F. et Burk, R.F. (2003) Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem*, **278**, 13640-13646.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M. et Funk, C.D. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem*, **272**, 16644-16651.
- Holt, K.H., Crosbie, R.H., Venzke, D.P. et Campbell, K.P. (2000) Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett*, **468**, 79-83.
- Hondal, R.J., Ma, S., Caprioli, R.M., Hill, K.E. et Burk, R.F. (2001) Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J Biol Chem*, **276**, 15823-15831.
- Hsieh, H.S. et Ganther, H.E. (1975) Acid-volatile selenium formation catalyzed by glutathione reductase. *Biochemistry*, **14**, 1632-1636.
- Hu, Y., Benya, R.V., Carroll, R.E. et Diamond, A.M. (2005) Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr*, **135**, 3021S-3024S.
- Hu, Y.J. et Diamond, A.M. (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res*, **63**, 3347-3351.
- Hu, Y.J., Korotkov, K.V., Mehta, R., Hatfield, D.L., Rotimi, C.N., Luke, A., Prewitt, T.E., Cooper, R.S., Stock, W., Vokes, E.E., Dolan, M.E., Gladyshev, V.N. et Diamond, A.M. (2001) Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. *Cancer Res*, **61**, 2307-2310.
- Hubert, N., Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P. et Krol, A. (1998) The 9/4 secondary structure of eukaryotic selenocysteine tRNA: more pieces of evidence. *Rna*, **4**, 1029-1033.
- Huttenhofer, A., Westhof, E. et Bock, A. (1996) Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in Escherichia coli and their base-specific interaction with special elongation factor SELB. *Rna*, **2**, 354-366.

- Hwang, D.Y., Cho, J.S., Oh, J.H., Shim, S.B., Jee, S.W., Lee, S.H., Seo, S.J., Lee, S.K., Lee, S.H. et Kim, Y.K. (2005) Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2 (N141I): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, **30**, 1009-1019.
- Irons, R., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. et Davis, C.D. (2006) Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J Nutr*, **136**, 1311-1317.
- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M. et Sies, H. (2003) Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 4742-4758.
- Jakobs, T.C., Koehler, M.R., Schmutzler, C., Glaser, F., Schmid, M. et Kohrle, J. (1997) Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics*, **42**, 361-363.
- Jeong, D., Kim, T.S., Chung, Y.W., Lee, B.J. et Kim, I.Y. (2002) Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett*, **517**, 225-228.
- Jimenez-Mallebrera, C., Brown, S.C., Sewry, C.A. et Muntoni, F. (2005) Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 809-823.
- Johansson, L., Gafvelin, G. et Arner, E.S. (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta*, **1726**, 1-13.
- Jones, J.B., Dilworth, G.L. et Stadtman, T.C. (1979) Occurrence of selenocysteine in the selenium-dependent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. *Arch Biochem Biophys*, **195**, 255-260.
- Kaiser, J.T., Gromadski, K., Rother, M., Engelhardt, H., Rodnina, M.V. et Wahl, M.C. (2005) Structural and functional investigation of a putative archaeal selenocysteine synthase. *Biochemistry*, **44**, 13315-13327.
- Kanagawa, M., Michele, D.E., Satz, J.S., Barresi, R., Kusano, H., Sasaki, T., Timpl, R., Henry, M.D. et Campbell, K.P. (2005) Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Lett*, **579**, 4792-4796.
- Kanagawa, M., Saito, F., Kunz, S., Yoshida-Moriguchi, T., Barresi, R., Kobayashi, Y.M., Muschler, J., Dumanski, J.P., Michele, D.E., Oldstone, M.B. et Campbell, K.P. (2004) Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, **117**, 953-964.
- Kernebeck, T., Lohse, A.W. et Grotzinger, J. (2001) A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology*, **34**, 230-233.
- Kim, H.Y. et Gladyshev, V.N. (2004a) Characterization of mouse endoplasmic reticulum methionine-R-sulfoxide reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 1277-1283.
- Kim, H.Y. et Gladyshev, V.N. (2004b) Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell*, **15**, 1055-1064.

