



HAL
open science

Contribution au développement de stratégies thérapeutiques pour la réparation fonctionnelle de processus neurodégénératifs : apport du peptide PSELT dérivé de la sélénoprotéine T et de cellules souches.

Hugo Pothion

► **To cite this version:**

Hugo Pothion. Contribution au développement de stratégies thérapeutiques pour la réparation fonctionnelle de processus neurodégénératifs : apport du peptide PSELT dérivé de la sélénoprotéine T et de cellules souches.. Neurobiologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR030 . tel-03097735

HAL Id: tel-03097735

<https://theses.hal.science/tel-03097735>

Submitted on 5 Jan 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Contribution au développement de stratégies thérapeutiques pour la réparation fonctionnelle de processus neurodégénératifs : Apport du peptide PSELT dérivé de la sélénoprotéine T et de cellules souches

**Présentée et soutenue par
Hugo POTHION**

**Thèse soutenue publiquement le 18 septembre 2020
devant le jury composé de**

Mme Valérie PLANAT-BENARD	MCF-HDR, Université Toulouse 3 Paul Sabatier	Rapportrice
Mr Patrick DECHERCHI	PR, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Isabelle LIHRMANN	CR-HDR, Université de Rouen Normandie	Examinatrice
Mr Vincent LELIEVRE	PR, Université de Strasbourg	Examinateur
Mr Frédéric TANKERE	PUPH, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Paris-VI	Examinateur
Mr Youssef ANOUAR	DR, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mr Jean-Paul MARIE	PUPH, CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
Mr Nicolas GUEROUT	MCF-HDR, Université de Rouen Normandie	Membre invité

Thèse dirigée par le Dr Youssef ANOUAR, laboratoire DC2N (INSERM U1239) et le Pr Jean-Paul MARIE, laboratoire GRHV (EA3830)



« Dans un voyage ce n'est pas la destination qui compte mais toujours le chemin parcouru, et les détours surtout. » Philippe Pollet-Villard

Remerciements

Premièrement j'adresse mes remerciements au Professeur Jean-Paul Marie et au Docteur Youssef Anouar de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de vos laboratoire. Je tiens à vous témoigner de ma gratitude quant aux soutiens financiers que vous avez mis à ma disposition durant ces quatre années. Je vous remercie également pour les nombreux conseils que vous m'avez apportés tout au long de ce travail et qui m'aideront également durant la suite de ma carrière.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Docteur Planat-Bénard et au Professeur Decherchi pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant que rapporteur.

Je remercie le Professeur Lelièvre ainsi que le Professeur Tankéré d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur. Monsieur Lelièvre merci pour les nombreux conseils que vous m'avez apportés tout au long de la thèse que ce soit lors des CSI ou lors de notre rencontre à Marrakech.

Isabelle, ... par où commencer ? Je vais essayer d'être succinct parce que peu importe les mots que j'utiliserai, je pense que je n'arriverai jamais à exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Sans toi je ne serais pas en train de rédiger ces lignes en ce moment. Ça peut faire pompeux pour certains mais ceux-là ne savent sûrement pas combien tu as été essentielle dans mon parcours : tu m'as fait confiance en master. Tu m'as aidé à préparer un oral pour le concours de l'école doctorale alors que tu n'étais pas censée être mon encadrante puis, après mon échec à celui-ci, tu as accepté de m'aider à préparer mon dossier pour mon insertion professionnelle. C'est toi encore qui, alors que je rentrais du travail en août 2016, m'a appelé pour m'informer qu'une bourse de thèse se libérait et que je pouvais postuler. Enfin, c'est encore toi qui, alors que rien ne t'y obligeait une nouvelle fois, m'a aidé dans la réalisation de cette thèse par ta disponibilité. Au cours de toutes ces années ta rigueur et ton exigence m'ont poussé à m'améliorer sans cesse même si par moment cela fut plus compliqué. Aujourd'hui je me considère privilégié d'avoir eu l'opportunité d'apprendre à tes côtés et je sais, pour en avoir discuté avec certains, ne pas être le seul étudiant à exprimer ce point de vue. Pour tout ce que

je viens d'écrire je ne peux que te remercier infiniment pour ces six dernières années alors merci Isabelle !

Nico, je tiens à te remercier également. D'abord merci pour ton accueil à mon arrivée. Par ta gentillesse et ta disponibilité je me suis rapidement senti intégré au sein du laboratoire. Ensuite, à l'image d'Isabelle, alors que rien ne t'y obligeait toi non plus, tu as toujours laissé la porte de ton bureau ouverte au cas où j'avais besoin d'aide. Je te remercie infiniment pour tout ce que tu m'as apporté durant ces deux années. Nos longues conversations du midi et ta bonne humeur vont me manquer.

Célia, ma collègue de bureau, merci d'avoir été là et pour toute l'aide que tu m'as donné durant cette thèse. Merci pour ton soutien et tes encouragements dans les moments difficiles qui ont été très précieux. Merci pour ta bonne humeur quotidienne.

Merci madame Batut pour votre patience et votre gentillesse au moment de m'enseigner la chirurgie. Vous avez été un super prof !

Je tiens à remercier le Professeur Patrick Charnay et le Docteur Piotr Topilko de l'ENS de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire le temps d'une journée pour apprendre l'extraction et la culture des cellules souches.

Je souhaite remercier l'équipe du Docteur Olivier Boyer et plus particulièrement Gaétan pour son aide dans l'utilisation du FACS.

Dorthe, Christine, merci pour votre gentillesse, votre aide et vos conseils qui m'ont beaucoup apporté durant ces six années.

Cédric, merci pour ta crinière brune d'abord ! On n'a pas l'habitude de voir ça tous les jours. Grâce à toi je garde de bons souvenirs de Marrakech !

Je remercie l'ensemble des membres de DC2N, de l'EA3830 et de Primacen. Je ne peux pas tous vous citer malheureusement mais le cœur y est. Merci pour votre accueil, votre sympathie et votre aide pendant toutes ces années.

Merci aux animaliers David, Dominique et Ronald d'avoir veillé sur mes animaux quand il le fallait.

Sarah, je te remercie pour nos pauses de « cinq minutes » qui étaient nécessaires moralement. Une vraie amie que j'avais plaisir à retrouver chaque fois que j'arrivais au labo. Merci d'avoir été là tout simplement.

Un mot pour mes amis les loutres (Auriane, Alex, Anthony). Merci de partager le même amour pour les idées étranges comme aller courir la nuit poursuivi par des zombies ou encore d'aller ramper dans la boue ou se baigner dans un bac d'eau glacé un samedi matin de septembre. Prêt à repartir à l'aventure avec vous quand vous voulez !

Mon Paulo, merci pour toutes ces parties de foot (et les chaussures du coup !) et ta gentillesse. Tu étais discret mais tu n'avais pas besoin de parler pour reconforter dans les moments difficiles.

Une dédicace pour tous mes amis Gomar, Charlotte, Martial, Balto, Oriane, Célia, Eléa, Fanny, Raphou. Pour la plupart ça fait 9 ans que vous êtes dans ma vie. Merci d'avoir été là que ce soit pour partager des supers souvenirs comme pour m'aider à surmonter les moments plus difficiles.

Pauline, même si ça ne fait pas longtemps tu n'as pas eu le droit à la partie la plus simple jusque-là. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur, mes moments de moins bien, ... merci pour tout le soutien et l'énergie que tu me donnes au quotidien.

Je remercie ma famille, plus particulièrement Vanessa, Fanny, Cathy, Christophe, papy et Nadine pour votre soutien et vos encouragements depuis toutes ces années.

Enfin mes parents, je tiens à vous remercier pour ces 28 années. Vous m'avez toujours encouragé dans mes choix comme lorsque j'ai décidé de me réorienter en neurosciences alors qu'il ne me restait qu'une année de maïeutique. Merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté durant cette thèse parce que je me doute qu'elle n'a pas dû être facile à vivre de votre côté aussi. C'est dans ce genre de situation que je réalise à quel point je suis chanceux d'avoir des parents compréhensifs et attentionnés comme vous. Vous m'avez toujours inspiré par votre courage, votre volonté et votre ténacité que ce soit dans le travail ou la vie. Cette thèse, c'est aussi la vôtre parce que sans les nombreux conseils et les encouragements que vous m'apportez depuis 28 ans je n'aurais pas réussi à accomplir tout cela. Merci d'être mes parents je suis fier de vous, je vous aime.

Un dernier mot pour George. Merci pour les nombreuses promenades effectuées à tes côtés qui m'ont aidé à évacuer mentalement même si tu n'as pas dû t'en rendre compte.

Table des matières

Liste des abréviations	3
Liste des figures	7
Introduction	9
1. Les lésions du nerf périphérique	10
1.1. Etiologie	10
1.2. Structure du nerf périphérique.....	11
1.2.1. Anatomie du nerf périphérique.....	11
1.2.2. La gaine de myéline	13
1.2.3. Le nerf facial	15
1.2.3.1. Présentation du nerf facial	15
1.2.3.2. Trajet du nerf facial.....	15
1.3. Les grades de sévérité des lésions	17
1.3.1. La classification de Seddon.....	17
1.3.2. La classification de Sunderland	19
1.4. Les bases cellulaires et moléculaires de la régénération nerveuse	20
1.4.1. La dégénérescence Wallérienne.....	20
1.4.2. La survie neuronale et la chromatolyse	23
1.4.3. La régénération axonale	24
1.5. Les traitements des LNP et les axes de recherche	27
1.5.1. Les traitements chirurgicaux	27
1.5.2. Les traitements conservateurs	28
1.5.3. Les traitements pharmacologiques	29
1.5.4. Les manchons d'interposition	30
2. La thérapie cellulaire à partir de cellules souches	33
2.1. Introduction.....	33
2.2. Le degré de potentialité des cellules souches.....	34
2.3. Les niches.....	35
2.4. L'utilisation thérapeutique des cellules souches pour traiter les LNP	37
2.4.1. Les voies d'administration des cellules souches	37
2.4.2. Les types de cellules souches testées en essais précliniques	38
2.4.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ESCs).....	38

2.4.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs).....	39
2.4.2.3. Les cellules souches neurales (NSCs).....	41
2.4.2.4. Les cellules précurseurs multipotentes de la peau (SKPs)	41
2.4.2.5. Les cellules souches vasculaires multipotentes (CSVMs).....	42
2.4.2.6. Les iPSCs.....	42
2.5. Les cellules souches dérivées des capsules frontières.....	43
2.5.1. Les cellules des crêtes neurales.....	43
2.5.2. Les cellules capsule frontière et les cellules dérivées des capsules frontières	47
3. Le potentiel thérapeutique d’une stratégie antioxydante pour traiter les LNP	52
3.1. Les radicaux libres et le stress oxydant	52
3.2. Les mécanismes de défense antioxydants	54
3.3. La famille des sélénoprotéines et la SELENOT	57
3.3.1. Les sélénoprotéines.....	57
3.3.2. La SELENOT	60
3.3.3. PSELT : un nouvel outil thérapeutique	65
3.4. L’utilisation des agents antioxydants pour traiter les LNP	67
3.4.1. Rôle des agents antioxydants dans les LNP.....	67
3.4.2. L’application des stratégies antioxydantes pour traiter les LNP.....	69
Objectif de la thèse.....	71
Matériel & méthodes	73
Résultats.....	79
Discussion & perspectives	122
Conclusion.....	135
Références.....	136
Annexes.....	172
Annexe 1 : AMPK Activation of PGC-1 α /NRF-1-Dependent SELENOT Gene Transcription Promotes PACAP-Induced Neuroendocrine Cell Differentiation Through Tolerance to Oxidative Stress	173
Annexe 2 : Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis.....	190
Annexe 3 : déclaration d’invention PSELT pour le traitement des lésions nerveuses	242
Abstract.....	263

Liste des abréviations

3-NT : 3-nitrotyrosine

AC : Adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADSCs : Adipose tissue-derived stem cells

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARN: Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CAT : Catalase

CCL2 : Chemokine (C-C motif) ligand 2

CN : Cellules des crêtes neurales

CF : Capsule frontière

C-Myc : MYC Proto-Oncogene

CNN1 : Calponin 1

CNTF : Ciliary neurotrophic factor

CS : Cellules de Schwann

Cys : Cystéine

Ednrb : récepteur B endothéline

eEFsec : Eukaryotic Elongation Factor, Selenocysteine-TRNA Specific

EGF : Epidermal Growth Factor

Erb2 : Receptor tyrosine-protein kinase

EROs : Espèces réactives à l'oxygène

ERNs : Espèces réactives à l'azote

ESCs : Embryonic stem cells

FAD : Flavin adénine dinucleotide

bFGF : Basic fibroblast growth factor
FoxD3 : Forkhead Box D3
GAP43 : Growth Associated Protein 43
GDNF : Glial-derived neurotrophic factor
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPx : Glutathion peroxydase
GRD : Ganglion rachidien dorsal
GSH : Glutathion (forme réduite)
Hsp70 : Heat shock protein 70
IGF : Insulin growth factor
IL : Interleukines
iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase
IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate
IPSCs : Induced pluripotent stem cells
KCP2 : Keratinocyte-associated psharifrotein 2
KLF4 : Kruppel Like Factor 4
L-DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine (forme stéréo-isomérique lévogyre)
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LKB1 : Liver kinase B1
LNP : Lésions nerveuses périphériques
MAG : Myelin-associated glycoprotein
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MBP : Myelin basic protein
MBPs : Bone morphogenetic *proteins*
MSCs : Mesenchymal stem cells
MVSCs : Multipotent vascular stem cells
NAC : N-acétylcystéine
NC : Nerf crânien

NCAM : Neural cell adhesion molecule

NGF : Nerve growth factor

Nmat1 : Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 1

NSCs : Neural stem cells

NT : Neurotrophin

Ntn5 : Netrin 5

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

NF200 : Neurofilament 200 KDa

NO : Oxyde nitrite

NOS : Oxyde nitrite synthase

NOX : NADPH Oxidase

NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor

Oct4 : Octamer-binding protein 4

OST-STT3A : STT3 Oligosaccharyltransferase Complex Catalytic Subunit A

P0 : Myelin Protein Zero

P75NGFR : Receptor 75 nerve growth factor

PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Pak1 : P21 activated kinase 1

PC12 : Cellules de phéochromocytome de rat

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Pi3K : Phosphoinositol-3-kinase

PIGF : Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class F

PKA : Protéine kinase A

PMP22 : Peripheral Myelin Protein 22

POMC : Pro-opiomélanocortine

PRDX : Peroxyrédoxine

Prss56 : Serine Protease 56

PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog

RE : Réticulum endoplasmique

SBP2 : SECIS-binding protein 2
Sec : Sélénocystéine
SECIS : Selenocysteine insertion structure
SELENOT : Sélénoprotéine T
SKPs : Skin-derived precursor cells
SMA : Smooth muscle actin
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SOD : Superoxyde dismutase
SOX : Sex determining region Y-box
TLR : Toll Like Receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
Trx : Thiorédoxine
TrxR : Thioredoxin reductase
UPR : Unfolded protein response
UTR : Untranslated region
VEGFR1 : Vascular endothelial growth factor receptor 1

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un nerf périphérique	11
Figure 2 : Représentation schématique de la vascularisation d'un nerf périphérique	12
Figure 3 : La myélinisation d'un axone périphérique	13
Figure 4 : Anatomie fonctionnelle du nerf facial	15
Figure 5 : Schéma des branches terminales du nerf facial	16
Figure 6 : Représentation schématique et équivalence des différents grades de lésions nerveuses selon Sunderland	17
Figure 7 : Les différentes étapes de dégénérescence Wallérienne	21
Figure 8 : Problèmes rencontrés après une mauvaise guidance axonale	25
Figure 9 : Schéma récapitulant les différentes stratégies aux LNP	30
Figure 10 : Représentation schématique des propriétés des cellules souches à travers l'exemple de la lignée neurale	31
Figure 11 : Les différents types de cellules souches	33
Figure 12 : Les niches des cellules souches	34
Figure 13 : Graphiques résumant les essais cliniques utilisant les cellules souches dans le cadre des LNP en 2015	36
Figure 14 : Schémas de la neurulation ou formation du tube neural	42
Figure 15 : La migration et le devenir des CN	43
Figure 16 : Représentation des facteurs environnementaux et des récepteurs impliqués dans la régulation des voies de migration des CN (flèches bleues) au niveau du tronc	44
Figure 17 : Les cellules capsules frontière	45
Figure 18 : Les cellules dérivées des CF	47
Figure 19 : Le métabolisme des EROs	50
Figure 20 : Voies biochimiques du métabolisme des radicaux libres par le système enzymatique endogène	54
Figure 21 : Représentation schématique de la machinerie d'insertion de la Sec chez les eucaryotes	56
Figure 22 : Structure de la SELENOT et prédiction informatique de sa conformation tridimensionnelle	60

Figure 23 : Interaction de la SELENOT avec le complexe OST-STT3A et conséquence de son absence sur le complexe OST-STT3A	60
Figure 24 : Séquence du peptide PSELT	61
Figure 25 : Communication macrophage-neurone lors de la régénération nerveuse	66
Figure 26 : Exposition du nerf facial et mise en place de la chambre de régénération d'origine veineuse.	72
Figure 27 : Evolution du nombre de cellules souches dérivées des CF (cellules tdTOM- positive dans l'article) au cours des différents passages	73
Figure 28 : Modalité d'évaluation du mouvement des vibrisses	74
Figure 29 : Exemple d'un potentiel d'action des unités motrices (MUAP) triphasique	75

Introduction

1. Les lésions du nerf périphérique

1.1. Etiologie

Les lésions nerveuses périphériques (LNP) ou neuropathies, sont des traumatismes relativement fréquents puisqu'elles affectent chaque année 300.000 patients en Europe et 200.000 aux Etats-Unis (Belkas et al., 2004; Ichihara et al., 2008). En 2003, le nombre de personnes souffrant de LNP sur le territoire américain était estimé à 20 millions (Grinsell and Keating, 2014).

Même si le système nerveux périphérique (SNP) possède des capacités de régénération spontanée meilleures que celles du système nerveux central (SNC), une récupération complète n'est observée que pour les lésions les moins sévères. Les conséquences des LNP dépendent du type de lésion (compression, section, lacération, élongation), de leur localisation (par rapport au soma du neurone) ainsi que de leur gravité. Les nerfs périphériques pouvant être sensitifs, moteurs ou mixtes, les lésions impactent, selon les nerfs atteints, la conduction sensorielle et/ou motrice. Les LNP peuvent toucher la discrimination sensitive et induire une hypoesthésie ou inversement une hyperalgésie voire une allodynie, c'est-à-dire une douleur déclenchée par un stimulus normalement non nociceptif (Richner et al., 2011). Du point de vue moteur, une perte de la motricité plus ou moins importante pouvant aller jusqu'à la paralysie dans les cas les plus graves peut aussi être observée. Le traitement chirurgical reste encore aujourd'hui la stratégie de référence pour corriger cette défaillance dans la récupération des fonctions nerveuses. Cependant, une méta-analyse menée en 2005 sur la récupération des lésions des nerfs ulnaires et médians montrait une efficacité du traitement chirurgical dans seulement 51.6% des cas (Ruijs et al., 2005). Les LNP sont ainsi une source importante de handicap pour les patients et représentent un coût énorme pour la société avec par exemple une dépense annuelle estimée à 150 milliards de dollars aux Etats-Unis (Lundborg, 2003; Taylor et al., 2008; Siemionow and Brzezicki, 2009).

De nos jours, les LNP sont majoritairement d'origine traumatique avec les accidents de la voie publique (64 % des cas), les incidents lors de la pratique d'une activité sportive ou encore les accidents balistiques ou à l'arme blanche (Noble et al., 1998; Burnett and Zager, 2004). Elles touchent surtout les membres supérieurs avec une forte prévalence pour les fractures de l'humérus. Concernant les membres inférieurs, les lésions se concentrent au

niveau du nerf sciatique qui peut être lésé lors de fractures du bassin ou des hanches. En plus des causes traumatiques, on peut également recenser des causes iatrogènes lors de la résection de tumeurs ou lors de complications chirurgicales (Kretschmer et al., 2001). Enfin, les LNP peuvent être la conséquence de certaines pathologies comme le diabète, l'insuffisance rénale chronique, les infections au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dûes à des carences vitaminiques ou nutritionnelles dans les cas d'alcoolisme ou encore après des traitements chimiothérapeutiques anticancéreux (Edwards et al., 2008; Evans et al., 2011; Chopra and Tiwari, 2012).

1.2. Structure du nerf périphérique

1.2.1. Anatomie du nerf périphérique

Le système nerveux est composé du SNC et du SNP. Si le SNC est constitué de l'encéphale et de la moelle spinale, le SNP inclut lui les nerfs périphériques et les ganglions. Le SNP a pour rôle de transmettre, à travers les nerfs périphériques, l'influx nerveux entre le SNC et les effecteurs périphériques (fibres efférentes motrices) ou les récepteurs sensoriels (fibres afférentes sensibles). On dénombre 43 paires de nerfs périphériques chez l'Homme : 12 paires de nerfs crâniens (NC I à XII) et 31 paires de nerfs spinaux.

Un nerf périphérique est constitué de plusieurs axones provenant de motoneurones, de neurones sensoriels primaires et/ou de neurones végétatifs pré et post-ganglionnaires dont les somas sont regroupés au niveau de noyaux ou ganglions (Felten and Jozefowicz, 2011; Mtui et al., 2015). Ces axones sont entourés de couches successives de cytoplasme provenant des cellules de Schwann (CS) (ou oligodendrocytes dans le SNC) avoisinantes qui forment une gaine de myéline. Autour de ces prolongements myélinisés, différentes couches de tissus conjonctifs structurent le nerf périphérique (voir figure 1) :

- L'endonèvre (endoneurium) : cloison collagénique formant des tunnels dans lesquels progressent les axones qui se regroupent pour former des fascicules nerveux (Richard et al., 2012; Gao et al., 2013).
- Le périnèvre (périneurium) : gaine conjonctivo-vasculaire entourant chaque fascicule nerveux. Elle est constituée de couches concentriques de cellules périneuriales d'origine

fibroblastique, séparées entre elles par une membrane basale et dont le nombre varie avec la taille du fascicule (Weerasuriya and Mizisin, 2011; Greathouse et al., 2016).

- L'épinèvre (épineurium) : membrane constituée de couches épaisses et denses de tissu conjonctivo-adipeux entre les fascicules. Elle représente 30 à 70 % de la surface de section d'un nerf périphérique. L'épinèvre permet l'adhésion et le glissement du nerf aux autres structures environnantes, de résister aux forces de tension par son élasticité et de protéger les axones (par exemple en limitant la diffusion de solutés injectés localement) (Rigoard and Lapierre, 2009; Peltonen et al., 2013; Sala-Blanch et al., 2013).

Des analyses microscopiques montrent que dans certains cas, comme par exemple pour le nerf sciatique au niveau de la fosse poplitée, il existe une couche supplémentaire de tissu conjonctif : la gaine paraneurale (ou conjunctiva nervorum). Cette couche de collagène, semblable à l'épineurium, enveloppe le nerf avec le tissu adipeux avoisinant (Brull et al., 2015).

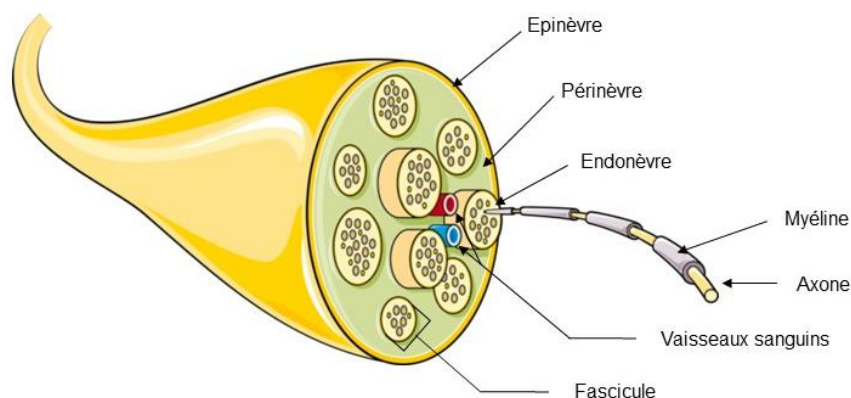


Figure 1 : Structure d'un nerf périphérique. Au centre du nerf se trouvent les filaments nerveux ou axones regroupés sous forme de fascicules. Ces fascicules sont entourés de couches de tissu conjonctif différentes dans leur composition et leur fonction : l'endonèvre (endoneurium), le périnèvre (perineurium) et l'épinèvre (epineurium) en périphérie.

Le nerf périphérique est vascularisé par un réseau vasculaire anastomotique complexe et singulier, appelé « vasa nervorum » qui trouve son origine dans des troncs artériels avoisinants. Un réseau vasculaire externe péri-fasciculaire génère des branches longitudinales

et radiculaires qui traversent les différentes couches successives de tissu conjonctif composant le nerf pour atteindre l'endonèvre sous forme de capillaires longitudinaux endofasciculaires (voir figure 2). Ces capillaires endoneuraux non fenêtrés forment avec le nerf une barrière hémato-nerveuse (*vaso nervorum*). Même si le nerf périphérique présente une résistance particulière à l'ischémie, cette dernière impactera en premier lieu les fascicules nerveux avant de s'appliquer sur l'épinèvre (Weerasuriya and Mizisin, 2011).

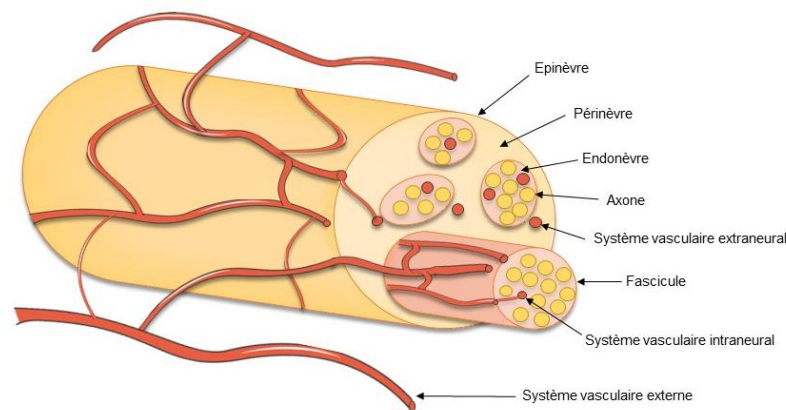


Figure 2 : Représentation schématique de la vascularisation d'un nerf périphérique. Chaque artère génère une branche ascendante et une branche descendante qui se divisent elles-mêmes en différentes branches épineurales qui traversent le nerf longitudinalement au sein de l'épinèvre. Ces branches épineurales génèrent des ramifications qui pénètrent dans l'épinèvre. A ce niveau, de nouvelles ramifications sont formées afin de traverser les couches successives du périnèvre et finalement entrer dans l'endonèvre. Une fois le périnèvre traversé, les capillaires endoneuraux générés suivent une distribution longitudinale.

1.2.2. La gaine de myéline

Lors de la myélinisation, l'axone périphérique est recouvert au niveau d'un internode par le cytoplasme de CS avoisinantes. Ce recouvrement est incomplet puisque persiste une fente reliée à la surface : le mésaxone (Scherer and Arroyo, 2014). Une fois que les feuillettes externes de la membrane plasmique de la CS ont fusionné, le mésaxone devient virtuel et commence à s'allonger autour de l'axone, formant plusieurs couches successives de cytoplasme. Cet enroulement se fait de manière spiralee, la couche en cours de formation

progressant sous la couche précédente (Bunge et al., 1961) (voir figure 3). Puis le cytoplasme disparaît ne laissant qu'une succession de couches de membrane plasmique donnant un aspect lamellaire de myéline dite compacte. Le cytoplasme est alors déplacé aux extrémités du segment internodal, formant des languettes superposées de cytoplasme : les languettes paranodales (Morell and Quarles, 1999). Par ailleurs, certaines portions de cytoplasme persistent entre les couches de membranes créant alors les incisures de Schmidt-Lanterman. Ces enroulements successifs de myéline permettent notamment de protéger l'axone et de l'isoler de son environnement. Cette myéline, est composée essentiellement de lipides (70%) comme les sphingomyélines et de quelques protéines spécifiques comme les protéines de myéline P0 (*Myelin protein zero*), PMP22 (*Peripheral myelin protein 22*), MBP (*Myelin basic protein*) ou MAG (*myelin associated glycoprotein*) qui ont notamment un rôle dans l'architecture de la gaine (Boiko and Winckler, 2006).

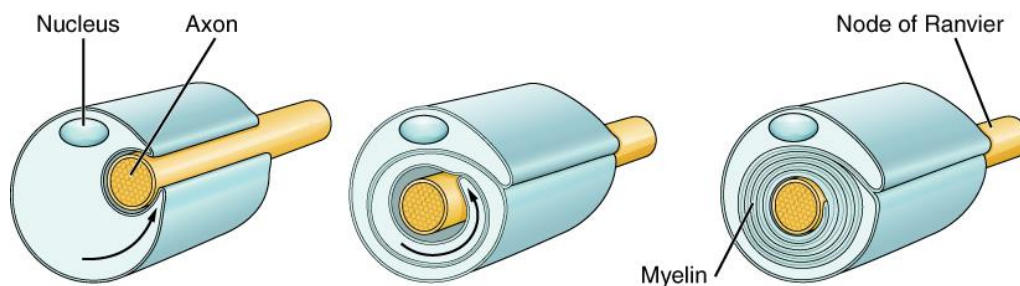


Figure 3 : La myélinisation d'un axone périphérique. La gaine de myéline est constituée de l'enroulement successif de membranes plasmiques de CS (tiré de [Biologydictionary.net](http://biologydictionary.net) Editors).

Entre les internodes se trouvent de courtes portions d'axone non-myélinisé appelées nœuds de Ranvier. A leur niveau, la membrane axonale comporte de nombreux canaux sodiques et potassiques voltage-dépendant ainsi que des pompes Na^+/K^+ pour permettre la formation d'un potentiel d'action (Ariyasu et al., 1985; Cooper, 2011). Ce potentiel d'action se propage le long de l'axone par l'intermédiaire des nœuds de Ranvier, donnant l'impression de sauter au-dessus des internodes. Ce phénomène de propagation rapide est appelé saltatoire.

1.2.3. Le nerf facial

1.2.3.1. Présentation du nerf facial

Le nerf facial appartient à la VII^{ème} paire de NC. Il trouve son origine au niveau central avec ses noyaux localisés dans le sillon bulbo-protubérantiel dans la fossette olivaire du tronc cérébral entre les noyaux du nerf abducens (VI^{ème} NC) en avant et les noyaux du nerf vestibulocochléaire (VIII^{ème} NC) en arrière. C'est un nerf mixte avec une fonction motrice principale pour les muscles peauciers de la face, le muscle stylo-hyoïde, la partie postérieure du muscle digastrique et le muscle stapédien au niveau de l'oreille ainsi qu'une fonction sensitive affiliée aux sensations gustatives sur les deux tiers antérieurs de la langue. Il possède également des fonctions sensibles au niveau de la peau et du pavillon de l'oreille (au niveau de la zone de Ramsay-Hunt) apportées par les fibres du nerf intermédiaire (NC VII bis) auquel le nerf facial est affilié et qui trouve son origine entre les noyaux du VII et du VIII. Le nerf facial possède aussi une activité viscérale en raccordant les fibres parasympathiques aux glandes submandibulaires et sublinguales où elle stimule la production salivaire, et aux glandes lacrymales ainsi que la muqueuse nasale. Enfin, le nerf facial participe au réflexe cornéen (voir figure 4) ([Lacombe, 2009](#)).

1.2.3.2. Trajet du nerf facial

Les fibres nerveuses émergent du sillon bulbo-protubérantiel accompagnées des fibres du nerf accessoire et pénètrent dans le conduit auditif interne puis traverse le rocher en empruntant le canal du facial. Au niveau du ganglion géniculé les fibres des nerfs VII et VII bis fusionnent pour générer un nerf facial unique qui sort du rocher par le foramen stylo-mastoïdien. Tout au long de son trajet dans le rocher, le nerf facial détache des rameaux collatéraux qui iront innerver la partie antérieure de la langue (la corde du tympan), le muscle stapédien (nerf stapédien) et s'anastomoser avec le nerf trijumeau (via les nerfs grand et petit pétreux) ([Lacombe, 2009](#)).

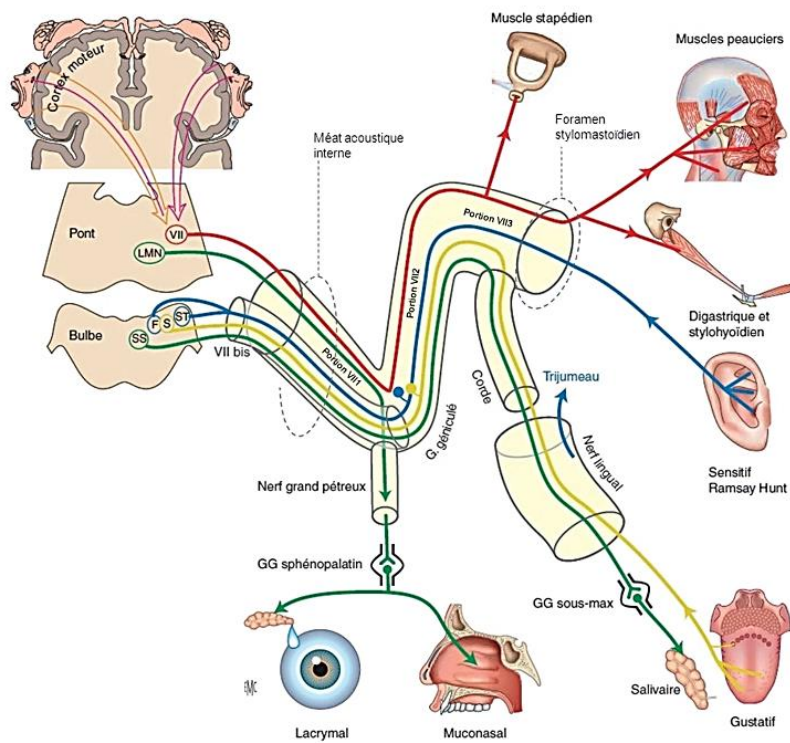


Figure 4 : Anatomie fonctionnelle du nerf facial. En rouge les fibres motrices, en bleu les fibres sensibles, en jaune les fibres sensorielles et en vert les fibres végétatives (Hitier et al., 2013).

Le foramen stylo-mastoidien franchi, le nerf facial génère encore différentes collatérales motrices et sensibles (nerf auriculaire postérieur). Il pénètre ensuite dans la glande parotide pour former les branches temporo-faciale et cervico-faciale d'où émergent les branches terminales : temporale, zygomatique, buccale, marginale mandibulaire et cervicale (voir figure 5) (Lacombe, 2009).

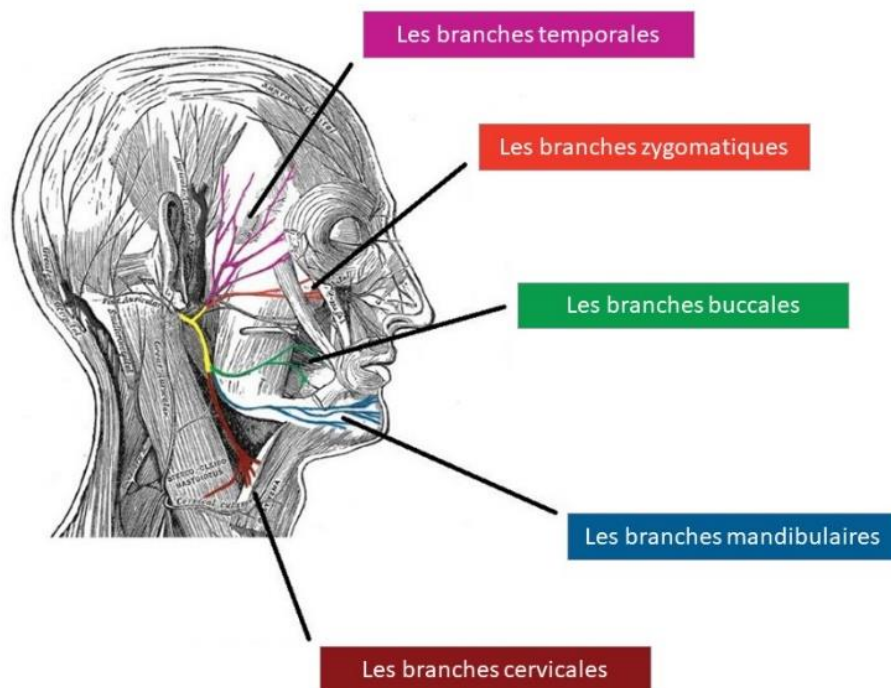


Figure 5 : Schéma des branches terminales du nerf facial (modifié de Curry, 2019)

1.3. Les grades de sévérité des lésions

1.3.1. La classification de Seddon

Selon le type et la gravité de la lésion, les différentes structures du nerf seront plus ou moins endommagées et influenceront sur le pronostic d'une restauration complète spontanée. C'est en 1943 que Seddon présente la première classification des LNP (Seddon, 1947). Celle-ci présente trois stades qui sont encore couramment utilisés en clinique (voir figure 6) :

- La neurapraxie : Elle traduit un arrêt ou bloc de la conduction sans lésion neuronale. La lésion impacte uniquement la gaine de myéline et est restreinte au site de lésion. Elle est généralement provoquée par une compression ou une élongation du nerf trop importante (Campbell, 2008). Cliniquement, elle se traduit par une perte temporaire de la fonction mais une récupération spontanée et complète est observée. Avec une vitesse de repousse axonale estimée chez l'Homme à 1 millimètre par jour (Walsh and Midha, 2009), les fonctions motrices

et ou sensibles lésées sont restaurées après quelques jours à quelques semaines selon la taille de la lésion.

- L'axonotmésis : Elle se définit par une rupture de l'axone sans atteinte du périnèvre et de l'épinèvre. La repousse axonale est guidée par le périnèvre intact. La perte de fonction et la récupération sont plus longues comparées à la neurapraxie (peut prendre plusieurs mois) mais est encore complète généralement.

- Le neurotmésis : Le stade le plus grave qui correspond à une section complète des trois structures du nerf (endonèvre, périnèvre et épinèvre) et un arrêt complet de la conduction. Dans certains cas l'épinèvre peut être épargné. La grande quantité de tissu conjonctif dans le site de lésion provoque une repousse axonale hasardeuse qui peut être à l'origine de l'apparition de tumeurs au niveau du nerf : les névromes. A ce stade, la récupération complète est impossible et seul un traitement chirurgical peut permettre une récupération partielle.

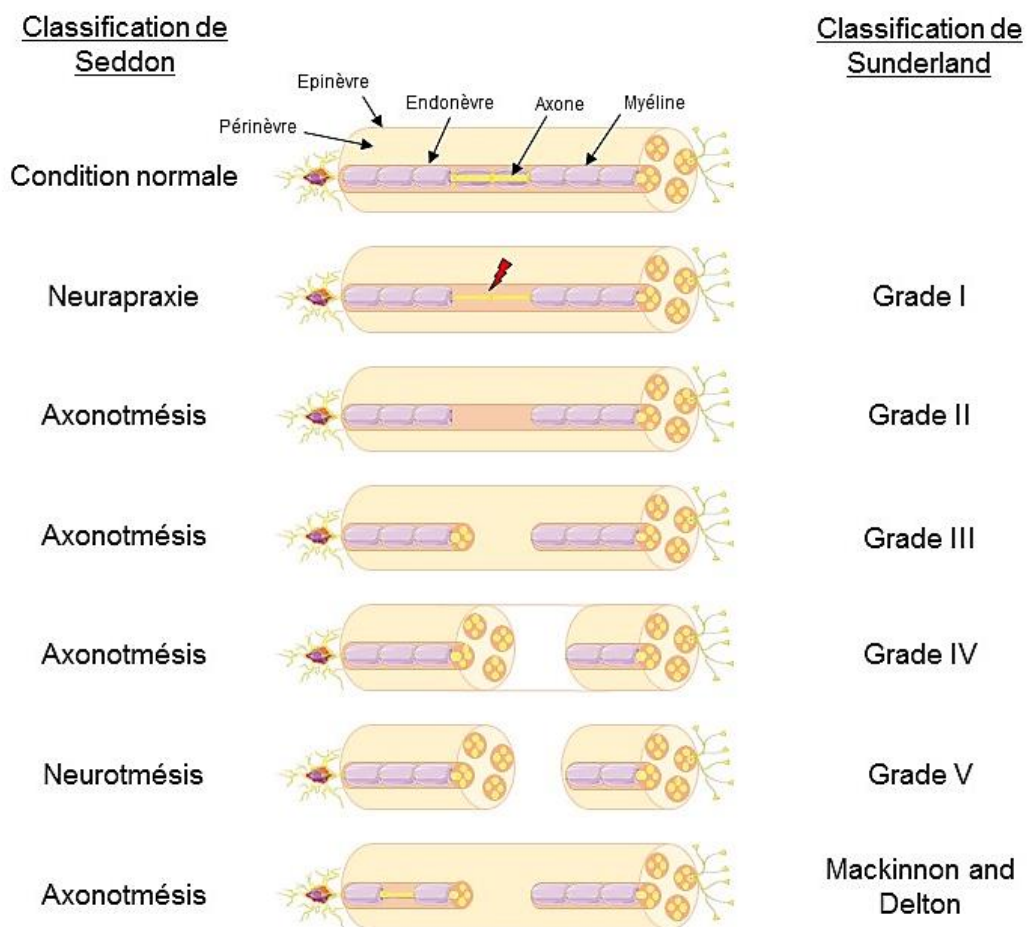


Figure 6 : Représentation schématique et équivalence des différents grades de lésions nerveuses selon Sunderland. Le stade de neurapraxie correspond à un arrêt plus ou moins important de la conduction nerveuse sans lésion axonale contrairement au stade d'axonotmésis. Le stade de Neurotmésis correspond, quant à lui, à la section de la totalité des structures nerveuses. Le grade I correspond à la neurapraxie de Seddon. Le grade II indique une perte de la continuité de l'axone et de sa gaine de myéline sans lésion de l'endonèvre. Les grades III à V correspondent à des atteintes des différents tissus conjonctifs du nerf (III ; endonèvre lésé ; IV : périnèvre ; V : transection de l'épinèvre).

1.3.2. La classification de Sunderland

Quelques années plus tard, Sunderland a affiné cette classification en 5 stades (Sunderland, 1951) (voir figure 6). Comparée à la classification de Seddon, cette nouvelle nomenclature prend en compte la membrane basale autour des fascicules nerveux comme structure anatomique supplémentaire et les processus cicatriciels impliqués. Elle permet d'expliquer les disparités de récupération entre les axonotmésis. Les lésions sont alors réparties de la manière suivante :

- Premier degré : est identique à la neurapraxie de Seddon
- Deuxième degré : rupture axonale sans atteinte de la membrane basale. La repousse axonale est guidée et la récupération est complète.
- Troisième degré : correspondent à des lésions des tubes endoneuraux (membrane basale inclut). Le périnèvre est encore préservé. Le processus cicatriciel est plus important que dans le deuxième degré et la perte d'intégrité de la membrane basale peut induire une désorganisation des axones au moment de la repousse axonale. Des échanges de différentes fibres (motrices, sensibles, végétatives) peuvent être observés entre les fascicules. A partir de ce stade, la récupération est incomplète.
- Quatrième degré : La lésion inclut le périnèvre et seul l'épinèvre est intact. La cicatrice inflammatoire au niveau du site de lésion, plus importante que le degré précédent, forme un névrome qui perturbe davantage la repousse axonale. La récupération spontanée est nulle à partir de ce stade et nécessite un traitement chirurgical.
- 5^{ème} degré : Lésion de toutes les structures et correspond au neurotmésis.

La classification de Sunderland a cependant quelques limites au niveau clinique car les nerfs lésés mélangent différents grades généralement. Mackinnon ajouta un sixième stade correspondant à une mosaïque des différents grades dans différents fascicules et à différentes localisations dans le nerf ([Watchmaker and Mackinnon, 1997](#)).

1.4. Les bases cellulaires et moléculaires de la régénération nerveuse

Lorsque les axones sont sectionnés comme lors d'une axonotmésis ou d'un neurotmésis, une suite rapide de changements métaboliques et structuraux surviennent au niveau du rameau distal du site de lésion pour dégénérer la fibre nerveuse lésée tandis que la portion proximale subit d'autres modifications pour préparer la régénération.

1.4.1. La dégénérescence Wallérienne

Les changements observés en aval de la lésion furent décrits pour la première fois par Augustus Volney Waller en 1850, après avoir observé des lésions des nerfs glossopharyngés et hypoglosses chez la grenouille et sont aujourd'hui regroupés sous le terme de dégénérescence Wallérienne ([Gaudet et al., 2011](#)). L'objectif de cette dégénérescence est d'éliminer le plus rapidement possible les débris cellulaires, notamment certaines protéines de myéline inhibitrices des processus de régénération comme MAG. Cela va créer un environnement favorable à la régénération axonale et réinnervier l'organe cible du nerf pour restaurer sa fonction ([Bähr and Przyrembel, 1995](#); [Shen et al., 1998](#); [Cafferty et al., 2010](#)). Cette élimination est assurée par les CS et les macrophages permettant une action rapide (dès les premières heures qui suivent la lésion) et prolongée (jusqu'à deux semaines) ([Perry and Brown, 1992](#)). Cette dégénérescence Wallérienne est également présente dans le SNC. Cependant, des différences existent concernant les types cellulaires impliqués (microglie et oligodendrocytes dans le SNC ; macrophages et CS dans le SNP) ou dans le processus de dégénérescence (suppression de la myéline dégénérée dans le SNP uniquement).

La séparation des axones du rameau distal avec leur soma initie la dégénérescence Wallérienne au niveau du rameau distal de la lésion avec l'activation rapide (1 heure après la lésion) de l'expression de récepteurs tyrosine kinase Erb2 au niveau des CS ([Guertin et al.,](#)

2005). Parmi les raisons expliquant cette vulnérabilité du rameau distal, un arrêt de l'acheminement vers l'axone de la protéine Nmat1 (*nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1*) causé par la lésion a été suggéré, même si les mécanismes mis en jeu n'ont pas encore été totalement élucidés (Sasaki et al., 2009; Coleman and Freeman, 2010). Les CS, localisées au contact des axones, sont les premières cellules non neuronales à répondre à une axotomie. La perte de contact entre l'axone et la myéline induit une réorganisation des protéines membranaires au sein des CS et une dédifférenciation de celles-ci selon un mécanisme dépendant du système ubiquitine-protéasome (Hung et al., 2015). Leur dédifférenciation s'accompagne d'un arrêt de la production de myéline, d'une prolifération et de leur migration vers le site de lésion où elles s'associent avec les fibroblastes adjacents pour former les bandes de Büngner (Gaudet et al., 2011). Ces bandes ont pour rôle de relier les extrémités proximale et distale afin de guider la repousse axonale (voir figure 7).

En aval de la lésion les rameaux nerveux distaux sont rapidement éliminés après la lésion puisqu'ils sont totalement fragmentés dans les deux jours qui suivent la lésion (Beirowski et al., 2005). Cette fragmentation est réalisée à l'intérieur de microsphères d'actine produites par les CS selon un mécanisme dépendant de l'axe PIGF (*phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class F*)-VEGFR1 (*Vascular endothelial growth factor receptor 1*)-Pak1 (*P21 activated kinase 1*) (Vaquié et al., 2019). Les CS sont ainsi capables de dégrader leur propre myéline et les débris extracellulaires, faisant de ces cellules les principaux acteurs phagocytaires durant les cinq premiers jours post-lésion (Perry et al., 1995). Cette étape peut même être capitale pour protéger les neurones non lésés en cas de lésion partielle où tous les neurones ne seraient pas axotomisés. En effet, dans le cas d'une élimination insuffisante, la myéline dégénérée activera le système du complément qui, à son tour, pourra endommager les cellules nerveuses saines (Mead et al., 2002; Ramaglia et al., 2007).

Cette action phagocytaire des CS est au fur et à mesure du temps renforcée puis relayée par les macrophages périphériques. Après la lésion, une réaction inflammatoire se met en place avec l'activation au niveau des CS de nombreux *Toll-like receptors* (TLRs) comme TLR3, TLR4 et TLR7 et notamment TLR1 (Boivin et al., 2007). Cette activation des TLRs induit chez les CS la production et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et le CCL2 (*Chemokine (C-C motif) ligand 2*) (Shamash et al., 2002; Martini et al., 2008). Cette sécrétion est renforcée par effet paracrine avec les

fibroblastes adjacents qui produisent d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6) et le GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Reichert et al., 1996; Be'eri et al., 1998). Le CCL2 permet le recrutement de macrophages hématogènes par diapédèse à partir du deuxième jour suivant la lésion pour atteindre un pic au septième jour (Reichert et al., 1994). Les macrophages recrutés, en plus de leur action phagocytaire, sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. La sécrétion, correspondant à la cinétique des macrophages, atteint un pic au septième jour puis décroît progressivement, la dégénérescence Wallérienne se concluant en moyenne deux-trois semaines après la lésion pour permettre la repousse axonale (Mirski et al., 2003). Cependant, les cinétiques de production et de sécrétion des différentes cytokines et chimiokines ainsi que le recrutement des macrophages a été montré dépendant du type de lésion (coupure/écrasement). Contrairement à ce qui peut être observé dans les lésions par cisaillement, la production de cytokines est régulée par les axones en cours de régénération dans les lésions par écrasement (Rotshenker, 2011).

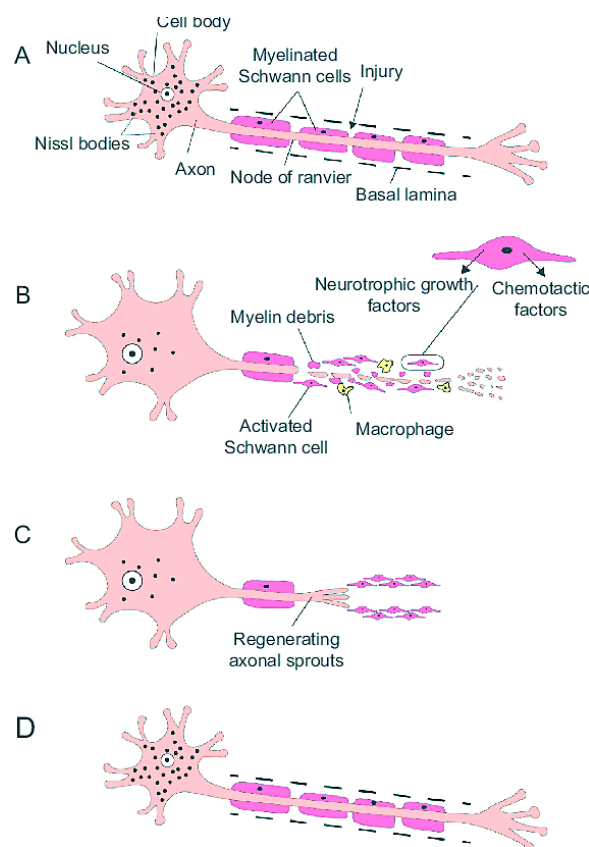


Figure 7 : Les différentes étapes de dégénérescence Wallérienne. (A) un axone sain provenant d'un nerf périphérique entouré de CS et de fibroblastes. (B) L'axone subit une lésion qui provoque des lésions tissulaires en aval. Les CS activées et les macrophages recrutés phagocytent les débris. (C) Une fois la zone de lésion nettoyée de ces débris, les filopodes axonaux émergent du rameau proximal pour réinnover la cible originale de l'axone. Le guidage des filopodes se fait à travers les colonnes de Büngner formées par les CS. (D) Lorsque l'innervation est réalisée les CS reprennent un phénotype myélinisant et une gaine de myéline enroule l'axone néoformé (Al-Zer and Kalbouneh, 2015).

1.4.2. La survie neuronale et la chromatolyse

Si en aval de la lésion le segment nerveux est fragmenté et éliminé pour créer un environnement propice à la repousse, en amont, d'autres modifications cellulaires et métaboliques ont lieu afin que le neurone survive et régénère son axone (Stoll and Müller, 1999). Les neurones subissent un changement métabolique, délaissant leur fonction excitatrice au profit d'un phénotype plus conservateur. L'arborisation dendritique est réduite drastiquement (plus de la moitié des synapses est perdue quatre semaines après une axotomie), le nombre d'afférences synaptiques issues d'autres neurones est diminué et la production de neurotransmetteurs est inhibée (Carlstedt, 2009; Spejo et al., 2013; Barbizan et al., 2014). En contrepartie, une augmentation de la synthèse protéique est observée pour différents gènes impliqués dans la structure cellulaire (tubuline, actine, peripherine, neurofilament), des facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs (*brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF)), des neuropeptides (neuropeptide Y) ou encore des protéines de croissance comme neuréguline ou GAP43 (*growth associated protein 43*) (Hoffman and Cleveland, 1988; Lewis and Bridgman, 1992; Allodi et al., 2012). Deux à cinq jours après une axotomie, ces changements métaboliques se traduisent par une importante réorganisation intracellulaire au niveau du péricaryon où les corps de Nissl, granules basophiles accolés au réticulum endoplasmique (RE) rugueux, disparaissent au cours d'un processus appelé chromatolyse. De plus, sous l'effet du réarrangement du cytosquelette, cette chromatolyse est associée à un gonflement du péricaryon et un déplacement du noyau vers la périphérie (McIlwain and Hoke, 2005). Cette chromatolyse et les changements morphologiques l'accompagnant ne restent cependant qu'une étape transitoire dans la survie neuronale avec un retour progressif à une morphologie « normale » plusieurs mois après

l'axotomie (Degn et al., 1999). Dans les cas où la lésion ne pourrait être supportée par l'étape de chromatolyse, le neurone entrera alors en apoptose (Martin et al., 1999). Ainsi, selon la gravité de la lésion une perte plus ou importante de neurones sera observée. Différents facteurs peuvent influencer sur la perte neuronale comme le type de lésion, la distance de la lésion par rapport au corps cellulaire, le type de neurone lésé ou encore le stade de maturité du neurone (Ygge, 1989; Lowrie et al., 1994; Decosterd and Woolf, 2000; Valero-Cabré and Navarro, 2001).