- Kinzy, S.A., Caban, K. et Copeland, P.R. (2005) Characterization of the SECIS binding protein 2 complex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5172-5180.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Wishe, H.I., Cohen, M.W. et Stotzky, G. (1994) Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biol Trace Elem Res*, **41**, 115-127.
- Kohrle, J., Brigelius-Flohe, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O. et Flohe, L. (2000) Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol Chem*, **381**, 849-864.
- Kohrle, J. (1999a) Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol*, **151**, 103-119.
- Kohrle, J. (1999b) The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*, **81**, 527-533.
- Kohrle, J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1853-1863.
- Korotkov, K.V., Kumaraswamy, E., Zhou, Y., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2001) Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem*, **276**, 15330-15336.
- Korotkov, K.V., Novoselov, S.V., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2002) Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Mol Cell Biol*, **22**, 1402-1411.
- Krol, A. (2002) Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. *Biochimie*, **84**, 765-774.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R. et Gladyshev, V.N. (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439-1443.
- Kryukov, G.V. et Gladyshev, V.N. (2004) The prokaryotic selenoproteome. *EMBO Rep*, **5**, 538-543.
- Kryukov, G.V., Kryukov, V.M. et Gladyshev, V.N. (1999) New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem*, **274**, 33888-33897.
- Kryukov, G.V., Kumar, R.A., Koc, A., Sun, Z. et Gladyshev, V.N. (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4245-4250.
- Krzycki, J.A. (2005) The direct genetic encoding of pyrrolysine. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 706-712.
- Kumar, S., Bjornstedt, M. et Holmgren, A. (1992) Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem*, **207**, 435-439.
- Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K.V., Kozyavkin, S., Hu, Y., Kwon, S.Y., Moustafa, M.E., Carlson, B.A., Berry, M.J., Lee, B.J., Hatfield, D.L., Diamond, A.M. et Gladyshev, V.N. (2000) Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology. *J Biol Chem*, **275**, 35540-35547.
- Labunskyy, V.M., Ferguson, A.D., Fomenko, D.E., Chelliah, Y., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2005) A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem*, **280**, 37839-37845.

- Lamand, M. (1970) [Biochemical lesions in calf myopathy by selenium deficiency]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, **270**, 417-420.
- 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., Raymond, C., 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. et Chen, Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Lee, B.J., Worland, P.J., Davis, J.N., Stadtman, T.C. et Hatfield, D.L. (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem*, **264**, 9724-9727.

- Lee, S.R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R.L., Stadtman, T.C. et Rhee, S.G. (2000) Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2521-2526.
- Lei, X.G. et Cheng, W.H. (2005) New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *J Nutr*, **135**, 2295-2298.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.A. et Bock, A. (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, **331**, 723-725.
- Lescure, A., Allmang, C., Yamada, K., Carbon, P. et Krol, A. (2002a) cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2. *Gene*, **291**, 279-285.
- Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P. et Krol, A. (1999) Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem*, **274**, 38147-38154.
- Lescure, A., Gautheret, D. et Krol, A. (2002b) Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. *Methods Enzymol*, **347**, 57-70.
- Li, S.S. (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*, **390**, 641-653.
- Liu, J., Ball, S.L., Yang, Y., Mei, P., Zhang, L., Shi, H., Kaminski, H.J., Lemmon, V.P. et Hu, H. (2006) A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech Dev*, **123**, 228-240.
- Lobanov, A.V., Kryukov, G.V., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2006) Is there a twenty third amino acid in the genetic code? *Trends Genet*, **22**, 357-360.
- Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R.K., Voit, T., Merlini, L., Sewry, C.A., Brown, S.C. et Muntoni, F. (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet*, **12**, 2853-2861.
- Look, M.P., Rockstroh, J.K., Rao, G.S., Kreuzer, K.A., Spengler, U. et Sauerbruch, T. (1997) Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection. *Biol Trace Elem Res*, **56**, 31-41.
- Low, S.C., Harney, J.W. et Berry, M.J. (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem*, **270**, 21659-21664.
- Läuchli, A. (1993) *Bot. Acta*, **106**, 455.

- M**aiorino, M., Flohe, L., Roveri, A., Steinert, P., Wissing, J.B. et Ursini, F. (1999) Selenium and reproduction. *Biofactors*, **10**, 251-256.
- Maiorino, M., Roche, C., Kiess, M., Koenig, K., Gawlik, D., Matthes, M., Naldini, E., Pierce, R. et Flohe, L. (1996) A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem*, **238**, 838-844.
- Maiorino, M., Wissing, J.B., Brigelius-Flohe, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., Ursini, F. et Flohe, L. (1998) Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *Faseb J*, **12**, 1359-1370.

- Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U. et Endo, T. (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 500-505.
- Maquat, L.E. (2001) Evidence that selenium deficiency results in the cytoplasmic decay of GPx1 mRNA dependent on pre-mRNA splicing proteins bound to the mRNA exon-exon junction. *Biofactors*, **14**, 37-42.
- Martin-Rendon, E. et Blake, D.J. (2003) Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 178-183.
- Martin-Romero, F.J., Kryukov, G.V., Lobanov, A.V., Carlson, B.A., Lee, B.J., Gladyshev, V.N. et Hatfield, D.L. (2001) Selenium metabolism in Drosophila: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem*, **276**, 29798-29804.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J. et Taketo, M.M. (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*, **178**, 179-185.
- Matsumoto, H., Noguchi, S., Sugie, K., Ogawa, M., Murayama, K., Hayashi, Y.K. et Nishino, I. (2004) Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. *J Biochem (Tokyo)*, **135**, 709-712.
- Mayer, B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*, **114**, 1253-1263.
- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. et von der Mark, K. (1997) Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*, **17**, 318-323.
- McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F. et Lei, X.G. (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8852-8857.
- McDearmon, E.L., Combs, A.C. et Ervasti, J.M. (2001) Differential Vicia villosa agglutinin reactivity identifies three distinct dystroglycan complexes in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **276**, 35078-35086.
- Metzger, D. et Chambon, P. (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*, **24**, 71-80.
- Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R.D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A. et Campbell, K.P. (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, **418**, 417-422.
- Mills, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, **229**, 189-197.
- Miranda-Vizueté, A., Damdimopoulos, A.E. et Spyrou, G. (2000) The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*, **2**, 801-810.
- Mizutani, T. (1989) Some evidence of the enzymatic conversion of bovine suppressor phosphoseryl-tRNA to selenocysteyl-tRNA. *FEBS Lett*, **250**, 142-146.
- Mizutani, T., Goto, C. et Totsuka, T. (2000) *J. Health Sci.*, **46**, 399.
- Mizutani, T., Kurata, H. et Yamada, K. (1991) Study of mammalian selenocysteyl-tRNA synthesis with [⁷⁵Se]HSe. *FEBS Lett*, **289**, 59-63.
- Moghadaszadeh, B., Desguerre, I., Topaloglu, H., Muntoni, F., Pavsek, S., Sewry, C., Mayer, M., Fardeau, M., Tome, F.M. et Guicheney, P. (1998) Identification of a new locus for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet*, **62**, 1439-1445.

- Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., Brockington, M., Roy, S.Q., Merlini, L., Romero, N., Estournet, B., Desguerre, I., Chaigne, D., Muntoni, F., Topaloglu, H. et Guicheney, P. (2001) Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet*, **29**, 17-18.
- Moghadaszadeh, B., Topaloglu, H., Merlini, L., Muntoni, F., Estournet, B., Sewry, C., Naom, I., Barois, A., Fardeau, M., Tome, F.M. et Guicheney, P. (1999) Genetic heterogeneity of congenital muscular dystrophy with rigid spine syndrome. *Neuromuscul Disord*, **9**, 376-382.
- Moreno, S.G., Laux, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W. et Conrad, M. (2003) Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem*, **384**, 635-643.
- Moreno-Reyes, R., Suetens, C., Mathieu, F., Begaux, F., Zhu, D., Rivera, M.T., Boelaert, M., Neve, J., Perlmutter, N. et Vanderpas, J. (1998) Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *N Engl J Med*, **339**, 1112-1120.
- Moriarty, P.M., Reddy, C.C. et Maquat, L.E. (1998) Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol*, **18**, 2932-2939.
- Moscow, J.A., Schmidt, L., Ingram, D.T., Gnarr, J., Johnson, B. et Cowan, K.H. (1994) Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. *Carcinogenesis*, **15**, 2769-2773.
- Mostert, V. (2000) Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch Biochem Biophys*, **376**, 433-438.
- Mostert, V., Lombeck, I. et Abel, J. (1998) A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma. *Arch Biochem Biophys*, **357**, 326-330.
- Motsenbocker, M.A. et Tappel, A.L. (1982) A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta*, **719**, 147-153.
- Moxon, A.L. (1937) Alkali disease, or selenium poisoning. *Dak. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.*, **311**, 1-91.
- Mueller, S., Riedel, H.D. et Stremmel, W. (1997) Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*, **90**, 4973-4978.
- Muller, S., Senn, H., Gsell, B., Vetter, W., Baron, C. et Bock, A. (1994) The formation of diselenide bridges in proteins by incorporation of selenocysteine residues: biosynthesis and characterization of (Se)₂-thioredoxin. *Biochemistry*, **33**, 3404-3412.
- Muntoni, F., Brockington, M., Blake, D.J., Torelli, S. et Brown, S.C. (2002) Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet*, **360**, 1419-1421.
- Muntoni, F., Valero de Bernabe, B., Bittner, R., Blake, D., van Bokhoven, H., Brockington, M., Brown, S., Bushby, K., Campbell, K.P., Fiszman, M., Gruenewald, S., Merlini, L., Quijano-Roy, S., Romero, N., Sabatelli, P., Sewry, C.A., Straub, V., Talim, B., Topaloglu, H., Voit, T., Yurchenco, P.D., Urtizbarea, J.A., Wewer, U.M. et Guicheney, P. (2003) 114th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD) 17-19 January 2003, Naarden, The Netherlands: (8th Workshop of the International Consortium on CMD; 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project GENRE). *Neuromuscul Disord*, **13**, 579-588.

Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, **26**, 99-109.

- Nalvarte, I., Damdimopoulos, A.E., Nystom, C., Nordman, T., Miranda-Vizuite, A., Olsson, J.M., Eriksson, L., Bjornstedt, M., Arner, E.S. et Spyrou, G. (2004) Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 54510-54517.
- Nelson, A.A., Fithughn, O.G. et Clavery, H.O. (1943) Liver tumors following cirrhosis caused by selenium in rats. *Cancer Res.*, **3**, 230-236.
- Neve, J. (1996) Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Risk*, **3**, 42-47.
- Nissinen, M., Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Evangelista, T., Topaloglu, H., Cruaud, C., Weissenbach, J., Fardeau, M., Tome, F.M., Schwartz, K., Tryggvason, K. et Guicheney, P. (1996) Substitution of a conserved cysteine-996 in a cysteine-rich motif of the laminin alpha2-chain in congenital muscular dystrophy with partial deficiency of the protein. *Am J Hum Genet*, **58**, 1177-1184.
- Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P. et Powis, G. (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*, **23**, 916-922.
- Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J*, **21**, 3681-3693.

- O**'Toole, D. et Raisbeck, M.F. (1995) Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest*, **7**, 364-373.
- Ohama, T., Yang, D.C. et Hatfield, D.L. (1994) Selenocysteine tRNA and serine tRNA are aminoacylated by the same synthetase, but may manifest different identities with respect to the long extra arm. *Arch Biochem Biophys*, **315**, 293-301.
- Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., Syntin, P., Dacheux, F. et Dacheux, J.L. (1997) Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta*, **1336**, 99-109.
- Oldereid, N.B., Thomassen, Y. et Purvis, K. (1998) Selenium in human male reproductive organs. *Hum Reprod*, **13**, 2172-2176.
- Olson, G.E., Winfrey, V.P., Nagdas, S.K., Hill, K.E. et Burk, R.F. (2005) Selenoprotein P is required for mouse sperm development. *Biol Reprod*, **73**, 201-211.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K. et Muto, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev*, **56**, 229-264.

- P**arsons, M.J., Campos, I., Hirst, E.M. et Stemple, D.L. (2002) Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development*, **129**, 3505-3512.
- Patterson, E.L., Milstrey, R. et Stokstad, E.L. (1957) Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med*, **95**, 617-620.
- Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U.M. et Guicheney, P. (2003) Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet*, **12**, 1045-1053.

- Pinsent, J. (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J*, **57**, 10-16.
- Polo, M. (1972) *From Venice to China*. Horst Erdmann Verlag, Tübingen.
- Quijano-Roy, S., Marti-Carrera, I., Makri, S., Mayer, M., Maugenre, S., Richard, P., Berard, C., Viollet, L., Leheup, B., Guicheney, P., Pinard, J.M., Estournet, B. et Carlier, R.Y. (2006) Brain MRI abnormalities in muscular dystrophy due to FKRP mutations. *Brain Dev*, **28**, 232-242.
- Ratnasinghe, D., Tangrea, J.A., Andersen, M.R., Barrett, M.J., Virtamo, J., Taylor, P.R. et Albanes, D. (2000) Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res*, **60**, 6381-6383.
- Rayman, M.P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet*, **356**, 233-241.
- Rayman, M.P. (2004) The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr*, **92**, 557-573.
- Rederstorff, M., Krol, A. et Lescure, A. (2006) Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 52-59.
- Richardson, D.R. (2005) More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain. *Biochem J*, **386**, e5-7.
- Robertson, E. (1987) *Teratocarcinomas*, Oxford.
- Romero, N.B., Herasse, M., Monnier, N., Leroy, J.P., Fischer, D., Ferreira, A., Viollet, L., Eymard, B., Laforet, P., Monges, S., Lubieniecki, F., Taratuto, A.L., Guicheney, P., Lunardi, J. et Fardeau, M. (2005) Clinical and histopathological aspects of central core disease associated and non-associated with RYR1 locus. *Acta Myol*, **24**, 70-73.
- Rother, M., Resch, A., Gardner, W.L., Whitman, W.B. et Bock, A. (2001a) Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. *Mol Microbiol*, **40**, 900-908.
- Rother, M., Resch, A., Wilting, R. et Bock, A. (2001b) Selenoprotein synthesis in archaea. *Biofactors*, **14**, 75-83.
- Rother, M., Wilting, R., Commans, S. et Bock, A. (2000) Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Mol Biol*, **299**, 351-358.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. et Hoekstra, W.G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588-590.
- Rowold, D.J. et Herrera, R.J. (2000) Alu elements and the human genome. *Genetica*, **108**, 57-72.
- Rudert, C.P., Lawrence, J.A., Foggin, C. et Barlow, R.M. (1978) A rigid lamb syndrome in sheep in Rhodesia. *Vet Rec*, **102**, 374-377.
- Rudinger, J., Hillenbrandt, R., Sprinzl, M. et Giege, R. (1996) Antideterminants present in minihelix(Sec) hinder its recognition by prokaryotic elongation factor Tu. *Embo J*, **15**, 650-657.
- Ruhl, M., Sahin, E., Johannsen, M., Somasundaram, R., Manski, D., Riecken, E.O. et Schuppan, D. (1999) Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J Biol Chem*, **274**, 34361-34368.