1.4.3. La régénération axonale

A partir d'un nœud de Ranvier situé en amont de la lésion, la membrane plasmique de l'axone lésé fusionne et forme le cône de croissance (ou bourgeon axonal) pour l'isoler des facteurs produits par les CS et cellules inflammatoires avoisinantes (Bradke et al., 2012). Le cône de croissance est une structure cellulaire capable de s'allonger selon son environnement et qui sera à l'origine de l'axone naissant. Lors de sa formation, plus d'une dizaine de filopodes bourgeonnent et progressent entre les CS à l'intérieur des bandes de Büngner. Puis, ce nombre de fibres nerveuses augmente progressivement pour atteindre un pic plusieurs semaines après la lésion (Bijlsma et al., 1983). L'élongation des axones naissants est guidée par chimiotactisme c'est-à-dire par un gradient de facteurs neurotrophiques comme le NGF (*nerve growth factor*), IGF (*insulin growth factor*) ou BDNF ainsi que des molécules d'adhésion comme N-CAM ou GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), produits et sécrétés par les CS le long de ces bandes (Bunge et al., 1982). En effet, lors des processus de clairance, les CS surexpriment des récepteurs de classe II qui permettent de lier le NGF libre de la matrice extracellulaire et former un support trophique qui guidera la repousse axonale. Ces facteurs créent alors un environnement qui peut être permissif et donc permettre l'élongation des filopodes ou au contraire être répulsif. A la fin, les filopodes atteignant leur cible murissent et voient leur diamètre croître tandis que ceux n'ayant pas réussi à établir des connexions subissent, quant à eux, une atrophie jusqu'à disparaître (Witzel et al., 2005). De nouveau au contact de l'axone, les CS se différencient et redeviennent myélinisantes. Ce processus d'élongation et de guidage est limité dans le temps : une perte anormalement longue de la connexion

nerveuse dans la portion distale entraînera une « mise en veille » des CS dans cette zone (perte de l'expression des facteurs neurotrophiques) et une atrophie des tissus cibles par apoptose.

L'efficacité de la récupération fonctionnelle varie selon les espèces avec une efficacité moindre chez l'Homme comparée aux rongeurs (1 mm par jour chez l'Homme et jusqu'à 4 mm par jour chez le rat) (Sulaiman and Gordon, 2013; Teixeira et al., 2016). Ces différences ont été attribuées d'une part à une élimination plus longue des débris de myéline et des axones lésés et deuxièmement à une longueur plus grande des nerfs chez l'Homme, donc une zone plus grande à nettoyer et une plus grande distance pour les axones régénérés à atteindre leur cible. Si les capacités de régénération et de guidage permettent une récupération quasi-complète pour les lésions légères (neurapraxie), lorsque la continuité du tissu conjonctif est altérée (axonotmésis ou neurotmésis), la récupération fonctionnelle de l'organe cible sera d'autant plus faible que la lésion sera sévère et la structure fasciculaire du nerf complexe. Dans ces cas, l'organisation topographique des fibres peut être modifiée avec une perte de l'architecture fasciculaire initiale ou avec un axone se retrouvant divisé en un nombre plus important de fascicules qu'il ne l'était avant la lésion (Valero-Cabré et al., 2004; Lago and Navarro, 2006). D'autre part, au moment où les filopodes traversent le site de lésion, ils progressent « à l'aveugle » dans le réseau dense de fibres de collagène d'origine fibroblastique que forme le névrome, où le risque de mauvaise guidance est important. Ces perturbations dans le processus de guidance peuvent être la source de douleurs et de dysesthésie et d'une innervation inappropriée d'autres organes (Valero-Cabré and Navarro, 2002). Par exemple, des fibres motrices efférentes peuvent innerver des organes sensitifs alors qu'à l'inverse des fibres afférentes sensitives peuvent innerver des plaques motrices. Selon le degré de sévérité de ces mauvaises orientations, une perte plus ou moins importante de la fonction de l'organe sera observée. Ces perturbations dans l'orientation des fibres sont en partie responsables du faible taux de récupération et de lésions secondaires pour les patients ayant subi des transections nerveuses même après traitement chirurgical. Parmi ces lésions secondaires, une mauvaise orientation nerveuse pourra se traduire cliniquement par l'apparition de dyscinésies (mauvaise contraction de muscles) ou des syncinésies (contraction involontaire de muscles). Plusieurs mécanismes peuvent en être à l'origine : un mauvais ciblage des axones en cours d'élongation lors de la régénération nerveuse, une réorganisation des motoneurones à l'intérieur du noyau du nerf facial ou encore le développement d'une transmission

éphaptique entre axones adjacents (Baker et al., 1994). Ces phénomènes de dyscinésie et de syncinésie sont particulièrement observés lorsque le nerf possède de nombreuses branches terminales rapprochées. Leur diminution représente aujourd’hui un axe de développement majeur pour améliorer l’efficacité des traitements contre les LNP (voir figure 8) (Moran and Neely, 1996).

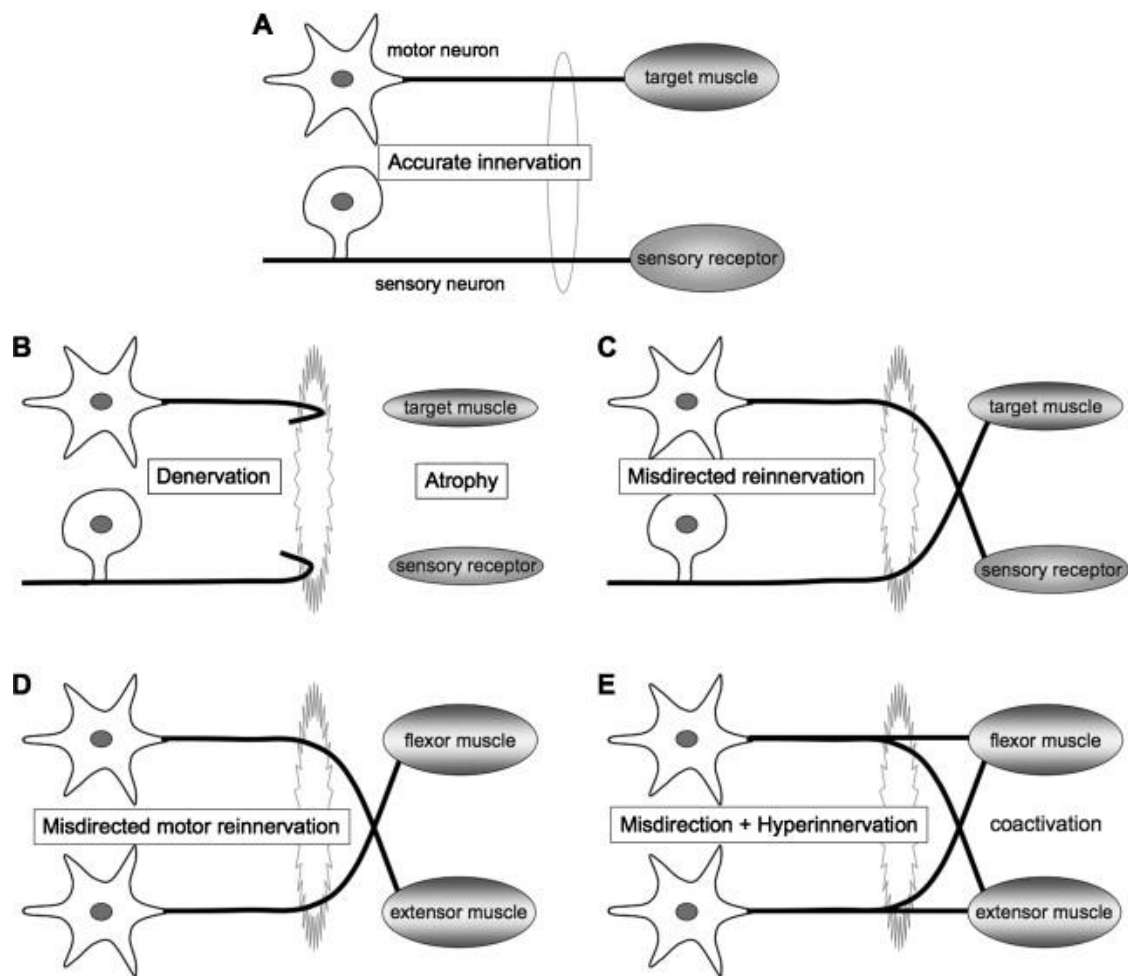


Figure 8 : Problèmes rencontrés après une mauvaise guidance axonale. (A) Exemple d’innervation précise d’un motoneurone et d’un neurone sensitif avec leur cible respective. (B) Une régénération avortée se conclut par une neurodégénérescence et une atrophie des tissus cibles. (C) Les problèmes de guidances rencontrés lors de la traversée du névrome peuvent être à l’origine d’innervation inappropriées. Lorsque ces problèmes impactent des fibres motrices ceux-ci peuvent être source de dyscinésie (D) ou de syncinésie (E) (Allodi et al., 2012).

1.5. Les traitements des LNP et les axes de recherche

Durant ces dernières années, les recherches menées ont considérablement amélioré notre compréhension des phénomènes mis en jeu dans la réparation nerveuse et les facteurs pouvant influencer sur ce processus. Il est à présent établi que la qualité de la repousse dépend du type de lésion (lésion de la myéline ou de l'axone) mais également de la distance la séparant du péricaryon. Si l'intervention chirurgicale reste encore le traitement de premier recours dans le cas des LNP, d'autres alternatives moins invasives ou faisant appel à des agents moléculaires ont vu le jour ([Faroni et al., 2015](#)).

1.5.1. Les traitements chirurgicaux

Les premiers témoignages de LNP remontent à l'Antiquité (XIIe-VIe siècle avant J-C) dans l'Illiade d'Homère et l'histoire de la guerre du Péloponnèse de Thucydide ([Terzis and Papakonstantinou, 2000](#)). Galien fut le premier à diagnostiquer et proposer un traitement pour les personnes souffrant de lésion du plexus brachial. A partir de la Renaissance (XIV-XVe siècle), l'essor des nouvelles sciences comme l'étude de l'anatomie remit en question les préceptes tenus jusque-là et c'est au cours de la première moitié du XIXe siècle avec les travaux de T. Schwann (1830), d'A. Waller (1850), de G.B. Duchenne (1861), de M. Nelaton (1864) et Laugier (1864) qu'apparut pour la première fois la notion de traitement des LNP par suture nerveuse chirurgicale ([Millesi, 1973](#); [Desouches et al., 2005](#)). En 1903, Les médecins W. Harris et V.W Low furent les premiers à proposer d'utiliser un nerf sain pour réinnervé les cibles atteintes ([Carlstedt, 2007](#)). Cette technique de transfert nerveux connu un énorme engouement durant la première moitié du XXème siècle mais sa difficulté de réalisation et le peu de résultats cliniques découragèrent les chirurgiens qui l'abandonnèrent progressivement. Il fallut néanmoins attendre la seconde moitié du XXe siècle et les nombreux cas de LNP suites aux deux guerres mondiales pour voir une nouvelle vague de progrès dans le traitement des LNP. En effet, le besoin de santé publique couplé aux progrès technologiques qui accompagnèrent cette période ont permis le développement de nouveaux outils, notamment les microscopes chirurgicaux et l'essor de la microchirurgie. De nouvelles

techniques de suture ont pu ainsi être mises en place comme la suture épineurale et périneurale (aussi appelée fasciculaire) ou réintroduire la suture latéro-terminale. Cette technique développée par Balance en 1903, consistant à raccorder l'extrémité distale du nerf lésé avec un nerf intact, connu un nouvel essor avec l'équipe de Viterbo (Viterbo et al., 1994). Le dernier axe pour améliorer la récupération est d'empêcher l'atrophie du tissu cible dénervé. Alors que les neurones sensitifs sont capables de voir leurs récepteurs réinnervés plusieurs années après la lésion, les cellules musculaires présentent une plus grande vulnérabilité face à la perte d'innervation. La transplantation de muscles sains peut également accompagner une reconstruction nerveuse pour les cas les plus graves (Faroni et al., 2015).

Malgré une amélioration de la récupération des fonctions sensorimotrices, le traitement chirurgical reste toujours incomplet et le bénéfice est patient-dépendant. S'il reste encore aujourd'hui la solution de premier recours, elle nécessite cependant le développement d'alternatives.

1.5.2. Les traitements conservateurs

En parallèle, des traitements non invasifs ont été développés. Il est aujourd'hui bien documenté que l'exercice physique et la mobilisation de la zone lésée améliore la récupération nerveuse, notamment en favorisant le tri synaptique, en stimulant la prolifération des CS et en stimulant la production et la sécrétion gliale de NGF et de BDNF (English et al., 2011; Teodori et al., 2011; de Ruitter et al., 2014). De plus, il a été observé chez le rat que l'activité physique provoquait une augmentation des niveaux de β -endorphines et de métenképhalines dans la moelle ventromédiale rostrale et dans la substance grise périacqueductale au sein du tegmentum du mésencéphale, deux zones impliquées dans le traitement de la douleur, suggérant qu'en plus de son action réparatrice, l'exercice physique pouvait diminuer la douleur neuropathique (Stagg et al., 2011; Teodori et al., 2011). En plus de son caractère non invasif, l'exercice physique peut-être couplé à d'autres traitements, qu'ils soient invasifs (comme la chirurgie) ou non comme l'électrostimulation (Rosa Junior et al., 2016).

L'électrostimulation a aussi suscité un intérêt croissant ces dernières années même si son bénéfice est encore débattu. Les différentes études menées ont mis en avant la

complexité de cette méthode dont l'effet sur la réparation pouvait être opposé selon le timing et l'intensité de la stimulation. Alors qu'une faible stimulation au niveau du rameau proximal favorise la sécrétion de facteurs neurotrophiques ou de neurotrophines, une stimulation excessive pourra retarder les processus de régénération et provoquer une atrophie musculaire (Gigo-Benato et al., 2010; Kim et al., 2011; Pinheiro-Dardis et al., 2017). A l'image de l'électrostimulation, d'autres pistes thérapeutiques comme la photothérapie, les ultrasons ou la stimulation magnétique ont montré un potentiel thérapeutique intéressant dans le cas des LNP même si pour certaines d'entre elles, les mécanismes impliqués ne sont pas encore totalement élucidés (Raso et al., 2005; Rochkind, 2009; Rosa Junior et al., 2016; Ni et al., 2017). Cependant, par leur sensibilité technique elles nécessitent encore des études complémentaires pour déterminer les réglages optimaux.

1.5.3. Les traitements pharmacologiques

Différents agents pharmacologiques furent également testés, administrés localement ou de manière systémique, avec pour cible différents processus intervenant dans la dégénérescence Wallérienne ou la repousse axonale. Un des premiers axes fut de moduler la réponse inflammatoire pour améliorer l'élimination des débris cellulaires et éviter la formation d'une cicatrice gliale pouvant gêner la guidance des axones néoformés. Dans cette optique, l'administration de corticostéroïdes, de dexaméthasone ou encore de gabapentine, utilisée couramment comme antiépileptique, ont tous montré des résultats bénéfiques chez le rat (Khan et al., 2014; Câmara et al., 2015; Feng and Yuan, 2015). Des résultats positifs ont également été constaté après application de vasodilatateurs (Nimodipine, Trepidil), de bloqueurs de canaux potassiques (4-aminopyridine), de thymorégulateur (chlorure de lithium), d'hormone (mélatonine), de vitamine (cholécalférol) ou d'aspirine, même si le mécanisme d'action n'a pu être identifié pour toutes ces molécules (Mattsson et al., 1999; Kurtoglu et al., 2005; Makoukji et al., 2012; Kaya et al., 2013; Cui et al., 2015; Montava et al., 2015; Tseng et al., 2016).

L'application d'agents pharmacologiques reste cependant confrontée à certaines limites : si l'application systémique est non invasive, son efficacité peut être plus faible qu'une administration locale (Suslu et al., 2013). L'absorbance rapide de certaines molécules peut

aussi freiner leur efficacité, et leur administration répétée pour palier à cette complication peut faire apparaître des effets secondaires sévères comme cela a été observé avec des hormones stéroïdes sur des fibroblastes ([Mukudai et al., 2015](#)).

1.5.4. Les manchons d'interposition

La seconde moitié du XX^{ème} siècle a également permis l'essor de la bioingénierie avec le développement de tubes matriciels produits en laboratoire. D'origine naturelle (collagène, fibronectine, chitosan, gélatine, acide hyaluronique, soie), issus de matières synthétiques biologiquement inactifs (silicone, polyéthylène glycol, polyvinyle, ...) ou d'origine mixte, ces manchons ont pour but de permettre la réinnervation de la cible en guidant le plus précisément possible la régénération axonale vers l'organe cible avec la perte minimale de fibres ([Grinsell and Keating, 2014](#)). Toutefois, cette stratégie n'est pas nouvelle puisqu'au XVIII^{ème} siècle des greffons autologues d'origine nerveuse, vasculaire, musculaires ou tendineuse furent testés, chacun montrant qu'ils pouvaient contribuer à la repousse axonale ([Desouches et al., 2005](#)). Les manchons veineux furent particulièrement étudiés pour leur efficacité comparée aux autres mais étaient restreints à des lésions courtes (< 4cm), la veine se collabait et devenant alors un obstacle pour la repousse axonale ([Sabongi et al., 2015](#)). Pour tous ces manchons naturels, les effets indésirables observés au niveau du site donneur encouragèrent les cliniciens à se tourner plutôt vers une stratégie d'allogreffe, rendue possible par les progrès des traitements immunosuppresseurs comme l'administration de cyclosporine A et de tacrolimus ([Desouches et al., 2005](#)). Cette stratégie alternative présente cependant pour le patient des risques infectieux et peut perturber la repousse axonale en modifiant la réaction inflammatoire. Si depuis 1999 des manchons d'interposition sont commercialisés, leurs résultats divergent en essai clinique, limités à des lésions courtes (<2cm) et avec une efficacité comparable à la greffe nerveuse autologue ([Moore et al., 2009](#); [Pabari et al., 2014](#)).

L'objectif à présent est de modifier l'environnement luminal de ces conduits. A l'origine passifs et uniquement protecteurs, ils deviennent actifs, modifiant le devenir des cellules, facilitant l'adhésion et la migration des CS et des axones. Pour cela, au manchon ont été ajoutés différentes molécules administrées dans la lumière du conduit ou incorporés dans un hydrogel dans la membrane. Parmi les pistes étudiées fut administré des facteurs neurotrophiques

naturellement exprimés lors de la régénération nerveuse comme le BDNF, NGF, GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), IGF-1 ou encore les neurotrophines-3 et 4/5 (Zhang et al., 2004; Madduri and Gander, 2010; Hopkins et al., 2013). Des hormones (progestérone, hormones thyroïdiennes, hormone de croissance) et des substances pharmacologiques comme la N-acétylcystéine (NAC) ont également montré un potentiel thérapeutique même si leur utilisation nécessite encore à ce jour des études supplémentaires (Schumacher et al., 2001; Hart et al., 2004; Barakat-Walter and Kraftsik, 2018; Lopez et al., 2019). Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de ces molécules pouvaient, selon les cas, améliorer l'action des CS, renforcer le nombre de neurofilaments, améliorer la conduction nerveuse ou l'innervation du muscle cible (Zhang et al., 2004; Madduri and Gander, 2010). Cependant, à l'image des traitements pharmacologiques, leur administration est généralement accompagnée de lésions secondaires liées au dosage, à la posologie ou aux interactions entre les différentes molécules qui peuvent parfois perturber leur effet (Boyd and Gordon, 2002; Boyd and Gordon, 2003).

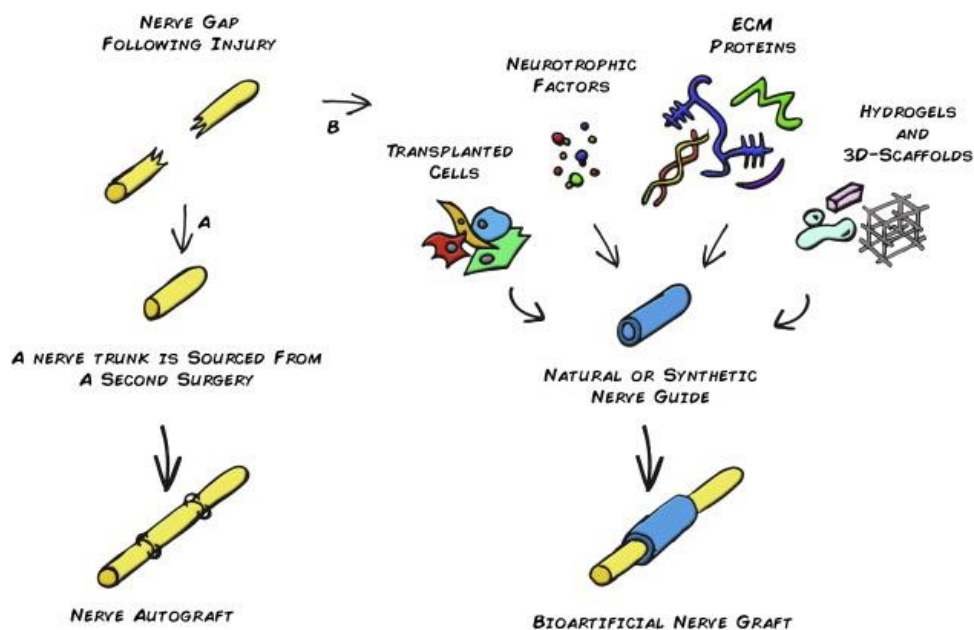


Figure 9 : Schéma récapitulant les différentes stratégies aux LNP. Suit à une axonotmésis le traitement chirurgical utilisant un manchon nerveux sain reste le traitement de première option. Actuellement, des manchons supplémentés avec des molécules sont en cours de développement (Faroni et al., 2015).

Ainsi, la seconde moitié du XX^{ème} siècle a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors des LNP. Grâce aux progrès techniques et technologiques, différentes pistes thérapeutiques ont été proposées en complément du traitement chirurgical actuel (voir figure 9), mais les résultats restent encore insuffisants. La dégénérescence Wallérienne et la régénération axonale étant des processus très complexes impliquant de nombreux acteurs qui agissent dans des intervalles de temps précis, l'idée d'un traitement reposant sur l'administration d'une ou quelques molécules semble utopique. Une dernière alternative, pas encore développée jusque-là, connut un essor important ces dernières années, est celle de la thérapie cellulaire à partir de cellules souches. Douées de capacités régénératrices intrinsèques uniques, les cellules souches sont aujourd'hui considérées comme un outil thérapeutique essentiel de la médecine régénérative de demain.

2. La thérapie cellulaire à partir de cellules souches

2.1. Introduction

C'est en 1868 avec Ernst Haeckel que le terme de cellules souches fut mentionné pour la première fois en faisant référence à l'œuf fécondé. Un siècle plus tard, James Till et Ernest McCulloch démontrent l'existence de ces cellules en injectant des cellules hématopoïétiques dans la moelle de souris irradiées (McCulloch and Till, 1971). Les cellules souches sont des cellules caractérisées par un état indifférencié et définies par deux propriétés : (1) celle d'auto-renouvellement, c'est-à-dire la capacité de se renouveler de manière potentiellement illimitée par division cellulaire symétrique ; et (2) celle de potentialité, à savoir la capacité de se différencier en un type cellulaire plus spécialisé (aussi appelée progéniteur) par division asymétrique (Weissman, 2000) (voir figure 10). Grâce à ces deux propriétés les cellules souches peuvent se maintenir en nombre constant et assurer l'homéostasie des tissus cibles (Wagers and Weissman, 2004). Par la suite, d'autres caractéristiques ont été mises en évidence pour ces cellules comme leur capacité de se regrouper sous forme de sphère pour certaines d'entre elles ou l'expression de différents marqueurs spécifiques (Mimeault and Batra, 2008).

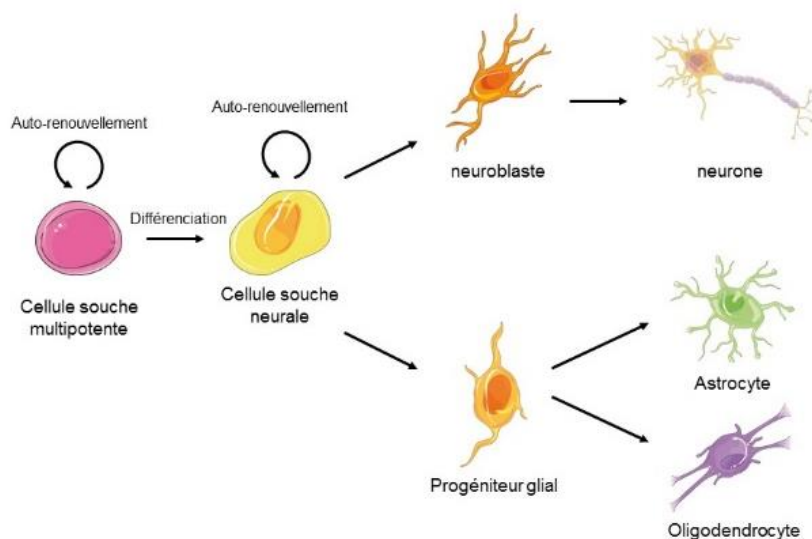


Figure 10 : Représentation schématique des propriétés des cellules souches à travers l'exemple de la lignée neuronale. Celle-ci est définie par deux propriétés (I) celle d'auto-renouvellement et (II) celle de générer un type cellulaire plus spécialisé, ici des précurseurs neuronaux et gliaux par division asymétrique.

2.2. Le degré de potentialité des cellules souches

Le degré de potentialité définit le nombre de types cellulaires différents que peut générer une même cellule souche. Il existe plusieurs degrés qui sont retrouvés à différents stades du développement d'un organisme. Le degré le plus élevé est celui des cellules souches totipotentes. Elles sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé (au stade zygote et de blastomères). Elles sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires et les seules capables de générer un organisme entier ainsi que les tissus extra-embryonnaires comme le placenta et la membrane amniotique. Ensuite, le deuxième degré est celui des cellules souches pluripotentes. Ces cellules correspondent aux cellules souches embryonnaires. Elles sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste (stade 64 cellules) et à l'origine des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme). Contrairement aux cellules totipotentes, les cellules pluripotentes sont incapables de générer un organisme entier. Le degré suivant est celui des cellules souches multipotentes ou cellules souches somatiques. Retrouvées chez le fœtus jusqu'à l'âge adulte, elles sont capables de générer plusieurs types cellulaires mais dans un lignage spécifique (par exemple les cellules souches hématopoïétiques qui sont capables de générer les différentes cellules de la lignée sanguine). Le dernier degré est celui des cellules souches unipotentes. Les cellules ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire (De Miguel et al., 2010). De plus, les cellules souches présentent des singularités selon les espèces dans leurs propriétés ou les voies métaboliques impliquées. Par exemple la voie de signalisation LIF (*leukemia Inhibitory Factor*)/gp130 est nécessaire au maintien des cellules souches embryonnaires murines mais pas dans celui des cellules souches embryonnaires humaines (voir figure 11) (Dahéron et al., 2004).

En 2006, les chercheurs Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka de l'Université de Kyoto, ont démontré la possibilité de dédifférencier des fibroblastes murins en un type « cellules souches embryonnaires-like » en forçant l'expression de 4 facteurs de transcription (Oct4 ou *Octamer-binding protein 4*, SOX2 ou *Sex determining region Y-box 2*, KLF4 ou *kruppel-like factor 4* et C-Myc ou *MYC Proto-Oncogene*) par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Ces cellules, renommées « cellules pluripotentes induites » ou iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) présentaient des similitudes avec les cellules souches embryonnaires en termes de

morphologie, de profil d'expression génique et de potentialité. Un an plus tard, des cellules somatiques humaines furent reprogrammées suivant le même procédé (Takahashi et al., 2007).

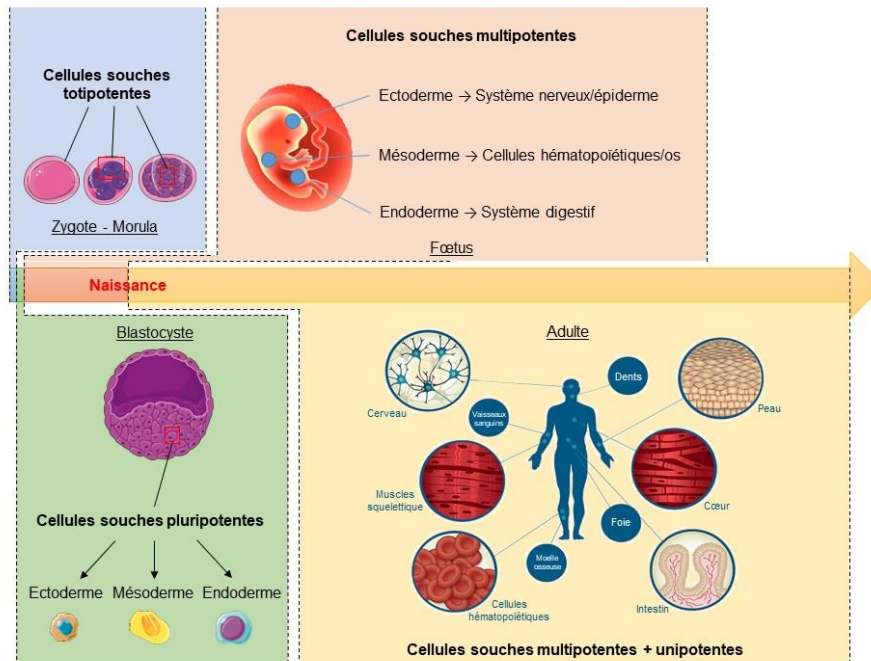


Figure 11 : Les différents types de cellules souches. Les types de cellules souches sont caractérisés par un potentiel leur permettant de générer une variété plus ou moins limitée de cellules dites spécialisées. Au cours de l'embryologie et du développement fœtal, ces différents grades de cellules souches interviennent de manière séquentielle, pour finalement engendrer un organisme vivant puis assurer son bon fonctionnement.

2.3. Les niches

Pour maintenir leur rôle de gardien de l'homéostasie tissulaire au cours de la vie, l'activité des cellules souches est finement régulée. En effet, une différenciation cellulaire trop fréquente risque d'épuiser le stock de cellules souches et diminuer leur capacité régénératrice. A l'inverse, une prolifération excessive augmentera le risque de développer des tumeurs. Cet équilibre est apporté par un ensemble de facteurs extrinsèques et intrinsèques (voir figure 12). Les cellules souches sont cloisonnées dans un environnement extracellulaire spécifique appelé niche qui permet de contrôler leur survie, leur prolifération, leur

différenciation et leur migration ([Wagers and Weissman, 2004](#); [Jones and Wagers, 2008](#)). Dans ces niches, les cellules sont maintenues à l'état quiescent, formant un stock de réserve prêt à être mobilisé en cas de besoin ([Fuchs and Chen, 2013](#)). Il existe plusieurs niches dans l'organisme responsables du maintien de l'intégrité d'un ou plusieurs organes cibles. Parmi elles, il en existe par exemple dans le derme, les gonades, la moelle osseuse, les follicules pileux, le système nerveux, le tissu adipeux et même la pulpe dentaire. Chacune de ces niches possède ses spécificités concernant la composition de sa matrice extracellulaire et les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme des cellules souches qu'elle contient ([Sakaguchi et al., 2005](#)). Par exemple, l'activation de la voie Notch augmente les capacités d'autorenouveaulement des cellules souches musculaires, neurales et hématopoïétiques, mais inversement elle induit la différenciation des cellules souches épithéliales de la peau ou du poumon. Le métabolisme des cellules souches nécessitant une régulation extrêmement fine, une même voie de signalisation peut voir son effet modifié selon l'intensité de son activation. Ainsi, l'activation variable de la voie Notch favorisera l'expansion ou la différenciation des cellules épithéliales localisées au niveau de la glande mammaire ([Valdez and Xin, 2013](#)).

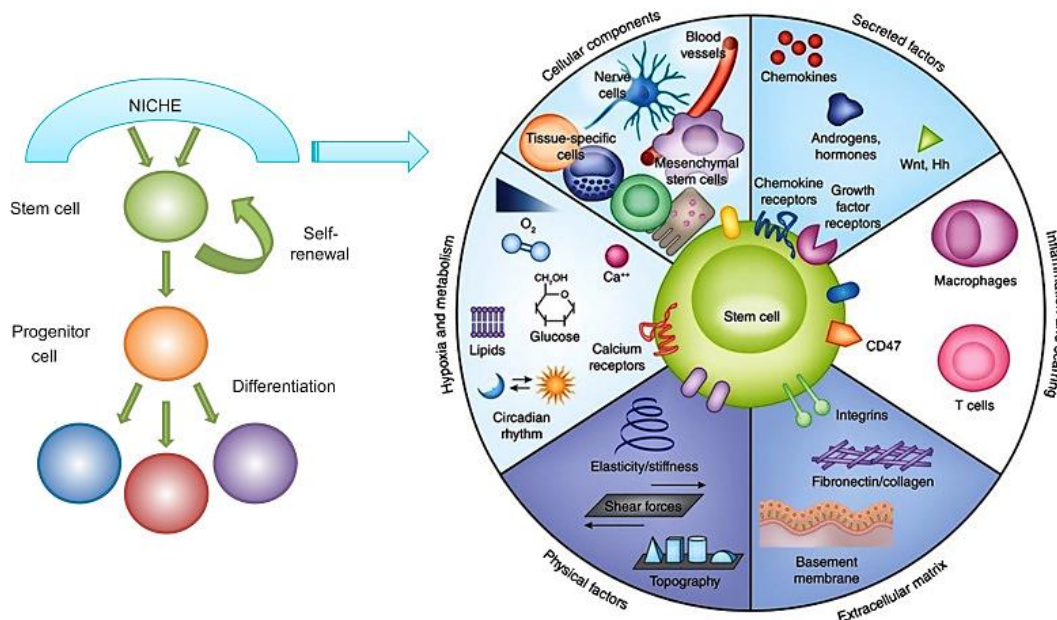


Figure 12 : Les niches des cellules souches. Une fois l'organisme formé, les cellules souches sont confinées au sein de différentes niches où elles subissent l'influence de multiples facteurs (physiques, métaboliques, cellulaires) pour maintenir l'homéostasie tissulaire ([Vishwakarma et al., 2017](#)).

2.4. L'utilisation thérapeutique des cellules souches pour traiter les LNP

2.4.1. Les voies d'administration des cellules souches

Même si les cellules de Schwann sont capables d'améliorer la régénération nerveuse, leur utilisation clinique reste néanmoins difficile pour plusieurs raisons. Leur prélèvement est très invasif car il nécessite le sacrifice d'un nerf sain et leur capacité d'expansion en culture est limitée (Wakao et al., 2010). Des cellules souches, qui seraient capables de se répliquer, de migrer et de se différencier en cellules de Schwann, ont donc été présentées comme une alternative thérapeutique très prometteuse. Pour traiter les LNP, les cellules souches ont été délivrées de différentes façons : en suspension dans un milieu et directement injectées dans le nerf mais ce procédé s'est avéré être extrêmement traumatique pour les tissus avec un risque de perdre l'architecture nerveuse. De plus, une distribution non homogène des cellules était généralement observée (McKenzie et al., 2006). Placées dans une matrice, les cellules ont également été injectées autour du site de lésion ou combinées à un conduit d'origine synthétique ou naturelle. Disposées au sein de la lumière ou bien imbriquées dans la paroi (Murakami et al., 2003; Keilhoff et al., 2006; Chen et al., 2007; Shimizu et al., 2007). Ces conduits présentent l'avantage de guider la repousse nerveuse et d'éviter la formation de névrome (Nakamura et al., 2004). Enfin, depuis quelques années, le développement de l'impression tridimensionnelle a permis l'émergence d'une nouvelle stratégie visant à cultiver les cellules souches sur une structure 3D reproduisant la structure nerveuse. Ainsi, un essai préclinique a été réalisé avec des cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ADSCs) et insérés dans un gel de gélatine méthacryloyle cryopolymérisée (cryoGelMA) dont les formes modélisaient l'architecture nerveuse. Les analyses *in vitro* ont montré que les ADSCs délivrées dans ce nerf artificiel pouvaient adhérer, survivre, proliférer et produire des facteurs neurotrophiques. Implanté chez l'animal cette construction, qui s'est dégradée dans les 2 à 4 mois suivant, a permis de réinnover une perte de substance nerveuse de 10 mm avec des résultats fonctionnels et histologiques comparables à ceux d'une autogreffe (Hu et al., 2016).

2.4.2. Les types de cellules souches testées en essais précliniques

Compte tenu des propriétés intrinsèques des cellules souches, leur exploitation thérapeutique représentent aujourd’hui un des principaux axes de développement pour de nombreuses pathologies. Ainsi, plusieurs types de cellules souches issues de l’embryon à l’adulte ont été testés dans différentes études précliniques (voir figure 13). Afin d’avoir la meilleure perspective clinique, le modèle de cellule souche idéal doit présenter les caractéristiques suivantes : (I) une niche facilement accessible et un prélèvement non invasif ; (II) une capacité d’expansion rapide; (III) un potentiel de différenciation en adéquation avec le type cellulaire nécessaire et (IV) une faible immunogénicité (Scatena et al., 2017).

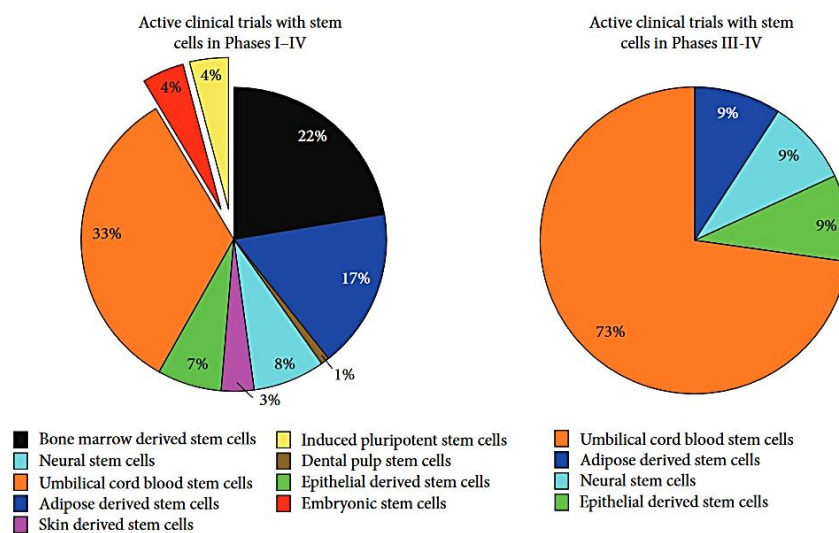


Figure 13 : Graphiques résumant les essais cliniques utilisant les cellules souches en 2015. Sur les 117 études menées seulement 11 étaient en phase III ou IV et utilisaient majoritairement les cellules souches embryonnaires (Bhangra et al., 2016).

2.4.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ESCs)

Les cellules souches embryonnaires furent parmi les premières testées pour leur grand potentiel de différenciation. Les travaux menés ont montré qu’il était possible de générer *in vitro* des cellules de Schwann myélinisantes et des motoneurones (Kubo et al., 2009; Ziegler et al., 2011). *In vivo*, des ESCs pouvaient se différencier en CS et améliorer chez le rat la

récupération nerveuse au niveau électrophysiologique et histologique ou encore diminuer l'atrophie musculaire (Cui et al., 2008; Yohn et al., 2008; Kubo et al., 2009; Magown et al., 2017). De plus, des motoneurones générés à partir d'ESCs injectés dans un nerf tibial chez des souris avaient formé des jonctions neuromusculaires avec le muscle dénervé pour aboutir à une augmentation de la force motrice de 40% (Yohn et al., 2008; Kubo et al., 2009). Récemment, des microvésicules sécrétées de cellules neurales dérivées d'ESCs ont été administrées dans un tube en silicone. Douze semaines après leur injection, les nerfs présentaient une meilleure architecture et un plus grand nombre d'axones (Chen et al., 2020). Cependant, en plus du risque tumorigène, l'utilisation des cellules souches embryonnaires a soulevé de nombreux problèmes éthiques qui persistent encore aujourd'hui et qui expliquent le faible nombre d'essais cliniques qui utilisaient ce modèle en 2015 (4%) (Rippon and Bishop, 2004).

2.4.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

Les MSCs sont le modèle de cellules souches le plus étudié pour les LNP puisqu'en 2015 elles représentaient 80% des essais cliniques et même 91% des essais cliniques en phase III ou IV (voir figure 13). Plusieurs raisons expliquent le grand nombre d'essais à leur sujet. Tout d'abord, les MSCs peuvent être isolées de nombreuses niches comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le sang de cordon ombilical, la pulpe dentaire ou encore les follicules pileux localisés dans le derme (Bhangra et al., 2016; Zhou et al., 2017). Cependant, si entre les différentes niches les MSCs présentent des similitudes en termes de phénotype et d'expression de gènes, la potentielle application thérapeutique de ces différentes populations de MSCs diffère selon les niches. Par exemple, le rendement d'extraction de MSCs au niveau du tissu adipeux est 100 à 1000 fois supérieure à celle des MSCs au sein de la moelle osseuse (Naderi et al., 2017). Deuxième avantage des MSCs, ces cellules ont montré que, selon leur environnement, elles pouvaient chez les rongeurs s'engager dans la lignée mésodermique et générer des progéniteurs mésenchymateux (ostéoblastes, chondroblastes, myoblastes) mais également s'engager dans la lignée ectodermique et ainsi donner naissance à des neurones ou des cellules gliales (Yu et al., 2010; Lavasani et al., 2014; Georgiou et al., 2015; Muraglia et al., 2015). De plus, les MSCs sont

capables de produire et sécréter des facteurs neurotrophiques et exercer un effet paracrine sur l'élongation et la myélinisation des axones ou encore sur la prolifération des CS (Kratchmarova et al., 2005; Keilhoff et al., 2006; Ding et al., 2010). L'injection de MSCs dans des modèles de LNP chez les rongeurs a montré des bénéfices thérapeutiques avec une amélioration de la régénération nerveuse accompagnée d'une récupération fonctionnelle observée dans la très large majorité des cas (Zarbakhsh et al., 2012; Lavasani et al., 2014; Amoh et al., 2016; Sanen et al., 2017; Di Summa et al., 2018). Selon les études menées chez les rongeurs, les MSCs ont pu augmenter le nombre d'axones, améliorer la myélinisation des axones néoformés, diminuer l'atrophie musculaire, réduire l'inflammation ou encore stimuler l'angiogenèse (Cao et al., 2003; Zhang and Rosen, 2018; Bingham et al., 2019; Masgutov et al., 2019). Les MSCs provenant du sang de cordon sont aujourd'hui privilégiées pour leur grande capacité de prolifération et de différenciation ainsi que leur accessibilité ne nécessitant pas de procédures invasives pour les isoler puisqu'elles sont prélevées au moment de la naissance. De plus, les MSCs issues de sang de cordon ont montré qu'elles pouvaient moduler la réaction inflammatoire lorsqu'elles étaient injectées dans un site lésionnel et inhiber la mort cellulaire par apoptose (Vendrame et al., 2005; Hao et al., 2009). Leur application dans des modèles de LNP résulte en une amélioration des capacités motrices même si leur mécanisme d'action reste encore à élucider (Veeravalli et al., 2011; Sung et al., 2012).

Les thérapies utilisant des MSCs rencontrent cependant des difficultés. Selon leur niche les MSCs peuvent être difficilement accessibles (moelle osseuse) ou difficiles à isoler comme c'est le cas pour les MSCs issues des follicules pileux et enfin, avoir tendance à se différencier préférentiellement en cellules adipeuses (Amoh et al., 2016; Zarbakhsh and Safari, 2016; Di Summa et al., 2018). De plus, leur bénéfice thérapeutique reste généralement inférieur à des traitements chirurgicaux (Alvites et al., 2018). Dans certains cas, les MSCs peuvent même avoir une action inhibitrice sur la régénération axonale avec la formation d'une cicatrice gliale et la formation d'un névrome (Masgutov et al., 2019). De plus, il a été montré que les MSCs pouvaient favoriser le développement de tumeurs en formant un microenvironnement favorable à l'expansion des cellules cancéreuses, notamment par leur faculté à produire et sécréter des facteurs pro-angiogéniques (Direkze et al., 2004; Karnoub et al., 2007; Shinagawa et al., 2010; Suzuki et al., 2011; Ren et al., 2012: 2; Mathew et al., 2016).

2.4.2.3. Les cellules souches neurales (NSCs)

Les NSCs peuvent être isolées du SNC au niveau de la zone sous-ventriculaire, de l'hippocampe ou des ganglions des racines spinales (Murakami et al., 2003; Tong et al., 2010; Gu et al., 2014). Étant les précurseurs naturels des différentes cellules neurales, les NSCs présentent l'avantage de pouvoir générer des CS (Tong et al., 2010; Gu et al., 2014; Lee et al., 2017). Différentes études utilisant des NSCs ont montré une meilleure régénération axonale avec au niveau histologique un diamètre nerveux et une myélinisation augmentés (Walter Heine et al., 2004; Lee et al., 2017). Des lapins ayant reçu au niveau de leur nerf facial lésé des NSCs transfectées pour exprimer de la neurotrophine-3 (NT-3) présentaient, douze semaines plus tard, un arrangement fasciculaire et un marquage S100 similaire aux lapins non lésés (Zhang et al., 2008). Néanmoins, l'utilisation des NSCs est confrontée à deux problèmes principaux : la localisation de leur niche qui est difficile d'accès et nécessite un prélèvement invasif. La deuxième barrière à l'heure actuelle est leur propension à former des tératomes. En effet, l'injection d'une lignée immortalisée de NSCs (la lignée C17.2) a provoqué la formation de neuroblastomes dans presque 25% des rats opérés (Johnson et al., 2008).

2.4.2.4. Les cellules précurseurs multipotentes de la peau (SKPs)

Localisées dans le derme, leur principal avantage est leur très grande accessibilité. Dérivant de l'ectoderme et des crêtes neurales comme les cellules gliales ou les neurones, les SKPs présentent ainsi une mémoire cellulaire facilitant leur différenciation vers ces phénotypes. Des études ont montré qu'elles étaient capables de se différencier en CS *in vitro* lorsqu'elles étaient privées d'EGF (*epithelial growth factor*) ou de bFGF ou suite à un traitement à la neuréguline (Biernaskie et al., 2006; McKenzie et al., 2006). Cette capacité à se différencier en CS myélinisantes a également été constatée chez la souris avec des SKPs d'origine murine ou humaines lorsqu'elles étaient délivrées dans un nerf sciatique comprimé ou un SNC démyélinisé (McKenzie et al., 2006). Par ailleurs, l'effet bénéfique des SKPs ne semble pas restreint à une administration précoce puisque des améliorations électrophysiologiques et histologiques ont aussi été constatées chez des rats ayant reçu une administration de SKPs retardée de plusieurs semaines après la lésion (Khuong et al., 2014).

2.4.2.5. Les cellules souches vasculaires multipotentes (CSVMs)

Les CSVMs, localisées dans la paroi des vaisseaux, ont récemment été mises en évidence par les travaux de Tang en 2012. Les études de caractérisation ont montré que ces cellules, activées lors de lésions vasculaires, exprimaient des marqueurs des crêtes neurales comme SOX10 et SOX17 et pouvaient s'engager dans la lignée neurale (Tang et al., 2012). Appliquées aux LNP chez le rat, les CSVMs ont facilité le recrutement de CS dans le site de lésion, amélioré la fonction neuromusculaire et l'angiogenèse et augmenté le nombre de jonctions serrées au niveau de la barrière hémato-nerveuse en se différenciant en cellules périneurales positives pour le marqueur Claudin-1+, et périvasculaires positives pour α -SMA (*Smooth muscle actin*) et CNN1 (*Calponin 1*) (Huang et al., 2019).

2.4.2.6. Les iPSCs

L'avantage majeur des iPSCs est l'absence de risque de rejet de greffe puisque cette technologie permet de reprogrammer des cellules somatiques facilement accessibles provenant du patient lui-même. Des neurosphères issues d'iPSCs incorporées dans des conduits nerveux synthétiques ont montré des résultats encourageants dans un modèle de lésion du nerf sciatique chez la souris avec une récupération sensorielle et motrice, une meilleure repousse axonale et aucun tératome observé 48 semaines après leur administration (Uemura et al., 2012; Uemura et al., 2014). Cet effet pouvait même être potentialisé quand elles étaient associées à un facteur neurotrophique comme le bFGF (Ikeda et al., 2014). Par ailleurs, des cellules neurales obtenues à partir d'iPSCs étaient capables d'accélérer la récupération d'un nerf sciatique chez le rat, notamment en stimulant la myélinisation sans qu'aucun tératome ne soit observé plus d'un an après leur injection (Wang et al., 2011). Malgré leur potentiel, les iPSCs ont vu leur application thérapeutique freinée par différents obstacles : (I) une faible efficacité de reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes (1 iPSC pour 10.000 cellules transduites), (II) une faible capacité des iPSCs à se différencier malgré la surexpression prolongée des facteurs de différenciation et (III) un risque tumorigène suite à l'expression importante du facteur c-Myc (Okita et al., 2007; Yu et al., 2007; Lowry et al., 2008).

Tous ces résultats montrent que la thérapie cellulaire, malgré des résultats encore inférieurs à ce que leur potentiel laissait suggérer, représente un outil intéressant dans la thérapie des LNP. Les freins à leur utilisation en essai clinique sont multiples et varient selon les modèles étudiés comme le risque tumorigène, leur faible capacité d'expansion ou encore leur accessibilité. Un modèle de cellules souches issu des crêtes neurales, récemment caractérisé et localisé dans la peau, a montré plusieurs résultats intéressants jusqu'à présent, faisant de ce modèle un nouveau candidat prometteur à une thérapie cellulaire dédiée à la régénération nerveuse : les cellules souches dérivées des capsules frontières (CF).

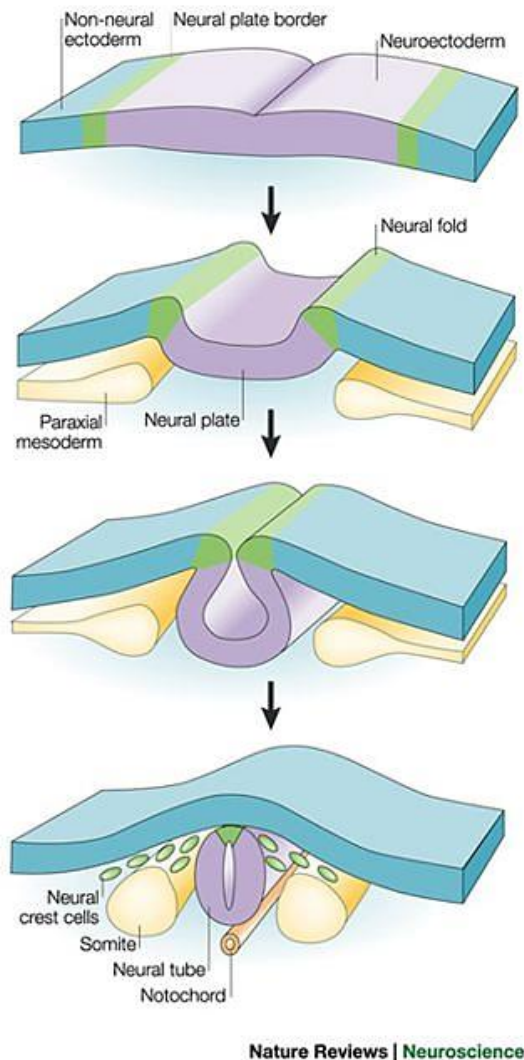
2.5. Les cellules souches dérivées des capsules frontières

2.5.1. Les cellules des crêtes neurales

Les crêtes neurales (CN) sont une population cellulaire embryonnaire transitoire, caractéristique des vertébrés et issue des bordures de la plaque neurale durant les étapes de gastrulation et de neurulation ([Bronner and LeDouarin, 2012](#)).

Au 21 et 22^e jour de développement chez l'Homme, sous l'effet de facteurs de transcription, la plaque neurale creuse un sillon dans sa portion médiane et forme la gouttière neurale (voir figure 14). Ses bords, constitués d'une portion neuroectodermique et ectodermique, s'épaississent au niveau de leur jonction et forme les bourrelets neuraux. Des études fonctionnelles réalisées chez différentes espèces ont montré que l'ectoderme ventral et le mésoderme produisent plusieurs facteurs comme *bone morphogenetic protein* (BMP), Wnt, Notch/Delta et bFGF qui initient la spécification des cellules au niveau de ces bourrelets. Sous l'effet de ces facteurs, les cellules localisées au niveau des bords de la plaque neurale expriment un ensemble de facteurs de transcription comme *Tfap2*, *Zic1*, *Pax3*, *Pax7* et *Msx1* qui stimulent l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la lignée des crêtes neurales comme *FoxD3* (*Forkhead Box D3*), *Snail*, *SOX9* et *SOX10* et génèrent les cellules progénitrices des crêtes neurales ([Basch et al., 2006](#)). Les bourrelets neuraux migrent jusqu'à s'unir au niveau médian sous l'effet des gènes *Par1* et *Par2*, refermant la gouttière neurale pour former alors le tube neural. Les cellules progénitrices des crêtes neurales, situés sur le

bord des bourrelets neuraux, s'unissent alors et forment la crête neurale (Bronner and Simões-Costa, 2016) (voir figure 14).



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 14 : Schémas de la neurulation ou formation du tube neural (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

A la suite de cela, les cellules progénitrices s'engagent dans une transition épithélio-mésenchymateuse pour devenir les CN. Ces cellules sont caractérisées par une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (NCAM (*neural cell adhesion molecule*), cadhérines) et l'architecture cellulaire (régulation des Rho GTPases notamment)

leur conférant des propriétés de migration et de pluripotence (Cheung et al., 2005; Sit and Manser, 2011). Cette transition s'accompagne d'une délamination des CN vis-à-vis de la région dorsale du tube neural. Les CN se repoussent les unes aux autres par inhibition de contact et déclenchent un mouvement migratoire de « fuite en avant » vers la région ventrale en direction de zones de différenciation nommées placodes où elles généreront différents types cellulaires selon leur localisation dans l'axe rostro-caudal (voir figure 15). Ainsi, les CN au niveau du crâne généreront des cellules osseuses, des cellules musculaires, des neurones, des cellules gliales, des cellules vasculaires ou encore des mélanocytes alors que les CN dans la région sacrée ont un potentiel plus restreint et généreront uniquement des ganglions parasympathiques du tube digestif (Szabó and Mayor, 2018). Cette différenciation est réalisée par des batteries de gènes effecteurs activés par des régulateurs (par exemple le facteur de transcription SOX10 pour la différenciation neurale) inhibés pendant la migration (Erwin and Davidson, 2009).

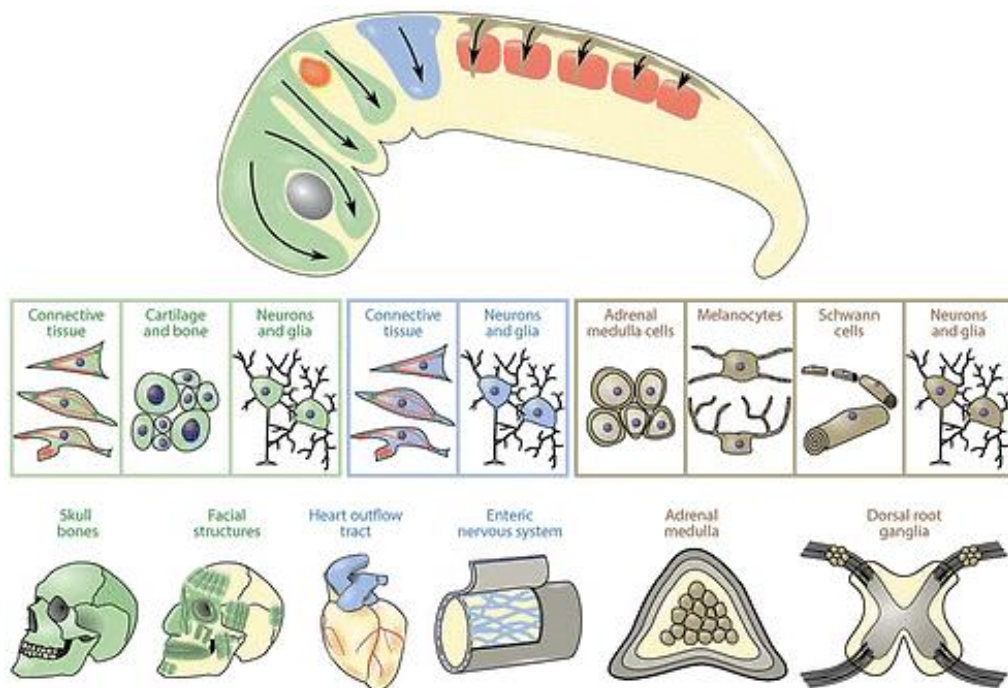


Figure 15 : La migration et le devenir des CN. Une délamination se forme sur l'axe cranio-caudal qui induit la formation de plusieurs lignées cellulaires (Szabó and Mayor, 2018).

La migration des CN est influencée par des causes intrinsèques et environnementales. Le guidage des CN est réalisé par chimiotactisme par l'intermédiaire des tissus adjacents aux crêtes neurales comme les somites ou l'épiderme en développement. Les cellules composants ces structures expriment des protéines comme BMP, des éphrines et des sémaphorines (Gammill et al., 2007; Saito et al., 2012). Les CN, selon leur état de différenciation et leur localisation dans l'axe rostro-caudal, seront attirés ou repoussés par ces structures. Ainsi, des régulations fines le long des axes crânio-caudal et ventro-dorsal se mettent en place et forment deux voies de migration principales : une ventro-médiale et une dorso-latérale (voir figure 16). Par exemple, chez la souris les endothélines exprimées dans la voie dorso-latérale attirent les CN exprimant à leur surface le récepteur endothéline B2 (EdnrB2) alors que celles exprimant EdnrB seront repoussées et redirigées vers la voie ventro-médiale (Pla et al., 2005).

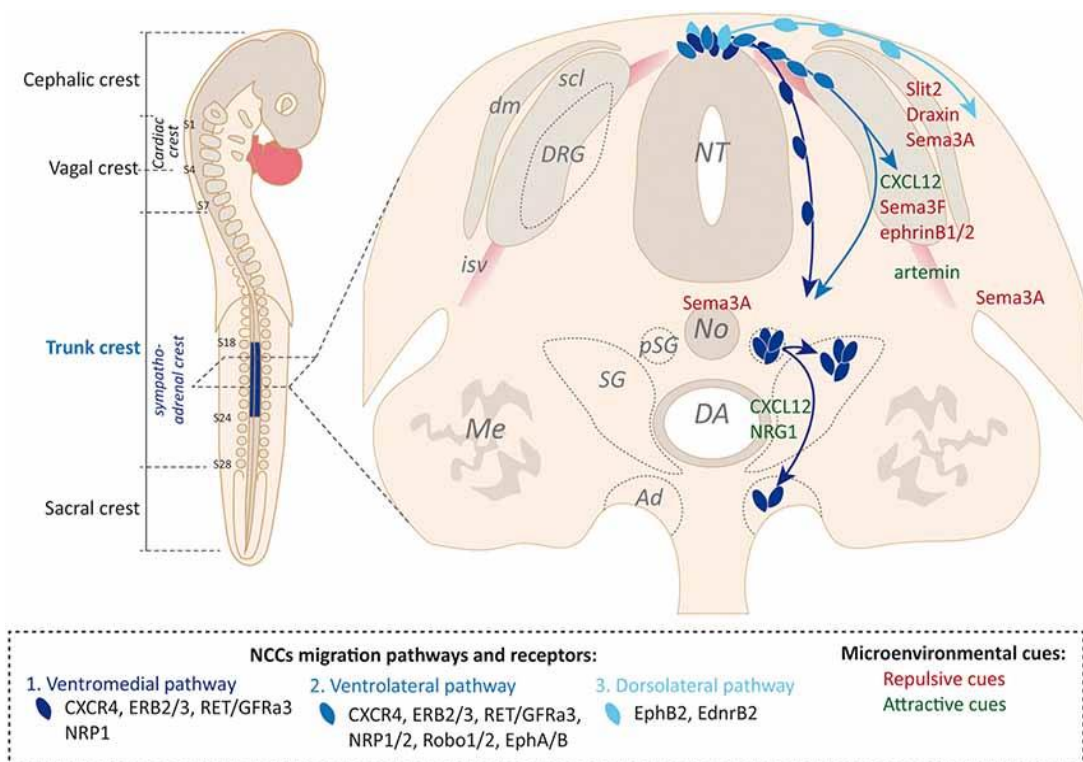


Figure 16 : Représentation des facteurs environnementaux et des récepteurs impliqués dans la régulation des voies de migration des CN (flèches bleues) au niveau du tronc. (DRG : ganglion rachidien dorsal, isv : vaisseaux intersomites ; NT : notochorde ; pSG : ganglion sympathique primaire ; SG : ganglion sympathique ; DA : aorte dorsale) (Delloye-Bourgeois and Castellani, 2019).

2.5.2. Les cellules capsule frontière et les cellules dérivées des capsules frontières

Parmi les types cellulaires générés, les CN donnent naissance aux cellules capsule frontière (CF). Dans un premier temps, cette population transitoire est localisée durant l'embryogenèse à l'interface entre le SNC et le SNP, aux futurs points d'entrée/sortie des axones sensoriels/motoneurones (Altman and Bayer, 1984). Les différentes études menées chez la souris ont mis en évidence différents rôles pour les cellules CF durant l'ontogenèse du SNP. Expriment spécifiquement certains marqueurs comme le facteur de transcription Krox20 ou la Serine Protease 56 (Prss56), les cellules CF sont détectables dès E10,5 chez la souris et indispensables pour le confinement des corps cellulaires des motoneurones dans la moelle spinale (Wilkinson et al., 1989; Topilko et al., 1994; Gresset et al., 2015). En effet, l'ablation génétique de son expression par l'intermédiaire de l'expression de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur Krox20 diminue la taille des racines des nerfs spinaux et des ganglions rachidiens dorsaux (GRD) et perturbe la migration de certains motoneurones avec des corps cellulaires retrouvés en dehors de la localisation attendue (Vermeren et al., 2003). La gravité dépend de la position des motoneurones sur l'axe antéro-postérieur dans le tube neural. Il a été montré par la suite que ce rôle de « douanier » nécessitait, au moins en partie, l'expression de netrin 5 (Ntn5) (Garrett et al., 2016). En revanche, la guidance axonale de ces mêmes motoneurones n'est pas impactée (Vermeren et al., 2003). Les études histologiques ont révélé que les cellules CF émettent de longs prolongements cytoplasmiques au sein du SNC qui suivent en parallèle le trajet de migration des motoneurones jusqu'au soma. Les cellules CF expriment chez le poulet et la souris des molécules de guidage comme les sémaphorines Sema6A et Sema6D et les motoneurones expriment au niveau de leur soma des récepteurs à Sema6A comme PlexinA2 ou Neuropilin2. Les CF pourraient ainsi restreindre la migration des motoneurones au niveau de la corne ventrale par contact direct (voir figure 17) (Bron et al., 2007).

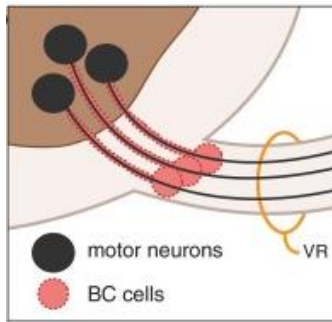


Figure 17 : Les cellules capsules frontière. Lors de la mise en place des motoneurones, les cellules CF se mettent à la jonction entre le SNC et le SNP et émettent de longs prolongements à travers le SNC pour confiner les somas des motoneurones dans le SNC ([Radomska and Topilko, 2017](#)).

Une fois les corps cellulaires des motoneurones installés dans la moelle, les cellules CF rejoignent la périphérie et migrent le long des racines dorsales et ventrales des nerfs rachidiens pour rejoindre les GRD et le derme respectivement ([Gresset et al., 2015](#)) (voir figure 18). Les GRD sont des noyaux renfermant le soma et les dendrites de différents types de neurones sensoriels (proprioceptifs, nociceptifs et mécanoceptifs). Ces neurones diffèrent par le type d'informations reçues, leur morphologie ou encore leurs neurotransmetteurs ([Patapoutian and Reichardt, 2001](#)). Autour de ces somas, des cellules satellites sont responsables des apports trophiques. A l'intérieur des GRD, les cellules CF donnent principalement naissance à des neurones sensoriels proprioceptifs, des neurones nociceptifs de classe I et II mais aussi des cellules satellites. Au cours de leur migration le long des racines nerveuses, les cellules CF génèrent des fibroblastes et tous les précurseurs de CS qui siègeront autour des axones par la suite ([Maro et al., 2004](#)). Si les cellules CF longeant les racines dorsales s'arrêtent au niveau des GRD, celles au niveau ventral migrent jusqu'au derme où elles sont à l'origine de CS immatures ou myélinisantes, des cellules gliales similaires à de la téloglie (des cellules gliales associées aux terminaisons sensibles nociceptives) et des follicules pileux, de mélanocytes, de fibroblastes et même de péricytes ([Gresset et al., 2015](#); [Radomska and Topilko, 2017](#)). Des études de suivi des cellules CF ont montré que leur devenir dépendait de l'expression coordonnée ou non des marqueurs Krox20 et Prss56 : les cellules exprimant uniquement Krox20 donneront des péricytes, celles exprimant uniquement Prss56 généreront les CS et les mélanocytes. Celles exprimant les deux marqueurs donnent les CS autour des racines nerveuses et coloniseront le GRD pour donner les neurones sensitifs et les cellules satellites ([Gresset et al., 2015](#)). Ces données mettant en avant une hétérogénéité des différentes sous-populations de cellules CF n'ont fait que confirmer les données

transcriptomiques obtenues quelques années auparavant. Celles-ci montraient des disparités au cours de la migration entre les cellules CF parcourant les racines ventrales et celles longeant les racines dorsales, mais aussi des différences au cours du trajet ce qui laissait déjà suggérer aux auteurs des propriétés différentes pour toutes ces sous-populations (Coulpier et al., 2009). Si la proportion de cellules issues des CF au sein du derme est relativement faible à la naissance (environ 0.6%), celle-ci persiste chez l'adulte dans des proportions similaires (Gresset et al., 2015).

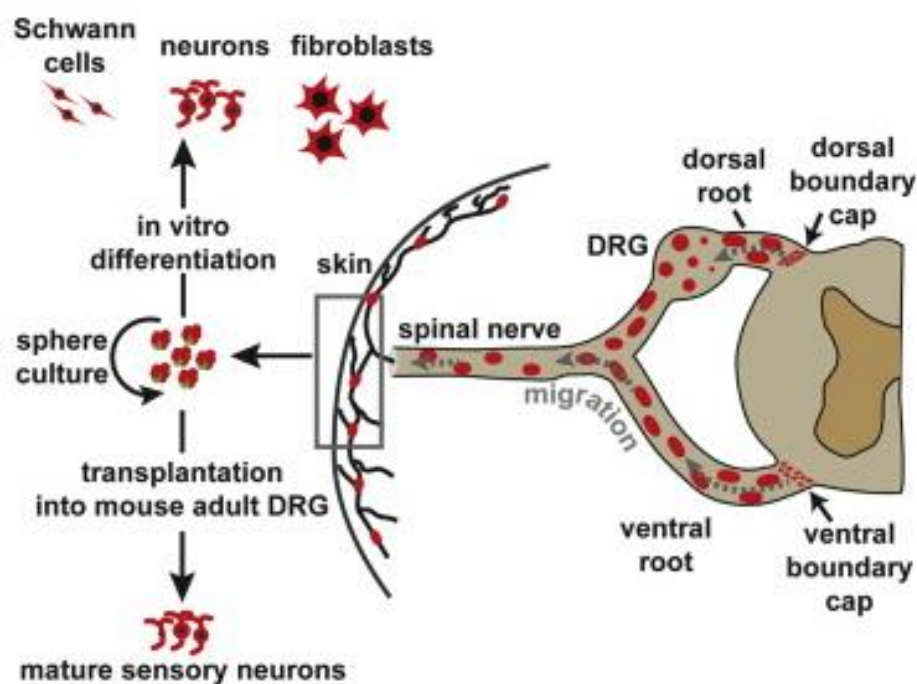


Figure 18 : Les cellules dérivées des CF. Après avoir confiné les somas des motoneurones, les cellules CF migrent le long des racines dorsales et ventrales des nerfs spinaux pour atteindre le derme où elles généreront principalement des cellules gliales. Lorsqu'elles sont extraites, ces cellules prolifèrent *in vitro* sous forme de neurosphères (Gresset et al., 2015).

In vitro, les cellules CF et leurs dérivés dermiques ont montré leur capacité à se propager sous forme de sphère, d'exprimer des marqueurs de CN comme nestine et le récepteur 75 au NGF (P75NGFR). Ces cellules ont aussi montré qu'elles étaient multipotentes puisqu'elles

étaient capables d'engendrer, de manière spontanée ou dirigée à l'aide de facteurs, des cellules correspondant à des lignées dérivées des crêtes neurales (neurone, CS, myofibroblastes, chondrocytes, mélanocytes, adipocytes) mais aussi des oligodendrocytes immatures (Hjerling-Leffler et al., 2005; Aquino et al., 2006; Zujovic et al., 2011; Gresset et al., 2015). Greffées dans le cadre d'une thérapie cellulaire pour évaluer leur effet thérapeutique chez la souris, ces cellules ont pu survivre au moins 1 mois dans le site de lésion, migrer et s'intégrer dans leur environnement. Elles ont montré une grande plasticité puisque capables de se différencier, selon les études, en différents sous-types de neurones sensitifs, en CS ou en oligodendrocytes myélinisants (Zujovic et al., 2010; Trolle et al., 2014). Leur bénéfice a également été démontré dans d'autres modèles, avec une action trophique et protectrice, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, vis-à-vis de cellules issues des îlots bêta pancréatiques ou dans le cas d'un modèle de sclérose latérale amyotrophique, où elles augmentent, dans des conditions neurotoxiques, la survie de motoneurones déficients pour l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase 1 (SOD1) (Grouwels et al., 2012; Aggarwal et al., 2017). Toutefois, leur utilité dans le cas d'une réparation nerveuse reste encore discutée. Leur transplantation dans un modèle de lésion des racines dorsales de la moelle s'est traduite pour une partie d'entre elles vers une différenciation pour une sous-catégorie d'astrocytes positifs pour les marqueurs GFAP et SOX2 et une modification de la cicatrice gliale avec la formation de structure tubulaire similaire aux colonnes de Büngner (Trolle et al., 2014). Néanmoins, les travaux menés par la suite ont montré que la formation de ces colonnes s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de la protéine S100A4 (*S100 Calcium Binding Protein A4*) dans le site de lésion. Cette protéine impliquée dans la mobilisation calcique, est reconnue pour inhiber la régénération nerveuse, suggérant aux auteurs que la greffe de cellules CF pourrait ne pas être aussi bénéfique qu'elle ne l'était pensée initialement (Trolle et al., 2017).

Les premières études menées sur les cellules dérivées des CF tendent à suggérer des propriétés similaires aux cellules CF puisqu'elles sont, elles aussi, capables de migrer et de s'adapter à leur environnement, générant naturellement des neurones sensitifs ou des fibroblastes selon qu'elles soient injectées dans un GRD sain ou dans le cas d'une neurapraxie du nerf sciatique. De plus, dans la même étude il a été montré qu'il était possible d'orienter le phénotype de ces cellules avant leur injection en CS après un traitement préalable avec de la forskoline et de l'hereguline (Gresset et al., 2015). Par leur accessibilité dans la peau, leur

capacité d'expansion en culture et leur fort potentiel neurogénique, les cellules dérivées des CF sont aujourd'hui présentées comme un éventuel nouveau vecteur de thérapie cellulaire dont le potentiel reste encore, lui-aussi, à évaluer.

En résumé, malgré leur capacité de régénération, aucun modèle de cellules souches testé jusqu'à présent ne permet de résoudre, à lui seul, de manière efficace et/ou de manière sûre les LNP. Comparés aux modèles testés jusqu'à présent, les cellules CF, à l'image des NSCs, possèdent un fort potentiel neurogénique qui peut être favorable dans le cas de LNP. Elles ont l'avantage d'être plus facilement accessibles que les NSCs. Certaines recherches actuelles visent à renforcer le potentiel des cellules souches en les modifiant génétiquement ou en les associant avec différents facteurs administrés dans le milieu extracellulaire ou au travers de biomatériaux. Certains auteurs proposent par exemple de cultiver les cellules souches sur des matrices hydrogels constituées de peptides ou d'injecter simultanément des CSM avec du NGF (Huang et al., 2006; Faroni et al., 2019). A l'image d'autres pathologies, la réaction inflammatoire et l'ischémie tissulaire dans la zone de lésion sont une source importante de radicaux libres qui peuvent créer un environnement défavorable pour une thérapie cellulaire et réduire son efficacité. Ainsi, la régulation des radicaux libres grâce à l'utilisation d'enzymes antioxydantes a montré des résultats encourageants, devenant aujourd'hui une stratégie parmi les plus prometteuses et qui sera développée dans une troisième partie.

3. Le potentiel thérapeutique d'une stratégie antioxydante pour traiter les LNP

3.1. Les radicaux libres et le stress oxydant

Les radicaux libres sont des espèces réactives présentant une grande activité rédox du fait de la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche de valence. Parmi les principaux radicaux libres peuvent être cités l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), considéré comme le précurseur des radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (Pincemail et al., 2002; Pizzino et al., 2017). Elles sont générées physiologiquement comme un dérivé de nombreux processus métaboliques impliquant l'oxygène (espèces réactives oxygénées ou (EROs)) ou l'azote (espèces réactives azotées (ERNs)). Les EROs sont principalement produites lors de la respiration aérobie mitochondriale. Au cours de ce processus aussi appelé phosphorylation oxydative, l'oxygène subit une réduction tétravalente par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (Migdal and Serres, 2011) pour produire *in fine* de l'ATP (adénosine triphosphate) mais aussi des radicaux primaires sous forme d' $O_2^{\bullet-}$ (Zhang et al., 2016). L'anion superoxyde est rapidement dismuté en H_2O_2 par des enzymes de la famille des SOD. L' H_2O_2 étant hautement réactif, peut générer en présence de cation Fe^{2+} l'anion hydroxyle ($\bullet OH$), reconnu comme très toxique, *via* la réaction de Fenton (Migdal and Serres, 2011) (voir figure 19).

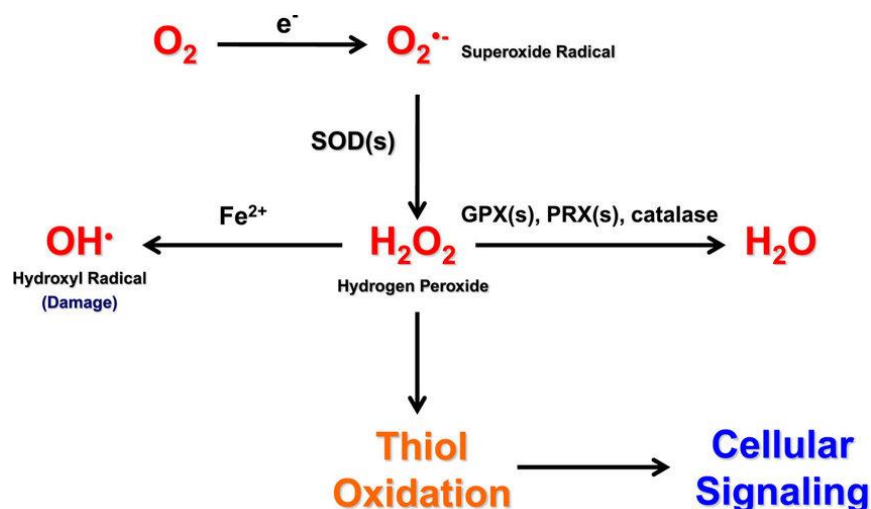


Figure 19 : Le métabolisme des EROs. L' H_2O_2 est produit à partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Il est ensuite soit réduit en H_2O et en O_2 par l'action d'enzymes antioxydantes ou en anion hydroxyle OH^\bullet par la réaction de Fenton. L' H_2O_2 est généralement oxydé par des composés thiol leur conférant un rôle d'intermédiaire dans les voies de signalisation cellulaires (Sullivan and Chandel, 2014).

Si la mitochondrie en est la principale source, les ERO sont également produites dans quasiment tous les compartiments cellulaires comme le cytosol, la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, le RE, le péroxysome, les lysosomes ou encore le noyau. L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut être généré de manière enzymatique suite à l'action d'enzymes comme la xanthine oxydase, la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase (NOX) membranaire, ou encore par le cytochrome P450 ou bien de manière non-enzymatique par l'intermédiaire de co-enzymes réduits, de xénobiotiques ou encore de groupements prosthétiques (Turrens, 2003).

Les ERNs quant à eux regroupent des radicaux libres dérivés de l'azote ainsi que d'autres molécules possédant un atome d'azote dans leur centre actif. Parmi ces membres peuvent être cités l'oxyde nitrite (NO^\bullet), le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) ou l'anion nitroxyde (NO^-). A l'image de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) chez les EROs, le NO^\bullet est le précurseur des ERNs. Il est formé par l'action d'enzymes cytosoliques de la famille des oxyde nitrite synthases (NOS) à partir d' O_2 et de L-arginine. En présence d' $\text{O}_2^{\bullet-}$, le NO^\bullet génère dans la mitochondrie ou le cytosol du NO_3^- (péroxy-nitrite) qui participe dans l'apoptose ou dans l'inflammation et dont la scission produit du NO_2^\bullet et OH^\bullet (Landino et al., 1996; Levrant et al., 2006; Burton and Jauniaux, 2011).

Lorsqu'ils sont en concentration faible ou modérée, par leur forte réactivité chimique, les EROs oxydent de manière réversible leurs cibles environnantes et agissent dans les compartiments cellulaires comme messagers secondaires dans différents processus cellulaires comme la régulation de la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire, la différenciation, la sénescence, l'inflammation, la réponse immunitaire ou encore l'apoptose (Dandekar et al., 2015; Rani et al., 2016; Islam, 2017). Cette signalisation rédox est initiée par la fixation d'un ligand (facteurs de croissance, cytokines, peptides) à son récepteur spécifique. Cette interaction produit des EROs qui peuvent à leur tour activer des kinases ou des facteurs de transcription, phosphoryler des récepteurs pour les activer, inhiber des phosphatases ou

encore moduler l'influx calcique (Dröge, 2002). Un rôle protecteur a également été attribué aux EROs puisqu'elles participent aux processus de détoxification au niveau du foie ou dans l'élimination des pathogènes par les neutrophiles (Lunec et al., 2002). En revanche, si la concentration des EROs devient excessive, causée par une production accrue ou une baisse des défenses antioxydantes, elles sont la source d'un stress oxydatif qui peut être nocif pour les cellules. En effet, en quantité anormalement élevée, les EROs affectent irréversiblement et de manière non spécifique les acides gras polyinsaturés au niveau des membranes, les chaînes latérales des acides aminés ou encore les acides désoxyribonucléiques (ADN) perturbant finalement le fonctionnement cellulaire global (stress du RE, mutation de l'ADN, perte de l'intégrité membranaire) (Han et al., 2013). En cas de dysfonctions sévères, la cellule active les voies de sauvetage comme l'*unfolded protein response* (UPR) au niveau du RE ou l'autophagie et dans les cas les plus critiques elle induira sa mort par apoptose (Gorman et al., 2012; Mohammed-Ali et al., 2017). L'origine de ce stress peut-être exogène comme une exposition à un agent pro-oxydant (consommation de tabac), une intoxication aux métaux lourds (intoxication au mercure), l'hyperoxie, les radiations ionisantes ou une carence en éléments antioxydants apportés par l'alimentation (Migdal and Serres, 2011; Birben et al., 2012). Il est aujourd'hui bien démontré que les EROs participent au développement de pathologies diverses comme le cancer, des maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique, des maladies cardio-vasculaires ou encore certaines neuropathies périphériques induites par le diabète ou les traitements chimiothérapeutiques (Iłzecka, 2001; Feldman, 2003; Di Cesare Mannelli et al., 2012; Li et al., 2013).

3.2. Les mécanismes de défense antioxydants

Pour réguler la production et la diffusion intracellulaire des EROs, la cellule a développé de nombreux agents antioxydants pour neutraliser les radicaux libres et réparer leurs dommages. Leur rôle est de donner un électron aux radicaux libres pour éviter une interaction indésirable. Ils peuvent être apportés par l'environnement, notamment par les fruits et les légumes riches en acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E) ou en glutathion par exemple. Ces aliments sont également une source importante d'oligoéléments comme le sélénium, le zinc ou le cuivre qui participent à la réduction des radicaux libres en tant que

cofacteur d'enzymes antioxydantes (Haleng et al., 2007). Ils peuvent aussi être produits directement par l'organisme (Muñoz-Esparza et al., 2019). Ces agents endogènes incluent des mécanismes enzymatiques comme la famille des SOD, des catalases (CAT), les thiorédoxines (Trx), les peroxyrédoxines (PRDX) ou encore des sélénoprotéines (Valko et al., 2007). Ils sont caractérisés par la présence dans leur centre actif d'un ion métallique ou non dans le cas des sélénoprotéines pour permettre le transfert d'électron. Ces oxydoréductases sont retrouvées dans les différents compartiments cellulaires comme par exemple la mitochondrie (glutathion peroxydase 1 (GPx1)), le peroxyosome (la catalase-peroxydase) ou encore le cytosol (SOD1) (Zelko et al., 2002; Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013; Liu and Kokare, 2017) (voir tableau 1). Il existe aussi des mécanismes non enzymatiques regroupant les polyamines, les *metal binding proteins* (MBPs) ou la famille des glutathiones (GSH) (Steinbrenner et al., 2016; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Snezhkina et al., 2019).

Localisation intracellulaire	Protéine	Action
Mitochondrie	GPx1 GPx4	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par l'intermédiaire d'un résidu Sec et la forme réduite du cofacteur glutathione (GSH).
	PRDX3 PRDX5	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par l'intermédiaire d'un résidu Cys. (PRDX5 est aussi localisé dans le peroxyosome)
	SOD1 SOD2	Dismutation de l'O ₂ ^{•-} en H ₂ O ₂ au niveau de la membrane interne (SOD1) ou de la matrice mitochondriale (SOD2).
Réticulum endoplasmique (RE)	GPx7 GPx8	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par l'intermédiaire d'un résidu Cys. GPx7 et GPx8 n'utilisent pas la GSH comme cofacteur mais des protéines réduites au sein du RE.
	PRDX4	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par l'intermédiaire d'un résidu Cys.
Peroxyosome	CAT	Hémoprotéine catalysant la réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O
	SOD1	Dismutation de l'O ₂ ^{•-} en H ₂ O ₂
	PRDX5	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par l'intermédiaire d'un résidu Cys. (PRDX5 est aussi localisé dans la mitochondrie)

Tableau 1 : Exemple d'enzymes oxydantes présentent chez l'Homme et leur localisation (traduit de Yoboue et al., 2018).

Parmi les agents enzymatiques, la famille des SODs est présentée comme les premiers acteurs de la défense contre les radicaux libres. Il existe 3 isoformes (SOD1, SOD2 et SOD3) différents selon leur localisation (cytosol, mitochondrie et espace extracellulaire respectivement) et la nature de l'atome de métal en leur centre (du cuivre et du zinc pour la SOD1 et SOD3 et du manganèse pour SOD2) (Zelko et al., 2002). Les SOD sont chargées de dismuter l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Cet H_2O_2 hautement réactif est ensuite dismuté à son tour en H_2O et O_2 par les CAT ou les GPx (Migdal and Serres, 2011) (voir figure 20).

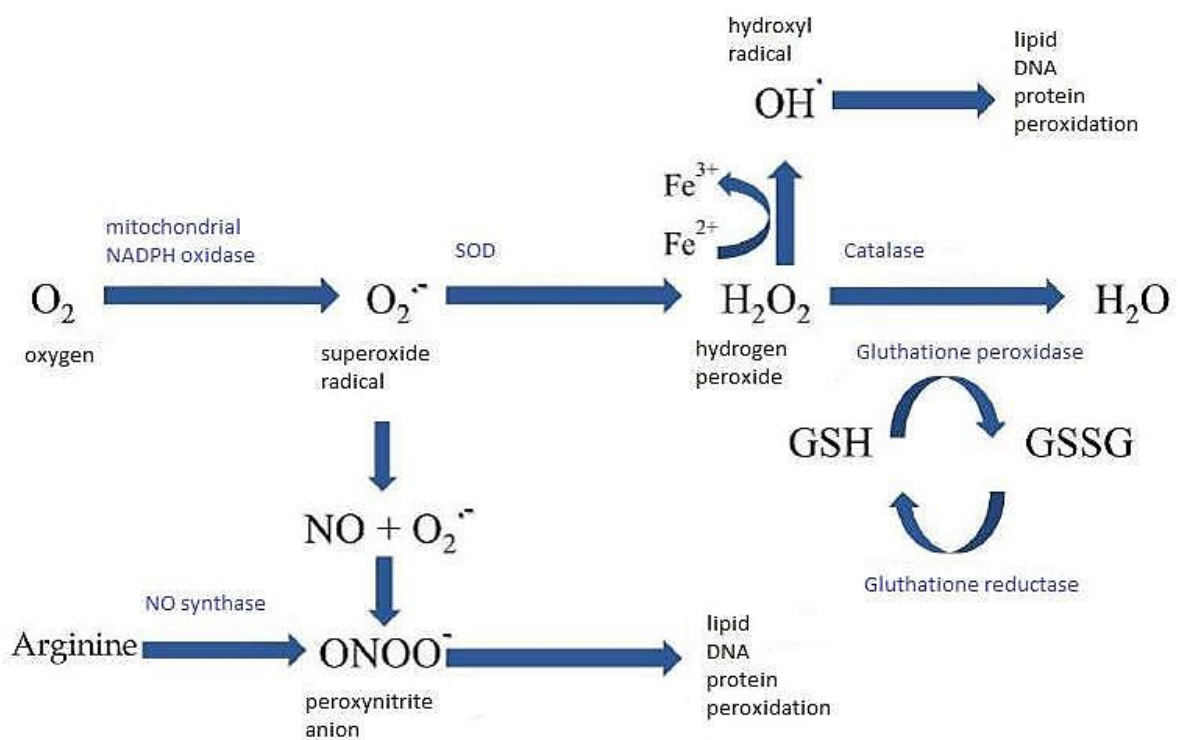


Figure 20 : Voies biochimiques du métabolisme des radicaux libres par le système enzymatique endogène. La réduction de l' O_2 aboutit à la formation de $O_2^{\bullet-}$. Cet $O_2^{\bullet-}$ est alors dismuté par la SOD pour générer de l' H_2O_2 . Pour éviter la génération d'EROs toxiques à partir d' H_2O_2 celui-ci est dismuté par les CAT et les GPx pour former de l' H_2O (Rifler, 2018).

Les GPx regroupent 8 isoformes nommés GPx1, GPx2, ... GPx8 dont 5 (GPx1, 2, 3, 4, et 6) qui contiennent du sélénium dans leur site actif et constituent avec d'autres sélénoprotéines la famille des sélénoprotéines, une des familles d'oxydoréductases parmi les plus importantes

de l'organisme. En effet, on retrouve également au sein de cette famille des Trx réductases (TrxR) comme TrxR1 et TrxR2 qui, associées aux Trx et la NADPH, constituent le système thiorédoxine, le principal système rédox de liaisons disulfures dans la cellule retrouvé chez tous les organismes vivants (Kryukov et al., 2003; Labunskyy et al., 2014). Par leur importance dans la survie cellulaire, les sélénoprotéines ont gagné en intérêt ces dernières années et notamment certaines, à l'image de la sélénoprotéine T (SELENOT), ont notamment montré un potentiel en vue d'une application thérapeutique pour certaines pathologies.

3.3. La famille des sélénoprotéines et la SELENOT

3.3.1. Les sélénoprotéines

Les sélénoprotéines regroupent un ensemble de protéines, caractérisées par la présence dans leur chaîne peptidique, pour la très grande majorité d'entre elles, de sélénocystéine (Sec), considérée comme le 21^{ème} acide aminé. Leur nombre varie selon les organismes. Alors que 25 sélénoprotéines sont recensées chez l'Homme, on en dénombre 24 chez le rongeur, seulement 2 chez le ver ou au contraire plus de 30 chez le poisson (Kryukov et al., 2003; Lobanov et al., 2009; Steinbrenner et al., 2016; Forgione et al., 2019). A l'exception de la sélénoprotéine P, les sélénoprotéines contiennent généralement un seul résidu Sec (Lobanov et al., 2009). L'élément Sec, localisée en C-terminal ou bien en N-terminal, est insérée par un mécanisme non conventionnel (voir figure 21). En effet, la Sec est synthétisée sur son propre acide ribonucléique de transfert (ARnt), l'ARnt[Ser]Sec, puis est insérée dans la chaîne peptidique en cours d'élongation au niveau d'un codon stop UGA. Cette insertion atypique est réalisée par l'intermédiaire d'un complexe constitué principalement des protéines SBP2 (*SECIS-binding protein 2*) et eEFSec (*eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific*). Le recrutement de ce complexe est réalisé grâce à l'élément SECIS (*Sec Insertion Sequence*), une séquence d'une soixantaine de nucléotides localisée dans la région 3' non codante (*3'-untranslated region (UTR)*) de l'ARN messager (ARNm) des sélénoprotéines (Shetty and Copeland, 2015).

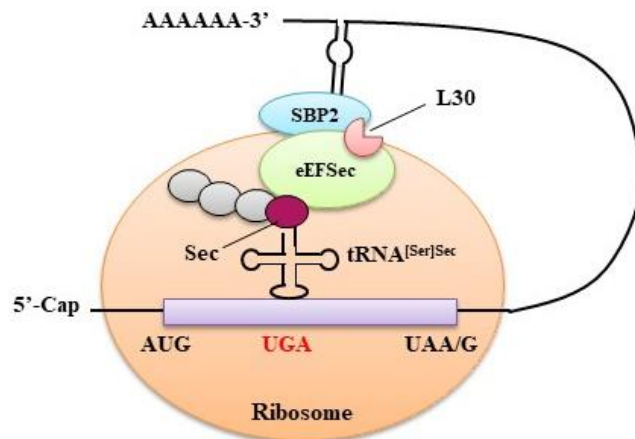


Figure 21 : Représentation schématique de la machinerie d'insertion de la Sec chez les eucaryotes. Au cours de la traduction, l'élément SECIS recrute un complexe protéique constitué des protéines SBP2, un facteur d'élongation spécifique eEFSec et d'autres protéines dont le rôle est plus ou moins identifié comme la protéine L30 qui permet l'interaction entre l'élément SECIS et le ribosome. Ce complexe est nécessaire pour convertir le codon stop UGA en codon Sec (Pothion et al., en révision).

La distribution tissulaire des sélénoprotéines est propre à chacune d'entre elles. Si certaines sont ubiquitaires comme la TrxR1, d'autres sont spécifiques à l'image de la GPx6 retrouvée au niveau du système olfactif (Kryukov et al., 2003). Dans la cellule, leur localisation varie également. En effet, elles peuvent être localisées dans le cytosol (GPx2), la mitochondrie (TrxR2), le noyau (la sélénoprotéine H) ou encore le RE (la SELENOT). Plusieurs facteurs influent sur leur expression. Premièrement, la disponibilité du sélénium. Celui-ci ne peut être produit de manière endogène et dépend donc exclusivement des apports alimentaires (Combs, 2015). Toutefois, toutes les sélénoprotéines ne sont pas impactées de façon équivalente en cas de carence. Ainsi, sont recensées des sélénoprotéines dites essentielles qui sont peu impactées comme les TrxR1 et 3 et des sélénoprotéines liées au stress comme la sélénoprotéine W ou la sélénoprotéine H (Sunde and Raines, 2011). En plus des apports en sélénium, les sélénoprotéines sont régulées par les niveaux d'expression des protéines

impliquées dans la machinerie d'insertion de la Sec comme SBP2 qui dépend des niveaux de sélénium ou encore de l'état rédox des cellules (Papp et al., 2007; Labunskyy et al., 2014).

Le sélénium possède un pouvoir nucléophile supérieur à celui de la cystéine et confère ainsi aux sélénoprotéines des propriétés de défense antioxydante significativement supérieure (Axley et al., 1991). Même si la fonction précise reste à déterminer pour la moitié d'entre-elles, certaines sélénoprotéines montrent un rôle essentiel dans l'organisme. En effet, une léthalité est constatée dans des modèles animaux invalidés pour certaines d'entre-elles (Kasaikina et al., 2012). Par ailleurs, une expression altérée d'une ou plusieurs sélénoprotéines ou des mutations de gènes impliqués dans la machinerie d'insertion de la Sec comme SBP2, sont à l'origine d'un large champ de pathologies métaboliques comme les dystrophies musculaires, le diabète ou des thyroéopathies (Dumitrescu et al., 2010; Fairweather-Tait et al., 2011). A partir des sélénoprotéines dont la fonction a été identifiée, trois principaux groupes ont été distingués selon leurs cibles et les cofacteurs nécessaires : les TrxR, les GPx et enfin les iodothyronines déiodinases (DIO). Chez l'Homme on recense trois isoformes de TrxR (Trx1, 2 et 3) dont la fonction est de réduire le groupement thiol de la Trx à l'aide de la NADPH et du FAD (flavine adénine dinucléotide). En revanche, la présence du sélénium au sein des TrxR est spécifique des eucaryotes supérieurs (Arnér and Holmgren, 2000; Mustacich and Powis, 2000). Parmi les GPx, six sélénoenzymes ont été identifiées (GPx1 à 6), réparties dans différents organes (testicules, intestin, rein, sang) et compartiments cellulaires comme le cytosol (GPx1, 2 et 4), l'espace extra-cellulaire (GPx3 et 6) (Battin and Brumaghim, 2009; Pitts and Hoffmann, 2018). Elles sont chargées de réduire l' H_2O_2 ou des hydroperoxydes organiques (ROOH) en H_2O par l'intermédiaire du glutathion. Enfin, les DIO sont impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, de leur production (DIO1) à leur désactivation (DIO3) en passant par leur conversion (DIO2) (Bianco et al., 2002). Si une majorité des sélénoprotéines présentent une fonction rédox, des sélénoprotéines ont par exemple été mentionnées dans la synthèse de phospholipides (sélénoprotéine I) ou dans le transport du sélénium (sélénoprotéine P) (Köhrle et al., 2005; Liu and Rozovsky, 2015a; Horibata et al., 2018). D'autres enfin interagissent avec d'autres enzymes pour exercer leur rôle. C'est le cas de la sélénoprotéine K (SELENOK) qui est supposée s'associer à l'enzyme DHHC6 au niveau de la membrane du RE et agir en tant que cofacteur dans le transfert d'un groupe palmityl au

niveau de certaines protéines comme le récepteur IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) et ainsi activer l'ouverture des canaux calciques (Fredericks et al., 2014; Fredericks et al., 2017).

3.3.2. La SELENOT

La SELENOT fut identifiée pour la première fois en 1999 à l'aide d'un programme informatique, SECISearch, dont l'algorithme était basé sur la reconnaissance d'un codon UGA à proximité d'une séquence SECIS chez l'Homme (Kryukov et al., 1999). Depuis, de nombreux orthologues de la SELENOT ont pu être recensés au sein de diverses espèces eucaryotes comme les métazoaires, quelques plantes ainsi que des algues de la famille des protistes (Lobanov et al., 2007; Mariotti et al., 2012). Pour certaines d'entre elles, la Sec contenu dans la séquence peptidique est remplacée par une Cys. Cette substitution est notamment observée chez des espèces de drosophile comme *Drosophila melanogaster* ou *willistoni*, chez certaines plantes hautes comme *Arabidopsis thaliana* ou encore chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lobanov et al., 2006; Moustafa and Antar, 2012; Romanelli-Cedrez et al., 2017). En revanche, aucun homologue de SELENOT contenant un résidu Sec ou Cys n'est mis en évidence à ce jour chez la bactérie ou la levure. Plusieurs arguments aujourd'hui suggèrent que la SELENOT occupe une place hiérarchique importante au sein du sélénoprotéome : (I) une forte conservation de la SELENOT au cours de l'évolution. En effet la SELENOT humaine partage entre 97 et 100% de similarité avec les autres espèces de mammifères ou 95% avec le poulet (Mariotti et al., 2012; Moustafa and Antar, 2012; You et al., 2014) ; (II) comparée à d'autres sélénoprotéines, une carence en sélénium impactera peu les niveaux d'expression de la SELENOT ; (III) enfin la léthalité observée en cas d'absence totale de SELENOT chez la souris (Boukhzar et al., 2016).

Si l'on retrouve dans certaines espèces deux (*C. elegans* ou chez *lepisosteus oculatus*) ou trois copies (comme chez certains téléostéens, le poisson-zèbre ou le *Carassius auratus*) du gène SELENOT, un bon nombre d'espèces, à l'image de l'Homme, possède une seule copie du gène dans leur génome (Chen et al., 2017; Romanelli-Cedrez et al., 2017). Chez l'Homme, le gène de la SELENOT est localisé sur le bras long du chromosome 3 sur le locus 25 (3q25). Sa séquence possède 6 exons avec une séquence SECIS au niveau du dernier exon. Le résidu Sec

s'insère, quant à lui, sur un codon stop UGA au niveau de l'exon 2. Dans le génome humain, deux pseudogènes nommés *SELENOTP1* (ENSG00000233846) et *SELENOTP2* (ENST00000603971.1) ont également été identifiés en position 9p24 et 5q23 respectivement (Pothion et al., 2020). Au sein de la séquence peptidique finale de 186 AA chez l'Homme (195 AA chez le rongeur), on retrouve un peptide signal de 19 AA en N-terminal et un centre rédox typique des thiorédoxines avec un motif CVSU, où le résidu Sec (U) est séparé d'une Cys (C) par deux AA, localisé sur une boucle entre un feuillet β et une hélice α (voir figure 22). Des expériences menées avec une protéine recombinante comportant une substitution Sec/Cys ont permis de démontrer que ce motif CVSU conférait à la SELENOT une fonction d'oxydoréductase *thioredoxin-like* même si cette fonction reste à démontrer en conditions physiologiques (Boukhzar et al., 2016). En plus du motif CVSU, la SELENOT partage avec quelques sélénoprotéines (la sélénoprotéine H, la sélénoprotéine V, la sélénoprotéine W et la Rdx12) une séquence en C-terminal contenant quelques AA conservés, indiquant que la SELENOT appartient à la sous-famille des rédoxines (Kryukov et al., 2003; Dikiy et al., 2007; Lobanov et al., 2009). Point intéressant, une étude génomique réalisée chez le nématode a montré que la SELENOT était la seule rédoxine présente, démontrant une nouvelle fois la forte conservation de cette sélénoprotéine au cours de l'évolution (Romanelli-Cedrez et al., 2017).

Chez le rongeur, la SELENOT est exprimée au cours de l'embryogénèse dans la quasi-totalité des structures embryonnaires (Grumolato et al., 2008; Tanguy et al., 2011). Dans le cerveau de rat en développement, la SELENOT est retrouvée dans les progéniteurs neuraux de la zone sous-ventriculaire, la zone intermédiaire, la plaque corticale et le cortex cérébelleux puis son expression diminue progressivement pour être restreinte chez l'adulte dans certains neurones comme les neurones POMC (Pro-opiomélanocortine) ainsi qu'au niveau de la glie de Bergman (Tanguy et al., 2011a; Gong et al., 2018). La SELENOT est principalement retrouvée chez le rongeur adulte dans certains tissus possédant une activité sécrétoire comme le pancréas, l'hypophyse ou encore le testicule (Grumolato et al., 2008; Prevost et al., 2011; Tanguy et al., 2011). L'utilisation de modèles de souris spécifiquement invalidés pour la SELENOT au niveau du pancréas (SelT-insKO) ou des précurseurs neuraux (Nestin-Cre-SelT^{fl/fl}) a révélé que la SELENOT était nécessaire au développement correct du pancréas et du cerveau respectivement. Ainsi, des altérations dans l'organisation des îlots β ou encore une diminution du volume de certaines structures cérébrales comme le cortex cérébral, le cervelet et

l'hippocampe ont été notées à la naissance. A l'âge adulte, ces modèles animaux présentent des perturbations dans le fonctionnement de ces organes avec une intolérance au glucose pour les souris SelT-insKO et un comportement hyperactif chez les animaux Nestin-Cre-SelT^{fl/fl}, suggérant que la SELENOT est nécessaire au bon fonctionnement de ces structures (Prevost et al., 2011; Castex et al., 2016).

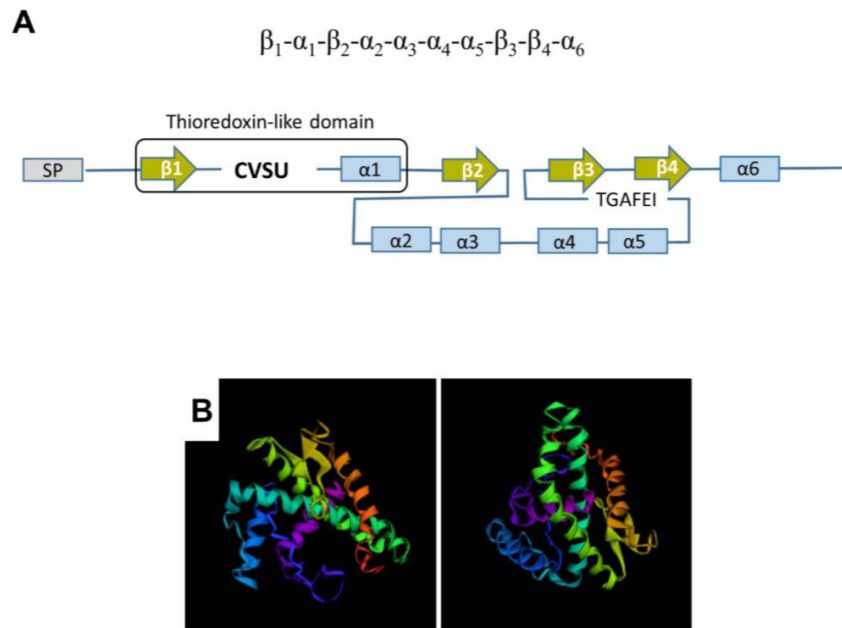


Figure 22 : Structure de la SELENOT et prédiction informatique de sa conformation tridimensionnelle. (A) Structure secondaire de la SELENOT obtenue *in silico* à partir de l'ARNm (GENBANK : NC_005101.4) chez *rattus norvegicus*. La SELENOT présente un peptide signal (SP) en N-terminal, son motif CVSU entre un feuillet β et une hélice α caractéristiques des Trx, un enchainement d'hélice α et de feuillet β . Contrairement aux autres Trx, la SELENOT possède en C-terminal une séquence (tGAFEI) conservée avec les rédoxines (B) Deux exemples de structures tertiaires de la SELENOT chez *rattus norvegicus* prédites *in silico* par le serveur QUARK (Pothion et al., 2020).

Au sein de la cellule, la SELENOT est principalement observée dans la membrane du RE où elle est fixée par au moins un de ses deux domaines hydrophobes (Grumolato et al., 2008; Hamieh et al., 2017). La localisation dans le RE a également été décrite chez *C. Elegans* et *Arabidopsis thaliana* (Nikolovski et al., 2012; Romanelli-Cedrez et al., 2017). Chez la souris, elle est aussi décrite dans le cytosol (microscopie électronique) et l'appareil de Golgi (Dikiy et al.,

2007; Hamieh et al., 2017). Des expériences de criblage double hybride et de co-immunoprécipitation ont montré que la SELENOT interagissait avec la protéine KCP2 (*Keratinocyte-associated Protein 2*), qui fait partie du complexe membranaire oligosaccharyltransférase-STT3A (OST-STT3A) (Hamieh et al., 2017). OST-STT3A est responsable du transfert « en bloc » d'un précurseur oligosaccharidique constitué de 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acétylglucosamines au niveau d'un résidu asparagine d'un site accepteur des chaînes polypeptidiques naissantes. Ce processus, appelé *N*-glycosylation des protéines, est un procédé co-translationnel indispensable au bon repliement de la protéine en une structure tertiaire ou quaternaire fonctionnelle. Des expériences d'inactivation dans des lignées cellulaires ont montré que la SELENOT était essentielle à la stabilité de ce complexe, son absence induisant (I) une déstabilisation du complexe OST-STT3A et une diminution de la *N*-glycosylation de certains substrats comme la POMC ; (II) une accumulation de protéines mal repliées à l'origine d'un stress du RE ; (III) une activation de l'UPR, une voie de sauvetage cellulaire qui implique différents facteurs de transcription et des chaperonnes, et dont le but est de diminuer la charge en protéines mal conformées pour rétablir l'homéostasie du RE ; (IV) une baisse de la sécrétion (Grumolato et al., 2008; Hamieh et al., 2017) (voir figure 23). Chose intéressante, cette implication de la SELENOT dans l'activité sécrétoire avait déjà été mentionnée *in vivo* avec le modèle de souris *Selt-insKO*. En effet ces souris présentaient une sécrétion d'insuline altérée (Prevost et al., 2011a). Cependant, les mécanismes exacts permettant l'interaction entre la SELENOT et OST-STT3A restent à élucider.

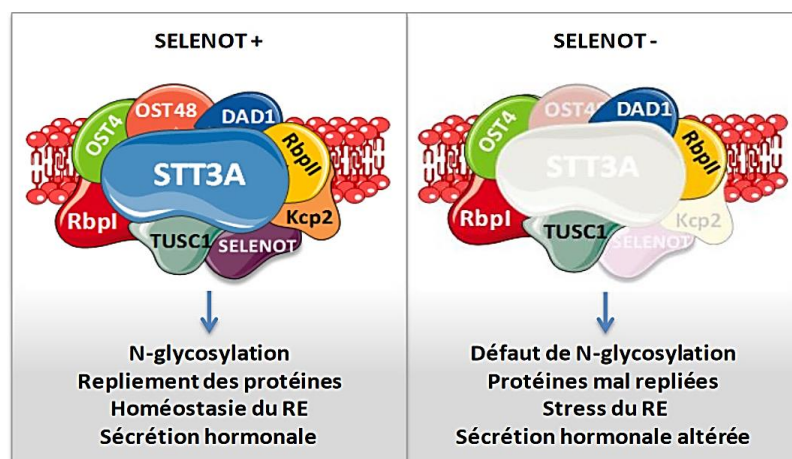


Figure 23 : Interaction de la SELENOT avec le complexe OST-STT3A et conséquence de son absence sur le complexe OST-STT3A (Hamieh et al., 2017).

En accord avec son implication dans les processus sécrétoires, la SELENOT semble exprimée lorsque la demande énergétique au sein de la cellule augmente. En effet, les premières études fonctionnelles menées avec une lignée de cellules issue de phéochromocytome de rat avaient identifié la SELENOT comme un gène stimulé par le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) lors de la différenciation neuronale, *via* l'activation de la voie adénosine monophosphate cyclique (AMPC)/protéine kinase A (PKA). Par ailleurs, ces travaux avaient montré l'implication de la SELENOT dans la mobilisation calcique induite par ce neuropeptide selon un mécanisme dépendant du centre rédox CVSU (Grumolato et al., 2008). Par la suite, une étude visant à élucider les voies de signalisation engagées dans la régulation de la SELENOT par le PACAP ont révélé au sein du promoteur de la SELENOT plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription *nuclear respiratory factor 1* (NRF-1). En plus de la voie AMPC/PKA une deuxième voie d'induction a pu ainsi être mise en évidence impliquant LKB1 (*Liver kinase B1*), AMPK (*AMP-activated protein kinase*), PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) et NRF-1. Le complexe PGC-1 α /NRF-1 étant lié à l'expression de protéines associées à la biogénèse mitochondriale, les auteurs ont suggéré que la SELENOT était induite en fonction de la demande énergétique, son expression étant nécessaire pour maintenir l'homéostasie rédox au sein du RE, et donc limiter la production d'EROs à l'échelle cellulaire (Abid et al., 2019). De fait, une augmentation des niveaux intracellulaires d'EROs ont été observés dans différents modèles d'invalidation de la SELENOT, que ce soit *in vitro* et *in vivo* avec le modèle de souris Nestin-Cre-SelT^{fl/fl} (Sengupta et al., 2009; Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016a; Hamieh et al., 2017; Abid et al., 2019). Cet effet antioxydant est également protecteur pour les cellules neuronales et neuroendocrines (Boukhzar et al., 2016; Hamieh et al., 2017). Normalement absente dans de nombreux tissus en condition physiologique, l'expression de la SELENOT peut être réinduite lorsque l'environnement induit un stress métabolique comme ce fut démontré *in vitro* avec des cellules issues de phéochromocytome de rat (PC12) et *in vivo* dans le cerveau et le foie de souris, le cœur de rat ou la rate chez le cochon (Ikematsu et al., 2007; Boukhzar et al., 2016; Sun et al., 2017; Rocca et al., 2018; Abid et al., 2019). En effet, des souris Nestin-Cre-SelT^{fl/fl} exposées au MPP+ (1-méthyl-4-phenylpyridinium) présentent une augmentation des niveaux de 3-NT (3-nitrotyrosine), un marqueur des ERNs, ainsi qu'une élévation de l'apoptose au sein des neurones dopaminergiques indiquant une vulnérabilité accrue de ces

cellules au stress oxydant en l'absence de SELENOT (Boukhzar et al., 2016). Par ailleurs, la baisse de volume des structures cérébrales observées dans les souris Nestin-Cre-SelT^{fl/fl} est associée à une augmentation des niveaux de ROS et de l'apoptose au niveau des précurseurs neuronaux dans ces structures (Castex et al., 2016). Enfin, une étude sur des cerveaux de patients parkinsoniens a montré une expression augmentée de la SELENOT dans le noyau caudé et le putamen comparée à d'autres structures cérébrales ou par rapport à des sujets sains (Boukhzar et al., 2016).