- Rundlof, A.K., Janard, M., Miranda-Vizuete, A. et Arner, E.S. (2004) Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *Free Radic Biol Med*, **36**, 641-656.
- Saito, A., Seiler, S., Chu, A. et Fleischer, S. (1984) Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol*, **99**, 875-885.
- Saito, Y. et Takahashi, K. (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem*, **269**, 5746-5751.
- Saito, Y., Yamamoto, T., Mizuguchi, M., Kobayashi, M., Saito, K., Ohno, K. et Osawa, M. (2006) Altered glycosylation of alpha-dystroglycan in neurons of Fukuyama congenital muscular dystrophy brains. *Brain Res*, **1075**, 223-228.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. et Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J*, **17**, 2596-2606.
- Salonen, J.T., Alfthan, G., Huttunen, J.K., Pikkarainen, J. et Puska, P. (1982) Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet*, **2**, 175-179.
- Salvatore, D., Harney, J.W. et Larsen, P.R. (1999) Mutation of the Secys residue 266 in human type 2 selenodeiodinase alters ⁷⁵Se incorporation without affecting its biochemical properties. *Biochimie*, **81**, 535-538.
- Salvatore, D., Low, S.C., Berry, M., Maia, A.L., Harney, J.W., Croteau, W., St Germain, D.L. et Larsen, P.R. (1995) Type 3 lodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest*, **96**, 2421-2430.
- Sandstrom, P.A., Murray, J., Folks, T.M. et Diamond, A.M. (1998) Antioxidant defenses influence HIV-1 replication and associated cytopathic effects. *Free Radic Biol Med*, **24**, 1485-1491.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sappey, C., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Favier, A., Rentier, B. et Piette, J. (1994) Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10**, 1451-1461.
- Sattler, W., Maiorino, M. et Stocker, R. (1994) Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys*, **309**, 214-221.
- Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E. et Bock, A. (1991) Expression and operon structure of the sel genes of Escherichia coli and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J Bacteriol*, **173**, 4983-4993.
- Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohe, L., Sendtner, M. et Kohrle, J. (2003) Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*, **370**, 397-402.
- Schrader, T., Rienhofer, A. et Andreesen, J.R. (1999) Selenium-containing xanthine dehydrogenase from Eubacterium barkeri. *Eur J Biochem*, **264**, 862-871.
- Schrauzer, G.N., White, D.A. et Schneider, C.J. (1977) Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem*, **7**, 23-31.
- Schroder, I., Rech, S., Krafft, T. et Macy, J.M. (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from Thauera selenatis. *J Biol Chem*, **272**, 23765-23768.
- Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P. et Metzger, D. (2005) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis*, **41**, 165-170.