3.3.3. PSELT : un nouvel outil thérapeutique

Il est bien documenté que la mort neuronale observée dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson fait intervenir le stress oxydant (Perfeito et al., 2013). Si certains traitements à partir de L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) ont montré des bienfaits, leur efficacité est néanmoins limitée dans le temps (Gambaryan et al., 2014). Les propriétés neuroprotectrices de la SELENOT et le fait qu'elle soit retrouvée dans le noyau caudé et le putamen de cerveaux parkinsoniens laissent suggérer que l'administration d'un peptide dérivé de cette SELENOT pouvait représenter un nouvel outil thérapeutique (Boukhzar et al., 2016). Dans cette optique, différents peptides d'une longueur de 10 acides aminés mimant la SELENOT et comportant le centre rédox CVSU ont été produits (voir figure 24). Les études menées *in vitro* ont montré que l'effet protecteur de la SELENOT était également présent dans le peptide PSELT sous sa forme réduite et que cette baisse de la mortalité s'accompagnait d'une diminution des niveaux de radicaux libres et de l'activation des caspases. Son application intranasale chez des souris traitées au MPP+ a montré que ce peptide était capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et de migrer jusqu'à la substance noire où elle protégeait les neurones dopaminergiques et maintenait les niveaux de dopamine produite et sécrétée par ces neurones. Les études fonctionnelles ont par la suite confirmé ces résultats histologiques puisque les animaux ayant reçu le peptide présentaient de meilleures performances et une meilleure coordination motrice comparé aux animaux témoins (Alsharif, soumis).

MRLLLLLLVAASAMVRSEASANLGGVPSKRLKMQYATGPLLK**FQICVSUGYR**RVFEEYMRVISQRYPDI

RIEGENYLPQPIYRHIAFSLSVFKLVLIIGLIIVGKDPFAFFGMQAPSIWQWGQENKVYACMMVFFLSNMI

ENQCMSTGAFEITLNDVPPVWSKLESGHLPSMQQLVQILDNEMKLNVMDSIPHRS

Figure 24 : Séquence du peptide PSELT. La séquence du peptide indiquée en rouge contient le motif CVSU coloré en vert.

A la suite de ces résultats, le peptide PSELT a été testé dans un modèle d'ischémie cardiaque dans lequel la reperfusion tissulaire induit une augmentation des niveaux de radicaux libres qui peuvent être à l'origine de nécroses tissulaires (Valencia and Morán, 2004). Dans cette étude, l'administration précoce de PSELT au début de la perfusion tissulaire a amélioré la contractilité myocardique et réduit la taille de l'infarct comparé aux animaux témoins. A l'image des résultats obtenus dans la voie nigro-striée, une baisse des niveaux de radicaux libres et une inhibition de l'activité caspase3/7, notamment en raison d'une inhibition de la phosphorylation de la kinase p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), ont été constatées dans le cœur des animaux traités avec le PSELT. Par ailleurs, cet effet cardioprotecteur était aboli lorsque les rats avaient reçu du PSELT dans lequel la Sec était remplacée par une sérine, indiquant le rôle essentiel du sélénium et du résidu cystéine. De plus, la co-administration de PSELT avec des inhibiteurs sélectifs de l'adénylate cyclase (AC), de la kinase 3 phosphatidylinositol d'Erk-1/2 ou encore des chaînes mitoKATP ont révélé que l'effet protecteur de PSELT nécessitait l'activation de ces voies de signalisation (Rocca et al., 2018). Cependant les travaux menés n'ont pas permis d'établir le site d'action où ce peptide exerçait son rôle protecteur, ni s'il pouvait renforcer l'activité d'autres enzymes antioxydantes comme cela a été démontré pour deux peptides dérivés de protéines de riz enrichies en sélénium (Wu et al., 2020). Cette étude, de manière similaire à celles utilisant le PSELT, évaluait le potentiel rôle neuroprotecteur de deux peptides comportant du sélénium contre les effets nocifs d'une intoxication au plomb. Ces travaux menés *in vitro* ont mis en lumière l'effet antioxydant de ces deux peptides avec une baisse des ERNs en renforçant l'activité de SOD et des GPx. Ces effets s'accompagnent d'une action anti-apoptotique même si là encore les sites d'action des deux peptides n'ont pu être identifiés.

A l'image des résultats obtenus avec ces différents peptides, de nombreuses études ont mis en lumière le rôle bénéfique que représentait une modulation de l'environnement rédox pour améliorer la repousse nerveuse dans le cas des LNP.

3.4. L'utilisation des agents antioxydants pour traiter les LNP

3.4.1. Rôle des agents antioxydants dans les LNP

Même s'il est aujourd'hui difficile d'évaluer précisément le rôle des radicaux libres dans les LNP, plusieurs études rapportent leur implication dans les processus de régénération (Zhou et al., 2016). Cela a pu être montré chez les rongeurs dans lesquels une lésion du nerf sciatique induit au niveau du muscle dénervé une augmentation des niveaux d' H_2O_2 , l'oxydation des lipides membranaires et l'expression d'enzymes antioxydantes comme SOD1 ou encore Gpx1 (Bhattacharya et al., 2009; Abruzzo et al., 2010). A la suite d'une axotomie, un rapide influx de calcium provenant du site de lésion se produit. Cela a pour conséquence d'augmenter la concentration calcique au niveau des rameaux proximal et distal de l'axone qui induit à son tour un gonflement des mitochondries et une production d' H_2O_2 (Rodella et al., 2016; Lobet Rosell and Neukomm, 2019). Par ailleurs, une analyse par micro-array a révélé une hausse de l'expression de gènes impliqués dans le transfert d'électrons, notamment du cytochrome P450, au niveau du rameau distal d'un nerf sciatique coupé (Kubo et al., 2002). L' H_2O_2 diffuse alors à travers la membrane axonale et participe à l'activation des CS avoisinantes pour permettre la dégénérescence Wallérienne (Duregotti et al., 2015). Il a été montré chez le poisson zèbre que la régénération nerveuse dépendait de l' H_2O_2 , lequel forme un gradient de concentration qui attire les leucocytes puis favorise l'élongation axonale (Rieger and Sagasti, 2011). En plus de l' H_2O_2 , les cytokines inflammatoires produites au début de la dégénérescence Wallérienne accroissent la production de NO *via* la stimulation de l'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) au sein des cellules de Schwann et des macrophages pro-inflammatoire de phénotype M1 (Murray and Wynn, 2011). Ce NO agit sur la barrière hémato-nerveuse pour permettre la diapédèse des macrophages (Zochodne and Levy, 2005). Une fois recrutés, en parallèle de leur action phagocytaire, les macrophages libèrent des exosomes contenant l'enzyme antioxydante NADPH oxydase 2 (NOX2) qui sont alors captés par les axones lésés par le mécanisme d'endocytose. Dans la cellule, NOX2 rejoint le soma par

transport rétrograde où elle inactive le gène *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) par oxydation et permettre ainsi la régénération axonale à travers l'activation de la voie *phosphoinositol-3-kinase* (Pi3K)-phosphorylated (p-)Akt (Hervera et al., 2018) (voir figure 25). Toutefois, le recrutement d'un nombre important de macrophages ou leur activité prolongée résulte en une augmentation excessive de NO qui peut collaber le cône de croissance et inhiber la régénération axonale (Hess et al., 1993; McDonald et al., 2007).

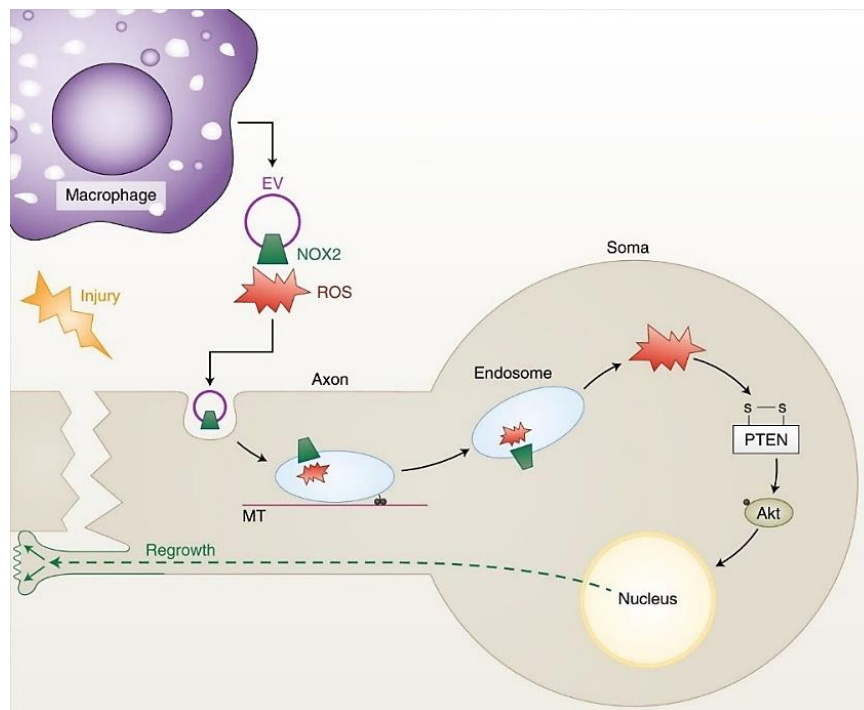


Figure 25 : Communication macrophage-neurone lors de la régénération nerveuse. Après une lésion les macrophages libèrent de la NOX2 qui est endocytée par les neurones, rétrogradée jusqu'au soma où elle active la voie NOX2–PTEN–PI3K–p-Akt pour enclencher la régénération axonale (Krämer-Albers, 2018).

Enfin, il est également bien documenté maintenant que les EROs influencent aussi la myélinisation. Une démyélinisation, comme celle observée dans les cas de neurapraxie, réduit la production d'ATP mais, en revanche, augmente les taux d'H₂O₂ au niveau des mitochondries des axones (van Hameren et al., 2019). Par ailleurs, des souris déficientes pour la SOD1 ont montré des lacunes dans la conduction nerveuse, causée en partie par une épaisseur de

myéline réduite (Hamilton et al., 2013). Des observations similaires ont été obtenues avec des souris invalidées cette fois pour le récepteur de la leptine (*dbdb*). Chez ces animaux, il a également été noté une carbonylation et une agrégation de la protéine de myéline PMP22 mal conformée dans les nerfs. De tels agrégats étant observés dans différents types de neuropathies, les auteurs ont suggéré à la vue de ces résultats que le stress oxydant pouvait être un déterminant dans le processus de démyélinisation de différentes pathologies (Hamilton et al., 2013; van Paassen et al., 2014). Dans une autre étude, l'injection de paraquat, une molécule génératrice de radicaux libres et utilisée pour simuler des modèles de Parkinson, provoquait une démyélinisation (Hichor et al., 2017).

3.4.2. L'application des stratégies antioxydantes pour traiter les LNP

La modulation de l'environnement oxydant a montré des effets bénéfiques pour traiter des pathologies diverses comme les maladies cardiovasculaires, le cancer ou les maladies neurodégénératives tel la maladie d'Alzheimer (Dröge, 2002; Dumont and Beal, 2011; Ribas et al., 2015). L'étude de l'impact du stress oxydant sur la récupération nerveuse dans le cadre des LNP est un axe de recherche relativement récent. Malgré le peu d'études menées jusqu'à maintenant, celles-ci ont pu mettre en évidence un intérêt de ces stratégies, les différents agents antioxydants évalués démontrant un effet bénéfique sur la régénération nerveuse.

La mélatonine, une hormone qui a montré un rôle dans la défense antioxydante, fut parmi les premières molécules expérimentées. Son administration chez des rats lésés dans différents modèles de LNP du nerf sciatique a montré qu'elle pouvait améliorer la restauration des fonctions motrices de l'animal et les propriétés électrophysiologiques du nerf lésé ainsi que diminuer la taille du névrome (Turgut et al., 2005; Atik et al., 2011). Entre temps, une étude avait démontré dans un modèle de lésion du nerf hypoglosse (XII^{ème} paire de NC) menée chez le rat que l'injection répétée de mélatonine renforçait l'action des SOD au sein de l'axone lésé. Les analyses électrophysiologiques ont ensuite montré que la préservation de la réaction des SOD aboutissait à une meilleure conduction nerveuse indicatrice d'une régénération nerveuse plus efficace (Chang et al., 2008). Quelques années plus tard, l'administration de curcumin, un agent antioxydant naturel, au niveau d'un nerf sciatique comprimé chez le rat, par

l'intermédiaire d'une pompe osmotique provoquait une meilleure récupération au niveau fonctionnel et électrophysiologique. Au niveau histologique, le processus de remyélinisation avait été stimulé avec une myéline plus épaisse et une élévation de l'expression de certaines protéines de myéline comme la myéline protéine zéro (P0) (Caillaud et al., 2018). Une autre étude a consisté à appliquer une solution composée de plusieurs antioxydants naturels dont entre autres des sels de zinc et de magnésium, du sélénium ou encore de l' α -tocophérole à l'intérieur d'un manchon biodégradable reliant les deux rameaux d'un nerf sciatique lésé chez le rat. Trente jours plus tard, le traitement antioxydant avait favorisé la régénération nerveuse entre les deux rameaux du nerf lésé (Salles et al., 2015).

Par ailleurs, dans des modèles de neuropathies diabétiques chez le rat, des traitements pharmacologiques utilisant des substances pharmacologiques capables de moduler l'environnement rédox comme l'Edaravone, le Trolox ou encore la NAC ont montré qu'elles diminuaient la peroxydation des lipides et augmentaient la conduction nerveuse ainsi que la récupération fonctionnelle (Sharma and Sayyed, 2006; Saini et al., 2007; Kamboj et al., 2010). Enfin chez l'Homme, une étude prospective réalisée chez 50 patients diabétiques souffrant de neuropathies a mis en évidence qu'un traitement prolongé d'acide α -lipoïque et de SOD (ALA600SOD®) améliorait la récupération des capacités physiques et sensorielles et réduisait les douleurs associées au névrome (Bertolotto and Massone, 2012).

Objectif de la thèse

Les LNP restent un enjeu majeur de santé publique compte tenu du nombre important de personnes atteintes. La microchirurgie reste le traitement de première ligne malgré une restauration incomplète. Les progrès technologiques survenus durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les pistes explorées, l'application d'agents antioxydants montrent en essais précliniques de réels bénéfices dans la régénération et le fonctionnement nerveux dans le cas des LNP. Les chercheurs de notre unité travaillent depuis plusieurs années sur la SELENOT, une oxydoréductase essentielle chez les mammifères qui protège les cellules neurales lorsque l'environnement induit un stress métabolique. Récemment, ces chercheurs ont développé un peptide mimant l'action Trx-like de la SELENOT (PSELT). Ce peptide a récemment démontré un effet protecteur vis-à-vis des neurones dopaminergiques et des cardiomyocytes soumis à un environnement nocif induit par l'administration de la neurotoxine MPTP ou un modèle d'ischémie/reperfusion cardiaque respectivement. L'ischémie survenant également lors des LNP, cette thèse cherche dans un premier temps à évaluer l'effet protecteur du peptide PSELT dans un modèle de LNP modélisé ici par lésion du nerf facial chez le rat.

Dans un second temps, nous évaluerons la capacité du peptide à améliorer l'efficacité d'une thérapie cellulaire. Malgré le fort potentiel thérapeutique des cellules souches, l'apport médical des thérapies cellulaires est encore insuffisant et les recherches visent désormais à renforcer l'action de ces cellules grâce à l'administration concomitante de substances pharmacologiques. Dans ce travail de thèse, nous évaluerons l'effet bénéfique d'une thérapie cellulaire utilisant les cellules souches dérivées des CF. Les études menées sur ces cellules ont montré qu'elles favorisaient la régénération nerveuse au niveau histologique sans vérifier leur impact sur la restauration fonctionnelle. Nous évaluerons donc si les bénéfices observés à l'échelle cellulaire peuvent être confirmés cliniquement et si ces bénéfices peuvent être renforcés en présence du peptide PSELT.

Matériel & méthodes

I. Le modèle de lésion du nerf facial

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet FHU SURFACE dont les objectifs sont de définir les conditions qui permettront d'améliorer la qualité de la reconstruction de la face au niveau esthétique et fonctionnel. Notre modèle de lésion pour évaluer la régénération nerveuse périphérique s'est donc naturellement tournée vers le nerf facial. Comparé à d'autres nerfs périphériques présents dans la région de la tête et du cou, le nerf facial est facilement accessible (voir figure 26.A), la procédure chirurgicale pour le léser est relativement simple et les modalités d'évaluations de la régénération nerveuse sont bien définies (Moran and Graeber, 2004). Tous ces avantages en font un nerf de référence pour l'étude de la régénération nerveuse périphérique *in vivo* (Moran and Graeber, 2004; Guntinas-Lichius et al., 2005; Angelov et al., 2007; Kim et al., 2011; Chabas et al., 2013; Olmstead et al., 2015). Enfin le nerf facial est un modèle bien étudié au sein du laboratoire EA3830 et dont les résultats ont déjà fait l'objet d'une publication (Bense et al., manuscrit accepté). Dans ce travail de thèse, le nerf facial a été lésé de manière similaire à celle décrite par Bense et collaborateurs. En résumé le nerf facial a été transecté à la sortie du foramen stylo-mastoïdien. Puis, les deux rameaux nerveux lésés ont été reliés grâce à l'interposition d'un extrait de veine fémorale prélevé juste avant la lésion (voir figure 26.B). Ce manchon veineux constitue un tuteur pour diriger la repousse nerveuse et est employé comme chambre de régénération dans laquelle le peptide PSELT et/ou les cellules souches dérivées des CF ont été administrés (voir figure 26.C-D). S'appuyant sur les résultats obtenus précédemment, le peptide PSELT a été utilisé dans cette étude à une concentration de 1 micromolaire (Rocca et al., 2018; Alsharif et al., soumis). Les conditions de production du peptide reprennent celles décrites précédemment (Rocca et al., 2018). Ces trois approches thérapeutiques (PSELT, cellules souches et PSELT associé aux cellules souches) ont été comparées à un traitement chirurgical standard basé sur une suture chirurgicale épineurale.

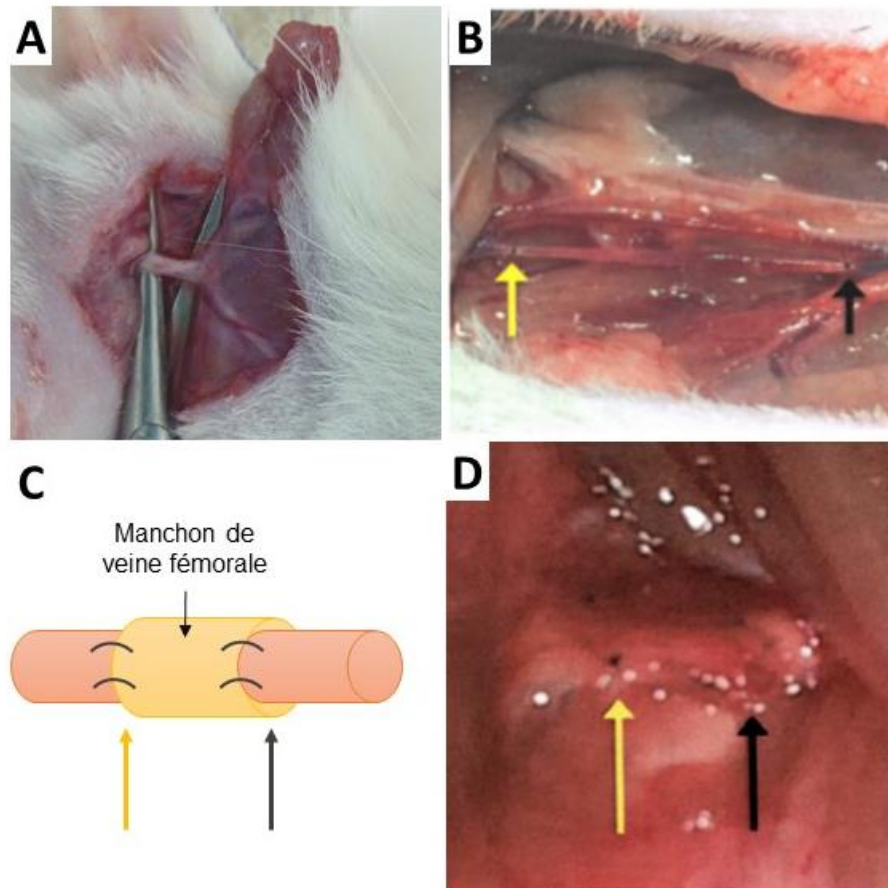


Figure 26 : Exposition du nerf facial et mise en place de la chambre de régénération d'origine veineuse. (A) Image illustrant la voie d'accès du tronc commun du nerf facial à la sortie du foramen stylo-mastoïdien. (B) Image illustrant le prélèvement de la veine fémorale. Les flèches jaunes et noires représentent les extrémités proximales et distales respectivement. (C) Représentation schématique de la construction chirurgicale. L'extrait de la veine fémorale prélevée est utilisé comme manchon d'interposition entre les deux rameaux du nerf facial lésé. (D) Image illustrant l'assemblage chirurgicale nerf-veine.

I. Les cellules souches dérivées des CF et le choix de la xénogreffe

Dans ce travail de thèse, l'effet des cellules souches dérivées des CF dans les processus de régénération nerveuse a été évalué. Le choix de ces cellules repose sur les nombreux avantages qu'elles proposent par rapport aux autres types de cellules souches testés jusqu'à maintenant : leur accessibilité, leur potentiel neurogénique ainsi que leur prolifération rapide. Alors que ces cellules représentent seulement 0.6% des cellules au moment de leur extraction de la peau, leur expansion en culture sous forme de neurosphères flottantes leur permet de

représenter après 3 semaines de cultures environ 66% des cellules en culture (voir figure 27). Par ailleurs, les premiers résultats obtenus chez la souris en font un candidat potentiel dans le cadre d'une médecine régénérative (Gresset et al., 2015). Les protocoles permettant leur extraction et leur culture reprennent ceux décrits dans la littérature (Gresset et al., 2015). Malheureusement ces protocoles ont été décrits uniquement pour la souris. Dans un premier temps il était envisagé de réaliser la transplantation cellulaire de manière allogénique. Plusieurs essais de chirurgie de lésion du nerf facial ont été réalisés dans ce but mais la trop grande difficulté de la procédure chirurgicale chez la souris nous a obligé à nous réorienter vers le rat et donc opter pour une xénogreffe. Une étude avait auparavant évalué l'intérêt de cellules embryonnaires provenant de souris dans la régénération d'un nerf sciatique lésé chez le rat Long-Evans (Cui et al., 2008). Nous avons donc repris ce modèle de rat dans notre étude. Afin de suivre le devenir de nos cellules transplantées après leur injection, celles-ci ont été extraites chez des souris exprimant de manière ubiquitaire le marqueur fluorescent *Rosa26^{tdTomato}*. Afin d'administrer une solution de cellules dérivées des CF la plus pure possible, les cellules ont été cultivées 8 semaines après leur extraction. Avant leur injection la culture cellulaire a été caractérisée par cytométrie en flux par l'intermédiaire de l'expression du marqueur nestin.

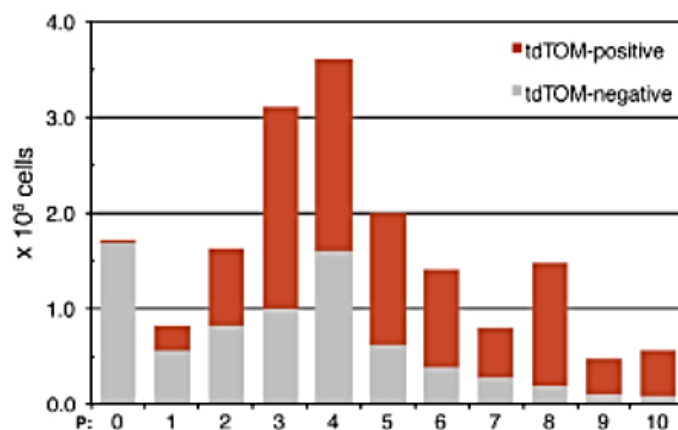


Figure 27 : Evolution du nombre de cellules souches dérivées des CF (cellules tdTOM-positive dans l'article) au cours des différents passages (Gresset et al., 2015).

II. Analyse fonctionnelle de la régénération nerveuse

L'évaluation de la régénération nerveuse a été réalisée 3 mois après la lésion, un délai qui permet une analyse à moyen terme du processus de régénération nerveuse. Elle était composée dans un premier temps d'une analyse fonctionnelle. Chez le rongeur, le nerf facial innerve les muscles qui sont responsables du mouvement des vibrisses (Semba and Egger, 1986). Ainsi, l'évaluation de la récupération des fonctions motrices a été évaluée au travers d'enregistrements vidéo de l'activité des vibrisses (voir figure 28) (Guntinas-Lichius et al., 2002; Tomov et al., 2002). A partir de ces enregistrements, le mouvement de protraction et de rétraction des vibrisses a été analysés par l'intermédiaire de trois paramètres mesurés couramment : (I) l'amplitude de protraction, c'est-à-dire la différence entre l'angle de rétraction maximal et l'angle de protraction maximal, (II) la vitesse de angulaire de protraction et enfin (III) la fréquence de protraction qui correspond au nombre d'allers-retours (protraction-rétraction) réalisés pendant 1 seconde (Guntinas-Lichius et al., 2002; Tomov et al., 2002; Guntinas-Lichius et al., 2005; Lindsay et al., 2010; Hizay et al., 2016).

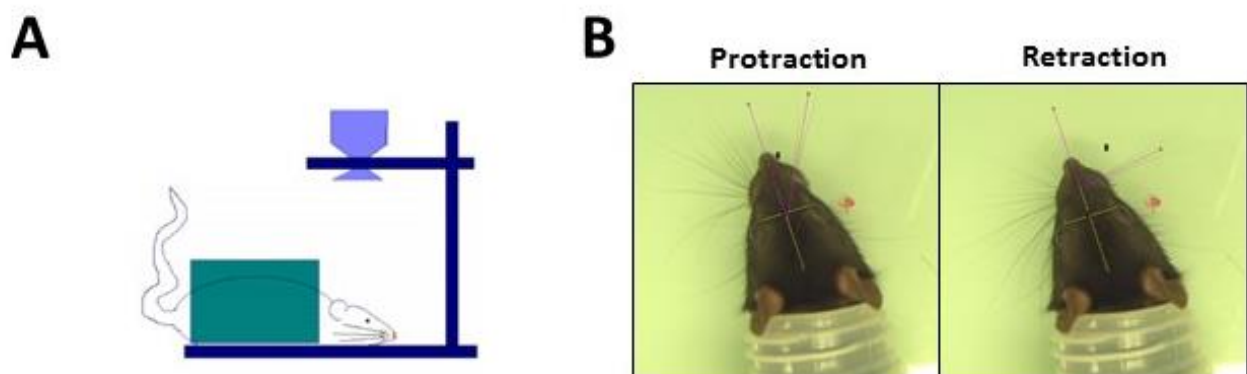


Figure 28 : Modalité d'évaluation du mouvement des vibrisses. (A) Représentation schématique de la procédure expérimentale. La caméra est placée perpendiculairement au rat qui est maintenu par un système de contention. (B) Le mouvement des vibrisses notamment l'amplitude du mouvement de protraction, la vitesse angulaire et la fréquence de protraction sont ensuite analysés.

III. Etude électrophysiologique de la régénération nerveuse

En complément de l'analyse fonctionnelle, l'efficacité des différents traitements a été étudiée par une approche électrophysiologique au niveau du nerf facial et des muscles

responsables de l'activité des vibrisses. La qualité de la réinnervation des muscles est examinée par la mesure du potentiel d'action des unités motrices (MUAP), une technique utilisée en clinique pour diagnostiquer la sévérité de la dénervation découlant de la lésion (Bischoff et al., 1994; Sohn et al., 2011). Ce MUAP correspond à la sommation des potentiels d'actions stimulant l'ensemble des fibres d'une même plaque motrice (Daube and Sorenson, 2004). L'analyse des MUAP s'est faite au travers de trois paramètres : l'amplitude, la durée et le nombre d'oscillations mesurées entre la dépolarisation initiale jusqu'au retour au potentiel de repos (voir figure 29). Ces paramètres indiquent de façon complémentaire le nombre d'axones répondant au stimulus, la synchronisation de leur réponse et la taille de l'unité motrice. A la suite d'un neurotmésis, la dénervation des fibres musculaires induit un affaiblissement de l'amplitude du MUAP et un raccourcissement de sa durée.

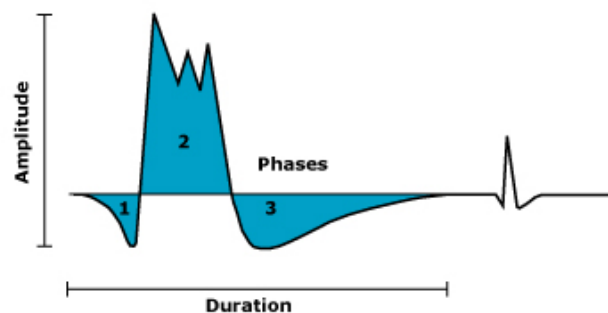


Figure 29 : Exemple d'un potentiel d'action des unités motrices (MUAP) triphasique. Ce MUAP peut être évalué selon plusieurs critères comme la mesure de son amplitude, sa durée ou encore le nombre de phase qui le compose (d'après <https://sites.google.com/site/emgandncs/emg---the-basics>).

IV. Etude histologique de la régénération nerveuse

Une analyse morphométrique des nerfs a été d'abord réalisée par l'analyse du diamètre nerveux. Par ailleurs, les cellules de Schwann occupent une place centrale lors des processus de régénération nerveuse. Une quantification de l'intensité de fluorescence du marqueur S100 a été aussi réalisée. Après 3 mois, les cellules de Schwann ont comme fonction principale la myélinisation des fibres néoformées. Ainsi une quantification de la proportion de fibres myélinisées a été menée grâce à l'utilisation du marqueur axonal NF200 et de la protéine de myéline PO à l'image de ce qui avait été réalisé par Cui (Cui et al., 2008).

Résultats

Therapeutic benefit of the SELENOT mimetic PSELT in facial nerve regeneration

Hugo Pothion^{1,2,6}, Nicolas Guérout^{2,6,†}, Isabelle Lihrmann^{1,†}, Celia Duclos², Gaëtan Riou³, Loubna Boukhzar¹, Dorthe Cartier¹, Benjamin Lefranc^{1,4}, Jérôme Leprince^{1,4}, Jean-Paul Marie^{2,5,6,*} and Youssef Anouar^{1,6,*}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

²Normandie Univ, UNIROUEN, GRHV EA3830; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000, Rouen, France.

³Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1234, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000, Rouen, France.

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN, Cell Imaging Platform of Normandy, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000, Rouen, France.

⁵Otorhinolaryngology and Head Neck Surgery Department, Rouen University Hospital, 76000, Rouen, France.

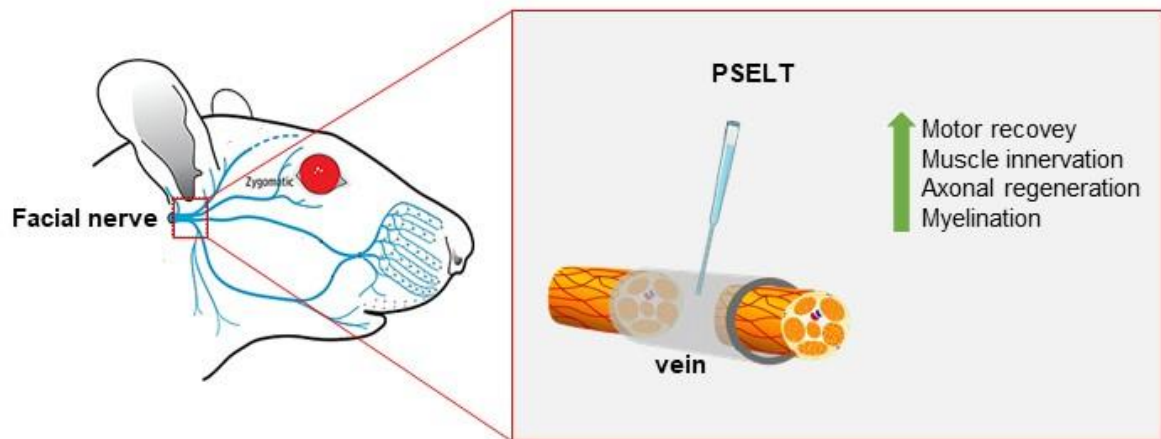
⁶Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Surface, 76000, Rouen, France.

Address correspondence to:

- Youssef Anouar,
U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory
Rouen-Normandie University
76821 Mont-Saint-Aignan Cedex France
Email address: youssef.anouar@univ-rouen.fr
- Nicolas Guérout
GRHV EA3830
Rouen-Normandie University
22 Boulevard Gambetta, 76000, Rouen, France
Email address: nicolas.guerout@univ-rouen.fr

† Contributed equally to this work

* Should be considered as co-last authors



Highlights

- PSELT improves the motor recovery of the mystacial *pad vibrissae* after injury
- PSELT increases the electrical activity of the motor units of mystacial pad muscles
- PSELT enhances axonal elongation and myelination of newly formed axons after injury
- PSELT displays higher therapeutic effect than stem cell transplantation
- No synergistic action between PSELT and stem cell xenotransplantation

Abstract

Peripheral nerve injury (PNI) is frequent and many patients suffer lifelong disabilities in severe cases. Although the peripheral nervous system is able to regenerate, its potential is limited. Nowadays, therapeutic approaches aim to strengthen the intrinsic regenerative capacities of peripheral nerves using neurotrophic factors, proangiogenic factors, antioxidant agents or different stem cell types. In this study, we tested in a facial nerve regeneration model the therapeutic effect of a short mimetic peptide, named PSELT, which derives from SELENOT, an essential thioredoxin-like selenoprotein endowed with neuroprotective and antioxidant activities. For this purpose, the right facial nerve of female long-Evans rats was axotomized then bridged with a free femoral vein interposition graft. PSELT (1 μ M) in Matrigel or Matrigel alone were injected into the vein immediately and 48 h after the injury. The effects observed were compared to those found after an end-to-end suture used as a gold standard treatment. In addition, PSELT was used in presence or absence of transplanted, nestin-positive boundary cap-derived stem cells (BCSC) to assess the effect of the peptide in combination with a cell therapy. Whisking behaviour, electrophysiological potential and histological analyses were performed 3 months after injury to determine the effects of these treatments. These analyses revealed that PSELT-treated animals exhibit a better motor recovery in terms of protraction amplitude and velocity of vibrissae compared to control and end-sutured animals. Moreover, administration of PSELT following injury enhanced muscle innervation, axonal elongation and myelination of newly formed nerve fibers. PSELT displayed a better therapeutic effect than xenotransplantation of BCSC. When PSELT was used in the presence of BCSC, no additional beneficial effect was observed in comparison to PSELT treatment alone. Altogether, these results indicate that a PSELT-based therapy is sufficient to enhance facial nerve regeneration and could represent a new therapeutic tool to treat PNI.

Key words: axotomy, boundary cap, facial nerve, motor unit, myelin, peptide, PSELT, selenoprotein, SELENOT, stem cells, therapy

Abbreviation list

BCSC, boundary cap-derived stem cells ; CsA, cyclosporin A ; EMG, electromyogram ; ER, endoplasmic reticulum ; ES, epineural suture ; MUAP, motor unit action potential ; NF200, neurofilament 200KDa ; NO, nitric oxide ; P0, myelin protein zero ; PNI, peripheral nerve

injury ; PNS, peripheral nervous system ; PSELT, SELENOT mimetic peptide ; ROS, reactive oxygen species ; SC, Schwann cells.

1. Introduction

It is well known that contrary to central nervous system axons, those of the peripheral nervous system (PNS) have an intrinsic regeneration ability. Indeed, following peripheral nerve injury (PNI), Wallerian degeneration takes place in order to clear the lesion site and to allow the initiation of axonal regeneration (Gaudet et al., 2011). However, complete recovery is not observed in case of severe PNI, which represents a major source of disability. Nowadays, microsurgery suture is still the gold standard and no other treatment is able to repair this lesion (Faroni et al., 2015). In order to strengthen the intrinsic regenerative capacities of peripheral nerves, new potential therapeutic strategies have emerged such as stem cell-based therapies or biosynthetic conducts supplemented in their lumen with various cues such as neurotrophic factors, hormones or pharmacological compounds (Hart et al., 2004; Catrina et al., 2013; Di Summa et al., 2018; Lu et al., 2018). Although these approaches improve somewhat the recovery, outcomes are comparable to those seen after microsurgery repair and no further improvement is observed. Thus, investigations are still necessary to uncover new treatments that could ensure a better nerve recovery.

PNI induces ischemia when the blood-nerve barrier is altered resulting in local hypoxia (Weerasuriya and Mizisin, 2011). It has been shown that hypoxia and reoxygenation could affect the survival and neurotrophic effects of primary cultured Schwann cells (SC) (Zhu et al., 2010). These cells play a crucial role in PNI since they phagocyte cellular and myelin debris with macrophages within Büngner bands where they promote the elongation of regrowing axons through secretion of neurotrophic factors, to ultimately remyelinate the regenerated axons (Zhu et al., 2010). However, PNI and demyelination are accompanied by oxidative stress, which is thought to play an important role in the pathogenesis of nerve injury (Lanza et al., 2012; Zhang et al., 2013; Qiu et al., 2019). Oxidative stress is considered to be one of the main sources of neural damage after injury, and is thought to have a negative impact on nerve functional recovery (Wang et al., 2015; Qiu et al., 2019). Recent studies have shown that inhibiting oxidative stress after PNI could improve functional recovery (Zhang et al., 2013; Renno et al., 2017; Qian et al., 2018).

Although preclinical studies using pharmacological agents targeting ROS have shown promising outcomes to repair peripheral nerves (Sharma and Sayyed, 2006; Saini et al., 2007; Kamboj et al., 2010; Caillaud et al., 2018), to our knowledge most attempts to translate to the

clinic therapeutics based on antioxidants such as vitamins C and E, and glutathione or some elements such as zinc have been unsuccessful (Dao et al., 2015; Ghezzi et al., 2017). Recently, it was shown that treatment with selenium has a beneficial effect in an acute nerve injury model in rat (Zendedel et al., 2017). Selenium is known to be incorporated in a particular class of proteins named selenoproteins defined by the presence of at least one selenocysteine (Sec), a selenium-containing amino acid, into their polypeptide chain. Endowed with a higher nucleophilicity than cysteine, Sec confers to selenoproteins a better redox resistance to irreversible inactivation by overoxidation, making of these proteins one of the main antioxidant family (Dardashti et al., 2016). Selenoproteins are present in almost all organisms and are essential for health since defects in their function have been related to a broad range of disorders including metabolic or cardiac diseases, muscular dystrophy, or azoospermia (Sponholz et al., 2006; Schoenmakers et al., 2010; Schomburg, 2011; Yu and Du, 2017). The large majority of selenoproteins exert oxidoreductase activities in various processes including thyroid hormone metabolism (Deiodinases DIO2, DIO3), phospholipid synthesis (SELENOI), selenium transport (SELENOP) or calcium mobilization (SELENOK) (Köhrle et al., 2005; Fredericks and Hoffmann, 2015; Liu and Rozovsky, 2015). Selenoproteins are present in different subcellular locations including the endoplasmic reticulum (ER) where they play an instrumental role in protein maturation and calcium regulation. Among the ER-resident selenoproteins, selenoprotein T (SELENOT) has gained interest in the last years since it acts as a new partner of the oligosaccharyltransferase complex involved in the N-glycosylation process of proteins, and is therefore essential for ER homeostasis (Hamieh et al., 2017). SELENOT contains in its N-terminal sequence a Sec residue within a CVSU (where U is the Sec) motif that is encompassed in a *thioredoxin-like* domain, suggestive of a redox function. *In vitro* assays showed that SELENOT exerts indeed a thioredoxin-like activity that is able to protect a neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) against free radicals through an oxidoreductase activity involving the Sec residue (Boukhzar et al., 2016). Neuroprotective properties of SELENOT were subsequently established *in vivo* in dopaminergic neurons or in neural precursors indicating a contribution in brain ontogenesis (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). In fact, our recent studies indicate that SELENOT promotes cell survival and neuritogenesis and exerts a supportive role when energy requirements are high (Anouar et al., 2018; Abid et al., 2019). We have therefore developed a SELENOT-derived peptide (named PSELT) which contains the active redox centre CVSU, in order to use it as a short mimetic of the protein for potential therapeutic applications. This peptide proved to be effective in an

ischaemia/reperfusion injury model in adult rat heart ensuring a better cardiac contracture, a reduction of infarct size and a decrease in the levels of oxygen reactive species (ROS) and caspase 3 activity (Rocca et al., 2018). Moreover, PSELT protected the dopaminergic neurons and fibers of the nigrostriatal pathway, resulting in improved motor activity in mice exposed to the neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Higher cell survival, and lower ROS levels and caspase 3 activity were observed in PSELT-treated dopaminergic neurons compared to untreated controls (Alsharif et al., submitted).

Despite the vast literature reported on the beneficial effects of antioxidant enzymes including selenoproteins in various pathologies, studies on their advantageous impact in PNI are scarce (Mantovani et al., 2003; Valentine et al., 2008; Amato et al., 2019). Therefore, we tested in the present study the hypothesis that local application in the lesion site of PSELT may increase SC integrity and nerve regeneration in a facial nerve axotomy model. Facial nerve is a mixed nerve with a motor component which controls the motor skills of the face and vibrissae in rats through its buccal branch (Dörfl, 1985). The effect of PSELT was evaluated on the amplitude, velocity and frequency of the vibrissae. Our data showed that 3 months after injury, PSELT-treated rats exhibit better motor performances and enhanced nerve regeneration observed at the electrophysiological and histological levels.

2. Materials and Methods

2.1. PSELT peptide

The SELENOT-derived peptide 43-52 (PSELT) was designed as previously reported (Rocca et al., 2018). The peptide (FQICVSUGYR, U=Sec) was synthesized on a Liberty Microwave assisted automated peptide synthesizer (CEM, Saclay, France) and purified by HPLC on a 21.2 x 250 mm Jupiter C18 (5 μ m, 300 Å) column (Phenomenex, Le Pecq, France) at a purity grade higher than 98.6% as previously described (Touchard et al., 2020). The authenticity of the synthetic peptide was controlled by MALDI-TOF-MS on an UltrafleXtreme (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) in the reflector mode with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix.

2.2. Surgical procedure

All procedures using animals were approved by the Normandy Ethics Committee for Animal Care and Use, in agreement with the European Committee Council Directives.

A total of 60 female Long-Evans rats aged of 8 weeks were used in this study. During all the surgical procedures, animals were sedated with isoflurane (2.5%). The right facial nerve was exposed via a 4-cm skin incision and transected using micro-scissor. After the nerve axotomy, different procedures were carried out depending on the animal group:

- Epineural suture group: the two segments were closed directly by an epineural suture with 10–0 microsurgical sutures (epineural suture group).
- Control group: the two segments were bridged with an extract of the right femoral vein (6 mm) removed from the same animal leaving a 3 mm gap between the two nerve segments. Vein-nerve suture was performed with 10–0 microsurgical sutures. Ten microliters of Matrigel® were gently injected in the 3 mm gap of the femoral vein with a tip diameter of 72 μ m mated to a 25- μ l Hamilton syringe (Hamilton Company).
- PSELT group: the two segments were bridged and the rats received a first injection of 10 μ l of Matrigel® supplemented with PSELT at the concentration of 1 μ M. Forty eight hours later, the injury site was exposed again and a second administration of PSELT at 1 μ M diluted in physiologic serum was performed.

- BCSC group: the two nerve stumps were bridged and about 0.5×10^6 or 10^6 viable cells diluted in 10 μ l of Matrigel® were injected in a similar manner as in the control group.
- BCSC + PSELT group: the two stumps were bridged and 10^6 viable cells diluted in 10 μ l of Matrigel® supplemented with PSELT at the concentration of 1 μ M. Forty eight hours after transplantation, the injury site was exposed again and a second administration of PSELT at 1 μ M diluted in physiologic serum was performed.

The surgery wound was sutured with 4–0 surgical sutures after Matrigel® BCSC±PSELT injection in vein.

Before and after the experiments, all rats were kept on standard laboratory food and tap water ad libitum in cages with room temperature maintained at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and a lighting condition of 12 hours light/dark cycle.

2.3. Video recording

Three months following injury, two large vibrissae of the C row (C3 and C4) on the injured side of the face were used for biometric analysis under light anaesthesia. All other vibrissae of the injured side were cut using small fine scissors, then the rats were inserted into a rodent restrained. Using CM_Blr1300-75g (Biometrics, Gometz-le-Châtel, France), whisking behaviour was video recorded for 6-10 min during active exploration. Video images of whisking behaviour were sampled at 80 Hz and the video camera shutter was open for 4 msec. Recorded video sequence fragments were selected for analysis according to the stable position of the animal's head and large-amplitude vibrissae sweeps. The tip of the rat's nose and the inner angles of both eyes were defined as reference points. Vibrissae were represented by a straight line passing between C3 and C4. Frame-by-frame analysis using ImageJ software evaluated protraction amplitude, amplitude velocity and the whisking frequency. Protraction has been assessed by the rostral angle between the midsagittal plane and the whisker shaft (fig. 1B).

2.4. Motor unit action potential measurements

Electromyogram evaluation of the facial nerve was performed 3 months after surgical procedure. Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg.) then the rat's right facial nerve was exposed. A bipolar stimulating

electrode and two unipolar platinum recording electrodes were used to induce and record electrical activity, respectively. The stimulating electrode was placed under the proximal facial nerve (at the exit point of the stylomastoid foramen before the site of injury) and the recording electrodes were placed within the mystacial pad (row C). The evoked action potential in responding to the stimuli (500 ms, 1V, 250 Ω) in the ipsilateral facial nerve was recorded using PowerLab 26T and analysed with LabChart 7 Pro software (Sydney, Australia).

2.5. Boundary caps derived stem cell harvest, culture and characterization

Mouse BCSC were harvested as described before (Gresset et al., 2015). Briefly, the dermis of the back from Td-Tomato newborn mice was dissected and digested with collagenase (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France)/dispase type I (Roche, Meylan, France) for 2 h at 37°C, then mechanically dissociated and filtered with 30 μ m pre-separation filters (Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach, Germany). Dissociated cells were resuspended at 6×10^5 cells/ml in proliferation medium (DMEM-F12, 2:1 medium containing B-27 without vitamin A supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 ng/ml EGF (Sigma) and 40 ng/ml bFGF (Sigma) and cultured under orbital agitation (40 rpm) to promote floating sphere formation. Cells were passaged every 7 days with supplementation between two passages of 1/10 of fresh medium containing growth factors.

Cultured cells were characterized by immunostaining (see below) using Nunc™ Polycarbonate Cell Culture Inserts (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) to maintain floating sphere structure. Primary antibodies used were mouse anti-nestin (1:250, Merck Millipore, Guyancourt, France), rabbit anti-P75 (1:1000, Abcam, Paris, France), mouse anti-SOX2 (1:500, Merck Millipore), mouse anti-vimentin (1:500, Santa-Cruz, Dallas, TX, USA). In order to visualize spheres, images were acquired on a confocal microscope TCS SP8 CFS (Leica Microsystems, Nanterre, France).

For spontaneous differentiation, spheres were plated onto 4-well Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fischer Scientific) coated with poly-D-lysine/laminin in differentiation medium (DMEM-F12, 2:1, containing 10% FBS). The differentiation medium was changed every 2 days. After two weeks, cells were fixed and staining analysis was performed (see below) with

the following antibodies: mouse anti-tuj1 (1:1000, BioLegend, Paris, France), rabbit anti-S100 (1:200, Dako, Les Ulis, France) or anti-smooth muscle actin (SMA) (1:100, Santa-Cruz).

2.6. FACS characterization

Before BCSC transplantation, flow cytometry analysis was performed using BD Cytotfix/Cytoperm™ kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) following the manufacturer's instructions. Briefly, dissociated cells were washed with PBS and treated with trypsin/ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA). Cells were fixed 20 min with fixation and permeabilization kit then incubated with the primary antibody donkey anti-nestin (1:100 Neuromics, Lyon, France) for 30 min at 4°C in dark. Cells were washed three times with washing buffer then incubated with Alexa Fluor 647-conjugated secondary antibody (1:500; Molecular Probes-Invitrogen) for 30 min at 4°C in dark condition. At the end of the incubation, 0.5 ml of PBS/EDTA was added. The total number of 20,000 events was analyzed on a FACS calibur flow cytometer (BD Biosciences) directly after the staining procedure. Data were processed using the FACS diva program (BD Biosciences). The proportion of nestin-positive cells in the various samples was determined by measuring the fluorescence intensity dot plot compared to the total number of cells.

2.7. BCSC survival

To suppress rejection of the mouse BCSC, rats received cyclosporin A (15 mg/kg/day, s.c.; Sandoz Pharmaceutical Corp, Holzkirchen, Germany) diluted in corn oil, starting with a double-dose 1-day before surgery until the day before sacrifice. Surgical procedure was as follow: the right facial nerve was exposed via a skin incision and crushed twice for 20 sec with forceps. A suspension containing 10^6 tdTOM-positive cells (5×10^5 cells/ μ l) was immediately injected into the facial perineurium at the lesion site with a tip diameter of 72 μ m mated to a 5- μ l Hamilton syringe (Hamilton Company). Twenty-four hours, seven and fifteen days after transplantation, animals were deeply anesthetized and sacrificed for histological analysis (see below).

2.8. Histological evaluation

The rats were perfused and tissues were fixed through 4% paraformaldehyde perfusion. The right facial nerve, the right mystical pad and the brain stem were dissected then postfixed overnight in the same fixative at 4°C and immersed in 30% sucrose-PBS 24 h at 4°C. Samples were embedded in optimal cutting temperature compound (ThermoFischer Scientific) and cut with a cryostat microtome (Leica). Sections were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution (PBS containing 10% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100) overnight at 4°C. Sections were washed 10 minute in PBS three times, then stained with Alexa Fluor 488, 594 or 647-conjugated secondary antibodies (1:500; Jackson) diluted in blocking solution for 60 min at room temperature. Sections were washed 10 min in PBS three times before coverslips were applied with Mowiol® 4-88 (Biovalley, Nanterre, France). Images were acquired on a photonic fluorescence microscope (Zeiss).

For morphometric analysis, axonal counting and axonal myelination assessment, 30 µm transverse nerve sections were done along the lesion site with cryostat microtome (Leica). Nerve diameter measurement corresponds to the average of 8 diameters assessed on the same nerve section. After staining with antibodies against chicken anti-P0 (1:200, USBiological Life Sciences, Swampscott, MA, USA), rabbit anti-S100 (1:200, Dako) and mouse anti-neurofilament 200 KDa (1:500, Merck Millipore), five areas of 5 mm² were randomly selected and analyzed with ImageJ software.

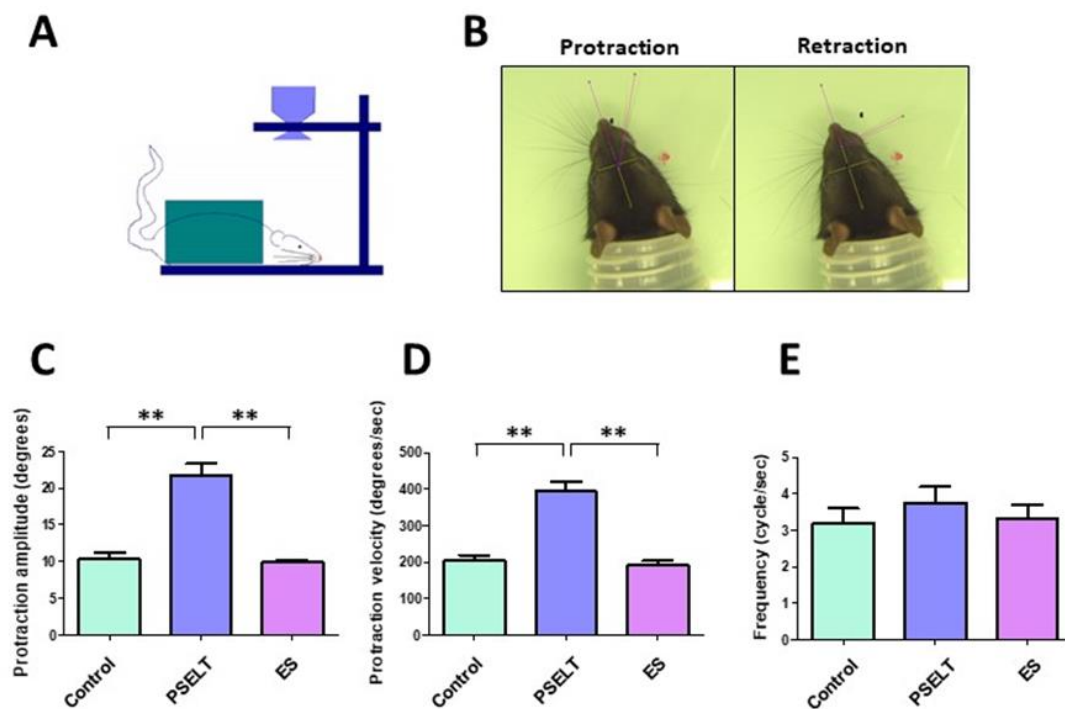
2.9. Statistical analysis

Statistical comparisons were made by using Mann–Whitney U test, and analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Dunnett's test or Student's *t* test, as indicated, using Graphpad Prism 5 (GraphPad Software). Results reported are presented as mean ± SEM. Statistical significance was set as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Motor performance recovery 12 weeks after axotomy

In order to investigate the potential therapeutic benefit of PSELT in PNI, a Matrigel solution containing PSELT at the concentration of 1 μ M (PSELT group) or Matrigel alone (control group) were injected into the space left between the two nerve stumps within the vein that bridged the transected facial nerve of rats. After 48 h, the injured facial nerve was exposed again and a second injection of PSELT at the same concentration or Matrigel® was performed. In the perspective of a clinical application, these two experimental groups were compared to rats in which both nerve stumps were bridged by an epineural suture (ES group), a microsurgery procedure used in clinical practice. Three months after injury, rats were placed in a restraint system in order to evaluate the effect of PSELT on motor recovery (Fig. 1A). To evaluate the effect of PSELT on motor recovery of the transected facial nerve, we assessed vibrissae movement using video recording (Fig. 1B). Analysis of video recordings showed that early administration of PSELT at the concentration of 1 μ M at day 0 and day 2 post-injury significantly increases ($p < 0.01$) functional motor performance recovery illustrated by an elevation of protraction amplitude and protraction velocity in the PSELT group (21.74 ± 1.99 degrees and 394.83 ± 33.23 degrees/sec, respectively) compared to the control group (10.30 ± 1.41 degrees and 203.94 ± 22.06 degrees/sec, respectively) and to the ES group (9.94 ± 0.41 degrees and 192.44 ± 17.74 degrees/sec, respectively) (Fig. 1C-D). However, no difference was



observed for the average frequency (Fig. 1E). These data show that early PSELT administration improves motor function restoration after PNI.

Fig. 1: Effect of PSELT-based therapy on facial nerve motor performance recovery 12 weeks after injury.

(A) Schematic representation of the experimental procedure. The camera is perpendicular to the immobilized rat and records the vibrissae movements. (B) Video recording allows precise measurement of protraction angle, protraction velocity and mean frequency of the whisker movement on the operated side. The protraction amplitude is obtained by the difference between the protraction angle and the retraction angle. Note that no difference in whisking was observed in the intact side. (C-E) Effect of PSELT on whisking performance. Protraction amplitude (C), protraction velocity (D) and mean whisking frequency (E) were compared after injured facial nerve was bridged with vein (control) or with vein infused with PSELT, or was treated with the standard surgery procedure (ES: epineural suture) (n=6-9). Video recordings were analysed with Image J Software. Data are presented as mean \pm SEM (** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test).

3.2. Motor unit functionality 12 weeks after axotomy

To explain these motor performance improvements in the PSELT group, we hypothesized that nerve regeneration was ameliorated in the PSELT group compared to the other groups. Therefore, nerve regeneration was assessed by electromyographic analysis, notably motor unit action potential (MUAP) evaluation. Usually, axotomy disrupts MUAP wave in terms of amplitude, duration and shape. To assess these parameters in our facial nerve model, a stimulus of 1 mV during 500 ms was applied at the stylomastoid foramen exit upstream of the injury site and the MUAP was recorded with two electrodes placed on the mystacial pad (row C) (Fig. 2A). MUAP recordings highlighted a better outcome in the PSELT group (Fig. 2, B-D). Indeed, the PSELT group had a higher average MUAP amplitude (8.32 ± 0.48 mV) than the control group (1.73 ± 0.38 mV; $p < 0.01$) or the ES group (1.34 ± 0.39 mV; $p < 0.01$) (Fig. 2E). This better nerve recovery was also confirmed with a shorter MUAP duration in the PSELT group (19.65 ± 2.06 ms) compared to the control group (32.84 ± 3.75 ms; $p < 0.01$, Mann-Whitney *U*-test) and also to the ES group ($47.55 \pm 2,44$ ms; $p < 0.001$) (Fig. 2F). Altogether, these data indicate that PSELT increases nerve functional regeneration 12 weeks after its administration into the injury site.

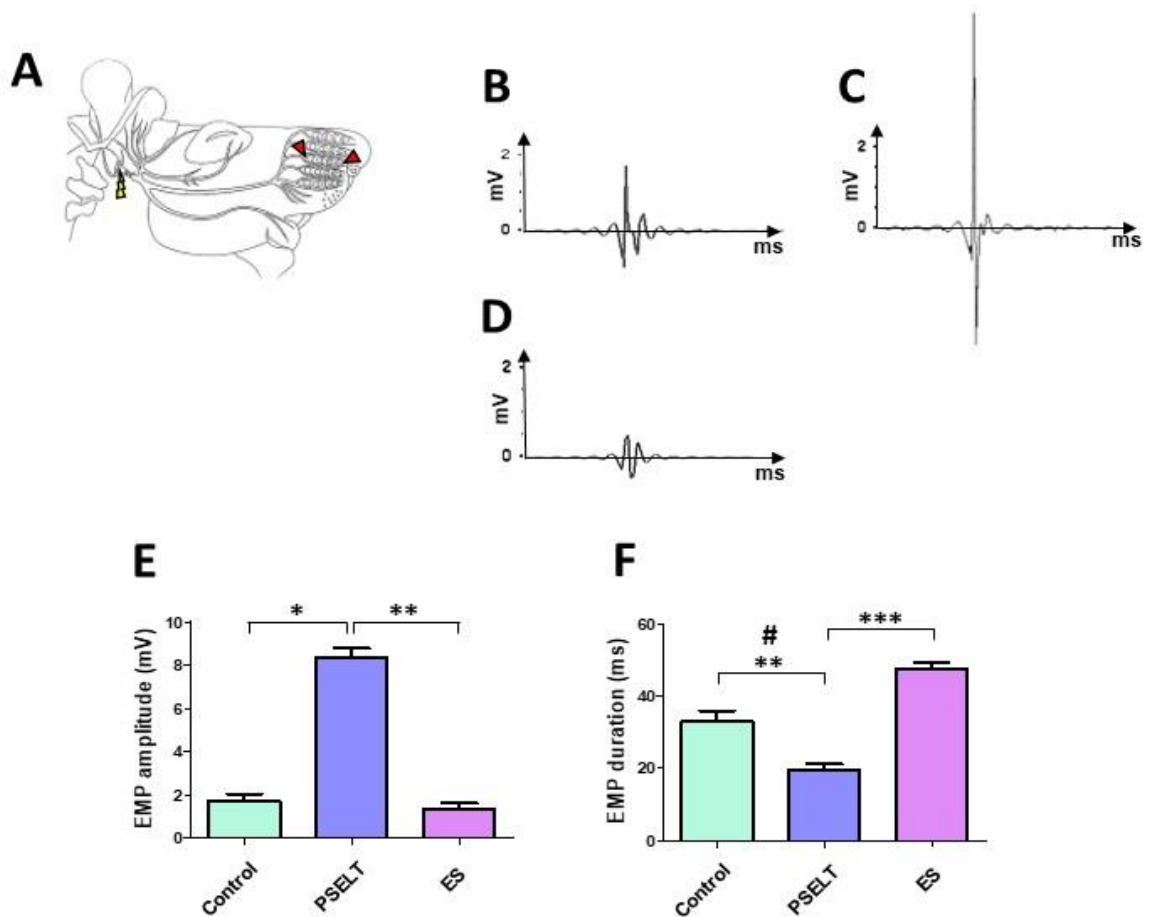


Fig. 2: Effect of PSELT-based therapy on motor end plate innervation 12 weeks after injury.

(A) Schematic drawing of the experimental procedure. On the operated side, the facial nerve was exposed, and 1-mV current was applied by an electrode (yellow thunderbolt) upstream of the injury. Evoked action potentials were recorded with two electrodes (red triangles) in mystacial pad (row C). (B-D) Motor unit action potentials (MUAP) were recorded 3 months after injury in the control group (B), in rats treated with PSELT (C) and in surgically treated rats (D). (E-F) Effect of PSELT on amplitude (E) and duration (F) of MUAP were analyzed using LabChart 7 Pro software (n=6-9). Data shown are mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test; # Mann-Whitney U test).

3.3. Histological outcome of facial nerve regeneration 12 weeks after axotomy

Twelve weeks after injury, facial nerves were taken and transversal sections were performed at about 100 μm downstream of the proximal stump (Fig. 3A). Nerve integrity was examined in these sections after immunostaining with the neurofilament marker NF200 (Fig. 3, B-D). While in a normal nerve, regular myelinated fibers are organized in fascicles (Gao et al., 2013), all our experimental groups exhibited numerous irregular and thin nerve fibers homogeneously distributed throughout the entire field, typical of a regeneration process. Moreover, a smaller diameter of the damaged nerve segment was observed in rats that received vehicle injection (Matrigel®) compared to the others, with a mean diameter of $184.95 \pm 15.33 \mu\text{m}$ for controls and $422.25 \pm 75.99 \mu\text{m}$ for the PSELT group ($p < 0.01$) or $377.19 \pm 55.84 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$) for the ES group. Of note, the difference between the PSELT and the ES groups did not reach statistical difference (Fig. 3E).

It is now well established that SC have a crucial role in peripheral nerve repair. In order to investigate the effect of the PSELT peptide on SC occurrence, transverse sections were stained with antibodies against the SC marker S100 (Fig. 3, F-G). The S100 fluorescence intensity was quantified in five areas of 5 mm^2 of the nerve section for each animal to take into account nerve heterogeneity. This analysis revealed that rats that received PSELT exhibit a higher mean fluorescence intensity of S100 compared to control rats (+172%; $p < 0.05$) and to rats with ES (+185%; $p < 0.01$). Note that there is no difference between the ES animals and the control group for S100 labelling (Fig. 3I).

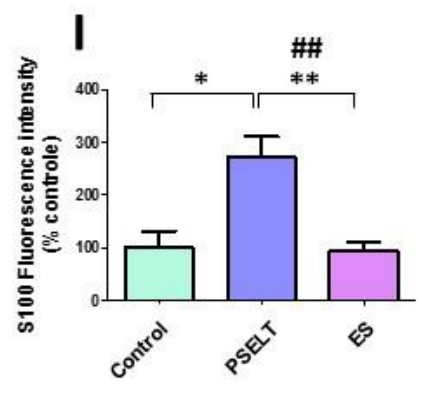
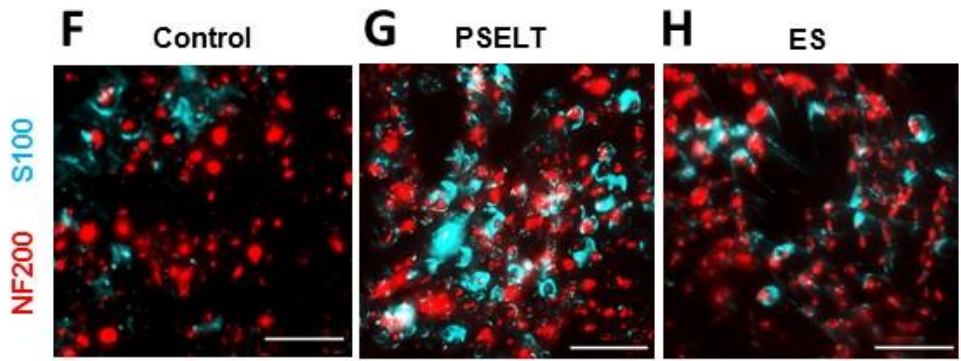
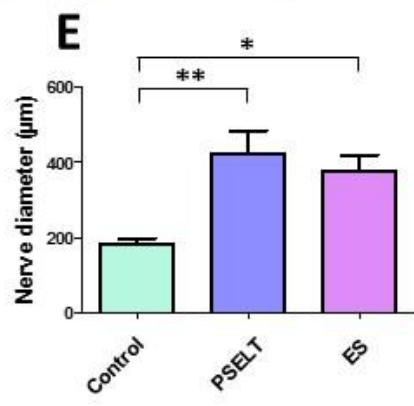
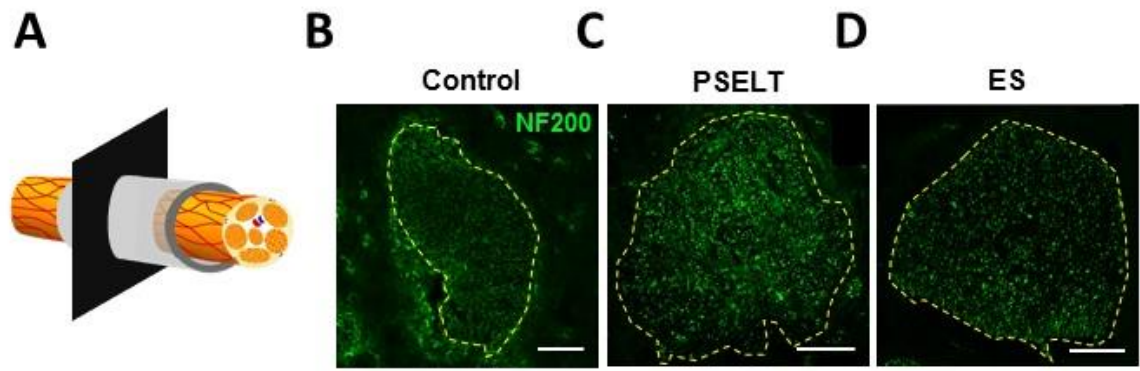


Fig. 3: Effect of PSELT-based therapy on histological repair of the facial nerve 12 weeks after injury

(A) Schematic drawing representing the image acquisition procedure. Transverse sections were performed in the injury site about 0.1 mm beyond the proximal stump toward the distal direction. (B-D) Confocal imaging shows labelling of the neurofilament marker NF200 (green) in transverse sections of the facial nerve from the control, PSELT and ES groups 3 months after injury. The dotted line indicates the perineurium. *Scale bar*: 100 μm . (E) Nerve diameters were assessed from confocal images using Image J software (n=6-7). (F-H) Three months after injury, transverse sections were stained with antibodies against the axonal marker NF200 (red) and the SC marker S100 (blue). *Scale bar*: 25 μm . (I) S100 fluorescence intensity in the PSELT and ES groups were determined and compared to the control group. Fluorescence quantification was performed using Image J software (n=4-6). Data are presented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test).

3.4. Influence of PSELT-based therapy on myelinisation of regenerated axons 12 weeks after axotomy

After cleaning of the lesion site, SC participate in axon elongation through neurotrophic factor production and secretion, and then in myelination of newly formed axons. Thus, we asked whether the higher S100 fluorescence intensity observed in rats that received PSELT, could be related to a better axonal regrowth and myelination. To address this question, transverse sections were stained with antibodies against the axon-abundant neurofilament marker NF200 and the protein zero (P0), a major structural protein of the peripheral myelin sheath. In line with data in the literature, immunofluorescence analyses showed the occurrence in the lesion site of axons wrapped or not by a myelin sheath (Fig. 4,A-C). In agreement with the S100 fluorescence intensity results, counting of myelinated and unmyelinated axons (Fig. 4A, blue and pink arrows, respectively) was performed in five areas of 5 mm² for each section. The axonal density was higher in the PSELT and ES groups, with an estimated number of axons by area of 139 ± 13 and 132 ± 14 , respectively, whereas the control group had a mean of 98 ± 7 , which is statistically different from that of the PSELT group ($p < 0.05$) (Fig. 4D). Moreover, we found twice as many myelinated axons in the PSELT group (74.03 ± 2.86) compared to the control (43.66 ± 2.52 ; $p < 0.05$) and ES (45.89 ± 1.65 ; $p < 0.05$) groups (Fig. 4E). Altogether, these data

indicate that a PSELT-based therapy could promote sustained regenerative sprouting and improve myelination of newly axons.

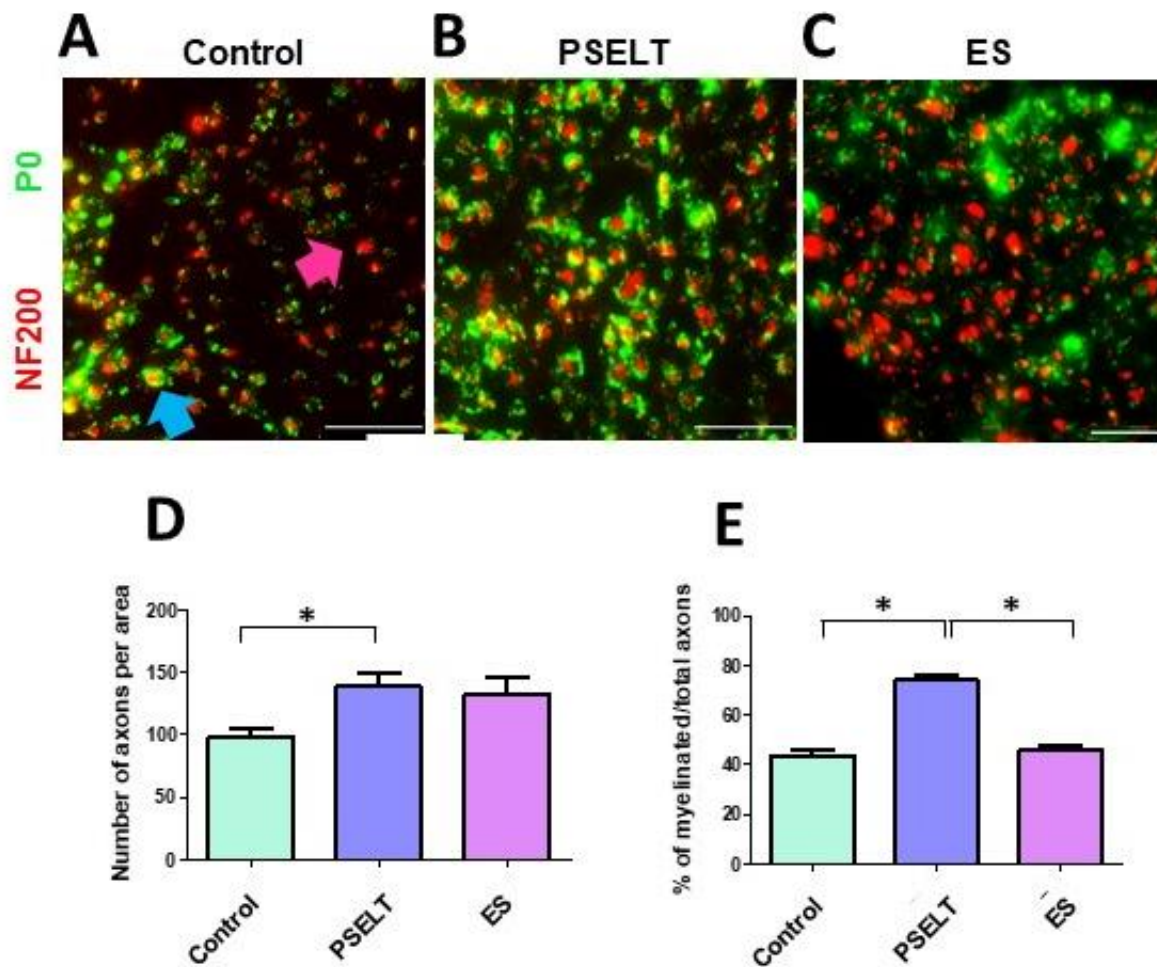


Fig. 4: Effect of PSELT-based therapy on myelination of facial nerve 12 weeks after injury.

(A-C) Transverse sections were stained with antibodies against NF200 (red) and the myelin marker protein zero (P0) (green). Blue and pink arrows indicate a myelinated and an unmyelinated nerve fiber, respectively. *Scale bar*: 25 μ m. (D) Axon number counting was performed using Image J Software. Counting was repeated 5 times for every animal to account for nerve heterogeneity and averages are presented (n=4-6). (E) Myelinated axon number counting was performed using Image J Software. Counting was repeated 5 times for every animal and averages are presented (n=4-6). Data are presented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; * $p < 0.01$; ANOVA test and post-hoc Dunnett's test; ## Mann-Whitney U test).

3.5. Effect of a combination of PSELT and stem cell transplantation in PNI 12 weeks after axotomy

With these data showing the beneficial effect of PSELT on peripheral nerve repair...SC, we next asked whether PSELT effect could be strengthened if the pool of glial/satellite cells is increased in the lesion site. To test this hypothesis and based on data from the literature showing the therapeutic effect of various stem cell types, we used a stem cell population located in the skin and named the boundary caps-derived stem cells (BCSC) which has been previously reported to hold an interesting neurogenic and gliogenic potential (Gresset et al., 2015). Thus, to investigate the therapeutic potential of PSELT when it is associated with a BCSC-based therapy, we first characterized the fate of these cells before and after transplantation, and their therapeutic potential. After two weeks of BCSC culture, immunofluorescence experiments showed the occurrence of numerous cells co-labelled with several neural crest and glial cell markers such as nestin, P75NGFR, vimentin and SOX2 (Fig. S1). Cells were propagated for 8 weeks in sphere conditions. FACS analysis performed after this period indicated that 80-91% of the cultured cells were nestin-positive (Fig. 5A).

In order to investigate whether BCSC had a therapeutic effect by themselves in the injured facial nerve model, 0.5×10^6 or 1×10^6 cells were injected into a vein segment used for bridging the two nerve stumps. Video recording analyses performed 3 months after injury, revealed better motor vibrissae performances only when rats received 1×10^6 cells, but not 0.5×10^6 cells compared to the control group (Fig. S2). Furthermore, immunofluorescence experiments did not show any TdTomato-positive cells 3 months after injury, indicating that all transplanted cells died after this period. Addition of an immunosuppressive treatment *i.e.* cyclosporin A (CsA) injection, as its pro-survival effect on transplanted cells was described by Cui et al., (2008), did not improve BCSC survival 15 days after transplantation. Indeed, analysis of longitudinal nerve sections from CsA-treated rats showed only TdTomato-positive cellular debris, while in untreated rats TdtTomato-positive transplanted cells were found one week after engraftment (Figure S3). Therefore, further experiments in this study were performed without CsA treatment and with 1×10^6 cells.

Comparative motor performance analyses showed a better protraction amplitude ($p < 0.05$) (Fig. 5B) and protraction velocity ($p < 0.01$) (Fig. 5C) in the BCSC-transplanted animals compared to the ES group, but no difference was observed with this group for protraction mean frequency (Fig. 5D). In line with motor outcome, a better nerve conduction ($p < 0.05$) was

observed in the BCSC group with a higher amplitude and a shorter duration than those observed in the control and ES groups (Fig. 5, E-F). These results indicate that transplantation of boundary caps-derived stem cells improve motor recovery and nerve conduction in the PNI model studied.

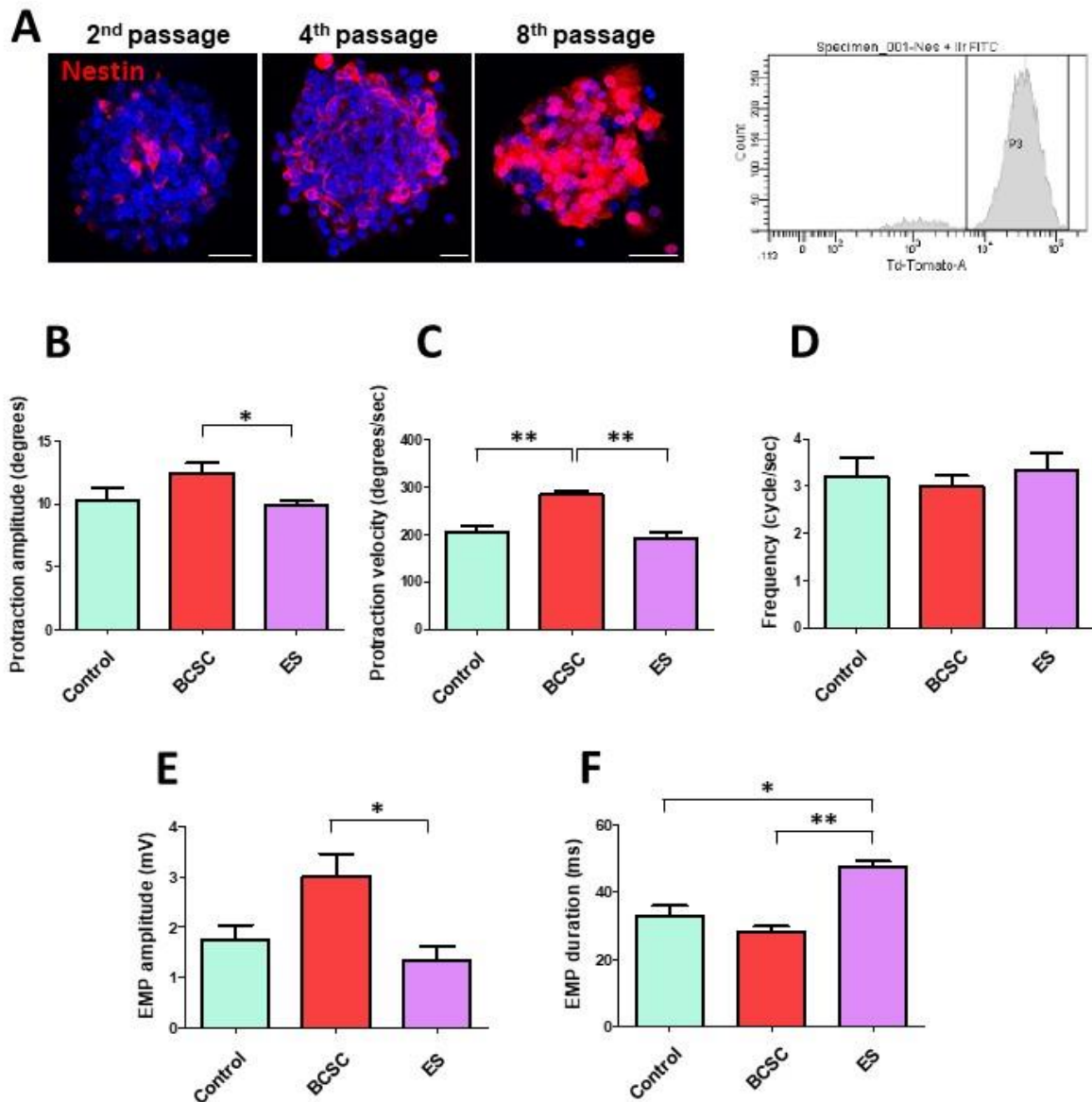


Fig. 5: Effect of BCSC-based therapy on nerve recovery 12 weeks after injury.

(A) BCSC were propagated under floating sphere conditions until the 8th passage corresponding to 8 weeks of culture. Cultured cells were characterized by FACS analysis before their transfer into the vein. (B-D) Effect of BC-derived stem cells on whisking performance 3 months after injury. Using video recording, protraction amplitude (B), protraction velocity (C) and mean whisking frequency (D) were compared after the injured facial nerve was bridged with vein

(control), with vein infused with 10^6 cells (BCSC) or after treatment with the standard surgery procedure (ES: epineural suture). Video recordings were analyzed with Image J Software. (E-F) Motor unit action potentials (MUAP) were recorded in mystacial pad (row C) in the control group, in rats treated with stem cells (BCSC) or surgically treated rats (Epineural suture). MUAP were recorded 3 months after injury, and amplitude (E) and duration (F) of MUAP were analyzed using LabChart 7 Pro software (n=8-10). Data are presented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test).

We next investigated the effect of a combination therapy with both PSELT and BCSC on the injured nerve. Three months after injury and therapy, transverse sections were performed and stained in a similar manner as done above with antibodies against NF200 and S100 (Fig. 6, A-C). Morphometric quantification revealed that PSELT at $1 \mu\text{M}$ to BCSC transplantation (10^6 cells comprising 80-91% of nestin-positive cells) increases the nerve diameter ($419.14 \pm 24.11 \mu\text{m}$) compared to cell therapy alone ($246.83 \pm 33.73 \mu\text{m}$; $p < 0.05$), but the effect of the combination of PSELT and BCSC did not differ from that of PSELT alone (Fig. 6D). Similar results were observed for S100 labelling which showed a lower intensity in the BCSC group compared to the PSELT group ($47.78 \% \pm 5.34$; $p < 0.05$) and no significant difference between PSELT and PSELT+BCSC groups (Fig. 6E). The increase in S100 labelling in the PSELT group compared to the BCSC group did not have an impact on axonal sprouting (Fig. 6F). Finally, using P0 staining, we observed a higher proportion of myelinated fibers per area in the PSELT group (74.03 ± 2.86 ; $p < 0.01$) compared to the group with BCSC transplantation alone (41.24 ± 4.93), but adding PSELT to cell transplantation did not modify the positive effect of PSELT alone on the proportion of myelinated fibers (Fig. 6G). These histological observations indicate that adding precursor cells to a PSELT-based therapy does not improve nerve anatomical properties compared to PSELT treatment alone.

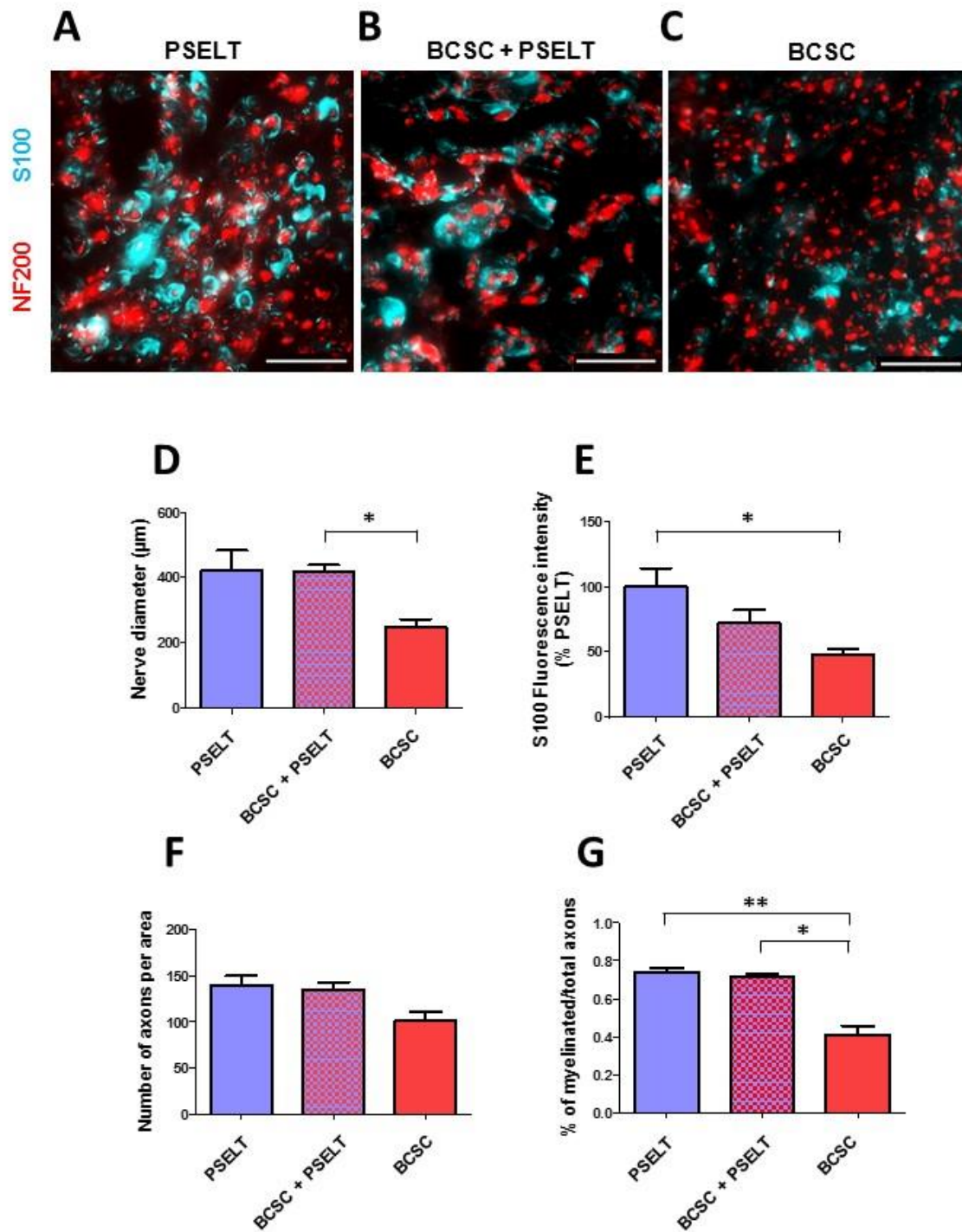


Fig. 6: Effect of PSELT-BCSC combination on histological repair of the facial nerve 12 weeks after injury

(A-C) Three months after injury, transverse sections were stained with antibodies against the axonal marker NF200 (red) and the SC marker S100 (blue). *Scale bar*: 25 μm . (D) Nerve diameters were assessed after confocal imaging using Image J software (n=6-7). (E) S100

fluorescence intensity in the BCSC+PSELT group and BCSC group were determined and compared to the PSELT group. S100 fluorescence quantification was performed using Image J software (n=5-6). (F) Axon number counting was performed using Image J Software. Counting was repeated 5 times for every animal to account for nerve heterogeneity (n=5-6). (G) Myelinated axon number counting was performed using Image J Software (n=5-6). Data are presented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test).

Finally, we investigated the functional consequences of the therapeutic effect of the combination of PSELT with the stem cell therapy. For this purpose, nerve stumps were bridged with a vein and treated with PSELT at the concentration of 1 μ M and in addition to 10^6 cells (80-91% of nestin-positive cells). After 48 h, the injured facial nerve was re-exposed and a second injection of PSELT at the concentration of 1 μ M was performed (BCSC+PSELT group). Three months after the injury, motor recovery of vibrissae was investigated using video recording. Video analyses showed that vibrissae from the PSELT group had a better amplitude and velocity protraction (21.74 ± 1.99 degrees and 394.83 ± 33.23 degrees/sec, respectively) compared to the BCSC group (12.41 ± 1.32 degrees and 283.92 ± 11.43 degrees/sec, respectively; $p < 0.01$) (Fig. 7, A and B). Moreover, a lower velocity was observed in the BCSC+PSELT group (291.09 ± 14.61 degrees/sec) compared to the PSELT group ($p < 0.05$) (Fig. 7B). However, combination of both therapies resulted in an increase of protraction frequency (4.43 ± 0.52) compared to the BCSC group (2.99 ± 0.36 ; $p < 0.05$) (Fig. 7C).

MUAP was also recorded in the different conditions (Fig. 7D-F), and the analyses showed a higher MUAP amplitude in the PSELT group (6.49 ± 1.33 mV) compared to the BCSC group (3.01 ± 0.67 mV; $p < 0.01$) (Fig. 7G). Concerning EMP duration, a shorter MUAP was found in the PSELT (19.65 ± 2.06 ms) and BCSC+SELT groups (19.37 ± 1.44 ms) compared to the BCSC group (28.03 ± 2.01 ms; $p < 0.05$) (Fig. 7H).

Altogether, these data show that adding neuro-glial precursors in the lesion site does not improve the PSELT therapeutic potential.

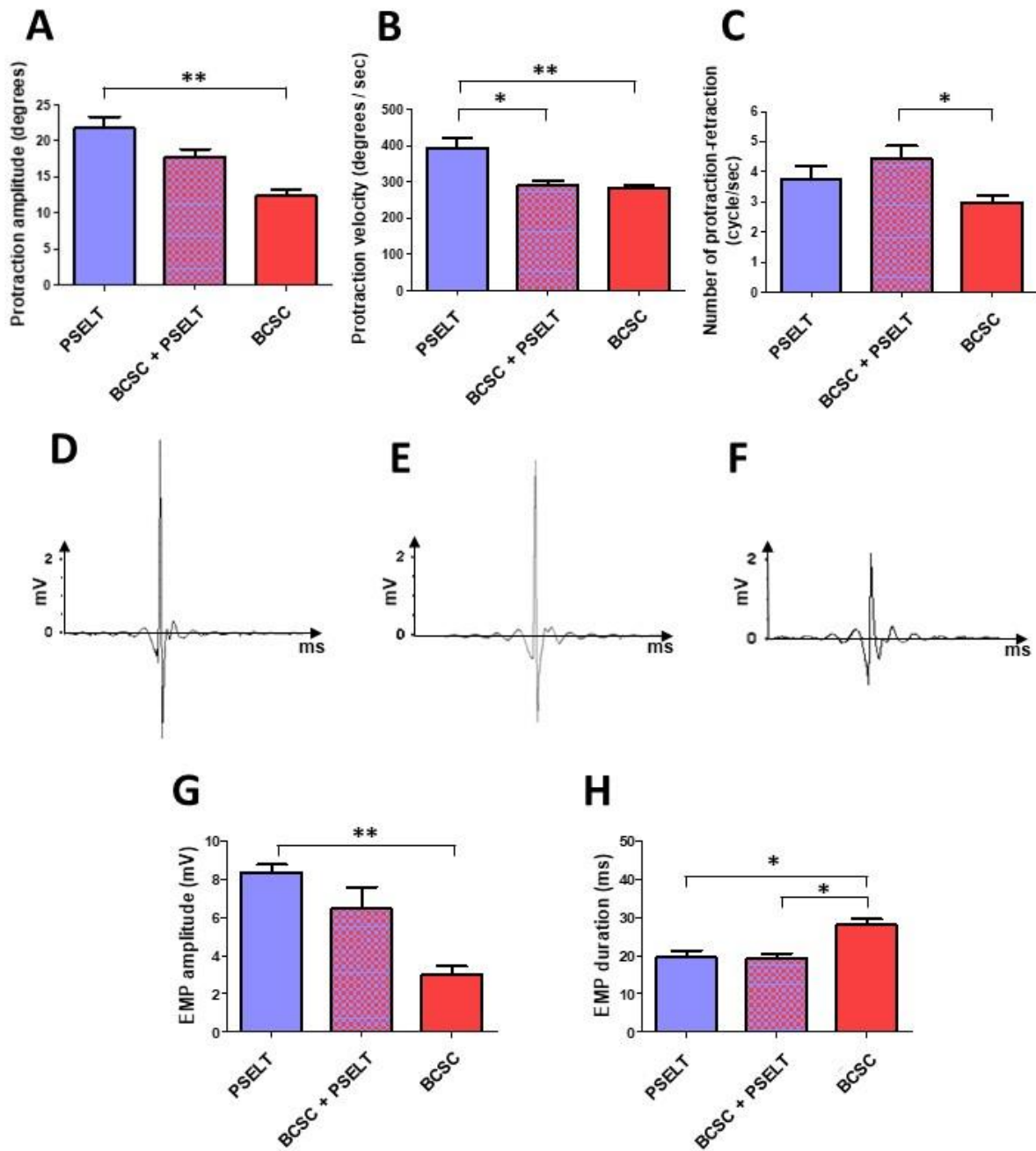


Fig. 7: Effect of PSELT-BCSC combination on motor performance and motor end plate innervation 12 weeks after injury.

(A-C) Using video recording, protraction amplitude (A), protraction velocity (B) and mean whisking frequency (C) were compared three months after injury in rats in which facial nerve was bridged with vein and infused with PSELT (PSELT), treated with 10^6 BCSC or treated with a PSELT/BCSC combination (BCSC+PSELT). Video recordings were analyzed with Image J Software. Data are presented as mean \pm SEM (n=6-10). (D-F) Three months after

injury, motor unit action potentials (MUAP) were recorded in mystacial pad (row C) in rats in which injured facial nerve was bridged with vein infused with PSELT (PSELT) (D), treated with 10^6 BCSC (E) or treated with a PSELT/BCSC combination (BCSC+PSELT) (F). (G-H) Effect of the three therapies on amplitude (G) and duration (H) of MUAP was analyzed using LabChart 7 Pro software (n=6-9). Data are presented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test and post-hoc Dunnett's test).

4. Discussion

This study builds on previous work in which PSELT demonstrated a protective effect on dopaminergic neurons and fibers in a Parkinson's disease model, and on myocardiatic cells after ischemia/reperfusion injury. We investigated here the therapeutic potential of the PSELT peptide in a facial nerve defect, a well-documented model to evaluate PNI. We demonstrated that early injection of PSELT enhances nerve regeneration in terms of improved motor performances of the whisker pad and higher myelination of the regrown axons in the injured facial nerve.

Facial transection injuries are more severe than crush injuries and result in lower whisker function (Hadlock et al., 2010). Facial nerve being responsible of whisker pad motion, video analysis of vibrissae activity, its use as a model of PNI enables to evaluate motor recovery (Guntinas-Lichius et al., 2002; Tomov et al., 2002). In agreement with published data, we found in the present study that approaches for reconstructing the nerve after injury such as epineural suture or entubulation through a vein result in poor motor recovery (Angelov et al., 2007; Hadlock et al., 2008; Hadlock et al., 2010). The poor motor performances observed were associated with an irregular whisking in the injured compared to the healthy side. In contrast, PSELT-treated rats exhibited a better organization of whisking, with a more regular and improved amplitude and velocity. In order to rule out the possibility that cutting the vibrissae only on the operated side could impact performance, we tested whisking performance in healthy rats and saw no difference between the side where the whiskers were cut and the healthy side.

Voluntary muscle contraction is initiated by the nervous system with action potential conduction to skeletal muscle fibers through large myelinated motor neurons (type A α fibers) (Menorca et al., 2013). All the muscle fibers innervated by the same motor neuron axon terminal form a motor unit. Motor unit action potentials (MUAP) are the summation of all the potentials

generated by synchronous firing of the muscle fibers in a motor unit (Daube and Sorenson, 2004). Assessment of MUAP evaluates the neuromuscular system activity, reflecting the structure of a motor unit (Bischoff et al., 1994). In axotomy cases, axonal regeneration provokes the appearance of polyphasic MUAP with small amplitude referred to as “nascent potentials” which indicate weak reinnervation (Robinson, 2000; Crone and Krarup, 2013). In agreement, we observed such MUAP recordings in the ES and control groups. Following nerve injury, denervation of muscle fibers induces a shortening of MUAP duration. MUAP duration comprises the period from the slow initial phase until the terminal phase of the MUAP signal and varies with the number of muscle fibers activated in the recorded area. The long-lasting MUAP duration observed in the present study could be explained by abnormal number of shapes observed on the electromyogram recordings, reflecting the temporal dispersion of the action potential and resulting from irregular remyelination (Rodríguez et al., 2012). In contrast, MUAP in PSELT-treated rats had the highest mean amplitude compared to the other experimental groups and had mostly a biphasic or triphasic shape in a proportion similar to that seen in healthy rats. Because the amplitude depends on various factors such as the number of axons responding to the stimulus, the synchronization of their response and the size of the motor unit, an elevation of this parameter indicates a higher number of nerve fibers recruited and their better remyelination, indicating thereby a better nerve regeneration (Archibald et al., 1991). These data show that administration of PSELT at 1 μ M given twice to rats early after nerve injury was sufficient to ameliorate regenerated nerve functioning. Nevertheless, additional adjustments are still necessary to determine the optimal dose, duration and route of administration that could further improve the therapeutic effect of the peptide.

Following injury, proximal stumps of peripheral axons undergo changes at their tips at the level of their cytoskeleton, calcium signalling and cell surface molecule profile in order to form the growth cone (Bradke et al., 2012). Few hours later, numerous axonal branches emerge from the growth cone (a phenomenon referred to as sprouting) which begins to elongate. Axonal elongation varies in term of speed at a rate from 1 to 4 mm per day depending on species until axons reach their organ target (Sulaiman and Gordon, 2013; Teixeira et al., 2016). In rodents, sprouting and elongation depend on the severity of injury and may last up to several months (Bijlsma et al., 1983). Our analysis revealed histological features of regenerative processes in all experimental groups with changes in the architecture of the fascicules which are more irregular and numerous, and comprising some thinner axons. The PSELT and ES groups showed the highest axonal density compared to the control or BCSC groups. However, the

proportion of myelinated axons, which were less clustered, was increased to a similar level in rats treated with PSELT or with BCSC in the presence of PSELT compared to the other groups, suggesting a more advanced nerve recovery in the former groups. These observations are in line with the video recordings and electromyogram results and suggest that PSELT impacts the sprouting and/or elongation processes. Further investigations are required to determine the impact of this axonal sprouting in terms of synkinesis, one of the major issues following facial nerve regeneration ([Çelik et al., 2000](#)).

Stem cell-based therapy has shown some promises to treat PNI, notably through the neurotropic action of stem cells, and their ability to differentiate into SC and to promote nerve regeneration and myelination ([Ren et al., 2012](#); [Guo et al., 2015](#); [Wang et al., 2017](#)). Although various stem cell types have been evaluated, this treatment showed a low therapeutic benefit so far compared to surgical treatments. Indeed, some parameters such as survival of transplanted cells still need to be improved in order to further consider a clinical application ([Heine et al., 2004](#)). To overcome this limitation, therapeutic stem cells are sometimes associated with neurotrophic factors or antioxidant agents that could improve their survival. In order to determine whether such a strategy would ameliorate nerve regeneration in our PNI model, we combined PSELT to boundary caps-derived stem cells. These cells were recently identified and showed interesting features thanks to their neurogenic/gliogenic potential allowing them to generate various neural cell types depending on the environment ([Gresset et al., 2015](#)). The results obtained in the present study indicate that these cells could enhance nerve recovery to a level comparable to PSELT when nestin-positive cells were transplanted, but no synergistic beneficial effect was observed compared to the effect of PSELT alone. Given that no therapeutic benefit was observed when 5×10^5 nestin-positive cells were transplanted, it would be interesting to evaluate nerve recovery after transplantation of 10^6 or more nestin-positive cells. A previous work showed that therapeutic benefit varied with the quantity of transplanted cells and observed a better axonal regeneration when 80×10^6 cells/ml were transplanted compared to 40×10^6 or 160×10^6 cells ([Mosahebi et al., 2001](#)).

Rocca et al. demonstrated that the PSELT cardioprotective effect relies on the activation of RISK pathway through PI3K-Akt and ERK1/2, and requires mitoKATP-channel opening (Rocca et al., 2018). Interestingly, recent studies indicated that facial axotomy triggers simultaneous activation of ERK/MAPK and PI3K/AKT signalling in facial nerve cells and axons from day 1 following axotomy, and that this activation promotes neuron survival and axon regrowth (Haitao Huang et al., 2017; Hai-tao Huang et al., 2017). Further studies showed that both pathways have complementary functions: ERK pathway activation promotes nerve fiber plasticity and elongation, while Akt pathway signalling through PI3 kinase activation at the level of SC has a crucial role in axon ensheathment and regulation of myelin sheath thickness in the PNS via increased myelin-binding protein and P0 levels (Domènech-Estévez et al., 2016; Hausott and Klimaschewski, 2019). As our results showed a higher myelination after PSELT administration, these data suggest that PSELT could act in facial axotomy/regeneration in a similar manner to that observed in ischaemia/reperfusion injury through strengthened activation of the same signalling pathways. In fact, PSELT may balance ROS and nitric oxide levels to maintain them at sustainable levels for SC, thus enabling these cells to release neurotrophic factors necessary for the regeneration of the injured nerve, as previously evoked for selenium or ascorbic acid (Kizilay et al., 2017; Huff et al., 2020). In fact, PSELT may help to appropriately synthesize these trophic factors as our transcriptomic analyses revealed that the peptide induces an adaptive transcriptional response in neuronal cells (Alsharif et al., submitted). Further investigations are required to identify the mechanism of action of PSELT in facial nerve regeneration. It should be mentioned that PSELT is able to cross the plasma membrane in vitro and in vivo and to target different pathways in neuronal cells (Alsharif et al., submitted). Similar experiments need to be performed in order to elucidate whether PSELT, like its precursor SELENOT, acts at the level of the ER to accompany nerve regeneration (Dikiy et al., 2007; Hamieh et al., 2017).

Following PNI, injured motor neurons undergo significant changes in their metabolism, morphology and electrophysiology (Graeber, 1994). These changes in neural cells promote ROS formation (Rodella et al., 2016; Llobet Rosell and Neukomm, 2019), which is reduced by various antioxidant molecules whose expression is stimulated in motor neurons as demonstrated for glutathione reductase, thioredoxin 1, and the selenoprotein thioredoxin reductase 1 in a hypoglossal nerve injury model in rats (Mansur et al., 1998; Hama et al., 2010). Previous studies showed that SELENOT is mainly expressed during embryogenesis where it contributes to the ontogenesis of various organs such as brain, pancreas or heart (Prevost et al., 2011; Tanguy et al., 2011; Castex et al., 2016; Rocca et al., 2018). In adult, although SELENOT expression is restricted to some cell types having high secretory activity such as pituitary or pancreatic cells, SELENOT can be induced in different cells when they are exposed to a noxious environment as it was demonstrated for cardiomyocytes subjected to ischaemia/reperfusion or dopaminergic neurons of the substantia nigra challenged with neurotoxins (Boukhzar et al., 2016; Hamieh et al., 2017; Rocca et al., 2018). It is tempting to speculate that following injury, SELENOT is induced in injured motor neurons to reduce plasticity-generated ROS and to support spontaneous regeneration. This hypothesis is supported by several observations. First, SELENOT was originally identified as a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-stimulated oxidoreductase involved in neuronal differentiation (Grumolato et al., 2008). A previous study showed that PACAP expression in facial motor neurons is low in physiologic conditions but is rapidly increased following injury in a time-dependant manner to reach a peak at 48 h post-injury, and then remained elevated for 30 days (Zhou et al., 1999), suggesting that SELENOT expression could be stimulated following PACAP elevation. Besides, it was demonstrated that the PACAP-induced SELENOT expression requires activation of AMPK-PGC-1 α /NRF-1 cascade (Abid et al., 2019), which is also involved in mitochondriogenesis. Since nerve plasticity and regrowth following injury require high amounts of ATP and expression of several mitochondrial biogenesis markers such as PGC-1 α , NRF-1, and TFAM as shown in the injured sciatic nerve in rats from day 3 until at least day 28 post-injury (W. Huang et al., 2017), it is possible that the same pathway operates to combat oxidative stress through SELENOT and to increase energy supply via mitochondriogenesis. In the present study, all our analyses were performed 90 days following injury to evaluate nerve regeneration but this precluded the possibility to monitor SELENOT expression which needs to be examined at earlier times after injury. As observed in our previous studies, administration

of PSELT would strengthen the effect of the endogenous SELENOT in the injury site (Boukhzar et al., 2016; Rocca et al. 2018; Alsharif et al., submitted).

5. Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated the beneficial effect of PSELT in facial nerve injury/regeneration. Its early administration in the lesion site following injury results in better functional recovery of the nerve. In line with motor restoration, nerve regeneration was enhanced with increased axonal regrowth and myelination compared to the other groups. Although additional studies are required to further elucidate its mechanism of action, this work identified PSELT as a new therapeutic candidate to treat PNI.

Author contributions

Conceptualization, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP ; Methodology, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP, J.L ; Investigation, HP, I.L, N.G, C.D, D.C, G.R, B.L ; Format analysis, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP ; Validation, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP ; Visualization, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP ; Writing, Y.A, J-P.M, I.L, N.G, HP ; Funding acquisition, Y.A, J-P.M ; Supervision, Y.A, J-P.M, I.L, N.G.

Funding

This work was supported by the Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Surface, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, grant number U1239), University of Rouen Normandy, the Regional Council of Normandy, the Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB) and ADIR Association. Y.A. and N.G. are supported by the European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

Declaration of Competing Interest

There are no conflicts of interest in relation to this work. The authors confirm reading the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this manuscript is consistent with the Journal's guidelines.

Acknowledgements

Thanks to Dr Claire Batut for help with the surgery procedure. Images were acquired in PRIMACEN, the Cell Imaging Platform of Normandy and FACS analyses were performed in the cell sorting service of IRIB.