- Schuster, C., Myslinski, E., Krol, A. et Carbon, P. (1995) Staf, a novel zinc finger protein that activates the RNA polymerase III promoter of the selenocysteine tRNA gene. *Embo J*, **14**, 3777-3787.
- Schwarz, K. et Foltz, C.M. (1957) Selenium as an integral part of factor 3 gainst dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293.
- Schweizer, U. et Schomburg, L. (2005) New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice. *IUBMB Life*, **57**, 737-744.
- Schweizer, U., Streckfuss, F., Pelt, P., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., Kohrle, J. et Schomburg, L. (2005) Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J*, **386**, 221-226.
- Serras, F., Morey, M., Alsina, B., Baguna, J. et Corominas, M. (2001) The Drosophila selenophosphate synthetase (seld) gene is required for development and cell proliferation. *Biofactors*, **14**, 143-149.
- Shisler, J.L., Senkevich, T.G., Berry, M.J. et Moss, B. (1998) Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science*, **279**, 102-105.
- Sliwkowski, M.X. et Stadtman, T.C. (1988) Selenoprotein A of the clostridial glycine reductase complex: purification and amino acid sequence of the selenocysteine-containing peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 368-371.
- Sorek, R., Ast, G. et Graur, D. (2002) Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res*, **12**, 1060-1067.
- Sorgenfrei, O., Muller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I. et Klein, A. (1997) The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes and regulation. *Arch Microbiol*, **167**, 189-195.
- Spallholz, J.E., Boylan, L.M. et Larsen, H.S. (1990) Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, **587**, 123-139.
- Stadtman, T.C. (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem*, **65**, 83-100.
- Steinbrenner, H., Alili, L., Bilgic, E., Sies, H. et Brenneisen, P. (2006) Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, **40**, 1513-1523.
- Sturchler, C., Lescure, A., Keith, G., Carbon, P. et Krol, A. (1994) Base modification pattern at the wobble position of *Xenopus* selenocysteine tRNA(Sec). *Nucleic Acids Res*, **22**, 1354-1358.
- Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P. et Krol, A. (1993) Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA(Sec). *Nucleic Acids Res*, **21**, 1073-1079.
- Sturchler-Pierrat, C., Hubert, N., Totsuka, T., Mizutani, T., Carbon, P. et Krol, A. (1995) Selenocysteinylation in eukaryotes necessitates the uniquely long aminoacyl acceptor stem of selenocysteine tRNA(Sec). *J Biol Chem*, **270**, 18570-18574.
- Su, D., Novoselov, S.V., Sun, Q.A., Moustafa, M.E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2005) Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem*, **280**, 26491-26498.
- Sun, J., Xin, C., Eu, J.P., Stamler, J.S. et Meissner, G. (2001a) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11158-11162.
- Sun, Q.A. et Gladyshev, V.N. (2002) Redox regulation of cell signaling by thioredoxin reductases. *Methods Enzymol*, **347**, 451-461.

- Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S. et Gladyshev, V.N. (2001b) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3673-3678.
 - Sun, Q.A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B.J., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (1999) Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem*, **274**, 24522-24530.
 - Sun, Q.A., Zappacosta, F., Factor, V.M., Wirth, P.J., Hatfield, D.L. et Gladyshev, V.N. (2001c) Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing. *J Biol Chem*, **276**, 3106-3114.
 - Sunde, R.A. (2001) *Regulation of selenoprotein expression*. Dans Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 81-98.
 - Sylvers, L.A., Rogers, K.C., Shimizu, M., Ohtsuka, E. et Soll, D. (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by Escherichia coli glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **32**, 3836-3841.
- T**ajsharghi, H., Darin, N., Tulinius, M. et Oldfors, A. (2005) Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (SEPN1). *Neuromuscul Disord*, **15**, 299-302.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. et Koyama, J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J Biochem (Tokyo)*, **108**, 145-148.
 - Takeda, S., Kondo, M., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Arai, K., Misaki, K., Fukui, T., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Imamura, M., Nakamura, Y., Shimizu, T., Murakami, T., Sunada, Y., Fujikado, T., Matsumura, K., Terashima, T. et Toda, T. (2003) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet*, **12**, 1449-1459.
 - Taniguchi, M., Kurahashi, H., Noguchi, S., Fukudome, T., Okinaga, T., Tsukahara, T., Tajima, Y., Ozono, K., Nishino, I., Nonaka, I. et Toda, T. (2006) Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in alpha-dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet*, **15**, 1279-1289.
 - Taylor, E.W., Bhat, A., Nadimpalli, R.G., Zhang, W. et Kececioglu, J. (1997) HIV-1 encodes a sequence overlapping env gp41 with highly significant similarity to selenium-dependent glutathione peroxidases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **15**, 393-394.
 - Tham, D.M., Whitin, J.C., Kim, K.K., Zhu, S.X. et Cohen, H.J. (1998) Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol*, **275**, G1463-1471.
 - Thisse, C., Degrave, A., Kryukov, G.V., Gladyshev, V.N., Obrecht-Pflumio, S., Krol, A., Thisse, B. et Lescure, A. (2003) Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns*, **3**, 525-532.
 - Toda, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nonaka, I., Masuda, K., Ishihara, T., Sakai, M., Tomita, I., Origuchi, Y., Suzuki, M. et et al. (1993) Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nat Genet*, **5**, 283-286.
 - Tome, F.M., Evangelista, T., Leclerc, A., Sunada, Y., Manole, E., Estournet, B., Barois, A., Campbell, K.P. et Fardeau, M. (1994) Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III*, **317**, 351-357.