References

- Abid H, Cartier D, Hamieh A, François-Bellan A-M, Bucharles C, Pothion H, Manecka D-L, Leprince J, Adriouch S, Boyer O, et al. 2019. AMPK activation of PGC-1 α /NRF-1-dependent SELENOT gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress. *Mol Neurobiol* **56**: 4086–4101. doi: 10.1007/s12035-018-1352-x
- Amato A, Terzo S, Mulè F. 2019. Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A Focus on Alzheimer's disease. *Antioxidants* **8**: 608. doi: 10.3390/antiox8120608
- Angelov DN, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova SI, Skouras E, Maegele M, Irintchev A, Neiss WF, et al. 2007. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis* **26**: 229–242. doi: 10.1016/j.nbd.2006.12.016
- Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. 2018. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* **127**: 145–152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076
- Archibald SJ, Krarup C, Shefner J, Li ST, Madison RD. 1991. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J Comp Neurol* **306**: 685–696. doi: 10.1002/cne.903060410
- Bijlsma WA, Jennekens FGI, Schotman P, Gispen W-H. 1983. Stimulation by ACTH4–10 of nerve fiber regeneration following sciatic nerve crush. *Muscle Nerve* **6**: 104–112. doi: 10.1002/mus.880060205
- Bischoff C, Stålberg E, Falck B, Eeg-Olofsson KE. 1994. Reference values of motor unit action potentials obtained with multi-MUAP analysis. *Muscle Nerve* **17**: 842–851. doi: 10.1002/mus.880170803
- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet J-J, Errami M, et al. 2016. Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* **24**: 557–574. doi: 10.1089/ars.2015.6478

- Bradke F, Fawcett J, Spira M. 2012. Assembly of a new growth cone after axotomy: The precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **13**: 183–93. doi: 10.1038/nrn3176
- Caillaud M, Chantemargue B, Richard L, Vignaud L, Favreau F, Faye P-A, Vignoles P, Sturtz F, Trouillas P, Vallat J-M, et al. 2018. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology* **139**: 98–116. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.001
- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet J-J, Anouar Y, Falluel-Morel A. 2016. Selenoprotein T Deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in Mice. *Mol Neurobiol* **53**: 5818–5832. doi: 10.1007/s12035-015-9505-7
- Catrina S, Gander B, Madduri S. 2013. Nerve conduit scaffolds for discrete delivery of two neurotrophic factors. *Eur J Pharm Biopharm* **85**: 139–142. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.03.030
- Çelik M, Forta H, Vural Ç. 2000. The Development of Synkinesis after Facial Nerve Paralysis. *Eur Neurol* **43**: 147–151. doi: 10.1159/000008154
- Crone C, Krarup C. 2013. Chapter 6 - Neurophysiological approach to disorders of peripheral nerve. In: Said G, Krarup C, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier. p. 81–114. doi: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00006-0
- Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. 2008. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells* **26**: 1356–1365. doi: 10.1634/stemcells.2007-0333
- Dao VT-V, Casas AI, Maghzal GJ, Seredenina T, Kaludercic N, Robledinos-Anton N, Di Lisa F, Stocker R, Ghezzi P, Jaquet V, et al. 2015. Pharmacology and clinical drug candidates in redox medicine. *Antioxid Redox Signal* **23**: 1113–1129. doi: 10.1089/ars.2015.6430
- Dardashti RN, Dery L, Mousa R, Dery S, Reddy PS, Metanis N. 2016. The chemistry of selenocysteine in proteins. In: Hatfield DL, Schweizer U, Tsuji PA, Gladyshev VN, editors. *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Cham: Springer International Publishing. p. 73–83. doi: 10.1007/978-3-319-41283-2_7
- Daube JR, Sorenson EJ. 2004. Needle electromyography. In: Eisen A, editor. *Handbook of Clinical Neurophysiology*. Elsevier. p. 221–240. doi: 10.1016/S1567-4231(04)04011-0
- Di Summa PG, Schiraldi L, Cherubino M, Oranges CM, Kalbermatten DF, Raffoul W, Madduri S. 2018. Adipose derived stem cells reduce fibrosis and promote nerve regeneration in rats. *Anat Rec Hoboken Nj 2007* **301**: 1714–1721. doi: 10.1002/ar.23841

- Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2007. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* **46**: 6871–6882. doi: 10.1021/bi602462q
- Domènech-Estévez E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, Einheber S, Chrast R, Salzer JL. 2016. Akt regulates axon wrapping and myelin sheath thickness in the pns. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **36**: 4506–4521. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3521-15.2016
- Dörfl J. 1985. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat* **142**: 173–184.
- Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. 2015. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* **82–83**: 160–167. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010
- Fredericks GJ, Hoffmann PR. 2015. Selenoprotein K and protein palmitoylation. *Antioxid Redox Signal* **23**: 854–862. doi: 10.1089/ars.2015.6375
- Gao X, Wang Y, Chen J, Peng J. 2013. The role of peripheral nerve ECM components in the tissue engineering nerve construction. *Rev Neurosci* **24**: 443–453. doi: 10.1515/revneuro-2013-0022
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**: 110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110
- Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW. 2017. The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol* **174**: 1784–1796. doi: 10.1111/bph.13544
- Graeber MB. 1994. The role of astrocytes in facial nerve regeneration. Stennert ER, Kreutzberg GW, Michel O, Jungehülsing M, editors. *The Facial Nerve: 75–77*. Berlin, Heidelberg: Springer. doi: 10.1007/978-3-642-85090-5_21
- Gresset A, Couplier F, Gerschenfeld G, Jourdon A, Matesic G, Richard L, Vallat J-M, Charnay P, Topilko P. 2015. Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin. *Stem Cell Rep* **5**: 278–290. Elsevier. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.005
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, et al. 2008. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **22**: 1756–1768. doi: 10.1096/fj.06-075820

- Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss WF, Angelov DN. 2002. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J Neurosci* **22**: 7121–7131. Society for Neuroscience. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-16-07121.2002
- Guo Z, Sun X, Xu X, Zhao Q, Peng J, Wang Y. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural Regen Res* **10**: 651–658. doi: 10.4103/1673-5374.155442
- Hadlock T, Kowaleski J, Lo D, Bermejo R, Zeigler HP, Mackinnon S, Heaton JT. 2008. Functional assessments of the rodent facial nerve: a synkinesis model. *The Laryngoscope* **118**: 1744–1749. doi: 10.1097/MLG.0b013e31817f5255
- Hadlock TA, Kowaleski J, Lo D, Mackinnon SE, Heaton JT. 2010. Rodent facial nerve recovery after selected lesions and repair techniques. *Plast Reconstr Surg* **125**: 99–109. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181c2a5ea
- Hama I, Nakagomi S, Konishi H, Kiyama H. 2010. Simultaneous expression of glutathione, thioredoxin-1, and their reductases in nerve transected hypoglossal motor neurons of rat. *Brain Res* **1306**: 1–7. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.014
- Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, et al. 2017. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* **18**: 1935–1946. doi: 10.15252/embr.201643504
- Hart AM, Terenghi G, Kellerth J-O, Wiberg M. 2004. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* **125**: 91–101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.040
- Hausott B, Klimaschewski L. 2019. Promotion of peripheral nerve regeneration by stimulation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *Anat Rec Hoboken Nj 2007* **302**: 1261–1267. doi: 10.1002/ar.24126
- Heine W, Conant K, Griffin J, Hoke A. 2004. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp Neurol* **189**: 231–240. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.06.014
- Huang Haitao, Liu H, Yan R, Hu M. 2017. PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following rat facial nerve axotomy. *Neurochem Res* **42**: 3515–3524. doi: 10.1007/s11064-017-2399-1

- Huang Hai-tao, Sun Z, Liu H, Ma J, Hu M. 2017. ERK/MAPK and PI3K/AKT signal channels simultaneously activated in nerve cell and axon after facial nerve injury. *Saudi J Biol Sci* **24**: 1853–1858. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.11.027
- Huang W., Wang T, Jiang B, Zheng M. 2017. Mitochondrial biogenesis in ventral spinal cord and nerve following sciatic nerve axotomy. *Int J Clin Exp Med* **10**: 14386–14393.
- Huff TC, Sant DW, Camarena V, Van Booven D, Andrade NS, Mustafi S, Monje PV, Wang G. 2020 Mar 26. Vitamin C regulates Schwann cell myelination by promoting DNA demethylation of pro-myelinating genes. *J Neurochem*, in press. doi: 10.1111/jnc.15015
- Kamboj SS, Vasishta RK, Sandhir R. 2010. N-acetylcysteine inhibits hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis markers in diabetic neuropathy. *J Neurochem* **112**: 77–91. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06435.x
- Kizilay Z, Erken H, Aktas S, Ersoy N, Abas B, Topcu A, Yenisey Ç, Ismailoglu O. 2017. Effects of selenium on axon and myelin healing in an experimental sciatic nerve injury model. *J Istanbul Fac Med* **80**: 138–45. doi: 10.18017/iuitfd.349434
- Köhrle J, Jakob F, Contempré B, Dumont JE. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* **26**: 944–984. doi: 10.1210/er.2001-0034
- Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Sénès F, Tos P, Geuna S. 2012. Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Res* **90**: 842–848. doi: 10.1002/jnr.22778
- Liu J, Rozovsky S. 2015. Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* **23**: 795–813. doi: 10.1089/ars.2015.6388
- Llobet Rosell A, Neukomm LJ. 2019. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. *Open Biol* **9**: 190118. Royal Society. doi: 10.1098/rsob.190118
- Lu J, Sun Xun, Yin H, Shen X, Yang S, Wang Y, Jiang W, Sun Y, Zhao L, Sun Xiaodan, et al. 2018. A neurotrophic peptide-functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogel enhances rat sciatic nerve regeneration. *Nano Res* **11**: 4599–4613. doi: 10.1007/s12274-018-2041-9
- Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J, Kiyama H. 1998. Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* **62**: 86–91. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00244-7
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, Murgia V, Camboni P, Ferrelli L, Mocchi M, et al. 2003. The impact of different antioxidant agents alone or in combination on

- reactive oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: correlation with disease progression. *Free Radic Res* **37**: 213–223. doi: 10.1080/10715760303849
- Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. 2013. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin* **29**: 317–330. doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.002
- Mosahebi A, Woodward B, Wiberg M, Martin R, Terenghi G. 2001. Retroviral labeling of Schwann cells: In vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration. *Glia* **34**: 8–17. doi: 10.1002/glia.1035
- Prevost G, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Tanguy Y, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**: 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246
- Qian Y, Han Q, Zhao X, Song J, Cheng Y, Fang Z, Ouyang Y, Yuan W-E, Fan C. 2018. 3D melatonin nerve scaffold reduces oxidative stress and inflammation and increases autophagy in peripheral nerve regeneration. *J Pineal Res* **65**: e12516. doi: 10.1111/jpi.12516
- Qiu J, Yang X, Wang L, Zhang Q, Ma W, Huang Z, Bao Y, Zhong L, Sun H, Ding F. 2019. Isoquercitrin promotes peripheral nerve regeneration through inhibiting oxidative stress following sciatic crush injury in mice. *Ann Transl Med* **7**: 680–680. doi: 10.21037/atm.2019.11.18
- Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, Yuan Z, Roberts AI, Zhang L, Zheng B, et al. 2012. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **11**: 812–824. doi: 10.1016/j.stem.2012.08.013
- Renno WM, Benov L, Khan KM. 2017. Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg Spine* **27**: 593–613. doi: 10.3171/2016.10.SPINE16218
- Robinson LR. 2000. Traumatic injury to peripheral nerves. : 11. 2000. *Muscle Nerve* **23** : 863-873. Doi:[10.1002/\(sici\)1097-4598\(200006\)23:6<863::aid-mus4>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(200006)23:6<863::aid-mus4>3.0.co;2-0)
- Rocca C, Boukhzar L, Granieri MC, Alsharif I, Mazza R, Lefranc B, Tota B, Leprince J, Cerra MC, Anouar Y, et al. 2018. A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta Physiol Oxf Engl* **223**: e13067. doi: 10.1111/apha.13067
- Rodella U, Scorzeto M, Duregotti E, Negro S, Dickinson BC, Chang CJ, Yuki N, Rigoni M, Montecucco C. 2016. An animal model of Miller Fisher syndrome: Mitochondrial hydrogen peroxide is

produced by the autoimmune attack of nerve terminals and activates *Schwann cells*. *Neurobiol Dis* **96**: 95–104. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.005

Rodríguez I, Gila-Useros L, Malanda A. 2012. Motor Unit Action Potential Duration: Measurement and Significance. doi: 10.5772/50265

Saini AK, Kumar H S A, Sharma SS. 2007. Preventive and curative effect of edaravone on nerve functions and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* **568**: 164–172. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.04.016

Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, et al. 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* **120**: 4220–4235. doi: 10.1172/JCI43653

Schomburg L. 2011. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **8**: 160–171. doi: 10.1038/nrendo.2011.174

Sharma SS, Sayyed SG. 2006. Effects of trolox on nerve dysfunction, thermal hyperalgesia and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**: 1022–1028. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04481.x

Sponholz S, von der Hagen M, Hahn G, Seifert J, Richard P, Stoltenburg-Didinger G, Ferreira A, Kaindl AM. 2006. Selenoprotein N muscular dystrophy: differential diagnosis for early-onset limited mobility of the spine. *J Child Neurol* **21**: 316–320. doi: 10.1177/08830738060210041401

Sulaiman W, Gordon T. 2013. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J* **13**: 100–108.

Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**: 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246

Teixeira MJ, Almeida DB, Yeng LT, Teixeira MJ, Almeida DB, Yeng LT. 2016. Concept of acute neuropathic pain. The role of nervi nervorum in the distinction between acute nociceptive and neuropathic pain. *Rev Dor* **17**: 5–10. Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. doi: 10.5935/1806-0013.20160038

Touchard A, Aili S, Téné N, Barassé V, Klopp C, Dejean A, Kini RM, Mrinalini, Coquet L, Jouenne T, Lefranc B, Lepince J, Escoubas P, Nicholson G, Treilhou M, Bonnafé E. 2020. Venom peptide repertoire of the European Myrmicine Ant *Manicarusubida*: identification of insecticidal toxins. *J Proteome Res*, **19**, 1800–1811. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00048

- Tomov TL, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Streppel M, Schraermeyer U, Neiss WF, Angelov DN. 2002. An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol* **178**: 207–218. doi: 10.1006/exnr.2002.8040
- Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF. 2008. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**: 68–77. doi: 10.1097/NEN.0b013e318160f347
- Wang C, Lu C-F, Peng J, Hu C-D, Wang Y. 2017. Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* **12**: 2106–2112. doi: 10.4103/1673-5374.221171
- Wang H, Ding X-G, Li S-W, Zheng H, Zheng X-M, Navin S, Li L, Wang X-H. 2015. Role of oxidative stress in surgical cavernous nerve injury in a rat model. *J Neurosci Res* **93**: 922–929. doi: 10.1002/jnr.23545
- Weerasuriya A, Mizisin AP. 2011. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **686**: 149–173. doi: 10.1007/978-1-60761-938-3_6
- Yu S-S, Du J-L. 2017. Selenoprotein S: a therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? *Cardiovasc Diabetol* **16**: 101. doi: 10.1186/s12933-017-0585-8
- Zendedel A, Gharibi Z, Anbari K, Abbaszadeh A, Khayat ZK, Khorramabadi RM, Soleymaninejad M, Gholami M. 2017. Selenium Ameliorate Peripheral Nerve Ischemic-Reperfusion Injury via Decreased TNF- α . *Biol Trace Elem Res* **176**: 328–337. doi: 10.1007/s12011-016-0836-7
- Zhang L, Johnson D, Johnson JA. 2013. Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury. *Neurobiol Dis* **54**: 329–338. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.003
- Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA. 1999. Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* **57**: 953–961.
- Zhu H, Li F, Yu W-J, Wang W-J, Li L, Wan L-D, Le Y, Ding W-L. 2010. Effect of hypoxia/reoxygenation on cell viability and expression and secretion of neurotrophic factors (NTFs) in primary cultured schwann cells. *Anat Rec* **293**: 865–870. doi: 10.1002/ar.21105

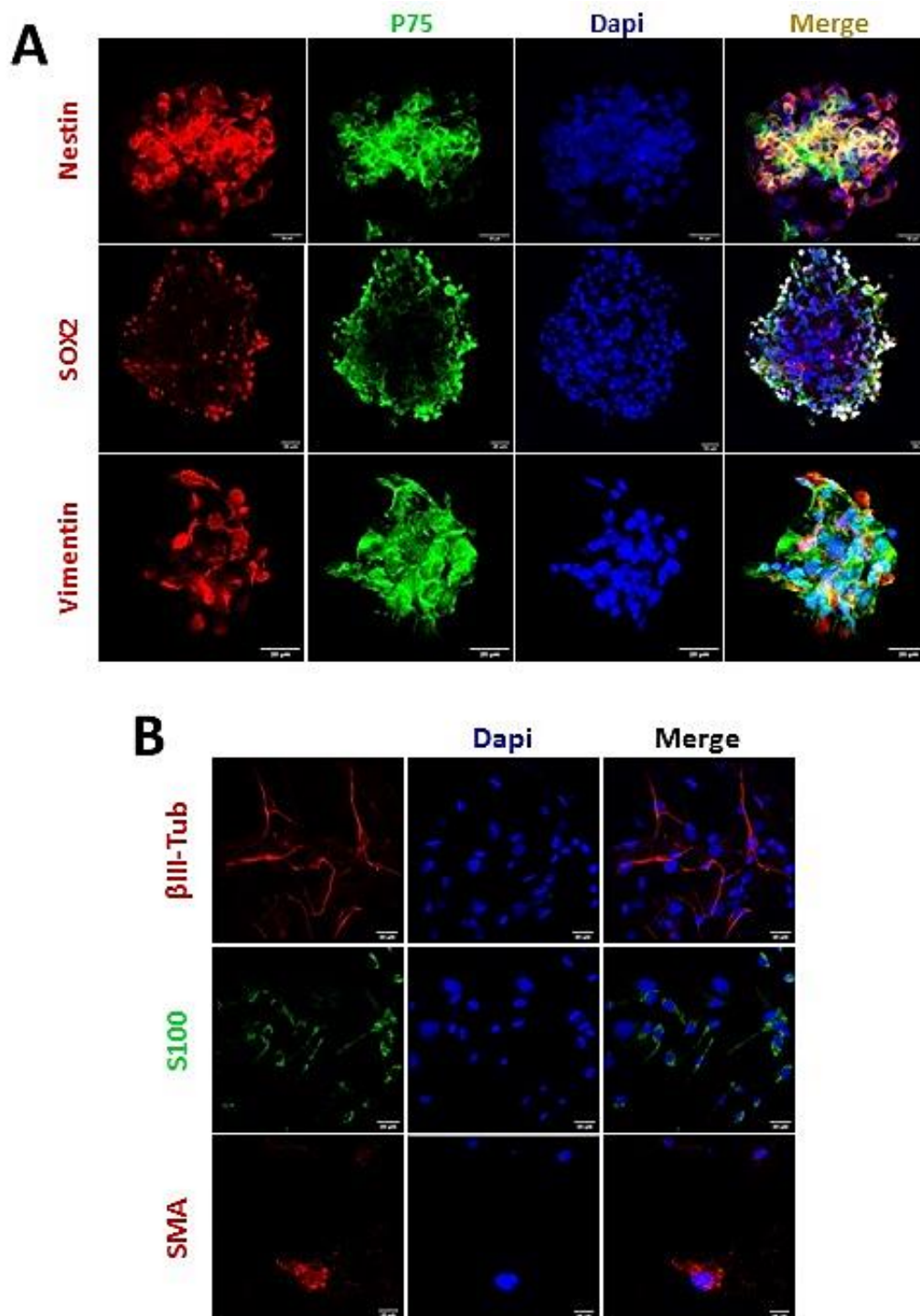


Fig. S1: Characterization of extracted cells *in vitro*.

(A) Extracted cells were cultured under floating sphere conditions for two weeks and stained with several boundary cap-derived stem cell markers including nestin, p75NGFR, SOX2 and vimentin. Some cells co-labelled with several markers. (B) Cell differentiation *in vitro*. Floating spheres were incubated in a medium promoting their spontaneous differentiation for 15 days

and then stained with the neuronal marker β III-tubulin (β III-tub), the SC marker S100 and the myofibroblast smooth muscle actin (SMA) marker. *Scale bar: 20 μ m.*

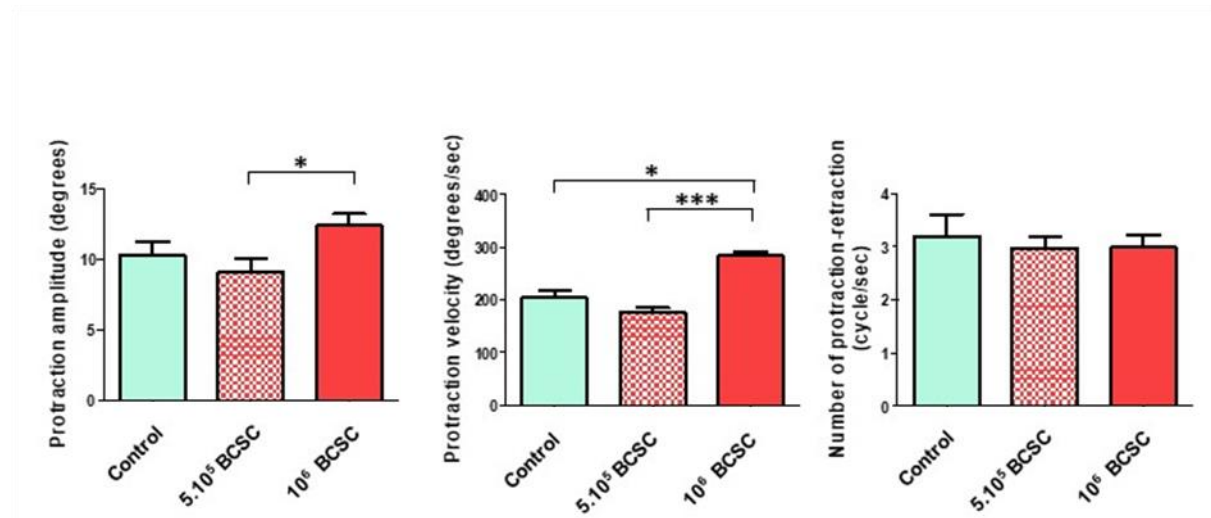


Fig. S2: Comparative motor recovery after administration of 0.5×10^6 or 10^6 BCSC. (A-C) Using video recording, protraction amplitude (A), protraction velocity (B) and mean whisking frequency (C) were compared 3 months after injury in rats where injured facial nerve was bridged with vein (control), vein infused with 0.5×10^6 cells or with 1×10^6 cells. Video recordings were analyzed with Image J Software (n=9-10). Data are presented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, ANOVA test).

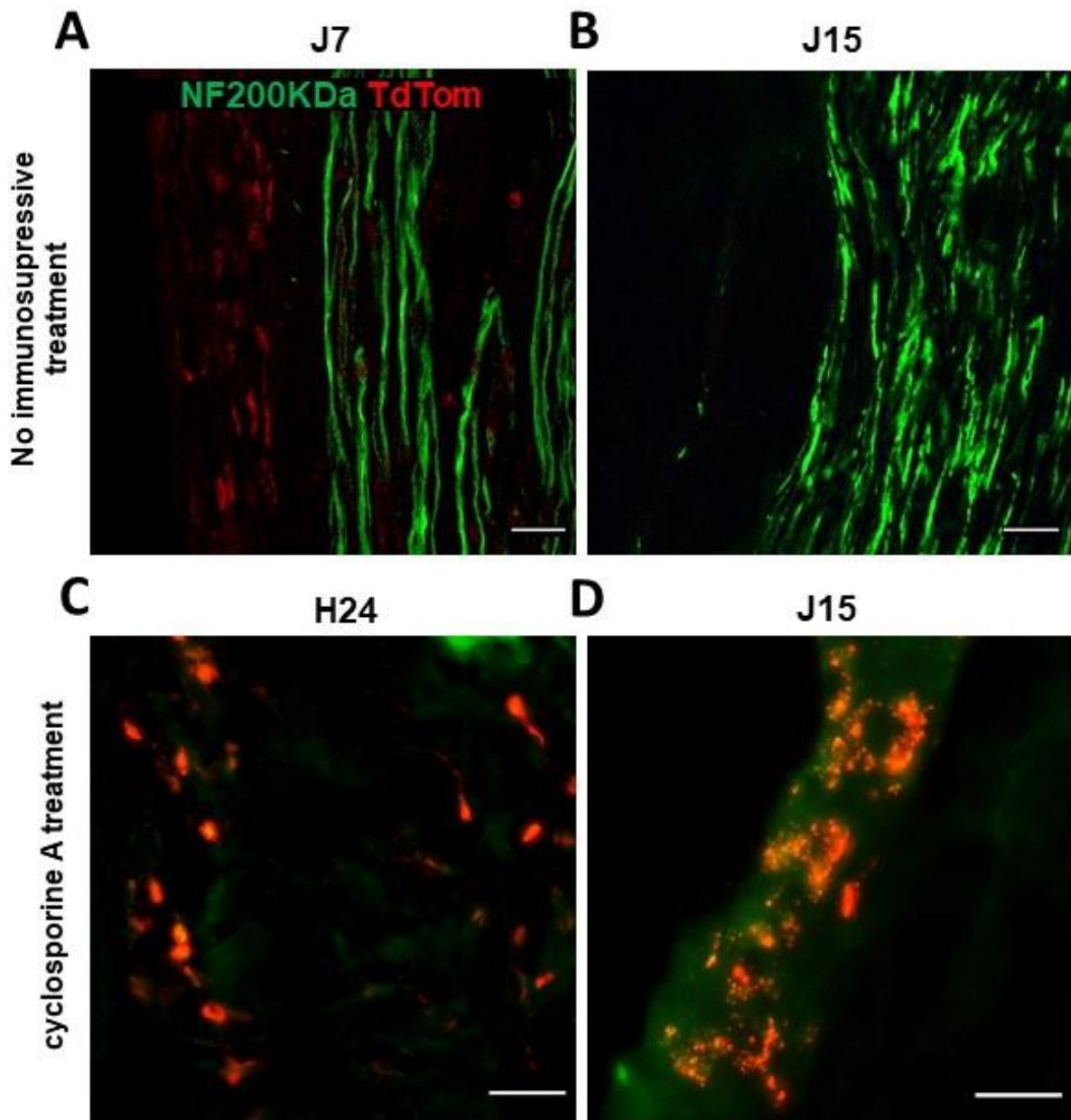


Fig. S3: Influence of an immunosuppressive therapy on survival of injected cells.

(A-D) TdTomato-positive BC-derived stem cells were cultured under floating sphere conditions and injected into the injured facial nerve of rats treated (A-B) or not (C-D) with cyclosporin A. Longitudinal sections of the facial nerve were analyzed 24 h, 7 days and 15 days after grafting, by immunohistochemistry using an antibody against the neurofilament marker NF200 (n=3). *Scale bar: 50 μm*

Discussion & perspectives

La greffe de visage est aujourd'hui confrontée à quelques limites comme la difficulté à trouver des donneurs ou encore l'utilisation prolongée de traitements immunosuppresseurs qui nécessitent le développement d'approches thérapeutiques alternatives comme la médecine régénérative. Ces nouvelles options ont pour objectif d'améliorer la reconstruction d'os vascularisés et les capacités de régénération nerveuse à travers l'utilisation de peptides à activité neurotrophique, ou de cellules souches. Le peptide PSELT a montré qu'il pouvait protéger les neurones ou les cardiomyocytes lorsque les niveaux de radicaux libres s'élevaient. Ces derniers étant aussi fortement augmentés après une lésion du nerf périphérique, l'effet protecteur du peptide PSELT a été testé dans un modèle de lésion du nerf facial chez le rat. Le PSELT a montré un avantage thérapeutique, son administration améliorant significativement (récupération deux fois supérieure par rapport aux témoins) la récupération des performances motrices, la conduction et la régénération nerveuse.

Le PSELT stimule la régénération nerveuse dans le modèle de lésion du nerf facial chez le rat

La principale information de ce travail est le bénéfice potentiel que représente l'administration de peptide PSELT en cas de LNP. En effet, comparés à des animaux non lésés, les animaux ayant reçu le PSELT ont montré une restauration de l'amplitude de protraction à hauteur de 32%, et 59% pour la vitesse angulaire, 3 mois après la lésion tandis que les autres groupes expérimentaux (suture épineurale, veine seule, cellules souches) montraient pour ces mêmes paramètres une restauration moyenne de [15-18%] et [30-42%], respectivement. En même temps qu'une restauration fonctionnelle, des améliorations sur les plans électrophysiologique et histologique ont été constatées chez ces animaux : une re-myélinisation des axones néoformés et une récupération de l'amplitude du MUAP, un raccourcissement de sa durée, ainsi qu'un aspect majoritairement triphasique. Ces effets sont en tout point similaires à ceux observés chez l'animal sain selon [Archibald et al., 1991](#). Ils sont le signe d'un plus grand nombre d'axones et de fibres musculaires mobilisés lors de l'exécution du mouvement ([Crone and Krarup, 2013](#)). En revanche, les rats témoins, ou ceux ayant reçu le traitement chirurgical par suture directe, ont montré une faible régénération nerveuse spontanée consécutive à la lésion, en accord avec les faibles performances décrites dans la littérature avec des approches similaires ([Guntinas-Lichius et al., 2002](#); [Tomov et al., 2002](#); [Guntinas-Lichius et al., 2005](#); [Angelov et al., 2007](#); [Hadlock et al., 2010](#); [Bense et al., manuscrit](#)

accepté). A titre de comparaison, les stratégies modulant les concentrations de facteurs neurotrophiques dans le site de lésion, soit en augmentant la concentration de GDNF par exemple, ou au contraire en diminuant la quantité de facteurs neurotrophiques par l'intermédiaire d'anticorps, ont montré une récupération fonctionnelle inférieure à celle observée en présence de PSELT (Guntinas-Lichius et al., 2005; Barras et al., 2009). Toutefois, ces progrès restent bien inférieurs à ceux obtenus après une stimulation mécanique quotidienne du pad vibrissal, qui semble à ce jour montrer la meilleure récupération (Angelov et al., 2007). Il est néanmoins important de noter que les résultats présentés dans ce travail avec le peptide PSELT sont préliminaires et restent à affiner.

Les mécanismes cellulaires mis en jeu par le peptide PSELT au cours de la régénération nerveuse sont peu connus à l'heure actuelle. L'hypothèse d'une action antioxydante est soutenue par plusieurs travaux réalisés dans l'équipe et en collaboration avec l'équipe de Tommaso Angelone en Italie. L'application de PSELT diminue l'élévation de radicaux libres et de l'apoptose induite par l'exposition au MPTP, que ce soit *in vitro* dans un modèle de neuroblastome SH-SY5Y, ou *in vivo* au niveau des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée chez la souris C57BL/6j (Alsharif et al., soumis). Dans un modèle d'ischémie/reperfusion cardiaque menée chez le rat, le peptide protège le tissu cardiaque du stress oxydatif et nitrosatif, et de l'apoptose. En revanche, le peptide dépourvu de Sec a peu d'effet sur la taille de la lésion et les performances cardiaques consécutives à la lésion (Rocca et al., 2018). La présence de sélénium dans le centre rédox est donc importante pour l'activité du peptide PSELT.

Avec un pouvoir nucléophile plus élevé et un pKa (pH de demi-dissociation) plus faible le sélénium est plus réactif que le soufre (Arnér, 2010). Les traitements à base de sélénium ont montré un effet positif dans le traitement d'une compression du nerf sciatique chez le rat. L'administration orale de sélénium durant les trois premiers jours qui ont suivi la compression nerveuse diminue les dommages électrophysiologiques et histologiques comparés aux animaux témoins (Kizilay et al., 2017). Si le mécanisme d'action n'a pu être déterminé, un rôle similaire à celui observé pour l'acide ascorbique a été suggéré. Celui-ci maintient les niveaux d'EROs et de NO à des degrés supportables pour les CS pour leur permettre de maintenir leur action trophique sur le nerf lésé (Huff et al., 2020). Des résultats encourageants ont également été obtenus avec des molécules pharmacologiques qui miment les effets du sélénium comme

l'ebsele, une molécule synthétique qui réagit avec le peroxy-nitrite d'une manière similaire aux GPx. Son administration intrapéritonéale à 15 mg/kg dans un modèle de nerf sciatique chez le rat a induit une réduction des dommages ischémiques mesurés par une baisse des niveaux de NO, de l'apoptose et une stimulation de l'activité de différentes enzymes antioxydantes (GPx, CAT, SOD) (Ozyigit et al., 2015).

Le sélénium est engagé dans différents processus cellulaires comme l'apoptose et la signalisation calcique, via son incorporation sous forme de Sec dans les sélénoprotéines (Uğuz and Naziroğlu, 2012). Ces protéines, qui comprennent entre autres certaines formes de Gpx, et toutes les TrxR, sont principalement connues pour leur action antioxydante médiée par certaines d'entre elles par un motif de type *thioredoxin-fold* incorporant un centre redox similaire à celui de la SELENOT. Elles se répartissent dans les différents compartiments cellulaires : Gpx dans la mitochondrie, Trx dans le cytoplasme, SELENOT dans le RE, SELENOH dans le noyau et peuvent donc limiter la production de ROS dans chacun d'entre eux. Le peptide PSELT qui est capable de diffuser dans tous les compartiments cellulaires, le noyau y compris, pourrait donc récapituler l'effet antioxydant de toutes ces enzymes d'autant plus qu'il diffuse facilement dans les tissus, puisqu'il est retrouvé dans l'ensemble du cerveau de souris après une administration intranasale (Alsharif et al., soumis). L'injection intranasale de PSELT limite dans la substance noire la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (Alsharif et al., soumis). Il pourrait agir de même au niveau du site de lésion, au niveau des organites dans lesquels les niveaux de radicaux libres sont élevés après une lésion nerveuse, en particulier dans la mitochondrie axonale (Van Hameren et al., 2019). En effet, les changements métaboliques, structuraux et électrophysiologiques observés au niveau des axones après une lésion sont à l'origine d'une production de radicaux libres (Rodella et al., 2016; Llobet Rosell and Neukomm, 2019). Pour contrebalancer cette élévation, les gènes impliqués dans la défense antioxydante sont stimulés au sein du motoneurone comme cela a été démontré pour la Trx1, la glutathion réductase (GSHr) ou même une sélénoprotéine comme la TrxR1 après une lésion du nerf hypoglosse chez le rat (Mansur et al., 1998; Hama et al., 2010). L'hypothèse selon laquelle la SELENOT serait exprimée de manière similaire dans les motoneurones après une LNP mérite d'être vérifiée (Boukhzar et al., 2016; Rocca et al., 2018).

En plus de mettre en avant le rôle indispensable du sélénium dans l'action cardioprotectrice de PSELT, Rocca et al., 2018 ont démontré que ses mécanismes d'action impliquaient l'activation des voies de signalisation PI3K-Akt et Erk-1.2 et nécessitaient l'ouverture des canaux mitoKATP (Rocca et al., 2018). Ces mêmes voies sont activées chez le rat à la suite d'un neurotmésis du nerf facial. En effet, une augmentation des formes phosphorylées d'Akt et d'Erk a été observée dans le noyau du nerf facial des animaux lésés dès le lendemain de la lésion (Hai-tao Huang et al., 2017). L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs pour chacune de ces deux voies a montré que leur activation participe dans les processus de régénération nerveuse à travers des mécanismes complémentaires. L'activation extracellulaire de la voie ERK favorise l'élongation des axones naissants (Haitao Huang et al., 2017; Hausott and Klimaschewski, 2019). La voie Akt, quant à elle, en plus de favoriser l'élongation axonale, est également impliquée dans la survie neuronale et améliore la myélinisation des axones par les cellules de Schwann (Domènech-Estévez et al., 2016; Haitao Huang et al., 2017). L'observation d'un plus grand nombre d'axones et d'une myélinisation plus importante des axones néoformés chez les rats traités avec le PSELT suggère que ce peptide pourrait agir sur la régénération nerveuse par les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans son activité cardioprotectrice.

La xénotransplantation de cellules dérivées des CF favorise la régénération nerveuse

Comparer le bénéfice thérapeutique qu'apporterait les cellules dérivées des CF par rapport à d'autres types de cellules reste à ce jour limité compte tenu des disparités entre les différentes études concernant le modèle animal (souris, rat, lapin singe), du type de lésion (compression, transection) ainsi que le nerf lésé (facial, sciatique, péroné) et de la présence ou non d'analyses fonctionnelles. Parmi celles dans lesquelles la comparaison est possible, la restauration fonctionnelle décrite après administration de cellules gliales olfactives ou de CSM semble toutefois supérieure à celle obtenue avec les cellules souches dérivées des CF dans notre étude (Guntinas-Lichius et al., 2002; Watanabe et al., 2014). Néanmoins, du fait que notre étude soit un modèle de xénogreffe, obtenir un effet thérapeutique supérieur à une suture épineurale comme observé ici représente un résultat très encourageant qui tend à confirmer le potentiel de ces cellules.

A l'image du peptide PSELT, ces résultats soulèvent de nombreuses questions quant aux mécanismes mis en jeu. Une transplantation autologue de ces cellules dérivées des CF après une neurapraxie du nerf sciatique chez la souris a montré que ces cellules sont capables de survivre au moins 6 semaines suivant la lésion (Gresset et al., 2015). Dans notre cas, avec un modèle de lésion plus sévère et une xénogreffe, il n'est pas surprenant d'observer qu'aucune des cellules transplantées n'ait survécu au-delà de 10 jours après leur transplantation sans traitement immunosuppresseur. Alors qu'une administration quotidienne de cyclosporine A permet à des cellules souches embryonnaires d'origine murine de survivre au-delà de 30 jours dans un nerf sciatique de rat, dans notre étude, l'application d'un protocole immunosuppresseur identique ne prolonge la survie des cellules souches dérivées des CF que de 7 jours supplémentaires (Cui et al., 2008). Une faible survie des cellules injectées est un phénomène régulièrement reporté dans les stratégies de xénogreffes. Selon les types de cellules souches et les temps d'évaluation, la survie des cellules transplantées peut osciller entre 0.5 % et 12.6 % malgré l'application d'un traitement immunosuppresseur (Walter Heine et al., 2004; McKenzie et al., 2006; Shimizu et al., 2007). Néanmoins, un effet bénéfique sur la régénération nerveuse ou la myélinisation a été reporté dans chacune indiquant qu'une faible survie des cellules souches après leur administration ne représente cependant pas un frein dans l'efficacité d'une thérapie cellulaire. Cette perte importante du produit cellulaire n'est pas restreinte aux xénotransplantations. Dans une autre étude, la transplantation autologue de MSCs provenant de liquide amniotique de rat au niveau d'un nerf sciatique comprimé avait montré 4 semaines après la lésion une amélioration en termes de récupération des capacités motrices et de conduction nerveuse. Cependant, les analyses histologiques avaient révélé qu'aucune cellule transplantée n'avait survécu (Pan et al., 2007). Dans notre étude, si la réaction immunitaire est sûrement responsable de l'élimination rapide des cellules, un avantage thérapeutique a néanmoins été observé lorsqu'un million de cellules a été injecté. Ces résultats concordent avec ceux de Choi et Raisman qui ont rapporté qu'une xénotransplantation sans traitement immunosuppresseur est capable d'améliorer la régénération nerveuse pour les lésions inférieures à 7 mm (Choi and Raisman, 2003). Le rejet immunitaire dans le cadre de xénogreffe implique le recrutement de cellules immunitaires appartenant au système immunitaire inné (macrophages) et adaptatif (lymphocytes T) (Fox et al., 2001; Cadili and Kneteman, 2008). Les macrophages occupent même un rôle central dans

le rejet de xélogreffe comme cela a été mis en évidence dans un modèle de xélogreffe de cellules souches hématopoïétiques porcines chez la souris (Abe et al., 2002). Or, ces deux types cellulaires sont impliqués dans l'élimination des débris lors de la dégénérescence Wallérienne. Les macrophages ont notamment un rôle essentiel dans la régénération nerveuse en éliminant les débris puis en favorisant l'angiogenèse ainsi que la migration et la prolifération des CS en libérant des cytokines comme l'IL-10 ou TGF- β (Armstrong et al., 2003; David and Kroner, 2011; Chen et al., 2015). On peut supposer que dans notre étude, la xénotransplantation de cellules souches a pu augmenter le nombre de macrophages recrutés dans le site de lésion, améliorant la dégénérescence Wallérienne. Une évaluation des niveaux d'expression d'IL-10 ou de TGF- β au moment de la mort des cellules souches injectées pourrait être une piste à explorer.

Autre hypothèse, Gresset et al., ont montré que des cellules souches dérivées des CF injectées au niveau d'un nerf sciatique comprimé génèrent principalement des fibroblastes (Gresset et al., 2015). Il peut être envisagé que dans notre modèle, nos cellules injectées se comportent de manière similaire. Or, il a été montré que les fibroblastes commencent à produire et sécréter de l'IL-10, une cytokine inflammatoire, dans les 5 heures qui suivent la lésion (Fregnan et al., 2012). Cette sécrétion est par la suite relayée par les macrophages recrutés (Rotshenker, 2011). Cette cytokine est impliquée dans la régénération nerveuse, son administration à faible dose diminue la cicatrice lésionnelle, améliore l'élongation des axones ainsi que leur myélinisation (Atkins et al., 2007). Cet IL-10 est également impliquée dans la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (Potas et al., 2015). Enfin, il a été montré qu'orienter la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 dans le site de lésion améliore la régénération nerveuse chez le rat (Popiolek-Barczyk et al., 2015).

Il peut également être envisagé que le devenir des cellules diffère dans notre étude comparée aux résultats de Gresset. En effet, l'environnement influe sur le devenir des cellules souches dérivées des CF qui peuvent générer d'autres types cellulaires que les fibroblastes comme des neurones sensitifs ou des CS immatures (Gresset et al., 2015). L'hypothèse que les cellules aient conservées un phénotype indifférencié n'est pas à exclure non plus comme cela a été observé pour des NSCs (Walter Heine et al., 2004). Malgré la conservation de leur phénotype immature, les NSCs améliorent la régénération du nerf tibial à l'échelle histologique et électrophysiologique. Parmi les hypothèses émises pour expliquer leur effet,

la première mentionnait la capacité des NSCs à produire et sécréter des facteurs trophiques comme le NGF, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ou le BDNF afin d'augmenter le recrutement de CS endogènes au site de lésion. Cette propriété n'est pas spécifique des NSCs puisqu'elle a été aussi décrite pour les ADSCs (Zhao et al., 2009; Sowa et al., 2012; Watanabe et al., 2014; Sowa et al., 2016). La possibilité que les cellules souches dérivées des CF aient, elles aussi, cette capacité à recruter des CS au niveau du site de lésion via la production de facteurs trophiques, n'est donc pas à exclure. Une étude *in vitro* du sécrétome de ces cellules souches ou une évaluation histologique de l'expression de différents facteurs neurotrophiques dans le site de lésion après l'injection des cellules souches pourrait être une piste d'exploration afin de répondre à cette question.

N'ayant pas pu extraire les cellules souches à partir du modèle murin Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom} qui permet de marquer spécifiquement les cellules souches dérivées des CF, nous avons déterminé la proportion de ces cellules en culture par l'intermédiaire du marqueur nestine. Toutefois, les cellules souches dérivées des CF ne sont pas les seules cellules souches présentes dans la peau puisqu'on en retrouve au niveau des follicules pileux, au niveau de l'épiderme et dans le derme. Certaines, à l'image des SKPs, partagent même des caractéristiques communes avec les cellules souches dérivées des CF comme un potentiel neurogénique et gliogénique, l'expression de différents marqueurs comme la nestine ou le P75NGFR ou encore une capacité à proliférer sous forme de neurosphères (Xie et al., 2008; Dai et al., 2018). Cependant, le manque de marqueurs spécifiques pour ces différentes populations de cellules souches ont restreint leur caractérisation (Gresset et al., 2015). Dans notre étude, pour augmenter la proportion de cellules souches dérivées des CF au profit d'autres types de cellules souches, l'expansion des cellules en culture a été faite pendant 8 semaines. Cette période d'incubation permettait, selon les résultats de prolifération *in vitro* obtenus par Gresset, une prolifération suffisante des cellules souches dérivées des CF pour représenter environ 90% du nombre total de cellules en culture (Gresset et al., 2015). Les caractérisations obtenues par la cytométrie en flux ont montré qu'entre 95 à 98 % des cellules injectées chez le rat étaient positives au marqueur nestine. S'il est probable que parmi les cellules nestine-positives injectées certaines ne soient pas des cellules souches dérivées des CF, évaluer leur impact dans notre étude reste à ce jour difficile.

Enfin, identifier les mécanismes par lesquels le PSELT renforce la thérapie cellulaire comme nous l'observons dans notre étude est aujourd'hui compliqué compte tenu du manque d'informations relatives aux mécanismes d'action à la fois du peptide et des cellules souches dérivées des CF. Toutefois, cette amélioration n'est pas surprenante puisqu'il est largement démontré que moduler l'environnement rédox peut améliorer l'efficacité d'une thérapie cellulaire. Même si à notre connaissance aucune étude n'a, à ce jour, démontré les bienfaits de ce genre de stratégie pour traiter les LNP, cela a pu être mis en évidence dans d'autres types de lésions dans lesquels les radicaux libres participent dans les mécanismes physiopathologiques. Le renforcement des capacités antioxydantes des NSCs par la surexpression de SOD1 augmente la survie de ces cellules dans le site lésionnel, améliore leur capacité à libérer des facteurs paracrines et au final favorise la récupération fonctionnelle dans des modèle d'ischémie et d'hémorragie cérébrale chez la souris ([Sakata et al., 2012](#); [Wakai et al., 2014](#)). D'autre part, des cellules pancréatiques génétiquement modifiées pour surexprimer la Trx1 montrent lorsqu'elles sont greffées chez des souris diabétiques, une meilleure résistance à l'inflammation dû à un effet anti-apoptotique de la Trx1. *In fine*, les souris receveuses présentent une meilleure tolérance au glucose en comparaison des animaux témoins ([Chou and Sytwu, 2009](#); [Asami et al., 2013](#)). L'effet anti-apoptotique de la Trx1 avait auparavant été démontré dans un modèle d'ischémie cérébrale ([Hattori et al., 2004](#)). Le PSELT possédant une action *Trx-like*, nous pouvons supposer une action anti-apoptotique similaire. Une étude comparative de la survie des cellules souches dérivées des CF en présence ou non du PSELT permettra de clarifier ce point.

Dans ce travail de thèse, les évaluations histologiques n'ont pu être menées que 3 mois après l'administration des cellules. Une évaluation histologique à court terme permettrait d'évaluer les niveaux d'inflammation, le recrutement des macrophages et le devenir des cellules injectées, et ainsi éclairer sur les mécanismes mis en jeu.

Perspectives d'étude

Que ce soit pour le peptide PSELT ou la thérapie cellulaire, les résultats présentés ici sont extrêmement prometteurs, d'autant plus que les conditions d'expérimentation n'ont pu être optimisées, faute de temps.

Premièrement, la posologie ou la concentration de PSELT et la quantité de cellules administrée. Concernant le PSELT, la dose de 1 μM a été déterminée à partir des résultats obtenus précédemment *in vitro* et chez l'animal (Alsharif et al., soumis ; Rocca et al., 2018). En vue d'une éventuelle perspective clinique, une étude pharmacologique comparant différentes concentrations sera nécessaire. Pour les cellules souches dérivées des CF, nous observons dans notre étude un avantage thérapeutique lorsqu'environ 10^6 cellules sont transplantées alors qu'aucun bénéfice n'est noté avec 0.5×10^6 cellules. Il est intéressant de noter que peu d'études détaillent les éléments qui ont permis d'établir le nombre de cellules à administrer dans le site de lésion. Ce nombre peut énormément varier selon les études, allant de 2×10^4 cellules souches dérivées des CF injectées dans au niveau du nerf sciatique chez la souris à 20×10^7 MSCs au niveau d'un nerf ulnaire chez des singe rhésus (Hu et al., 2007; Gresset et al., 2015). Or, comme l'ont montré les travaux de Mosahebi du *College Medical School* de Londres sur le rat, le nombre de cellules administrées impacte les résultats thérapeutiques. Il ne constate aucun bénéfice thérapeutique sur la régénération axonale trois semaines après l'injection de 20×10^6 CS/ml. En revanche, il met en évidence un effet dose qui suit une courbe en cloche, avec une amélioration de plus en plus importante de la régénération nerveuse après injection de 40×10^6 et 80×10^6 CS/ml, qui diminue après avoir injecté 160×10^6 CS/ml (Mosahebi et al., 2001). Augmenter la quantité de PSELT ou de cellules souches dérivées des CF pourrait être un premier axe d'optimisation.

Le deuxième paramètre est celui de la voie d'administration. A l'image de toute substance pharmacologique, le PSELT est confronté à plusieurs facteurs qui peuvent limiter son efficacité, comme une courte demi-vie ou encore une forte capacité à diffuser hors du site d'intérêt. L'administration répétée permet de limiter ces effets. Plusieurs alternatives qui ont montré leur avantage dans le traitement des LNP ont été développées de nos jours. C'est le cas des pompes osmotiques implantables utilisées par exemple pour administrer continuellement pendant 42 jours de la nifédipine dans un modèle de nerf sciatique (Yan et al., 2013). Une autre alternative est d'incorporer un facteur neurotrophique dans un conduit d'origine naturel ou synthétique par des méthodes de bioingénierie. L'avantage de ces structures est qu'elles permettent d'incorporer également les cellules souches. L'application d'un conduit nerveux encapsulant du NGF et dans lequel des MSCs sont cultivées montrent que l'association des traitements potentialise la régénération du nerf sciatique chez le rat

(Zhou et al., 2020). Enfin, combiner l'action du peptide PSELT avec différents facteurs de croissance peut également représenter une piste thérapeutique prometteuse dans le futur pour traiter les LNP.

Le troisième levier correspond à la fenêtre thérapeutique idéale. De nombreuses études ont comparé l'efficacité d'une thérapie précoce à une thérapie retardée pour traiter les lésions du nerf facial. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus et le sujet reste encore débattu aujourd'hui. Les premières études menées par May en 1985, ou par Felix cinq ans plus tard, plaident pour une prise en charge précoce des lésions du nerf facial (May, 1985; Felix et al., 1991). Cependant, ces recommandations ont été remises en question quelques années plus tard avec les travaux de Guntinas-Lichius et al., menées chez le rat (Guntinas-Lichius et al., 1997; Guntinas-Lichius et al., 2000). Par rapport à une prise en charge immédiate ou retardée de plusieurs semaines, un léger retard de 7 jours permet de réduire les phénomènes de polyinnervation responsables des syncinésies et donc d'améliorer la récupération fonctionnelle des muscles. A l'opposé, deux études menées chez le rat et le cochon-nain n'ont reporté aucune différence entre une prise en charge immédiate et un traitement retardé de 90 jours (Barrs, 1991; Jergović et al., 2001). Une étude rétrospective menée sur 311 patients traités pour des LNP n'a, elle aussi, reporté aucune fenêtre thérapeutique idéale, la récupération dépendant plutôt de la gravité de la lésion (E Wang et al., 2017). L'optimisation de la fenêtre thérapeutique semble néanmoins une étape fondamentale dans la réussite d'une thérapie cellulaire. Une étude menée chez le rat a montré que des SKPs administrées 11 semaines après un neurotmésis du nerf tibial améliorent la récupération des fonctions locomotrices deux fois moins efficacement qu'une administration de ces mêmes cellules immédiatement après la lésion (Khuong et al., 2014). Il serait intéressant d'évaluer l'impact que pourrait avoir un délai de 7 jours sur l'effet thérapeutique du PSELT ou des cellules dérivées des CF, au lieu d'une injection immédiate comme cela a été réalisé dans cette étude.

Enfin, il pourrait être intéressant de réaliser une prédifférenciation des cellules souches dérivées des CF avant leur injection. Les études menées jusqu'à maintenant montrent qu'une prédifférenciation des cellules souches en CS ou en motoneurones améliore la régénération nerveuse à la suite d'une LNP (Wang et al., 2016). Néanmoins, l'intérêt d'une prédifférenciation est encore discuté. L'injection de MSCs prédifférenciées en CS ont montré

chez le lapin une régénération nerveuse accélérée et une myélinisation plus importante après une lésion du nerf facial comparée à des lapins ayant reçu des MSCs non différenciées (X Wang et al., 2011). A l'inverse, certaines études comparatives ont observé que la prédifférenciation n'avait pas d'effet bénéfique, voire pouvait être néfaste, en diminuant la survie cellulaire (Keilhoff et al., 2006; Swijnenburg et al., 2008; Orbay et al., 2012; Watanabe et al., 2014; Abeysinghe et al., 2015; Abd Emami et al., 2018). Parmi les hypothèses évoquées pour expliquer cette mortalité accrue, une activation immunitaire causée par une augmentation de l'expression d'antigènes reconnus par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a été proposée (Swijnenburg et al., 2008).

En définitive, si les résultats obtenus dans cette étude sont très encourageants dans le cadre de la régénération nerveuse périphérique, leur potentiel bénéfique dans le cadre de la reconstruction de la face nécessite plus d'investigations. Comparé à d'autres nerfs périphériques, le nerf facial se distingue par le nombre important de ramifications qui émergent de son tronc principal et qui constituent un facteur risque pour l'apparition de dyscinésies et de syncinésies (Guntinas-Lichius et al., 2007). Ces syncinésies sont aujourd'hui un problème majeur pour les patients souffrant de lésions nerveuses au niveau de la face puisqu'elles peuvent concerner selon les études entre 9 et 55% des paralysies faciales (Çelik et al., 2000). Par rapport à d'autres membres du corps, la face possède une composante sociale très importante. Cette singularité impacte le ressenti des patients quant à la survenue de ces lésions secondaires qui peuvent pour certaines être douloureuses (Pepper and Kim, 2012). En plus d'une difficulté plus ou moins importante dans l'exécution de certaines fonctions comme la parole ou le clignement d'œil, ces lésions peuvent être associées à une dépression et un isolement sociale (Owusu et al., 2018). La méthode de référence pour évaluer les syncinésies est l'administration de rétrotraceurs fluorescents au sein des nerfs (Guntinas-Lichius et al., 2005). Initialement nous souhaitions évaluer ce paramètre mais nous avons rencontré des difficultés expérimentales : une variabilité du marquage obtenu avec les différents rétrotraceurs utilisés, une mortalité importante des animaux utilisés pour la mise au point du protocole expérimental (environ 20%) et enfin le nombre limité d'animaux qui nous empêchait de pouvoir analyser le processus de myélinisation et les syncinésies en parallèle. Néanmoins, compte tenu des améliorations observées dans la récupération des performances motrices, il conviendra de lever ces verrous expérimentaux afin d'étudier les

zones de projection du nerf régénéré et de rechercher d'éventuelles syncinésies par la méthode de retraçage. Cette étape est essentielle pour évaluer l'intérêt du peptide PSELT dans le cadre de la reconstruction de la face en particulier.

Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse met en évidence un nouvel effet bénéfique du peptide PSELT dans le cadre de la régénération des nerfs périphériques après une lésion. Nos résultats montrent que l'administration précoce du peptide au sein d'une chambre de régénération améliore la repousse nerveuse, ainsi que la myélinisation des nouveaux axones formés. Cette régénération nerveuse s'accompagne d'une meilleure réinnervation des muscles cibles et une restauration des fonctions motrices plus importantes comparées à un traitement chirurgical comme la suture épineurale. De plus, cette étude met en lumière le potentiel thérapeutique d'un nouveau type de cellules souches localisé au niveau du derme. A l'image d'autres types de cellules souches, celles dérivées des CF ont montré qu'elles pouvaient, elles aussi, apporter une aide à la régénération nerveuse dans notre modèle de xénogreffe. Malgré une survie limitée dans le site lésionnel, les analyses fonctionnelles ont mis en évidence que ces cellules pouvaient contribuer à la récupération des fonctions motrices avec un recouvrement supérieur à celui apporté par un traitement chirurgical. Même si les résultats obtenus restent moins efficaces que ceux observés avec le peptide PSELT, les nombreux axes de développement comme le nombre de cellules injectées ou encore une prédifférenciation en CS, devraient permettre d'optimiser leur bénéfice. Compte tenu de leur grande accessibilité comparée à d'autres types de cellules souches, nos résultats renforcent le potentiel thérapeutique de ces cellules en vue d'une application clinique dans le cadre de la médecine régénérative. Si le peptide PSELT permet d'accroître l'effet thérapeutique des cellules dérivées des CF, l'association de ces deux thérapies ne montre, pour le moment, aucun avantage comparée à un traitement basé sur l'administration du peptide seul. Cette thèse ouvre ainsi la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques dans le cadre de la récupération des fonctions motrices pour les patients atteints de lésions nerveuses périphériques.