- Torelli, S., Brown, S.C., Brockington, M., Dolatshad, N.F., Jimenez, C., Skordis, L., Feng, L.H., Merlini, L., Jones, D.H., Romero, N., Wewer, U., Voit, T., Sewry, C.A., Noguchi, S., Nishino, I. et Muntoni, F. (2005) Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. *Neuromuscul Disord*, **15**, 836-843.
- Tormay, P. et Bock, A. (1997) Barriers to heterologous expression of a selenoprotein gene in bacteria. *J Bacteriol*, **179**, 576-582.
- Tormay, P., Sawers, A. et Bock, A. (1996) Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol Microbiol*, **21**, 1253-1259.
- Tormay, P., Wilting, R., Lottspeich, F., Mehta, P.K., Christen, P. et Bock, A. (1998) Bacterial selenocysteine synthase--structural and functional properties. *Eur J Biochem*, **254**, 655-661.
- Tscherkes, L.A., Volgarev, M.N. et Aptekar, S.G. (1963) Selenium-Caused Tumours. *Acta Unio Int Contra Cancrum*, **19**, 632-633.
- Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Harney, J.W., Driscoll, D.M., Hatfield, D.L. et Berry, M.J. (2000a) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep*, **1**, 158-163.
- Tujebajeva, R.M., Ransom, D.G., Harney, J.W. et Berry, M.J. (2000b) Expression and characterization of nonmammalian selenoprotein P in the zebrafish, *Danio rerio*. *Genes Cells*, **5**, 897-903.
- Turner, D.C. et Stadtman, T.C. (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch Biochem Biophys*, **154**, 366-381.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. et Flohe, L. (1999) Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, **285**, 1393-1396.
- Ursini, F., Maiorino, M. et Gregolin, C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, **839**, 62-70.
- Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D.S., Wang, Y.C., Desai, K.V., Green, J.E., Chen, P.L. et Lee, W.H. (2004) Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **279**, 43522-43529.
- Vanderpas, J.B., Contempre, B., Duale, N.L., Goossens, W., Bebe, N., Thorpe, R., Ntambue, K., Dumont, J., Thilly, C.H. et Diplock, A.T. (1990) Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. *Am J Clin Nutr*, **52**, 1087-1093.
- Venance, S.L., Koopman, W.J., Miskie, B.A., Hegele, R.A. et Hahn, A.F. (2005) Rigid spine muscular dystrophy due to SEPNI mutation presenting as cor pulmonale. *Neurology*, **64**, 395-396.
- Vendeland, S.C., Beilstein, M.A., Chen, C.L., Jensen, O.N., Barofsky, E. et Whanger, P.D. (1993) Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem*, **268**, 17103-17107.
- Veres, Z., Kim, I.Y., Scholz, T.D. et Stadtman, T.C. (1994) Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J Biol Chem*, **269**, 10597-10603.

- Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J.P. et Drevet, J.R. (1996) In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*, **74**, 125-131.
 - Virtamo, J., Valkeila, E., Alfthan, G., Punsar, S., Huttunen, J.K. et Karvonen, M.J. (1985) Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am J Epidemiol*, **122**, 276-282.
 - Vorholt, J.A., Vaupel, M. et Thauer, R.K. (1997) A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol Microbiol*, **23**, 1033-1042.
- W**agner, M., Sonntag, D., Grimm, R., Pich, A., Eckerskorn, C., Sohling, B. et Andreessen, J.R. (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur J Biochem*, **260**, 38-49.
- Walczak, R., Carbon, P. et Krol, A. (1998) An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation. *Rna*, **4**, 74-84.
 - Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P. et Krol, A. (1996) A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *Rna*, **2**, 367-379.
 - Walder, K., Kantham, L., McMillan, J.S., Trevaskis, J., Kerr, L., De Silva, A., Sunderland, T., Godde, N., Gao, Y., Bishara, N., Windmill, K., Tenne-Brown, J., Augert, G., Zimmet, P.Z. et Collier, G.R. (2002) Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes*, **51**, 1859-1866.
 - Warner, G.J., Berry, M.J., Moustafa, M.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. et Faust, J.R. (2000) Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]Sec lacking isopentenyladenosine. *J Biol Chem*, **275**, 28110-28119.
 - Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A.C. et Auwerx, J. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, **439**, 484-489.
 - Weiss Sachdev, S. et Sunde, R.A. (2001) Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem J*, **357**, 851-858.
 - Wendel, A., Kerner, B. et Graupe, K. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1035.
 - Wies, I., Brunner, S., Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H. et Lohse, A.W. (2000) Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet*, **355**, 1510-1515.
 - Willer, T., Prados, B., Falcon-Perez, J.M., Renner-Muller, I., Przemeck, G.K., Lommel, M., Coloma, A., Valero, M.C., de Angelis, M.H., Tanner, W., Wolf, E., Strahl, S. et Cruces, J. (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14126-14131.
 - Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O. et Campbell, K.P. (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum Mol Genet*, **6**, 831-841.
 - Wilting, R., Schorling, S., Persson, B.C. et Bock, A. (1997) Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. *J Mol Biol*, **266**, 637-641.
 - Winder, S.J. (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci*, **26**, 118-124.