Références

- Abd Emami B, Mahmoudi E, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Farzad Mohajeri S, Haghighipour N, Marjanmehr SH, Molazem M, Amin S, Gholami H. 2018. Mechanical and Chemical Predifferentiation of Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes and Their Effectiveness on Acute Myocardial Infarction. *Artif Organs* **42**(6): E114–E126. doi: 10.1111/aor.13091
- Abe M, Cheng J, Qi J, Glaser RM, Thall AD, Sykes M, Yang Y-G. 2002. Elimination of porcine hemopoietic cells by macrophages in mice. *J Immunol Baltim Md 1950* **168**(2): 621–628. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.621
- Abeyasinghe HCS, Bokhari L, Quigley A, Choolani M, Chan J, Dusting GJ, Crook JM, Kobayashi NR, Roulston CL. 2015. Pre-differentiation of human neural stem cells into GABAergic neurons prior to transplant results in greater repopulation of the damaged brain and accelerates functional recovery after transient ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther* **6**: 186. doi: 10.1186/s13287-015-0175-1
- Abid H, Cartier D, Hamieh A, François-Bellan A-M, Bucharles C, Pothion H, Manecka D-L, Leprince J, Adriouch S, Boyer O, et al. 2019. AMPK Activation of PGC-1 α /NRF-1-Dependent SELENOT Gene Transcription Promotes PACAP-Induced Neuroendocrine Cell Differentiation Through Tolerance to Oxidative Stress. *Mol Neurobiol* **56**(6): 4086–4101. doi: 10.1007/s12035-018-1352-x
- Abruzzo PM, di Tullio S, Marchionni C, Belia S, Fanó G, Zampieri S, Carraro U, Kern H, Sgarbi G, Lenaz G, et al. 2010. Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic Res* **44**(5): 563–576. doi: 10.3109/10715761003692487
- Aggarwal T, Hoeber J, Ivert P, Vasylovska S, Kozlova EN. 2017. Boundary Cap Neural Crest Stem Cells Promote Survival of Mutant SOD1 Motor Neurons. *Neurotherapeutics* **14**(3): 773–783. doi: 10.1007/s13311-016-0505-8
- Allodi I, Udina E, Navarro X. 2012. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* **98**(1): 16–37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005
- Altman J, Bayer SA. 1984. The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **85**: 1–164. doi: 10.1007/978-3-642-69537-7
- Alvites R, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho MV, Ronchi G, Geuna S, Varejão ASP, Maurício AC. 2018. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. Spurkland A, editor. *Cogent Med* **5**(1): 1466404. Cogent OA. doi: 10.1080/2331205X.2018.1466404
- Al-Zer H, Kalbouneh H. 2015. Dental pulp stem cells-derived schwann cells for peripheral nerve injury regeneration. *Neural Regen Res* **10**(12): 1945–1946. doi: 10.4103/1673-5374.172309
- Amato A, Terzo S, Mulè F. 2019. Natural Compounds as Beneficial Antioxidant Agents in Neurodegenerative Disorders: A Focus on Alzheimer's Disease. *Antioxidants* **8**(12). doi: 10.3390/antiox8120608
- Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. 2016. Peripheral-Nerve and Spinal-Cord Regeneration in Mice Using Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1453**: 21–32. doi: 10.1007/978-1-4939-3786-8_4

- Angelov DN, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova SI, Skouras E, Maegele M, Irintchev A, Neiss WF, et al. 2007. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis* **26**(1): 229–242. doi: 10.1016/j.nbd.2006.12.016
- Anouar Y, Lihrmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. 2018. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* **127**: 145–152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076
- Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Ernfors P. 2006. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Exp Neurol* **198**(2): 438–449. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.12.015
- Archibald SJ, Krarup C, Shefner J, Li ST, Madison RD. 1991. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J Comp Neurol* **306**(4): 685–696. doi: 10.1002/cne.903060410
- Ariyasu RG, Nichol JA, Ellisman MH. 1985. Localization of sodium/potassium adenosine triphosphatase in multiple cell types of the murine nervous system with antibodies raised against the enzyme from kidney. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **5**(10): 2581–2596.
- Armstrong BD, Hu Z, Abad C, Yamamoto M, Rodriguez WI, Cheng J, Tam J, Gomariz RP, Patterson PH, Waschek JA. 2003. Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *J Neurosci Res* **74**(2): 240–247. doi: 10.1002/jnr.10750
- Arnér ES, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**(20): 6102–6109. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x
- Arnér ESJ. 2010. Selenoproteins—What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* **316**(8): 1296–1303. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.032
- Asami K, Inagaki A, Imura T, Sekiguchi S, Fujimori K, Masutani H, Yodoi J, Satomi S, Ohuchi N, Goto M. 2013. Thioredoxin-1 Attenuates Early Graft Loss after Intraportal Islet Transplantation in Mice. *PLOS ONE* **8**(8): e70259. Public Library of Science. doi: 10.1371/journal.pone.0070259
- Atik B, Erkutlu I, Tercan M, Buyukhatipoglu H, Bekerecioglu M, Pence S. 2011. The Effects of Exogenous Melatonin on Peripheral Nerve Regeneration and Collagen Formation in Rats. *J Surg Res* **166**(2): 330–336. doi: 10.1016/j.jss.2009.06.002
- Atkins S, Loescher AR, Boissonade FM, Smith KG, Ocleston N, O’Kane S, Ferguson MWJ, Robinson PP. 2007. Interleukin-10 reduces scarring and enhances regeneration at a site of sciatic nerve repair. *J Peripher Nerv Syst JPNS* **12**(4): 269–276. doi: 10.1111/j.1529-8027.2007.00148.x
- Axley MJ, Bock A, Stadtman TC. 1991. Catalytic properties of an Escherichia coli formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc Natl Acad Sci* **88**(19): 8450–8454. doi: 10.1073/pnas.88.19.8450
- Bähr M, Przyrembel C. 1995. Myelin from peripheral and central nervous system is a nonpermissive substrate for retinal ganglion cell axons. *Exp Neurol* **134**(1): 87–93. doi: 10.1006/exnr.1995.1039

- Baker RS, Stava MW, Nelson KR, May PJ, Huffman MD, Porter JD. 1994. Aberrant reinnervation of facial musculature in a subhuman primate: a correlative analysis of eyelid kinematics, muscle synkinesis, and motoneuron localization. *Neurology* **44**(11): 2165–2173. doi: 10.1212/wnl.44.11.2165
- Barakat-Walter I, Kraftsik R. 2018. Stimulating effect of thyroid hormones in peripheral nerve regeneration: research history and future direction toward clinical therapy. *Neural Regen Res* **13**(4): 599–608. doi: 10.4103/1673-5374.230274
- Barbizan R, Castro MV, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira ALR. 2014. Influence of Delivery Method on Neuroprotection by Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy following Ventral Root Reimplantation with Fibrin Sealant. *PLoS ONE* **9**(8). doi: 10.1371/journal.pone.0105712
- Barras FM, Kuntzer T, Zurn AD, Pasche P. 2009. Local delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves facial nerve regeneration after late repair. *The Laryngoscope* **119**(5): 846–855. doi: 10.1002/lary.20169
- Barrs DM. 1991. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *The Laryngoscope* **101**(8): 835–848. doi: 10.1288/00005537-199108000-00007
- Basch ML, Bronner-Fraser M, García-Castro MI. 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* **441**(7090): 218–222. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nature04684
- Battin EE, Brumaghim JL. 2009. Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. *Cell Biochem Biophys* **55**(1): 1–23. doi: 10.1007/s12013-009-9054-7
- Be'eri H, Reichert F, Saada A, Rotshenker S. 1998. The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *Eur J Neurosci* **10**(8): 2707–2713.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. 2005. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci* **6**: 6. doi: 10.1186/1471-2202-6-6
- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. 2004. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res* **26**(2): 151–160. doi: 10.1179/016164104225013798
- Bertolotto F, Massone A. 2012. Combination of Alpha Lipoic Acid and Superoxide Dismutase Leads to Physiological and Symptomatic Improvements in Diabetic Neuropathy. *Drugs RD* **12**(1): 29–34. doi: 10.2165/11599200-000000000-00000
- Bhangra KS, Busuttill F, Phillips JB, Rahim AA. 2016. Using Stem Cells to Grow Artificial Tissue for Peripheral Nerve Repair. *Stem Cells Int* **2016**: 7502178. doi: 10.1155/2016/7502178
- Bhattacharya A, Muller FL, Liu Y, Sabia M, Liang H, Song W, Jang YC, Ran Q, Van Remmen H. 2009. Denervation Induces Cytosolic Phospholipase A2-mediated Fatty Acid Hydroperoxide Generation by Muscle Mitochondria. *J Biol Chem* **284**(1): 46–55. doi: 10.1074/jbc.M806311200

- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* **23**(1): 38–89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455
- Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD. 2006. Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc* **1**(6): 2803–2812. doi: 10.1038/nprot.2006.422
- Bijlsma WA, Jennekens FGI, Schotman P, Gispen W-H. 1983. Stimulation by ACTH4–10 of nerve fiber regeneration following sciatic nerve crush. *Muscle Nerve* **6**(2): 104–112. doi: 10.1002/mus.880060205
- Bingham JR, Kniery KR, Jorstad NL, Horkayne-Szakaly I, Hoffer ZS, Salgar SK. 2019. “Stem cell therapy to promote limb function recovery in peripheral nerve damage in a rat model” – Experimental research. *Ann Med Surg* **41**: 20–28. doi: 10.1016/j.amsu.2019.03.009
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: *World Allergy Organ J* **5**(1): 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Bischoff C, Stålberg E, Falck B, Eeg-Olofsson KE. 1994. Reference values of motor unit action potentials obtained with multi-MUAP analysis. *Muscle Nerve* **17**(8): 842–851. doi: 10.1002/mus.880170803
- Boiko T, Winckler B. 2006. Myelin under construction -- teamwork required. *J Cell Biol* **172**(6): 799–801. doi: 10.1083/jcb.200602101
- Boivin A, Pineau I, Barrette B, Filali M, Vallières N, Rivest S, Lacroix S. 2007. Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**(46): 12565–12576. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3027-07.2007
- Boukharz L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet J-J, Errami M, et al. 2016. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson’s Disease. *Antioxid Redox Signal* **24**(11): 557–574. doi: 10.1089/ars.2015.6478
- Boyd JG, Gordon T. 2002. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* **15**(4): 613–626. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01891.x
- Boyd JG, Gordon T. 2003. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* **27**(3): 277–323. doi: 10.1385/MN:27:3:277
- Bradke F, Fawcett J, Spira M. 2012. Assembly of a new growth cone after axotomy: The precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **13**: 183–93. doi: 10.1038/nrn3176
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **1830**(5): 3289–3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Bron R, Vermeren M, Kokot N, Andrews W, Little GE, Mitchell KJ, Cohen J. 2007. Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *Neural Develop* **2**: 21. doi: 10.1186/1749-8104-2-21

- Bronner ME, LeDouarin NM. 2012. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Dev Biol* **366**(1): 2–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.042
- Bronner ME, Simões-Costa M. 2016. The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier. p. 115–134. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.12.003
- Brull R, Hadzic A, Reina MA, Barrington MJ. 2015. Pathophysiology and Etiology of Nerve Injury Following Peripheral Nerve Blockade. *Reg Anesth Pain Med* **40**(5): 479–490. doi: 10.1097/AAP.000000000000125
- Bunge MB, Bunge RP, Ris H. 1961. ULTRASTRUCTURAL STUDY OF REMYELINATION IN AN EXPERIMENTAL LESION IN ADULT CAT SPINAL CORD. *J Biophys Biochem Cytol* **10**(1): 67–94. doi: 10.1083/jcb.10.1.67
- Bunge MB, Williams AK, Wood PM. 1982. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol* **92**(2): 449–460. doi: 10.1016/0012-1606(82)90190-7
- Burnett MG, Zager EL. 2004. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* **16**(5): E1.
- Burton GJ, Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**(3): 287–299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- Cadili A, Kneteman N. 2008. The Role of Macrophages in Xenograft Rejection. *Transplant Proc* **40**(10): 3289–3293. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.08.125
- Cafferty WBJ, Duffy P, Huebner E, Strittmatter SM. 2010. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **30**(20): 6825–6837. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6239-09.2010
- Caillaud M, Chantemargue B, Richard L, Vignaud L, Favreau F, Faye P-A, Vignoles P, Sturtz F, Trouillas P, Vallat J-M, et al. 2018. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology* **139**: 98–116. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.001
- Câmara CC, Araújo CV, de Sousa KKO, Brito GAC, Vale ML, Raposo R da S, Mendonça FE, Mietto BS, Martinez AMB, Oriá RB. 2015. Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats. *Neurosci Lett* **607**: 52–58. doi: 10.1016/j.neulet.2015.09.021
- Campbell WW. 2008. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* **119**(9): 1951–1965. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.018
- Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J. 2003. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* **5**(7): 640–646. doi: 10.1038/ncb1008
- Carlstedt T. 2007. *Central Nerve Plexus Injury*. World Scientific.
- Carlstedt T. 2009. Nerve root replantation. *Neurosurg Clin N Am* **20**(1): 39–50, vi. doi: 10.1016/j.nec.2008.07.020

- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet J-J, Anouar Y, Falluel-Morel A. 2016a. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* **53**(9): 5818–5832. doi: 10.1007/s12035-015-9505-7
- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet J-J, Anouar Y, Falluel-Morel A. 2016b. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* **53**(9): 5818–5832. doi: 10.1007/s12035-015-9505-7
- Catrina S, Gander B, Madduri S. 2013. Nerve conduit scaffolds for discrete delivery of two neurotrophic factors. *Eur J Pharm Biopharm* **85**(1): 139–142. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.03.030
- Çelik M, Forta H, Vural Ç. 2000. The Development of Synkinesis after Facial Nerve Paralysis. *Eur Neurol* **43**(3): 147–151. doi: 10.1159/000008154
- Chabas J-F, Stephan D, Marqueste T, Garcia S, Lavaut M-N, Nguyen C, Legre R, Khrestchatisky M, Decherchi P, Feron F. 2013. Cholecalciferol (vitamin D₃) improves myelination and recovery after nerve injury. *PLoS One* **8**(5): e65034. doi: 10.1371/journal.pone.0065034
- Chang H-M, Huang Y-L, Lan C-T, Wu U-I, Hu M-E, Youn S-C. 2008. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J Pineal Res* **44**(2): 172–180. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00505.x
- Chen C-J, Ou Y-C, Liao S-L, Chen W-Y, Chen S-Y, Wu C-W, Wang C-C, Wang W-Y, Huang Y-S, Hsu S-H. 2007. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* **204**(1): 443–453. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.12.004
- Chen P, Piao X, Bonaldo P. 2015. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol (Berl)* **130**(5): 605–618. doi: 10.1007/s00401-015-1482-4
- Chen W, Zhang Z, Yan F, Jiang X, Qin S, Dong H. 2017. Identification of three selenoprotein T paralogs in goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis in response to environmental stressors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **203**: 65–75. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.09.004
- Chen X, Ye K, Yu J, Gao J, Zhang L, Ji X, Chen T, Wang H, Dai Y, Tang B, et al. 2020 Feb 12. Regeneration of sciatic nerves by transplanted microvesicles of human neural stem cells derived from embryonic stem cells. *Cell Tissue Bank*, in press. doi: 10.1007/s10561-020-09816-5
- Cheung M, Chaboissier M-C, Mynett A, Hirst E, Schedl A, Briscoe J. 2005. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* **8**(2): 179–192. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.010
- Choi D, Raisman G. 2003. Immune rejection of a facial nerve xenograft does not prevent regeneration and the return of function: an experimental study. *Neuroscience* **121**(2): 501–507. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00433-0
- Chopra K, Tiwari V. 2012. Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *Br J Clin Pharmacol* **73**(3): 348–362. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.04111.x

- Chou F-C, Sytwu H-K. 2009. Overexpression of thioredoxin in islets transduced by a lentiviral vector prolongs graft survival in autoimmune diabetic NOD mice. *J Biomed Sci* **16**(1): 71. doi: 10.1186/1423-0127-16-71
- Coleman MP, Freeman MR. 2010. Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annu Rev Neurosci* **33**: 245–267. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153248
- Combs GF. 2015. Biomarkers of selenium status. *Nutrients* **7**(4): 2209–2236. doi: 10.3390/nu7042209
- Cooper EC. 2011. Made for “anchorin”: Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol* **22**(2): 185–192. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.10.001
- Couplier F, Crom SL, Maro GS, Manent J, Giovannini M, Maciorowski Z, Fischer A, Gessler M, Charnay P, Topilko P. 2009. Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers. *Glia* **57**(13): 1450–1457. doi: 10.1002/glia.20862
- Crone C, Krarup C. 2013. Chapter 6 - Neurophysiological approach to disorders of peripheral nerve. In: Said G, Krarup C, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier. p. 81–114. doi: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00006-0
- Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. 2008. Transplantation of Embryonic Stem Cells Improves Nerve Repair and Functional Recovery After Severe Sciatic Nerve Axotomy in Rats. *STEM CELLS* **26**(5): 1356–1365. doi: 10.1634/stemcells.2007-0333
- Cui Y, Li J, Zhu Y, Tang H, He X, Xu Y. 2015. The neuroprotective effects of aspirin following crush injury to rat sciatic nerve. *Int J Clin Exp Med* **8**(10): 18185–18190.
- Curry L. 2019. The Facial Nerve (CN VII) - Course - Functions - TeachMeAnatomy. Available at <https://teachmeanatomy.info/head/cranial-nerves/facial-nerve/>. Accessed 2020 Mar 17.
- Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Lensch WM, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* **22**(5): 770–778. doi: 10.1634/stemcells.22-5-770
- Dai R, Hua W, Xie H, Chen W, Xiong L, Li L. 2018. The Human Skin-Derived Precursors for Regenerative Medicine: Current State, Challenges, and Perspectives. *Stem Cells International*. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/8637812>
- Dandekar A, Mendez R, Zhang K. 2015. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease. In: Osowski CM, editor. *Stress Responses: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer. p. 205–214. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_15
- Dao VT-V, Casas AI, Maghzal GJ, Seredenina T, Kaludercic N, Robledinos-Anton N, Di Lisa F, Stocker R, Ghezzi P, Jaquet V, et al. 2015. Pharmacology and Clinical Drug Candidates in Redox Medicine. *Antioxid Redox Signal* **23**(14): 1113–1129. doi: 10.1089/ars.2015.6430
- Dardashti RN, Dery L, Mousa R, Dery S, Reddy PS, Metanis N. 2016. The Chemistry of Selenocysteine in Proteins. In: Hatfield DL, Schweizer U, Tsuji PA, Gladyshev VN, editors. *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. Cham: Springer International Publishing. p. 73–83. doi: 10.1007/978-3-319-41283-2_7

- Daube JR, Sorenson EJ. 2004. Needle electromyography. In: Eisen A, editor. *Handbook of Clinical Neurophysiology*. Elsevier. p. 221–240. doi: 10.1016/S1567-4231(04)04011-0
- David S, Kroner A. 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* **12**(7): 388–399. doi: 10.1038/nrn3053
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep* **6**(4): 633–649. doi: 10.1007/s12015-010-9170-1
- Decosterd I, Woolf CJ. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain: *Pain* **87**(2): 149–158. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1
- Degn J, Tandrup T, Jakobsen J. 1999. Effect of nerve crush on perikaryal number and volume of neurons in adult rat dorsal root ganglion. *J Comp Neurol* **412**(1): 186–192. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990913)412:1<186::aid-cne14>3.0.co;2-h
- Delloye-Bourgeois C, Castellani V. 2019. Hijacking of Embryonic Programs by Neural Crest-Derived Neuroblastoma: From Physiological Migration to Metastatic Dissemination. *Front Mol Neurosci* **12**. Frontiers. doi: 10.3389/fnmol.2019.00052
- Desouches C, Alluin O, Mutaftschiev N, Dousset E, Magalon G, Boucraut J, Feron F, Decherchi P. 2005. [Peripheral nerve repair: 30 centuries of scientific research]. *Rev Neurol (Paris)* **161**(11): 1045–1059.
- Di Cesare Mannelli L, Zanardelli M, Failli P, Ghelardini C. 2012. Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. *J Pain Off J Am Pain Soc* **13**(3): 276–284. doi: 10.1016/j.jpain.2011.11.009
- Di Summa PG, Schiraldi L, Cherubino M, Oranges CM, Kalbermatten DF, Raffoul W, Madduri S. 2018. Adipose Derived Stem Cells Reduce Fibrosis and Promote Nerve Regeneration in Rats. *Anat Rec Hoboken Nj 2007* **301**(10): 1714–1721. doi: 10.1002/ar.23841
- Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2007. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* **46**(23): 6871–6882. doi: 10.1021/bi602462q
- Ding F, Wu J, Yang Y, Hu W, Zhu Q, Tang X, Liu J, Gu X. 2010. Use of tissue-engineered nerve grafts consisting of a chitosan/poly(lactic-co-glycolic acid)-based scaffold included with bone marrow mesenchymal cells for bridging 50-mm dog sciatic nerve gaps. *Tissue Eng Part A* **16**(12): 3779–3790. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0299
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. 2004. Bone Marrow Contribution to Tumor-Associated Myofibroblasts and Fibroblasts. *Cancer Res* **64**(23): 8492–8495. American Association for Cancer Research. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1708
- Domènech-Estévez E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, Einheber S, Chrast R, Salzer JL. 2016. Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **36**(16): 4506–4521. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3521-15.2016

- Dörfel J. 1985. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat* **142**: 173–184.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**(1): 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Dumitrescu AM, Di Cosmo C, Liao X-H, Weiss RE, Refetoff S. 2010. The syndrome of inherited partial SBP2 deficiency in humans. *Antioxid Redox Signal* **12**(7): 905–920. doi: 10.1089/ars.2009.2892
- Dumont M, Beal MF. 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **51**(5): 1014–1026. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026
- Duregotti E, Negro S, Scorzeto M, Zornetta I, Dickinson BC, Chang CJ, Montecucco C, Rigoni M. 2015. Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci* **112**(5): E497–E505. National Academy of Sciences. doi: 10.1073/pnas.1417108112
- Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL. 2008. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther* **120**(1): 1–34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005
- English AW, Wilhelm JC, Sabatier MJ. 2011. Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges* **193**(4): 354–361. doi: 10.1016/j.aanat.2011.02.013
- Erwin DH, Davidson EH. 2009. The evolution of hierarchical gene regulatory networks. *Nat Rev Genet* **10**(2): 141–148. doi: 10.1038/nrg2499
- Evans SR, Ellis RJ, Chen H, Yeh T, Lee AJ, Schifitto G, Wu K, Bosch RJ, McArthur JC, Simpson DM, et al. 2011. Peripheral neuropathy in HIV: prevalence and risk factors. *AIDS Lond Engl* **25**(7): 919–928. doi: 10.1097/QAD.0b013e328345889d
- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R. 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* **14**(7): 1337–1383. doi: 10.1089/ars.2010.3275
- Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. 2015. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* **82–83**: 160–167. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010
- Faroni A, Workman VL, Saiani A, Reid AJ. 2019. Self-Assembling Peptide Hydrogel Matrices Improve the Neurotrophic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Healthc Mater* **8**(17): 1900410. doi: 10.1002/adhm.201900410
- Feldman EL. 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest* **111**(4): 431–433. doi: 10.1172/JCI17862
- Felix H, Eby TL, Fisch U. 1991. New aspects of facial nerve pathology in temporal bone fractures. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **111**(2): 332–336. doi: 10.3109/00016489109137396
- Felten D, Jozefowicz R. 2011. *Atlas de Neurosciences Humaines de Netter - Neuroanatomie Neurophysiologie*. Masson. (Hors collection).

- Feng X, Yuan W. 2015. Dexamethasone Enhanced Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. *BioMed Research International*. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/627923>
- Forgione M, Cap A, Liao R, Moldovan N, Eberhardt R, Lim C. 2019 May 12. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. - PubMed - NCBI. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heterozygous+cellular+glutathione+peroxidase+deficiency+in+the+mouse%3A+abnormalities+in+vascular+and+cardiac+function+and+structure>. Accessed 2019 May 12.
- Fox A, Mountford J, Braakhuis A, Harrison LC. 2001. Innate and adaptive immune responses to nonvascular xenografts: evidence that macrophages are direct effectors of xenograft rejection. *J Immunol Baltim Md 1950* **166**(3): 2133–2140. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.2133
- Fredericks GJ, Hoffmann FW, Hondal RJ, Rozovsky S, Urschitz J, Hoffmann PR. 2017. Selenoprotein K Increases Efficiency of DHHC6 Catalyzed Protein Palmitoylation by Stabilizing the Acyl-DHHC6 Intermediate. *Antioxid Basel Switz* **7**(1). doi: 10.3390/antiox7010004
- Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, Osterheld HJ, Hess FM, Mercier F, Hoffmann PR. 2014. Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(46): 16478–16483. doi: 10.1073/pnas.1417176111
- Fredericks GJ, Hoffmann PR. 2015. Selenoprotein K and protein palmitoylation. *Antioxid Redox Signal* **23**(10): 854–862. doi: 10.1089/ars.2015.6375
- Fregnan F, Muratori L, Simões AR, Giacobini-Robecchi MG, Raimondo S. 2012. Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* **7**(29): 2259–2266. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.29.003
- Fuchs E, Chen T. 2013. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep* **14**(1): 39–48. doi: 10.1038/embor.2012.197
- Gambaryan PY, Kondrasheva IG, Severin ES, Guseva AA, Kamensky AA. 2014. Increasing the Efficiency of Parkinson's Disease Treatment Using a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Based L-DOPA Delivery System. *Exp Neurobiol* **23**(3): 246–252. doi: 10.5607/en.2014.23.3.246
- Gammill LS, Bronner-Fraser M. 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* **4**(10): 795–805. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrn1219
- Gammill LS, Gonzalez C, Bronner-Fraser M. 2007. Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Dev Neurobiol* **67**(1): 47–56. doi: 10.1002/dneu.20326
- Gao X, Wang Y, Chen J, Peng J. 2013. The role of peripheral nerve ECM components in the tissue engineering nerve construction. *Rev Neurosci* **24**(4): 443–453. doi: 10.1515/revneuro-2013-0022
- Garrett AM, Jucius TJ, Sigaud LPR, Tang F-L, Xiong W-C, Ackerman SL, Burgess RW. 2016. Analysis of Expression Pattern and Genetic Deletion of Netrin5 in the Developing Mouse. *Front Mol Neurosci* **9**. doi: 10.3389/fnmol.2016.00003

- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**: 110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110
- Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips JB. 2015. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials* **37**: 242–251. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.009
- Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW. 2017. The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol* **174**(12): 1784–1796. doi: 10.1111/bph.13544
- Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, Domingues NRSR, Salvini TF, Parizotto NA. 2010. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle Nerve* **41**(5): 685–693. doi: 10.1002/mus.21549
- Gong T, Torres DJ, Berry MJ, Pitts MW. 2018. Hypothalamic redox balance and leptin signaling - Emerging role of selenoproteins. *Free Radic Biol Med* **127**: 172–181. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.038
- Gorman AM, Healy SJM, Jäger R, Samali A. 2012. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* **134**(3): 306–316. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.02.003
- Graeber MB. 1994. The Role of Astrocytes in Facial Nerve Regeneration. Stennert ER, Kreutzberg GW, Michel O, Jungehülsing M, editors. *The Facial Nerve*: 75–77. Berlin, Heidelberg: Springer. doi: 10.1007/978-3-642-85090-5_21
- Greathouse KM, Palladino SP, Dong C, Helton ES, Ubogu EE. 2016. Modeling leukocyte trafficking at the human blood-nerve barrier in vitro and in vivo geared towards targeted molecular therapies for peripheral neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **13**: 3. doi: 10.1186/s12974-015-0469-3
- Gresset A, Culpier F, Gerschenfeld G, Jourdon A, Matesic G, Richard L, Vallat J-M, Charnay P, Topilko P. 2015. Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. *Stem Cell Rep* **5**(2): 278–290. Elsevier. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.005
- Grinsell D, Keating CP. 2014. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Res Int* **2014**. doi: 10.1155/2014/698256
- Grouwels G, Vasylovska S, Olerud J, Leuckx G, Ngamjarriyawat A, Yuchi Y, Jansson L, Castele MV de, Kozlova EN, Heimberg H. 2012. Differentiating neural crest stem cells induce proliferation of cultured rodent islet beta cells. *Diabetologia*, in press. doi: 10.1007/s00125-012-2542-0
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, et al. 2008. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **22**(6): 1756–1768. doi: 10.1096/fj.06-075820
- Gu Y, Xue C, Zhu J, Sun H, Ding F, Cao Z, Gu X. 2014. Basic fibroblast growth factor (bFGF) facilitates differentiation of adult dorsal root ganglia-derived neural stem cells toward Schwann cells by

- binding to FGFR-1 through MAPK/ERK activation. *J Mol Neurosci MN* **52**(4): 538–551. doi: 10.1007/s12031-013-0109-2
- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. 2005. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **25**(13): 3478–3487. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3766-04.2005
- Guntinas-Lichius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E, Neiss WF. 2000. Delayed Rat Facial Nerve Repair Leads to Accelerated and Enhanced Muscle Reinnervation with Reduced Collateral Axonal Sprouting during a Definite Denervation Period Using a Cross-Anastomosis Paradigm. *Exp Neurol* **162**(1): 98–111. doi: 10.1006/exnr.2000.7309
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. 2005. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci* **21**(2): 391–402. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03877.x
- Guntinas-Lichius O, Straesser A, Streppel M. 2007. Quality of Life After Facial Nerve Repair. *The Laryngoscope* **117**(3): 421–426. doi: 10.1097/MLG.0b013e31802d83df
- Guntinas-Lichius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. 1997. Effect of Delayed Facial-Facial Nerve Suture on Facial Nerve Regeneration: A Horseradish Peroxidase Tracing Study in the Rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **117**(5): 670–674. Taylor & Francis. doi: 10.3109/00016489709113458
- Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss WF, Angelov DN. 2002. Transplantation of Olfactory Mucosa Minimizes Axonal Branching and Promotes the Recovery of Vibrissae Motor Performance after Facial Nerve Repair in Rats. *J Neurosci* **22**(16): 7121–7131. Society for Neuroscience. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-16-07121.2002
- Guo Z, Sun X, Xu X, Zhao Q, Peng J, Wang Y. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural Regen Res* **10**(4): 651–658. doi: 10.4103/1673-5374.155442
- Hadlock T, Kowaleski J, Lo D, Bermejo R, Zeigler HP, Mackinnon S, Heaton JT. 2008. Functional assessments of the rodent facial nerve: a synkinesis model. *The Laryngoscope* **118**(10): 1744–1749. doi: 10.1097/MLG.0b013e31817f5255
- Hadlock TA, Kowaleski J, Lo D, Mackinnon SE, Heaton JT. 2010. Rodent Facial Nerve Recovery After Selected Lesions and Repair Techniques. *Plast Reconstr Surg* **125**(1): 99–109. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181c2a5ea
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P. 2007. Le stress oxydant. *Rev Médicale Liège* **62**(10). Available at <https://orbi.uliege.be/handle/2268/8914>. Accessed 2020 Mar 25.
- Hama I, Nakagomi S, Konishi H, Kiyama H. 2010. Simultaneous expression of glutathione, thioredoxin-1, and their reductases in nerve transected hypoglossal motor neurons of rat. *Brain Res* **1306**: 1–7. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.014
- van Hameren G, Campbell G, Deck M, Berthelot J, Gautier B, Quintana P, Chrast R, Tricaud N. 2019. In vivo real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling

- in mouse models of peripheral neuropathies. *Acta Neuropathol Commun* **7**. doi: 10.1186/s40478-019-0740-4
- Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, et al. 2017. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* **18**(11): 1935–1946. doi: 10.15252/embr.201643504
- Hamilton RT, Bhattacharya A, Walsh ME, Shi Y, Wei R, Zhang Y, Rodriguez KA, Buffenstein R, Chaudhuri AR, Van Remmen H. 2013. Elevated Protein Carbonylation, and Misfolding in Sciatic Nerve from db/db and Sod1^{-/-} Mice: Plausible Link between Oxidative Stress and Demyelination. *PLoS ONE* **8**(6). doi: 10.1371/journal.pone.0065725
- Han J, Back SH, Hur J, Lin Y-H, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, et al. 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* **15**(5): 481–490. doi: 10.1038/ncb2738
- Hao L, Zhang C, Chen X-H, Zou Z-M, Zhang X, Kong P-Y, Liang X, Gao L, Peng X-G, Sun A-H, et al. 2009. Human umbilical cord blood-derived stromal cells suppress xenogeneic immune cell response in vitro. *Croat Med J* **50**(4): 351–360. doi: 10.3325/cmj.2009.50.351
- Hart AM, Terenghi G, Kellerth J-O, Wiberg M. 2004. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* **125**(1): 91–101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.040
- Hattori I, Takagi Y, Nakamura H, Nozaki K, Bai J, Kondo N, Sugino T, Nishimura M, Hashimoto N, Yodoi J. 2004. Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice. *Antioxid Redox Signal* **6**(1): 81–87. doi: 10.1089/152308604771978372
- Hausott B, Klimaschewski L. 2019. Promotion of Peripheral Nerve Regeneration by Stimulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Pathway. *Anat Rec Hoboken Nj 2007* **302**(8): 1261–1267. doi: 10.1002/ar.24126
- Heine W, Conant K, Griffin J, Hoke A. 2004. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp Neurol* **189**(2): 231–240. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.06.014
- Heine Walter, Conant K, Griffin JW, Höke A. 2004. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp Neurol* **189**(2): 231–240. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.06.014
- Hervera A, De Virgiliis F, Palmisano I, Zhou L, Tantardini E, Kong G, Hutson T, Danzi MC, Perry RB-T, Santos CXC, et al. 2018. Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat Cell Biol* **20**(3): 307–319. doi: 10.1038/s41556-018-0039-x
- Hess DT, Patterson SI, Smith DS, Skene JH. 1993. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* **366**(6455): 562–565. doi: 10.1038/366562a0
- Hichor M, Sampathkumar NK, Montanaro J, Borderie D, Petit PX, Gorgievski V, Tzavara ET, Eid AA, Charbonnier F, Grenier J, et al. 2017. Paraquat Induces Peripheral Myelin Disruption and

- Locomotor Defects: Crosstalk with LXR and Wnt Pathways. *Antioxid Redox Signal* **27**(3): 168–183. doi: 10.1089/ars.2016.6711
- Hitier M, Edy E, Salame E, Moreau S. 2013. Anatomie du nerf facial. *EMC - Oto-Rhino-Laryngol* **36**: 1–16. doi: 10.1016/S1632-3475(07)70323-5
- Hizay A, Seitz M, Grosheva M, Sinis N, Kaya Y, Bendella H, Sarikcioglu L, Dunlop SA, Angelov DN. 2016. FGF-2 is required to prevent astrogliosis in the facial nucleus after facial nerve injury and mechanical stimulation of denervated vibrissal muscles. *J Biomed Res* **30**(2): 142–148. doi: 10.7555/JBR.30.20140042
- Hjerling-Leffler J, Marmigère F, Heglind M, Cederberg A, Koltzenburg M, Enerbäck S, Ernfors P. 2005. The boundary cap: a source of neural crest stem cells that generate multiple sensory neuron subtypes. *Dev Camb Engl* **132**(11): 2623–2632. doi: 10.1242/dev.01852
- Hoffman PN, Cleveland DW. 1988. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(12): 4530–4533. doi: 10.1073/pnas.85.12.4530
- Hopkins AM, Laporte LD, Tortelli F, Spedden E, Staii C, Atherton TJ, Hubbell JA, Kaplan DL. 2013. Silk Hydrogels as Soft Substrates for Neural Tissue Engineering. *Adv Funct Mater* **23**(41): 5140–5149. doi: 10.1002/adfm.201300435
- Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, Hirabayashi Y, Savitzki D, Tal G, Mandel H, Sugimoto H. 2018. EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans. *J Lipid Res* **59**(6): 1015–1026. doi: 10.1194/jlr.P081620
- Hu J, Zhu Q-T, Liu X-L, Xu Y, Zhu J-K. 2007. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol* **204**(2): 658–666. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.11.018
- Hu Y, Wu Y, Gou Z, Tao J, Zhang J, Liu Q, Kang T, Jiang S, Huang S, He J, et al. 2016. 3D-engineering of Cellularized Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Sci Rep* **6**. doi: 10.1038/srep32184
- Huang C-W, Hsueh Y-Y, Huang W-C, Patel S, Li S. 2019. Multipotent vascular stem cells contribute to neurovascular regeneration of peripheral nerve. *Stem Cell Res Ther* **10**. doi: 10.1186/s13287-019-1317-7
- Huang F, Junfang W, Anmin C. 2006. Effects of co-grafts mesenchymal stem cells and nerve growth factor suspension in the repair of spinal cord injury. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **26**(2): 206–210. doi: 10.1007/BF02895817
- Huang Haitao, Liu H, Yan R, Hu M. 2017. PI3K/Akt and ERK/MAPK Signaling Promote Different Aspects of Neuron Survival and Axonal Regrowth Following Rat Facial Nerve Axotomy. *Neurochem Res* **42**(12): 3515–3524. doi: 10.1007/s11064-017-2399-1
- Huang Hai-tao, Sun Z, Liu H, Ma J, Hu M. 2017. ERK/MAPK and PI3K/AKT signal channels simultaneously activated in nerve cell and axon after facial nerve injury. *Saudi J Biol Sci* **24**(8): 1853–1858. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.11.027
- Huang W, Wang T, Jiang B, Zheng M. 2017. Mitochondrial biogenesis in ventral spinal cord and nerve following sciatic nerve axotomy. *Int J Clin Exp Med* **10**: 14386–14393.

- Huff TC, Sant DW, Camarena V, Van Booven D, Andrade NS, Mustafi S, Monje PV, Wang G. 2020 Mar 26. Vitamin C regulates Schwann cell myelination by promoting DNA demethylation of pro-myelinating genes. *J Neurochem*, in press. doi: 10.1111/jnc.15015
- Hung HA, Sun G, Keles S, Svaren J. 2015. Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury. *J Biol Chem* **290**(11): 6937–6950. doi: 10.1074/jbc.M114.622878
- Ichihara S, Inada Y, Nakamura T. 2008. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury* **39 Suppl 4**: 29–39. doi: 10.1016/j.injury.2008.08.029
- Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, Ikada Y, Nakamura H. 2014. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res A* **102**(5): 1370–1378. doi: 10.1002/jbm.a.34816
- Ikematsu K, Tsuda R, Tsuruya S, Nakasono I. 2007. Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display. *Forensic Sci Int* **169**(2–3): 168–172. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.015
- Łżeczka J. 2001. [Superoxide dismutase-1 (SOD-1) gene mutation-dependent mechanisms of neural degeneration in amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurol Neurochir Pol* **35**(3): 461–469.
- Islam MT. 2017. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* **39**(1): 73–82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711
- Jergović D, Stål P, Lidman D, Lindvall B, Hildebrand C. 2001. Changes in a rat facial muscle after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve* **24**(9): 1202–1212. doi: 10.1002/mus.1133
- Johnson TS, O’Neill AC, Motarjem PM, Nazzal J, Randolph M, Winograd JM. 2008. Tumor Formation Following Murine Neural Precursor Cell Transplantation in a Rat Peripheral Nerve Injury Model. *J Reconstr Microsurg* **24**(8): 545–550. © Thieme Medical Publishers. doi: 10.1055/s-0028-1088228
- Jones DL, Wagers AJ. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 11–21. doi: 10.1038/nrm2319
- Kamboj SS, Vasishta RK, Sandhir R. 2010. N-acetylcysteine inhibits hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis markers in diabetic neuropathy. *J Neurochem* **112**(1): 77–91. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06435.x
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**(7162): 557–563. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nature06188
- Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2012. Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim Biophys Acta* **1823**(9): 1633–1642. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.018
- Kaya Y, Sarıkcıoğlu L, Aslan M, Kencebay C, Demir N, Derin N, Angelov DN, Yıldırım FB. 2013. Comparison of the beneficial effect of melatonin on recovery after cut and crush sciatic nerve injury: a combined study using functional, electrophysiological, biochemical, and electron

- microscopic analyses. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* **29**(3): 389–401. doi: 10.1007/s00381-012-1936-0
- Keilhoff G, Goihl A, Stang F, Wolf G, Fansa H. 2006. Peripheral Nerve Tissue Engineering: Autologous Schwann Cells vs. Transdifferentiated Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng* **12**(6): 1451–1465. Mary Ann Liebert, Inc., publishers. doi: 10.1089/ten.2006.12.1451
- Khan AA, Faruqi NA, Ansari MS. 2014. Effects of hydrocortisone on the sciatic nerve crush injury in adult rat - a light microscopic study. *Curr Neurobiol* **5**(1). Allied Business Academies. Available at <https://www.abacademies.org/abstract/effects-of-hydrocortisone-on-the-sciatic-nerve-crush-injury-in-adult-rat--arnlight-microscopic-study-1561.html>. Accessed 2020 Apr 16.
- Khuong HT, Kumar R, Senjaya F, Grochmal J, Ivanovic A, Shakhbazau A, Forden J, Webb A, Biernaskie J, Midha R. 2014. Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Exp Neurol* **254**: 168–179. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.002
- Kim J, Han SJ, Shin DH, Lee W-S, Choi JY. 2011. Subthreshold continuous electrical stimulation facilitates functional recovery of facial nerve after crush injury in rabbit. *Muscle Nerve* **43**(2): 251–258. doi: 10.1002/mus.21840
- Kizilay Z, Erken H, Aktas S, Ersoy N, Abas B, Topcu A, Yenisey Ç, Ismailoglu O. 2017. Effects of Selenium on Axon and Myelin Healing in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model. *J Istanbul Fac Med* **80**: 138–45. doi: 10.18017/iuitfd.349434
- Köhrle J, Jakob F, Contempré B, Dumont JE. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* **26**(7): 944–984. doi: 10.1210/er.2001-0034
- Krämer-Albers E-M. 2018. Exosomes deliver ROS for regeneration. *Nat Cell Biol* **20**(3): 225–226. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/s41556-018-0048-9
- Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. 2005. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **308**(5727): 1472–1477. doi: 10.1126/science.1107627
- Kretschmer T, Antoniadis G, Braun V, Rath SA, Richter HP. 2001. Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *J Neurosurg* **94**(6): 905–912. doi: 10.3171/jns.2001.94.6.0905
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**(5624): 1439–1443. doi: 10.1126/science.1083516
- Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN. 1999. New Mammalian Selenocysteine-containing Proteins Identified with an Algorithm That Searches for Selenocysteine Insertion Sequence Elements. *J Biol Chem* **274**(48): 33888–33897. doi: 10.1074/jbc.274.48.33888
- Kubo T, Randolph MA, Gröger A, Winograd JM. 2009. Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Form Neuromuscular Junctions In Vitro and Enhance Motor Functional Recovery In Vivo. *Plast Reconstr Surg* **123**(2S): 139S. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181923d07

- Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Hosokawa K, Tohyama M. 2002. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J Neurochem* **82**(5): 1129–1136. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01060.x
- Kurtoglu Z, Ozturk AH, Bagdatoglu C, Polat G, Aktekin M, Uzmannel D, Camdeviren H, Bagdatoglu O, Sargon M. 2005. Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama* **59**(2): 37–44. doi: 10.18926/AMO/31967
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2014. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev* **94**(3): 739–777. doi: 10.1152/physrev.00039.2013
- Lacombe H. 2009. Anatomie fonctionnelle du nerf facial. *Neurochirurgie* **55**(2): 113–119. doi: 10.1016/j.neuchi.2009.01.002
- Lago N, Navarro X. 2006. Correlation between target reinnervation and distribution of motor axons in the injured rat sciatic nerve. *J Neurotrauma* **23**(2): 227–240. doi: 10.1089/neu.2006.23.227
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. 1996. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* **93**(26): 15069–15074. doi: 10.1073/pnas.93.26.15069
- Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Sénès F, Tos P, Geuna S. 2012. Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Res* **90**(4): 842–848. doi: 10.1002/jnr.22778
- Lavasani M, Thompson SD, Pollett JB, Usas A, Lu A, Stolz DB, Clark KA, Sun B, Péault B, Huard J. 2014. Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration. *J Clin Invest* **124**(4): 1745–1756. doi: 10.1172/JCI44071
- Lee D-C, Chen J-H, Hsu T-Y, Chang L-H, Chang H, Chi Y-H, Chiu I-M. 2017. Neural stem cells promote nerve regeneration through IL12-induced Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* **79**: 1–11. doi: 10.1016/j.mcn.2016.11.007
- Levrant S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, Pacher P, Feihl F, Waeber B, Liaudet L. 2006. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **41**(6): 886–895. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.034
- Lewis AK, Bridgman PC. 1992. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* **119**(5): 1219–1243. doi: 10.1083/jcb.119.5.1219
- Li Q, Ping P, Jiang H, Liu K. 2006. Nerve conduit filled with GDNF gene-modified Schwann cells enhances regeneration of the peripheral nerve. *Microsurgery* **26**: 116–21. doi: 10.1002/micr.20192
- Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* **6**: 19. doi: 10.1186/1756-8722-6-19
- Lindsay RW, Heaton JT, Edwards C, Smitson C, Vakharia K, Hadlock TA. 2010. Daily Facial Stimulation Improves Recovery after Facial Nerve Repair. *Arch Facial Plast Surg* **12**(3): 180–185. doi: 10.1001/archfacial.2010.39

- Liu J, Rozovsky S. 2015a. Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* **23**(10): 795–813. doi: 10.1089/ars.2015.6388
- Liu J, Rozovsky S. 2015b. Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* **23**(10): 795–813. doi: 10.1089/ars.2015.6388
- Liu X, Kokare C. 2017. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry. In: Brahmachari G, editor. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press. p. 267–298. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X
- Llobet Rosell A, Neukomm LJ. 2019. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. *Open Biol* **9**(8): 190118. Royal Society. doi: 10.1098/rsob.190118
- Lobanov AV, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2007. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol* **8**(9): R198. doi: 10.1186/gb-2007-8-9-r198
- Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN. 2006. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Res* **34**(14): 4012–4024. doi: 10.1093/nar/gkl541
- Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2009. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* **1790**(11): 1424–1428. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.014
- Lopez J, Quan A, Budihardjo J, Xiang S, Wang H, Koshy K, Cashman C, Lee WPA, Hoke A, Tuffaha S, et al. 2019. Growth Hormone Improves Nerve Regeneration, Muscle Re-innervation, and Functional Outcomes After Chronic Denervation Injury. *Sci Rep* **9**(1): 1–11. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/s41598-019-39738-6
- Lowrie MB, Lavalette D, Davies CE. 1994. Time Course of Motoneurone Death after Neonatal Sciatic Nerve Crush in the Rat. *Dev Neurosci* **16**(5–6): 279–284. Karger Publishers. doi: 10.1159/000112120
- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2883–2888. doi: 10.1073/pnas.0711983105
- Lu J, Sun Xun, Yin H, Shen X, Yang S, Wang Y, Jiang W, Sun Y, Zhao L, Sun Xiaodan, et al. 2018. A neurotrophic peptide-functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogel enhances rat sciatic nerve regeneration. *Nano Res* **11**(9): 4599–4613. doi: 10.1007/s12274-018-2041-9
- Lundborg G. 2003. Nerve injury and repair – a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst* **8**(4): 209–226. doi: 10.1111/j.1085-9489.2003.03027.x
- Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. 2002. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* **33**(7): 875–885. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00882-1
- Madduri S, Gander B. 2010. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* **15**(2): 93–103. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00257.x

- Magown P, Rafuse VF, Brownstone RM. 2017. Microcircuit formation following transplantation of mouse embryonic stem cell-derived neurons in peripheral nerve. *J Neurophysiol* **117**(4): 1683–1689. American Physiological Society. doi: 10.1152/jn.00943.2016
- Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackelford G, Fledrich R, Fonte C, Branchu J, Goulard M, et al. 2012. Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(10): 3973–3978. doi: 10.1073/pnas.1121367109
- Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J, Kiyama H. 1998. Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* **62**(1): 86–91. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00244-7
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, Murgia V, Camboni P, Ferrelli L, Mocci M, et al. 2003. The Impact of Different Antioxidant Agents alone or in Combination on Reactive Oxygen Species, Antioxidant Enzymes and Cytokines in a Series of Advanced Cancer Patients at Different Sites: Correlation with Disease Progression. *Free Radic Res* **37**(2): 213–223. doi: 10.1080/10715760303849
- Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2012. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* **7**(3): e33066. doi: 10.1371/journal.pone.0033066
- Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. 2004. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci* **7**(9): 930–938. doi: 10.1038/nn1299
- Martin LJ, Kaiser A, Price AC. 1999. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol* **40**(2): 185–201.
- Martini R, Fischer S, López-Vales R, David S. 2008. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* **56**(14): 1566–1577. doi: 10.1002/glia.20766
- Masgutov R, Masgutova G, Mullakhmetova A, Zhuravleva M, Shulman A, Rogozhin A, Syromiatnikova V, Andreeva D, Zeinalova A, Idrisova K, et al. 2019. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Applied in Fibrin Glue Stimulate Peripheral Nerve Regeneration. *Front Med* **6**. Frontiers. doi: 10.3389/fmed.2019.00068
- Mathew E, Brannon AL, Del Vecchio A, Garcia PE, Penny MK, Kane KT, Vinta A, Buckanovich RJ, di Magliano MP. 2016. Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia* **18**(3): 142–151. doi: 10.1016/j.neo.2016.01.005
- Mattsson P, Aldskogius H, Svensson M. 1999. Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg* **90**(4): 760–765. doi: 10.3171/jns.1999.90.4.0760
- May M. 1985. Facial reanimation after skull base trauma. *Am J Otol Suppl*: 62–67.
- McCulloch EA, Till JE. 1971. Regulatory mechanisms acting on hemopoietic stem cells. Some clinical implications. *Am J Pathol* **65**(3): 601–619.