- Wingler, K., Bocher, M., Flohe, L., Kollmus, H. et Brigelius-Flohe, R. (1999) mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem*, **259**, 149-157.
 - Wu, X.Q. et Gross, H.J. (1994) The length and the secondary structure of the D-stem of human selenocysteine tRNA are the major identity determinants for serine phosphorylation. *Embo J*, **13**, 241-248.
- X**u, X.M., Mix, H., Carlson, B.A., Grabowski, P.J., Gladyshev, V.N., Berry, M.J. et Hatfield, D.L. (2005) Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J Biol Chem*, **280**, 41568-41575.
- Y**aeger, M.J., Neiger, R.D., Holler, L., Fraser, T.L., Hurley, D.J. et Palmer, I.S. (1998) The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *J Vet Diagn Invest*, **10**, 268-273.
- Yamazaki, S. (1982) A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*. Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue. *J Biol Chem*, **257**, 7926-7929.
- Yang, G.Q., Wang, S.Z., Zhou, R.H. et Sun, S.Z. (1983) Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr*, **37**, 872-881.
- Yant, L.J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J.G., Motta, L., Richardson, A. et Prolla, T.A. (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, **34**, 496-502.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. et Rapoport, T.A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, **429**, 841-847.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T. et Endo, T. (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*, **1**, 717-724.
- Yu, M.W., Horng, I.S., Hsu, K.H., Chiang, Y.C., Liaw, Y.F. et Chen, C.J. (1999) Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol*, **150**, 367-374.
- Yu, S.Y., Zhu, Y.J. et Li, W.G. (1997) Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol Trace Elem Res*, **56**, 117-124.
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S. et Patton, B.L. (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol*, **22**, 521-538.
- Z**avacki, A.M., Mansell, J.B., Chung, M., Klimovitsky, B., Harney, J.W. et Berry, M.J. (2003) Coupled tRNA(Sec)-dependent assembly of the selenocysteine decoding apparatus. *Mol Cell*, **11**, 773-781.

- Zhang, Q.H., Ye, M., Wu, X.Y., Ren, S.X., Zhao, M., Zhao, C.J., Fu, G., Shen, Y., Fan, H.Y., Lu, G., Zhong, M., Xu, X.R., Han, Z.G., Zhang, J.W., Tao, J., Huang, Q.H., Zhou, J., Hu, G.X., Gu, J., Chen, S.J. et Chen, Z. (2000) Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res*, **10**, 1546-1560.
- Zhang, W., Ramanathan, C.S., Nadimpalli, R.G., Bhat, A.A., Cox, A.G. et Taylor, E.W. (1999) Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses. *Biol Trace Elem Res*, **70**, 97-116.
- Zhang, Y., Fomenko, D.E. et Gladyshev, V.N. (2005) The microbial selenoproteome of the Sargasso Sea. *Genome Biol*, **6**, R37.
- Zhao, L., Cox, A.G., Ruzicka, J.A., Bhat, A.A., Zhang, W. et Taylor, E.W. (2000) Molecular modeling and in vitro activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6356-6361.
- Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T.C. et Bock, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4650-4654.
- Zinoni, F., Heider, J. et Bock, A. (1990) Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4660-4664.
- Zorzato, F., Anderson, A.A., Ohlendieck, K., Froemming, G., Guerrini, R. et Treves, S. (2000) Identification of a novel 45 kDa protein (JP-45) from rabbit sarcoplasmic-reticulum junctional-face membrane. *Biochem J*, **351 Pt 2**, 537-543.