- McDonald DS, Cheng C, Martinez JA, Zochodne DW. 2007. Regenerative arrest of inflamed peripheral nerves: role of nitric oxide. *Neuroreport* **18**(16): 1635–1640. doi: 10.1097/WNR.0b013e3282f03fff
- McIlwain DL, Hoke VB. 2005. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. *BMC Neurosci* **6**: 19. doi: 10.1186/1471-2202-6-19
- McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. 2006. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **26**(24): 6651–6660. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1007-06.2006
- Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. 2002. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol Baltim Md 1950* **168**(1): 458–465. doi: 10.4049/jimmunol.168.1.458
- Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. 2013. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin* **29**(3): 317–330. doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.002
- Migdal C, Serres M. 2011. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* **27**(4): 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017
- Millesi H. 1973. Microsurgery of peripheral nerves. *The Hand* **5**(2): 157–160.
- Mimeault M, Batra SK. 2008. Recent Progress on Tissue-Resident Adult Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications. *Stem Cell Rev* **4**(1): 27–49. doi: 10.1007/s12015-008-9008-2
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci* **63**(1): 68–78. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.005
- Mirski R, Reichert F, Klar A, Rotshenker S. 2003. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) activity is regulated by a GM-CSF binding molecule in Wallerian degeneration following injury to peripheral nerve axons. *J Neuroimmunol* **140**(1–2): 88–96. doi: 10.1016/s0165-5728(03)00179-6
- Mohammed-Ali Z, Lu C, Marway MK, Carlisle RE, Ask K, Lukic D, Krepinsky JC, Dickhout JG. 2017. Endoplasmic reticulum stress inhibition attenuates hypertensive chronic kidney disease through reduction in proteinuria. *Sci Rep* **7**(1): 1–14. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/srep41572
- Montava M, Garcia S, Mancini J, Jammes Y, Courageot J, Lavieille J-P, Feron F. 2015. Vitamin D3 potentiates myelination and recovery after facial nerve injury. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **272**(10): 2815–2823. doi: 10.1007/s00405-014-3305-y
- Moore AM, Kasukurthi R, Magill CK, Farhadi HF, Borschel GH, Mackinnon SE. 2009. Limitations of conduits in peripheral nerve repairs. *Hand N Y N* **4**(2): 180–186. doi: 10.1007/s11552-008-9158-3
- Moran CJ, Neely JG. 1996. Patterns of Facial Nerve Synkinesis. *The Laryngoscope* **106**(12): 1491–1496. doi: 10.1097/00005537-199612000-00009

- Moran LB, Graeber MB. 2004. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* **44**(2–3): 154–178. doi: 10.1016/j.brainresrev.2003.11.004
- Morell P, Quarles RH. 1999. The Myelin Sheath. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp 6th Ed*, in press. Lippincott-Raven. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27954/>. Accessed 2020 Apr 16.
- Mosahebi A, Woodward B, Wiberg M, Martin R, Terenghi G. 2001. Retroviral labeling of Schwann cells: In vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration. *Glia* **34**(1): 8–17. doi: 10.1002/glia.1035
- Moustafa ME, Antar HA. 2012. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* **50**(9–10): 736–747. doi: 10.1007/s10528-012-9516-2
- Mtui E, Gruener G, Dockery P. 2015. *Fitzgerald's Clinical Neuroanatomy and Neuroscience*. 7th ed. Elsevier.
- Mukudai S, Matsuda KI, Nishio T, Sugiyama Y, Bando H, Hirota R, Sakaguchi H, Hisa Y, Kawata M. 2015. Differential responses to steroid hormones in fibroblasts from the vocal fold, trachea, and esophagus. *Endocrinology* **156**(3): 1000–1009. doi: 10.1210/en.2014-1605
- Muñoz-Esparza NC, Latorre-Moratalla ML, Comas-Basté O, Toro-Funes N, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. 2019. Polyamines in Food. *Front Nutr* **6**: 108. doi: 10.3389/fnut.2019.00108
- Muraglia A, Todeschi MR, Papait A, Poggi A, Spanò R, Strada P, Cancedda R, Mastrogiacomo M. 2015. Combined platelet and plasma derivatives enhance proliferation of stem/progenitor cells maintaining their differentiation potential. *Cytotherapy* **17**(12): 1793–1806. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.09.004
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M. 2003. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res* **974**(1–2): 17–24. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02539-3
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**(11): 723–737. doi: 10.1038/nri3073
- Mustacich D, Powis G. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346 Pt 1**: 1–8.
- Naderi N, Combellack EJ, Griffin M, Sedaghati T, Javed M, Findlay MW, Wallace CG, Mosahebi A, Butler PE, Seifalian AM, et al. 2017. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *Int Wound J* **14**(1): 112–124. doi: 10.1111/iwj.12569
- Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, Itoi S, Kanemaru S, Endo K, Shimizu Y. 2004. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res* **1027**(1–2): 18–29. doi: 10.1016/j.brainres.2004.08.040
- Ni X-J, Wang X-D, Zhao Y-H, Sun H-L, Hu Y-M, Yao J, Wang Y. 2017. The Effect of Low-Intensity Ultrasound on Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in a Rat Sciatic Nerve Crushed Injury Model. *Ultrasound Med Biol* **43**(2): 461–468. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.09.017

- Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TPJ, Munro S, Lilley KS, Dupree P. 2012. Putative Glycosyltransferases and Other Plant Golgi Apparatus Proteins Are Revealed by LOPIT Proteomics1[W]. *Plant Physiol* **160**(2): 1037–1051. doi: 10.1104/pp.112.204263
- Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. 1998. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* **45**(1): 116–122. doi: 10.1097/00005373-199807000-00025
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**(7151): 313–317. doi: 10.1038/nature05934
- Olmstead DN, Mesnard-Hoaglin NA, Batka RJ, Haulcomb MM, Miller WM, Jones KJ. 2015. Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury. *J Vis Exp JoVE*(96): e52382. doi: 10.3791/52382
- Orbay H, Uysal AC, Hyakusoku H, Mizuno H. 2012. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS* **65**(5): 657–664. doi: 10.1016/j.bjps.2011.11.035
- Owusu JA, Stewart CM, Boahene K. 2018. Facial Nerve Paralysis. *Med Clin North Am* **102**(6): 1135–1143. doi: 10.1016/j.mcna.2018.06.011
- Ozyigit F, Kucuk A, Akcer S, Tosun M, Kocak FE, Kocak C, Kocak A, Metineren H, Genc O. 2015. Different dose-dependent effects of ebselen in sciatic nerve ischemia-reperfusion injury in rats. *Bosn J Basic Med Sci* **15**(4): 36–43. doi: 10.17305/bjbms.2015.521
- van Paassen BW, van der Kooij AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M. 2014. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis* **9**(1): 38. doi: 10.1186/1750-1172-9-38
- Pabari A, Lloyd-Hughes H, Seifalian AM, Mosahebi A. 2014. Nerve conduits for peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg* **133**(6): 1420–1430. doi: 10.1097/PRS.0000000000000226
- Pan H-C, Cheng F-C, Chen C-J, Lai S-Z, Lee C-W, Yang D-Y, Chang M-H, Ho S-P. 2007. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci* **14**(11): 1089–1098. doi: 10.1016/j.jocn.2006.08.008
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**(7): 775–806. doi: 10.1089/ars.2007.1528
- Patapoutian A, Reichardt LF. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 272–280. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00208-7
- Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. 2013. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers* **1**(3): e24956. doi: 10.4161/tisb.24956
- Pepper J-P, Kim JC. 2012. Selective chemodenervation with botulinum toxin in facial nerve disorders. *Oper Tech Otolaryngol-Head Neck Surg* **23**(4): 297–305. doi: 10.1016/j.otot.2012.10.001

- Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC. 2013. Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol Med* **62**: 186–201. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.042
- Perry VH, Brown MC. 1992. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **2**(5): 679–682. doi: 10.1016/0959-4388(92)90038-M
- Perry VH, Tsao JW, Fearn S, Brown MC. 1995. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur J Neurosci* **7**(2): 271–280. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01063.x
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J-O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr Clin Métabolisme* **16**(4): 233–239. doi: 10.1016/S0985-0562(02)00166-8
- Pinheiro-Dardis CM, Erbereli BT, Gigo-Benato D, Castro PATS, Russo TL. 2017. Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* **56**(6): E108–E118. doi: 10.1002/mus.25589
- Pitts MW, Hoffmann PR. 2018. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium* **70**: 76–86. doi: 10.1016/j.ceca.2017.05.001
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Pla P, Alberti C, Solov'eva O, Pasdar M, Kunisada T, Larue L. 2005. Ednr β 2 orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation. *Pigment Cell Res* **18**(3): 181–187. doi: 10.1111/j.1600-0749.2005.00230.x
- Popielek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Makuch W, Rojewska E, Jurga AM, Pilat D, Mika J. 2015. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast* **2015**: 1–15. doi: 10.1155/2015/676473
- Potas JR, Haque F, Maclean FL, Nisbet DR. 2015. Interleukin-10 conjugated electrospun polycaprolactone (PCL) nanofibre scaffolds for promoting alternatively activated (M2) macrophages around the peripheral nerve in vivo. *J Immunol Methods* **420**: 38–49. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.013
- Pothion H, Jehan C, Tostivint H, Cartier D, Bucharles C, Falluel-Morel A, Boukhzar L, Anouar Y, Lihrmann I. 2020 Jun 11. Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, in press. doi: 10.1089/ars.2019.7931
- Prevost G, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Tanguy Y, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011a. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**(11): 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246
- Prevost G, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Tanguy Y, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011b. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly

- induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**(11): 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246
- Qian Y, Han Q, Zhao X, Song J, Cheng Y, Fang Z, Ouyang Y, Yuan W-E, Fan C. 2018. 3D melatonin nerve scaffold reduces oxidative stress and inflammation and increases autophagy in peripheral nerve regeneration. *J Pineal Res* **65**(4): e12516. doi: 10.1111/jpi.12516
- Qiu J, Yang X, Wang L, Zhang Q, Ma W, Huang Z, Bao Y, Zhong L, Sun H, Ding F. 2019. Isoquercitrin promotes peripheral nerve regeneration through inhibiting oxidative stress following sciatic crush injury in mice. *Ann Transl Med* **7**(22): 680–680. doi: 10.21037/atm.2019.11.18
- Radomska KJ, Topilko P. 2017. Boundary cap cells in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **47**: 209–215. doi: 10.1016/j.conb.2017.11.003
- Ramaglia V, King RHM, Nourallah M, Wolterman R, de Jonge R, Ramkema M, Vigar MA, van der Wetering S, Morgan BP, Troost D, et al. 2007. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**(29): 7663–7672. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5623-06.2007
- Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. 2016. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* **148**: 183–193. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.002
- Raso VVM, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. 2005. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods* **142**(2): 185–192. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.08.016
- Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S. 1996. Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci* **8**(3): 530–535. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01237.x
- Reichert F, Saada A, Rotshenker S. 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **14**(5 Pt 2): 3231–3245.
- Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, Yuan Z, Roberts AI, Zhang L, Zheng B, et al. 2012. CCR2-Dependent Recruitment of Macrophages by Tumor-Educated Mesenchymal Stromal Cells Promotes Tumor Development and Is Mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **11**(6): 812–824. doi: 10.1016/j.stem.2012.08.013
- Renno WM, Benov L, Khan KM. 2017. Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg Spine* **27**(5): 593–613. doi: 10.3171/2016.10.SPINE16218
- Ribas J, Mattiolo P, Boix J. 2015. Pharmacological modulation of reactive oxygen species in cancer treatment. *Curr Drug Targets* **16**(1): 31–37. doi: 10.2174/1389450115666141114153536
- Richard L, Topilko P, Magy L, Decouvelaere A-V, Charnay P, Funalot B, Vallat J-M. 2012. Endoneurial fibroblast-like cells. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**(11): 938–947. doi: 10.1097/NEN.0b013e318270a941
- Richner M, Bjerrum OJ, Nykjaer A, Vaegter CB. 2011. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. *J Vis Exp JoVE*(54). doi: 10.3791/3092

- Rieger S, Sagasti A. 2011. Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol* **9**(5): e1000621. doi: 10.1371/journal.pbio.1000621
- Rifler J-P. 2018. Is a Meal without Wine Good for Health? *Dis Basel Switz* **6**(4). doi: 10.3390/diseases6040105
- Rigoard P, Lapierre F. 2009. [Review of the peripheral nerve]. *Neurochirurgie* **55**(4–5): 360–374. doi: 10.1016/j.neuchi.2009.08.156
- Rippon HJ, Bishop AE. 2004. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* **37**(1): 23–34. doi: 10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x
- Robinson LR. 2000. Traumatic injury to peripheral nerves. : 11.
- Rocca C, Boukhzar L, Granieri MC, Alsharif I, Mazza R, Lefranc B, Tota B, Leprince J, Cerra MC, Anouar Y, et al. 2018. A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta Physiol Oxf Engl* **223**(4): e13067. doi: 10.1111/apha.13067
- Rochkind S. 2009. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. *Neurosurg Focus* **26**(2): E8. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E8
- Rodella U, Scorzeto M, Duregotti E, Negro S, Dickinson BC, Chang CJ, Yuki N, Rigoni M, Montecucco C. 2016. An animal model of Miller Fisher syndrome: Mitochondrial hydrogen peroxide is produced by the autoimmune attack of nerve terminals and activates Schwann cells. *Neurobiol Dis* **96**: 95–104. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.005
- Rodríguez I, Gila-Useros L, Malanda A. 2012. Motor Unit Action Potential Duration: Measurement and Significance. doi: 10.5772/50265
- Romanelli-Cedrez L, Carrera I, Otero L, Miranda-Vizueté A, Mariotti M, Alkema MJ, Salinas G. 2017. Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* **108**: 174–182. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.021
- Rosa Junior GM, Magalhães RMG, Rosa VC, Bueno CR de S, Simionato LH, Bortoluci CHF, Rosa Junior GM, Magalhães RMG, Rosa VC, Bueno CR de S, et al. 2016. Efeito da associação da laserterapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axonotmese. *Fisioter E Pesqui* **23**(1): 12–20. Universidade de São Paulo. doi: 10.1590/1809-2950/13929623012016
- Rotshenker S. 2011. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**: 109. doi: 10.1186/1742-2094-8-109
- Ruijs ACJ, Jaquet J-B, Kalmijn S, Giele H, Hovius SER. 2005. Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg* **116**(2): 484–494; discussion 495-496. doi: 10.1097/01.prs.0000172896.86594.07
- de Ruiter GCW, Spinner RJ, Verhaagen J, Malessy MJA. 2014. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. *J Neurosurg* **120**(2): 493–501. doi: 10.3171/2013.8.JNS122300

- Sabongi RG, Fernandes M, dos Santos JBG. 2015. Peripheral nerve regeneration with conduits: use of vein tubes. *Neural Regen Res* **10**(4): 529–533. doi: 10.4103/1673-5374.155428
- Saini AK, Kumar H S A, Sharma SS. 2007. Preventive and curative effect of edaravone on nerve functions and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* **568**(1–3): 164–172. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.04.016
- Saito H, Yamamura K, Suzuki N. 2012. Reduced bone morphogenetic protein receptor type 1A signaling in neural-crest-derived cells causes facial dysmorphism. *Dis Model Mech* **5**(6): 948–955. The Company of Biologists Ltd. doi: 10.1242/dmm.009274
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* **52**(8): 2521–2529. doi: 10.1002/art.21212
- Sakata H, Niizuma K, Wakai T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. 2012. Neural stem cells genetically modified to overexpress cu/zn-superoxide dismutase enhance amelioration of ischemic stroke in mice. *Stroke* **43**(9): 2423–2429. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.656900
- Sala-Blanch X, Reina MA, Ribalta T, Prats-Galino A. 2013. Sciatic nerve structure and nomenclature: epineurium to paraneurium: is this a new paradigm? *Reg Anesth Pain Med* **38**(5): 463–465. doi: 10.1097/AAP.0b013e3182a1b6c5
- Salles MB, Gehrke SA, Koo S, Allegrini S, Rogero SO, Ikeda TI, Cruz ÁS, Shinohara EH, Yoshimoto M. 2015. An alternative to nerve repair using an antioxidant compound: a histological study in rats. *J Mater Sci Mater Med* **26**(1): 5340. doi: 10.1007/s10856-014-5340-z
- Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrechts I, Phillips J. 2017. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med* **11**(12): 3362–3372. doi: 10.1002/term.2249
- Sasaki Y, Vohra BPS, Baloh RH, Milbrandt J. 2009. Transgenic mice expressing the Nmnat1 protein manifest robust delay in axonal degeneration in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**(20): 6526–6534. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1429-09.2009
- Scatena M, Eaton KV, Jackson MF, Lund SA, Giachelli CM. 2017. Macrophages: The Bad, the Ugly, and the Good in the Inflammatory Response to Biomaterials. In: Corradetti B, editor. *The Immune Response to Implanted Materials and Devices: The Impact of the Immune System on the Success of an Implant*. Cham: Springer International Publishing. p. 37–62. doi: 10.1007/978-3-319-45433-7_3
- Scherer SS, Arroyo EJ. 2014. Myelin: Molecular Architecture of CNS and PNS Myelin Sheath☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.04676-6
- Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, et al. 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* **120**(12): 4220–4235. doi: 10.1172/JCI43653
- Schomburg L. 2011. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **8**(3): 160–171. doi: 10.1038/nrendo.2011.174

- Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavidés J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. 2001. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Brain Res Rev* **37**(1–3): 343–359. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00139-4
- Seddon RJ. 1947. Surgical experiences with peripheral nerve injuries. *Q Bull Northwest Univ Evanst Ill Med Sch* **21**(3): 201–210.
- Semba K, Egger MD. 1986. The facial “motor” nerve of the rat: Control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol* **247**(2): 144–158. doi: 10.1002/cne.902470203
- Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2009. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* **87**(6): 953–961. doi: 10.1139/o09-064
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **22**(8): 3052–3060. doi: 20026249
- Sharma SS, Sayyed SG. 2006. Effects of trolox on nerve dysfunction, thermal hyperalgesia and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(11): 1022–1028. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04481.x
- Shen YJ, DeBellard ME, Salzer JL, Roder J, Filbin MT. 1998. Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol Cell Neurosci* **12**(1–2): 79–91. doi: 10.1006/mcne.1998.0700
- Shetty SP, Copeland PR. 2015. Selenocysteine incorporation: A trump card in the game of mRNA decay. *Biochimie* **114**: 97–101. doi: 10.1016/j.biochi.2015.01.007
- Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. 2007. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun* **359**(4): 915–920. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.212
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K. 2010. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* **127**(10): 2323–2333. doi: 10.1002/ijc.25440
- Siemionow M, Brzezicki G. 2009. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol* **87**: 141–172. doi: 10.1016/S0074-7742(09)87008-6
- Sit S-T, Manser E. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **124**(Pt 5): 679–683. doi: 10.1242/jcs.064964
- Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA. 2019. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**: 6175804. doi: 10.1155/2019/6175804
- Sohn MK, Jee SJ, Hwang SL, Kim Y-J, Shin H-D. 2011. Motor Unit Number Estimation and Motor Unit Action Potential Analysis in Carpal Tunnel Syndrome. *Ann Rehabil Med* **35**(6): 816–825. doi: 10.5535/arm.2011.35.6.816

- Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. 2012. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev* **21**(11): 1852–1862. doi: 10.1089/scd.2011.0403
- Sowa Y, Kishida T, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Tabata Y, Mazda O. 2016. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plast Reconstr Surg* **137**(2): 318e–330e. doi: 10.1097/01.prs.0000475762.86580.36
- Spejo AB, Carvalho JL, Goes AM, Oliveira ALR. 2013. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: synapse stability and axonal regeneration. *Neuroscience* **250**: 715–732. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.043
- Sponholz S, von der Hagen M, Hahn G, Seifert J, Richard P, Stoltenburg-Didinger G, Ferreiro A, Kaindl AM. 2006. Selenoprotein N muscular dystrophy: differential diagnosis for early-onset limited mobility of the spine. *J Child Neurol* **21**(4): 316–320. doi: 10.1177/08830738060210041401
- Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, Philip Malan T. 2011. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* **114**(4): 940–948. doi: 10.1097/ALN.0b013e318210f880
- Steinbrenner H, Speckmann B, Klotz L-O. 2016. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch Biochem Biophys* **595**: 113–119. doi: 10.1016/j.abb.2015.06.024
- Stoll G, Müller HW. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol Zurich Switz* **9**(2): 313–325.
- Sulaiman W, Gordon T. 2013. Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application. *Ochsner J* **13**(1): 100–108.
- Sullivan LB, Chandel NS. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* **2**(1): 17. doi: 10.1186/2049-3002-2-17
- Sun L-H, Pi D-A, Zhao L, Wang X-Y, Zhu L-Y, Qi D-S, Liu Y-L. 2017. Response of Selenium and Selenogenome in Immune Tissues to LPS-Induced Inflammatory Reactions in Pigs. *Biol Trace Elem Res* **177**(1): 90–96. doi: 10.1007/s12011-016-0863-4
- Sunde RA, Raines AM. 2011. Selenium Regulation of the Selenoprotein and Nonselenoprotein Transcriptomes in Rodents. *Adv Nutr* **2**(2): 138–150. Oxford Academic. doi: 10.3945/an.110.000240
- Sunderland S. 1951. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain J Neurol* **74**(4): 491–516. doi: 10.1093/brain/74.4.491
- Sung M-A, Jung HJ, Lee J-W, Lee J-Y, Pang K-M, Yoo SB, Alrashdan MS, Kim S-M, Jahng JW, Lee J-H. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote regeneration of crush-injured rat sciatic nerves. *Neural Regen Res* **7**(26): 2018–2027. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.26.003
- Suslu H, Altun M, Erdivanli B, Turan Suslu H. 2013. Comparison of the effects of local and systemic dexamethasone on the rat traumatic sciatic nerve model. *Turk Neurosurg* **23**(5): 623–629. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.7761-13.0

- Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y. 2011. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization. *Mol Med* **17**(7): 579–587. BioMed Central. doi: 10.2119/molmed.2010.00157
- Swijnenburg R-J, Schrepfer S, Cao F, Pearl JI, Xie X, Connolly AJ, Robbins RC, Wu JC. 2008. In Vivo Imaging of Embryonic Stem Cells Reveals Patterns of Survival and Immune Rejection Following Transplantation. *Stem Cells Dev* **17**(6): 1023–1029. doi: 10.1089/scd.2008.0091
- Szabó A, Mayor R. 2018. Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu Rev Genet* **52**(1): 43–63. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031559
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**(5): 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4): 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, Helms JA, Li S. 2012. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun* **3**: 875. doi: 10.1038/ncomms1867
- Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011a. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**(11): 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246
- Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011b. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**(11): 4322–4335. doi: 10.1210/en.2011-1246
- Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. 2008. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil* **87**(5): 381–385. doi: 10.1097/PHM.0b013e31815e6370
- Teixeira MJ, Almeida DB, Yeng LT, Teixeira MJ, Almeida DB, Yeng LT. 2016. Concept of acute neuropathic pain. The role of nervi nervorum in the distinction between acute nociceptive and neuropathic pain. *Rev Dor* **17**: 5–10. Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. doi: 10.5935/1806-0013.20160038
- Teodori RM, Betini J, de Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Montebelo MI de L. 2011. Swimming Exercise in the Acute or Late Phase after Sciatic Nerve Crush Accelerates Nerve Regeneration. Neural Plasticity. doi: <https://doi.org/10.1155/2011/783901>
- Terzis JK, Papakonstantinou KC. 2000. The surgical treatment of brachial plexus injuries in adults. *Plast Reconstr Surg* **106**(5): 1097–1122; quiz 1123–1124. doi: 10.1097/00006534-200010000-00022
- Tomov TL, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Streppel M, Schraermeyer U, Neiss WF, Angelov DN. 2002. An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of

- vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol* **178**(2): 207–218. doi: 10.1006/exnr.2002.8040
- Tong L, Ji L, Wang Z, Tong X, Zhang L, Sun X. 2010. Differentiation of neural stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **401**(4): 592–597. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.107
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**(6500): 796–799. doi: 10.1038/371796a0
- Trolle C, Ivert P, Hoeber J, Rocamonde-Lago I, Vasylovska S, Lukanidin E, Kozlova EN. 2017. Boundary cap neural crest stem cell transplants contribute Mts1/S100A4-expressing cells in the glial scar. *Regen Med* **12**(4): 339–351. doi: 10.2217/rme-2016-0163
- Trolle C, Konig N, Abrahamsson N, Vasylovska S, Kozlova EN. 2014. Boundary cap neural crest stem cells homotopically implanted to the injured dorsal root transitional zone give rise to different types of neurons and glia in adult rodents. *BMC Neurosci* **15**: 60. doi: 10.1186/1471-2202-15-60
- Tseng K-C, Li H, Clark A, Sundem L, Zuscik M, Noble M, Elfar J. 2016. 4-Aminopyridine promotes functional recovery and remyelination in acute peripheral nerve injury. *EMBO Mol Med* **8**(12): 1409–1420. doi: 10.15252/emmm.201506035
- Turgut M, Uysal A, Pehlivan M, Oktem G, Yurtseven ME. 2005. Assessment of effects of pinealectomy and exogenous melatonin administration on rat sciatic nerve suture repair: an electrophysiological, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Acta Neurochir (Wien)* **147**(1): 67–77; discussion 77. doi: 10.1007/s00701-004-0426-x
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**(Pt 2): 335–344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478
- Uemura T, Ikeda M, Takamatsu K, Yokoi T, Okada M, Nakamura H. 2014. Long-term efficacy and safety outcomes of transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres with bioabsorbable nerve conduits for peripheral nerve regeneration in mice. *Cells Tissues Organs* **200**(1): 78–91. doi: 10.1159/000370322
- Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H. 2012. Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. *Biochem Biophys Res Commun* **419**(1): 130–135. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.154
- Uğuz AC, Nazıroğlu M. 2012. Effects of Selenium on Calcium Signaling and Apoptosis in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Induced by Oxidative Stress. *Neurochem Res* **37**(8): 1631–1638. doi: 10.1007/s11064-012-0758-5
- Valdez JM, Xin L. 2013. The dual nature of Notch in tissue homeostasis and carcinogenesis. *Cell Cycle Georget Tex* **12**(4): 541. doi: 10.4161/cc.23671
- Valencia A, Morán J. 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med* **36**(9): 1112–1125. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.013

- Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF. 2008. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(1): 68–77. doi: 10.1097/NEN.0b013e318160f347
- Valero-Cabré A, Navarro X. 2001. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res* **919**(2): 302–312. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03052-9
- Valero-Cabré A, Navarro X. 2002. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma* **19**(11): 1475–1485. doi: 10.1089/089771502320914705
- Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. 2004. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma* **21**(1): 95–108. doi: 10.1089/089771504772695986
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vaquíe A, Sauvain A, Duman M, Nocera G, Egger B, Meyenhofer F, Falquet L, Bartesaghi L, Chrast R, Lamy CM, et al. 2019. Injured Axons Instruct Schwann Cells to Build Constricting Actin Spheres to Accelerate Axonal Disintegration. *Cell Rep* **27**(11): 3152–3166.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.060
- Veeravalli KK, Dasari VR, Fassett D, Dinh DH, Rao JS. 2011. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells upregulate myelin basic protein in shiverer mice. *Stem Cells Dev* **20**(5): 881–891. doi: 10.1089/scd.2010.0187
- Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, Sanberg PR, Pennypacker KR, Willing AE. 2005. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* **14**(5): 595–604. doi: 10.1089/scd.2005.14.595
- Vermeren M, Maro GS, Bron R, McGonnell IM, Charnay P, Topilko P, Cohen J. 2003. Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron* **37**(3): 403–415. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01188-1
- Vishwakarma A, Rouwkema J, Jones PA, Karp JM. 2017. Chapter 1 - The Need to Study, Mimic, and Target Stem Cell Niches. In: Vishwakarma A, Karp JM, editors. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. Boston: Academic Press. p. 3–13. doi: 10.1016/B978-0-12-802734-9.00001-9
- Viterbo F, Trindade J, Hoshino K, Mazzoni A. 1994. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg* **47**(2): 75–80. doi: 10.1016/0007-1226(94)90162-7
- Wagers AJ, Weissman IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**(5): 639–648. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00208-9
- Wakai T, Sakata H, Narasimhan P, Yoshioka H, Kinouchi H, Chan PH. 2014. Transplantation of neural stem cells that overexpress SOD1 enhances amelioration of intracerebral hemorrhage in

- mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **34**(3): 441–449. doi: 10.1038/jcbfm.2013.215
- Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D, Teramoto N, Ose T, Itokazu Y, Koshino K, Watabe H, et al. 2010. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* **223**(2): 537–547. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.01.022
- Walsh S, Midha R. 2009. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus* **26**(2): E2. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E2
- Wang A, Tang Z, Park I-H, Zhu Y, Patel S, Daley GQ, Li S. 2011. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. *Biomaterials* **32**(22): 5023–5032. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.070
- Wang C, Lu C-F, Peng J, Hu C-D, Wang Y. 2017. Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* **12**(12): 2106–2112. doi: 10.4103/1673-5374.221171
- Wang E, Inaba K, Byerly S, Escamilla D, Cho J, Carey J, Stevanovic M, Ghiassi A, Demetriades D. 2017. Optimal timing for repair of peripheral nerve injuries. *J Trauma Acute Care Surg* **83**(5): 875–881. doi: 10.1097/TA.0000000000001570
- Wang H, Ding X-G, Li S-W, Zheng H, Zheng X-M, Navin S, Li L, Wang X-H. 2015. Role of oxidative stress in surgical cavernous nerve injury in a rat model. *J Neurosci Res* **93**(6): 922–929. doi: 10.1002/jnr.23545
- Wang H, Ni H, Han S, Xu W, Wang J, Yuan B, Zhu T, Jin W, Liang W, Dai J. 2016. The Promotion of Neural Regeneration in A Rat Facial Nerve Crush Injury Model Using Collagen-Binding NT-3. **46**(6): 8.
- Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. 2011. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res* **1383**: 71–80. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.098
- Watanabe Y, Sasaki R, Matsumine H, Yamato M, Okano T. 2014. Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect. *J Tissue Eng Regen Med* **11**(2): 362–374. doi: 10.1002/term.1919
- Watchmaker GP, Mackinnon SE. 1997. Advances in peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* **24**(1): 63–73.
- Weerasuriya A, Mizisin AP. 2011. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **686**: 149–173. doi: 10.1007/978-1-60761-938-3_6
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**(1): 157–168. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81692-x
- Wilkinson DG, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, Charnay P. 1989. Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* **337**(6206): 461–464. doi: 10.1038/337461a0

- Witzel C, Rohde C, Brushart TM. 2005. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol* **485**(3): 183–190. doi: 10.1002/cne.20436
- Wu J, Li P, Shi Y, Fang Y, Zhu Y, Fan F, Pei F, Xia J, Xie M, Hu Q. 2020. Neuroprotective effects of two selenium-containing peptides, TSeMMM and SeMDPGQQ, derived from selenium-enriched rice protein hydrolysates on Pb²⁺-induced oxidative stress in HT22 cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **135**: 110932. doi: 10.1016/j.fct.2019.110932
- Xie A, Wang Y, Zhang L-X, Lou Y-L, Liu Y-X. 2008. Isolation and characterization of human skin-derived precursors. *Cell Res* **18**(1): S110–S110. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/cr.2008.200
- Yan J-G, Zhang L-L, Agresti M, Logiudice J, Yan Y-H, Wang Z, Sanger JR, Matloub HS. 2013. The effect of calcium modulating agents on peripheral nerve recovery after crush. *J Neurosci Methods* **217**(1–2): 54–62. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.04.013
- Ygge J. 1989. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* **478**(1): 193–195. doi: 10.1016/0006-8993(89)91497-2
- Yoboue ED, Sitia R, Simmen T. 2018. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis* **9**(3): 331. doi: 10.1038/s41419-017-0033-4
- Yohn DC, Miles GB, Rafuse VF, Brownstone RM. 2008. Transplanted Mouse Embryonic Stem-Cell-Derived Motoneurons Form Functional Motor Units and Reduce Muscle Atrophy. *J Neurosci* **28**(47): 12409–12418. Society for Neuroscience. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1761-08.2008
- You L, Liu C, Yang Z-J, Li M, Li S. 2014. Prediction of selenoprotein T structure and its response to selenium deficiency in chicken immune organs. *Biol Trace Elem Res* **160**(2): 222–231. doi: 10.1007/s12011-014-0049-x
- Yu H, Kumar SM, Kossenkov AV, Showe L, Xu X. 2010. Stem Cells with Neural Crest Characteristics Derived from the Bulge Region of Cultured Human Hair Follicles. *J Invest Dermatol* **130**(5): 1227–1236. doi: 10.1038/jid.2009.322
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**(5858): 1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526
- Yu S-S, Du J-L. 2017. Selenoprotein S: a therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? *Cardiovasc Diabetol* **16**(1): 101. doi: 10.1186/s12933-017-0585-8
- Zarbaksh S, Bakhtiyari M, Faghihi A, Joghataei MT, Mehdizadeh M, Khoei S, Mansouri K, Yousefi B, Pirhajati V, Moradi F, et al. 2012. The Effects of Schwann and Bone Marrow Stromal Stem Cells on Sciatic Nerve Injury in Rat: A Comparison of Functional Recovery. *Cell J Yakhteh* **14**(1): 39–46.
- Zarbaksh S, Safari M. 2016. Histological Study of Bone Marrow and Umbilical Cord Stromal Cell Transplantation in Regenerating Rat Peripheral Nerve. *CELL J* **17**(4): 10.

- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**(3): 337–349. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x
- Zendedel A, Gharibi Z, Anbari K, Abbaszadeh A, Khayat ZK, Khorramabadi RM, Soleymaninejad M, Gholami M. 2017. Selenium Ameliorate Peripheral Nerve Ischemic-Reperfusion Injury via Decreased TNF- α . *Biol Trace Elem Res* **176**(2): 328–337. doi: 10.1007/s12011-016-0836-7
- Zhang H, Wei YT, Tsang KS, Sun CR, Li J, Huang H, Cui FZ, An YH. 2008. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med* **6**: 67. doi: 10.1186/1479-5876-6-67
- Zhang J, Lineaweaver WC, Oswald T, Chen Zhengrong, Chen Zhongwei, Zhang F. 2004. Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. *J Reconstr Microsurg* **20**(4): 323–327. doi: 10.1055/s-2004-824891
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang L, Johnson D, Johnson JA. 2013. Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury. *Neurobiol Dis* **54**: 329–338. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.003
- Zhang R, Rosen JM. 2018. The role of undifferentiated adipose-derived stem cells in peripheral nerve repair. *Neural Regen Res* **13**(5): 757–763. doi: 10.4103/1673-5374.232457
- Zhao L, Wei X, Ma Z, Feng D, Tu P, Johnstone BH, March KL, Du Y. 2009. Adipose stromal cells-conditional medium protected glutamate-induced CGNs neuronal death by BDNF. *Neurosci Lett* **452**(3): 238–240. doi: 10.1016/j.neulet.2009.01.025
- Zhou D, Cheng H, Liu J, Zhang L. 2017. Establishment of human hair follicle mesenchymal stem cells with overexpressed human hepatocyte growth factor. *Iran J Basic Med Sci* **20**(6): 662–675. doi: 10.22038/IJBMS.2017.8834
- Zhou G, Chang W, Zhou X, Chen Y, Dai F, Anwar A, Yu X. 2020. Nanofibrous Nerve Conduits with Nerve Growth Factors and Bone Marrow Stromal Cells Pre-Cultured in Bioreactors for Peripheral Nerve Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**(14): 16168–16177. American Chemical Society. doi: 10.1021/acsami.0c04191
- Zhou H, Yan Y, Ee X, Hunter DA, Akers WJ, Wood MD, Berezin MY. 2016. Imaging of radicals following injury or acute stress in peripheral nerves with activatable fluorescent probes. *Free Radic Biol Med* **101**: 85–92. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.028
- Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA. 1999. Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* **57**(6): 953–961.
- Zhu H, Li F, Yu W-J, Wang W-J, Li L, Wan L-D, Le Y, Ding W-L. 2010. Effect of Hypoxia/Reoxygenation on Cell Viability and Expression and Secretion of Neurotrophic Factors (NTFs) in Primary Cultured Schwann Cells. *Anat Rec* **293**(5): 865–870. doi: 10.1002/ar.21105

Ziegler L, Grigoryan S, Yang IH, Thakor NV, Goldstein RS. 2011. Efficient Generation of Schwann Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurospheres. *Stem Cell Rev Rep* **7**(2): 394–403. doi: 10.1007/s12015-010-9198-2

Zochodne DW, Levy D. 2005. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr* **51**(3): 255–267.

Zujovic V, Thibaud J, Bachelin C, Vidal M, Coulpier F, Charnay P, Topilko P, Baron-Van Evercooren A. 2010. Boundary cap cells are highly competitive for CNS remyelination: fast migration and efficient differentiation in PNS and CNS myelin-forming cells. *Stem Cells Dayt Ohio* **28**(3): 470–479. doi: 10.1002/stem.290

Zujovic V, Thibaud J, Bachelin C, Vidal M, Deboux C, Coulpier F, Stadler N, Charnay P, Topilko P, Baron-Van Evercooren A. 2011. Boundary cap cells are peripheral nervous system stem cells that can be redirected into central nervous system lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(26): 10714–10719. doi: 10.1073/pnas.1018687108

Annexes

Annexe 1 : AMPK Activation of PGC-1 α /NRF-1-Dependent SELENOT
Gene Transcription Promotes PACAP-Induced Neuroendocrine Cell
Differentiation Through Tolerance to Oxidative Stress



AMPK Activation of PGC-1 α /NRF-1-Dependent SELENOT Gene Transcription Promotes PACAP-Induced Neuroendocrine Cell Differentiation Through Tolerance to Oxidative Stress

Houssni Abid^{1,2} · Dorthe Cartier^{1,2} · Abdallah Hamieh^{1,2} · Anne-Marie François-Bellan³ · Christine Buchares^{1,2} · Hugo Pothion^{1,2} · Destiny-Love Manecka^{1,2} · Jérôme Leprince^{1,2} · Sahil Adriouch^{2,4} · Olivier Boyer^{2,4} · Youssef Anouar^{1,2} · Isabelle Lihmann^{1,2}

Received: 13 July 2018 / Accepted: 13 September 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Several cues including pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), which acts through cAMP stimulation, specify the conversion of sympathoadrenal (SA) precursors toward different cell phenotypes by promoting their survival and differentiation. Selenoprotein T (SELENOT) is a PACAP-stimulated ER oxidoreductase that exerts an essential antioxidant activity and whose up-regulation is associated with SA cell differentiation. In the present study, we investigated the transcriptional cascade elicited by PACAP/cAMP to trigger SELENOT gene transcription during the conversion of PC12 cells from SA progenitor-like cells toward a neuroendocrine phenotype. Unexpectedly, we found that PACAP/cAMP recruits the canonical pathway that regulates mitochondrial function in order to elicit SELENOT gene transcription and the consequent antioxidant response during PC12 cell differentiation. This cascade involves LKB1-mediated AMPK activation in order to stimulate SELENOT gene transcription through the PGC1- α /NRF-1 complex, thus allowing SELENOT to promote PACAP-stimulated neuroendocrine cell survival and differentiation. Our data reveal that a PACAP and cAMP-activated AMPK-PGC-1 α /NRF-1 cascade is critical for the coupling of oxidative stress tolerance, via SELENOT gene expression, and mitochondrial biogenesis in order to achieve PC12 cell differentiation. The data further highlight the essential role of SELENOT in cell metabolism during differentiation.

Keywords cAMP · PGC-1 α · NRF-1 · Mitochondriogenesis · Oxidative stress

Houssni Abid, Dorthe Cartier, Youssef Anouar, and Isabelle Lihmann equally contributed to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1352-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Isabelle Lihmann
isabelle.lihmann@univ-rouen.fr

¹ UNIROUEN, Inserm U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Rouen-Normandie University, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

² Institute for Research and Innovation in Biomedicine, 76000 Rouen, France

³ CNRS UMR 7051, Neurophysiopathol Inst, Aix-Marseille University, 13015 Marseille, France

⁴ UNIROUEN, Inserm U1235, Pathophysiology and Biotherapy of Inflammatory and Autoimmune Diseases, Rouen-Normandie University, 76000 Rouen, France

Introduction

Studies of sympathetic ontogeny have shown that sympathoadrenal (SA) precursors derive from the neural crest and give rise to the two catecholaminergic derivatives, i.e., sympathetic neurons and chromaffin cells [1–3]. Ganglionic sympathetic neurons innervate various organs to control their vital activity, while chromaffin cells are a specialized group of neurons located principally in the adrenal medulla, which are endowed with both neuronal and endocrine features and which release catecholamines in the circulation in stress condition. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), acting through cAMP signaling, plays an important role in this lineage. It is present and active in pre- and post-ganglionic sympathetic neuroblasts and neurons in the embryo and the adult, respectively, and is a major regulator of sympathetic/chromaffin cell activity [4–8]. Like nerve growth factor (NGF), which is instrumental to sympathetic neuron survival

and differentiation, PACAP causes morphological and functional alterations in differentiating PC12 cells [9], a cell line with SA properties initially obtained from a rat adrenal tumor [10] and characterized by electrical excitability, a hallmark of both neuronal and neuroendocrine differentiation [6]. At variance with NGF, PACAP strongly regulates in these cells the expression of the neuroendocrine proteins chromogranins, which are constituents of dense-core secretory granules associated with the capacity to store and release catecholamines [6, 11, 12]. This observation indicates that the PACAP effect confers neuroendocrine properties in the SA lineage. In addition, PACAP but not NGF also up-regulated selenoprotein T (SELENOT) expression, a key oxidoreductase present in the endoplasmic reticulum (ER) [13–15] which is essential at early stages of mouse development [15, 16]. SELENOT is highly expressed in the developing nervous system, and has been shown to exert a potent protective and antioxidant effect in neurons [16–18]. For instance, targeted inactivation of SELENOT in mouse neural precursors led to a reduction of several brain structures during the first postnatal week, which results in a hyperactive behavior at adulthood [16]. A loss of immature neurons is observed in these mice, which is associated with an increase in oxidative stress [16]. In a mouse model of Parkinson's disease, SELENOT depletion in neural precursors resulted in an exacerbated increase in reactive oxygen species (ROS) and neurodegeneration in the nigrostriatal system [15, 16]. In addition to these neuroprotective effects, SELENOT also protects neuroendocrine and endocrine cells from ER and oxidative stresses, and its absence provoked Ca^{2+} store depletion, N-glycosylation defects, misfolded protein accumulation, unfolded protein response activation, and hormone production and secretion defects [13, 14, 18, 19]. Altogether, these observations suggest that stimulated SELENOT gene expression is essential to help neuronal and neuroendocrine cells to cope with ER and oxidative stress in response to high metabolic rate during differentiation and increased functional activity. To decipher the mechanisms underlying SELENOT gene induction, we first identified cis- and trans-acting elements transcriptionally regulating SELENOT expression during PACAP-promoted PC12 cell neuroendocrine differentiation. We found that SELENOT gene expression is governed by a transcriptional network that has been previously associated with mitochondrial function and ROS scavenging [20]. This signaling pathway requires the activation of the adenosine monophosphate (AMP)-dependent kinase (AMPK) and the recruitment of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α)/nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) transcriptional complex to the SELENOT gene promoter. This core signaling mechanism, which controls mitochondrial function and ATP production, would concomitantly allow PC12 cells to maintain redox homeostasis which is essential for their neuroendocrine differentiation upon PACAP stimulation.

Results

SELENOT Is Essential to Cope with Oxidative Stress During Neuroendocrine Cell Differentiation

SELENOT is part of an antioxidant program induced by PACAP during neuroendocrine cell differentiation [13, 18, 21–24]. This ER-resident protein contributes to maintain ER and redox homeostasis thanks to its antioxidant activity conferred by the evolutionary conserved CXXSec sequence, Sec being a selenocystein residue, within a thioredoxin-fold [15, 16]. In line with these previous results, PC12 cells in which SELENOT levels were permanently depleted with a SELENOT shRNA lentiviral vector (65% inhibition, Fig. 1a, b) have increased ROS levels (45% increase; Fig. 1c), as compared to cells expressing a non-specific shRNA. This effect could be specifically rescued, as described before [14], by transiently expressing in the stable SELENOT shRNA-KD (knocked down) PC12 cell line a shRNA-resistant form of SELENOT mRNA including the SECIS sequence necessary for Sec incorporation (Fig. 1d). SELENOT-depleted cells also showed decreased cell viability (47% decrease; Fig. 1e), and this effect was also rescued with the shRNA-resistant form of SELENOT mRNA (Fig. 1f). Strikingly, SELENOT shRNA treatment obliterated PC12 cell differentiation, as evidenced by the impairment of PACAP (100 nM)-induced neuritic processes (Fig. 1g, h). Together, these data show that SELENOT is necessary to maintain redox homeostasis, and that its repression affects PC12 cell survival and differentiation.

The SELENOT Gene Is a NRF-1 Target

In order to understand the mechanisms underlying SELENOT gene transcription during neuroendocrine cell differentiation, PC12 cells were exposed not only to PACAP (100 nM), but also to H_2O_2 (100 μM) used to trigger oxidative stress. Both stimuli generated a quite similar time-response curve for SELENOT gene expression (Fig. 2a, b), suggesting that SELENOT gene transcription is stimulated by PACAP to protect differentiating cells against oxidative stress. Using a comparative genomic approach (multipipmaker.bx.psu.edu/pipmaker), we visualized several regions of conservation within the SELENOT gene 5'-flank sequence (10 kb) cleared from interspread repeats and low complexity sequences (<http://www.repeatmasker.org/>): one in the proximal promoter region and the other around 3500 bp. However, only the former had undergone evolutionary pressure to be conserved between mouse, rat, human, and cow (Fig. 2c; Supplemental Fig. 1), suggesting its importance for SELENOT gene regulation. This region was used to construct three promoter-deletion mutants in order to assess their transcriptional activity in PC12 cells, using a luciferase reporter assay. The constructs encompassing 306 and 159 bp exhibited a significant

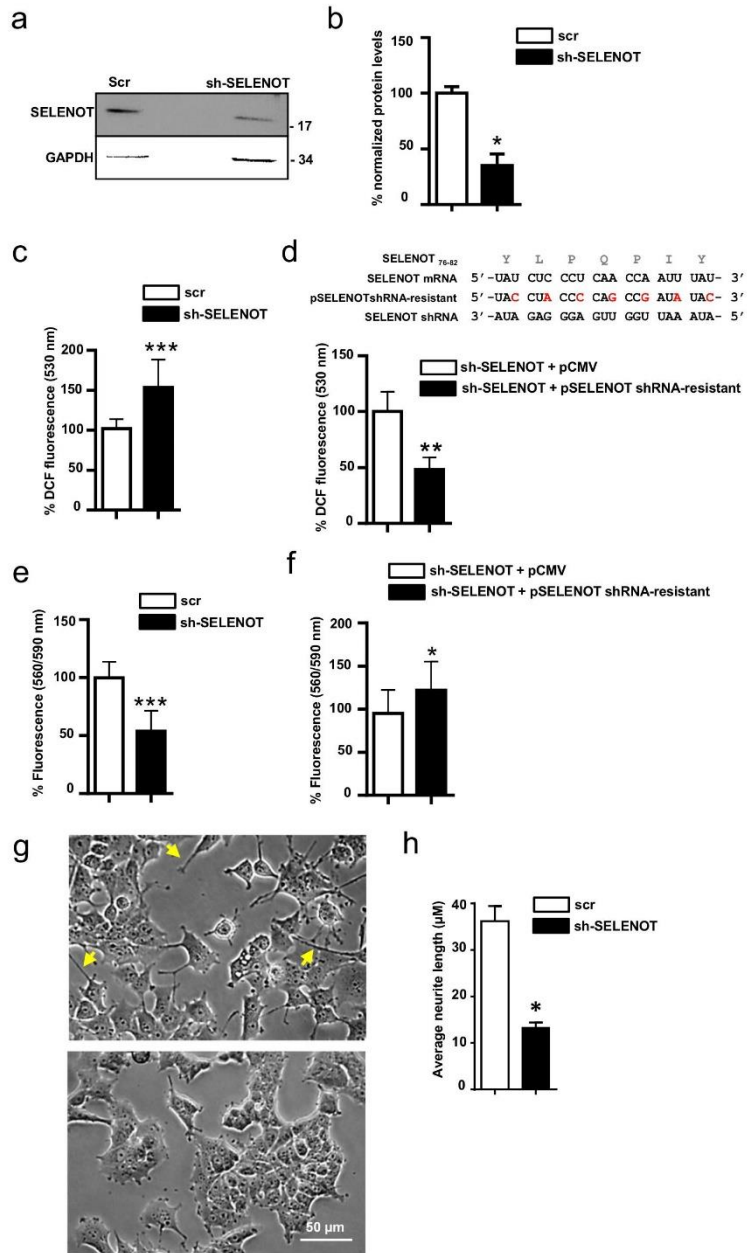


Fig. 1 The SELENOT antioxidant response is essential for PC12 cell survival and differentiation into neuron-like cells. **a, b** Western blot analysis of SELENOT expression in SELENOT shRNA- and control scrambled shRNA-transduced PC12 cells. GAPDH was used as a loading control. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n=4$) ($*P$ value < 0.05 ; Mann-Whitney U test). **c** Transduced PC12 cells expressing SELENOT shRNA or a scrambled shRNA were incubated with the DCFDA probe for 45 min, and the fluorescence of ROS-oxidized DCF probe was measured. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n=8$) ($***P$ value < 0.001 ; Mann-Whitney U test). **d** Analysis of ROS levels in cells expressing the SELENOT shRNA in the absence or presence (rescued) of a recombinant shRNA-resistant form of rat SELENOT mRNA containing the SECIS sequence necessary to direct incorporation of a selenocysteine residue. The empty pCMV vector was used to assess the specificity of the rescue experiment. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n=6$) ($**P$ value < 0.01 ; Mann-Whitney U test). **e** PC12 cell viability was assessed after transduction with SELENOT shRNA or scrambled shRNA. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n=8$) ($***P$ value < 0.001 ; Mann-Whitney U test). **f** Analysis of the viability of cells expressing the SELENOT shRNA in the absence or presence (rescued) of a recombinant shRNA-resistant form of rat SELENOT mRNA containing the SECIS sequence necessary to direct incorporation of a selenocysteine residue. The empty pCMV vector was used to assess the specificity of the rescue experiment. Data are presented as mean (SD) ($n=7$) ($*P$ value < 0.05 ; Wilcoxon test). **g** Transduced PC12 cells expressing SELENOT shRNA or a scrambled shRNA were incubated with PACAP for 48 h and the number of neurites was determined using an inverted Microscope Nikon Eclipse TS100 and ImageJ software. Neurites are indicated with arrows. Data are expressed as mean \pm SEM relative to control ($n=4$ slides) ($*P$ value < 0.05 ; Mann-Whitney U test)

transcriptional activity in PC12 cells (Fig. 2d), but not in Cos7 cells (data not shown), in comparison to the promoterless pGL3-basic vector. Compared to the -159 -bp construction, which presents high luciferase activity, the shorter -64 -bp construct was inactive in PC12 cells, thus indicating that important regulatory regions involved in SELENOT gene expression are included in a short promoter region comprised between positions -159 and -64 bp in the -159 -bp construct (Fig. 2d). Treatment of transfected PC12 cells by 100 nM PACAP for 6 h elicited a significant increase in the activity of the 306- and 159-bp promoter-containing constructs (1.57- and 1.65-fold increase, respectively) (Fig. 2d), but not of the 64-bp construct or the promoterless pGL3-basic plasmid. In agreement with the effect of PACAP through accumulation of cAMP, treatment with the adenylate cyclase activator forskolin (50 μ M) for 6 h also stimulated the transcriptional activity of the constructs bearing the 306- and 159-bp cis-acting fragments (not shown). To identify putative protein binding sites in the proximal region of the SELENOT gene, we analyzed in silico the DNA sequence comprised between -159 and -64 bp using the MatInspector program (<http://www.genomatix.de/>). Exploring the degree of evolutionary conservation of putative transcription factor binding sites in the SELENOT gene promoter from different species revealed that only cis-elements known as NRF-1 binding sites, denoted NRF-1 A, B, and C, were conserved between species (Fig. 2e). NRF-1 is a

basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor that activates the expression of nuclear genes essential for mitochondrial biogenesis and function, and some key metabolic genes regulating cellular growth [25, 26]. A mutation introduced in each of the three NRF-1 sites (Fig. 2f, upper panel) reduced the reporter activity in basal condition by at least 50% (Fig. 2f, lower panel), and abolished the PACAP (100 nM)- and forskolin (50 μ M)-induced SELENOT gene-promoter transcriptional activity. Noteworthy, NRF-1-C binding site showing the highest interspecies conservation (Fig. 2e) is also the most important for SELENOT promoter activity, which is reduced by 85–90% upon NRF-1-C mutation (Fig. 2f, g). Its mutation also abolished H₂O₂ (100 μ M)-induced SELENOT promoter-driven luciferase activity (Fig. 2g), further confirming the similarity of the mechanisms triggered by PACAP stimulation and oxidative stress to regulate SELENOT gene transcription. To determine whether NRF-1 associates with and regulates the SELENOT gene promoter in living PC12 cells, chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was carried out. As shown in Fig. 2h, an antibody directed against NRF-1 precipitated SELENOT gene promoter fragments from PC12 cells with a 191-fold enrichment factor compared to a non-specific control antibody ($F_{1,4} = 3251$). An enrichment of comparable magnitude (174-fold enrichment compared to the non-specific control antibody, $F_{1,4} = 160.5$) was found when the rabbit polyclonal antibody against NRF-1 was used to precipitate known NRF-1 target gene promoters, namely calmodulin 3 (Calm3) promoter (Fig. 2h) and ornithine decarboxylase 1 promoter (data not shown) [27]. By contrast, the same antibody did not precipitate the non-target glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) gene promoter ($F_{1,4} = 6.821$). When PC12 cells were treated with PACAP (100 nM, 6 h), a greater enrichment in SELENOT promoter fragments was obtained after DNA precipitation with the anti-NRF-1 antibody ($F_{1,4} = 57.46$; Fig. 2i). This was the case neither for Calm3 ($F_{1,4} = 1.417$; Fig. 2i) nor for GAPDH promoters ($F_{1,4} = 0.313$, data not shown). In accordance, the ratio of nuclear to cytosolic NRF-1 was 1.61 ± 0.196 in basal condition, and 3.23 ± 0.242 in PC12 cells treated with PACAP, thus showing that PACAP induces a 2-fold increase in NRF-1 nuclear translocation (Fig. 2j). These results indicate that NRF-1 binds to the SELENOT gene promoter in living PC12 cells, that PACAP treatment enhances the amount of NRF-1 bound to this promoter, and that NRF-1 is indispensable to increase SELENOT gene transcription in response to PACAP, forskolin, and oxidative stress signaling

PGC-1 α Binds to NRF-1 to Co-activate SELENOT Gene Transcription

PGC-1 α is a transcriptional coactivator that plays a major integrative function in orchestrating a genetic program of mitochondrial biogenesis via a NRF-1-dependent pathway [26, 28,

Fig. 2 The SELENOT gene is a NRF-1 target. **a, b** Time-dependent effect of PACAP (100 nM) (**a**) and H₂O₂ (100 μM) (**b**) on SELENOT mRNA levels. Data are presented as mean ± SEM relative to control ($n = 3-6$) (* P value < 0.05; ** P value < 0.01, *** P value < 0.001; Mann-Whitney U test). **c** MultiPipMaker analysis of sequences flanking the SELENOT gene in different species. In this diagram, the 5'-region (from 0 to 10,000 bp) flanking mouse SELENOT gene was compared with orthologous sequences obtained from different mammalian and non-mammalian species. Percent identity (50–100%) is shown on y-axis. Distance from the transcription start site (0 K) is shown below the sequence identity plots. Exon 1 is marked above the sequence identity plot with a black box. MultiPipMaker was performed at <http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/multipipmaker>. Mouse: (gb|AC119873.38); rat: (Ensembl Rnor_5.0 (GCA_000001895.3), human: (gb|AC069236.27); cow: (Ensembl UMD 3.1); chicken: (Ensembl Galgal4). **d** Sequential deletion constructs of the 306-bp SELENOT promoter were generated and tested for their ability to drive luciferase activity from the pGL3-Basic vector in control and PACAP (100 nM)-treated cells for 6 h. Results are presented as firefly luciferase/renilla luciferase ratio. Each value is the mean ± SEM ($n = 3-10$) (* P value < 0.05, Mann-Whitney U test). **e** In silico alignment of the 5'-proximal regions of the mouse, rat, and human SELENOT promoters. Putative NRF-1 binding sites termed NRF-1 A–C are indicated by open squares (the green box in NRF-1C displayed the highest bioinformatic score). Interspecies nucleotide conservation is indicated by asterisks. The putative transcription start in the 5'-UTR is marked by the arrow. **f** Three constructs with mutations in the NRF-1 consensus binding sites of the pGL3-SELENOT-159 bp vector were generated and tested for their ability to drive luciferase activity. PACAP (100 nM) and forskolin (50 μM) effects were assessed after a 6-h treatment of PC12 cells. The sequences of the consensus and mutant NRF-1 oligonucleotides are indicated in the upper panel. The core NRF-1 binding site is underlined, and inactivating mutations in the core consensus are depicted in bold. In the lower panel, point mutations of the identified NRF-1 sites (black boxes) are indicated by X. Each value is the mean ± SEM ($n = 4-8$) (* P value < 0.05; ** P value < 0.01, Mann-Whitney U test). **g** The construct with a mutation in the NRF-1-C consensus binding site in the pGL3-SELENOT-159 bp vector was tested for its ability to drive luciferase activity after a treatment with 100 μM H₂O₂. Each value is the mean ± SEM ($n = 4$) (* P value < 0.05, Mann-Whitney U test). **h, i** ChIP analysis of the interaction of endogenous NRF-1 with the rat SELENOT promoter in control conditions or in the presence of PACAP 100 nM for 6 h. Calm3 and Gapdh promoters were used as positive and negative controls, respectively. Data are presented as mean ± SEM relative to control ($n = 3$) (* P value < 0.05; ** P value < 0.01; *** P value < 0.001, two-way ANOVA). **j, k** Immunocytochemical analysis showing the nuclear translocation of NRF-1 in PC12 cells incubated with PACAP (100 nM) for 2 h. The ratio of fluorescence intensity in the nuclei to that in the cytoplasm were calculated from confocal Z stack images shown in Fig. 2j, by drawing regions of interest around several nuclei and the cytoplasm using PhotoFilter Studio X and ImageJ. Data are presented as mean ± SEM relative to control ($n = 14-17$) (*** P value < 0.001, Mann-Whitney U test)

29]. Since it is a powerful regulator of ROS metabolism as well [26, 30], we examined the possibility that the PGC-1 α is required for SELENOT gene expression. We found that PACAP increases PGC-1 α gene expression after 2 h of treatment, with a maximal effect (6.2-fold) observed at 4 h and a decrease to nearly basal level after 6 h of treatment (Fig. 3a). PGC-1 α protein levels were maximally increased at 6 h (2.97-fold) of treatment with PACAP (Fig. 3b, c). A siRNA targeting PGC-1 α (Fig. 3d) strongly reduced (73%) the PACAP-induced

SELENOT gene expression (Fig. 3e). In addition, immunoprecipitation experiments using NRF-1 antibodies revealed that PGC-1 α and NRF-1 do interact in both undifferentiated and PACAP-differentiated PC12 cells (Fig. 3f). Further supporting a functional NRF-1/PGC-1 α interaction, we showed that forskolin (50 μM), used to mimic the PACAP effect, induces well-known PGC-1 α /NRF-1 target genes such as Tfam, which controls mitochondrial DNA replication and transcription, and CytC, encoding an essential component of the electron transport chain [28, 31] (Fig. 3g). Concurrently, PACAP increased by ~30% mitochondrial DNA and biomass (Fig. 3h, i). Taken together, these data indicate that SELENOT gene transcription is PGC-1 α -dependent, and that increased levels of PGC-1 α /NRF-1 complexes concomitantly stimulate mitochondrial biogenesis and SELENOT gene transcription.

AMPK Activation Promotes SELENOT Gene Expression and PC12 Cell Differentiation

We next sought to elucidate the mechanisms by which PACAP stimulates SELENOT gene expression upstream of PGC-1 α during PC12 cell differentiation. Two kinases, p38MAPK and AMP-activated protein kinase (AMPK), are known to control PGC-1 α phosphorylation [32, 33]. Inhibition of p38 MAPK using SB203580 (10 μM) did not alter PACAP-induced SELENOT gene expression, while a specific AMPK inhibitor, Compound C (CC, 5 μM), reduced by ~60% the PACAP effect (Fig. 4a). Since SELENOT gene expression is linked to a high metabolic rate in endocrine cells [14], we focused on AMPK, a key metabolic rheostat activated in response to a low cellular energy charge [34–36], which adjusts NRF-1 binding activity, cytochrome c content, and mitochondrial density [37]. siRNA-mediated knock-down of AMPK α provoked a 40% reduction in both protein (Fig. 4b) and mRNA (Fig. 4c) levels, leading to a 40% reduction in PACAP-induced SELENOT mRNA levels (Fig. 4d). Also, incubation with PACAP for different times (5–60 min) stimulated the phosphorylation of Thr172 within AMPK α (1.55-fold after 15 min), while total AMPK α protein levels were unchanged (Fig. 4e, f). In addition, AMPK activation was able to trigger SELENOT expression since treatment of PC12 cells with 0.5 mM 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR), an analog of AMP, increased in a time-dependent manner SELENOT protein levels up to 30% (Fig. 4g, h). AICAR also elicited an increase in PGC-1 α protein levels, with a maximum (2-fold) at 24 h (Fig. 4g, h). Like PACAP, AICAR was able to trigger the differentiation of PC12 cells which showed prominent neuritic extensions after a 24-h treatment (Fig. 4i, j). We further dissected the upstream cascade leading to PACAP-stimulated AMPK phosphorylation. AMPK can be activated by upstream AMPK kinases (AMPKK) comprising calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CAMKK β) and liver kinase B1 (LKB1) [38]. A selective inhibitor of CAMKK β , STO-609 (10 μM), did not alter the PACAP-stimulated SELENOT gene

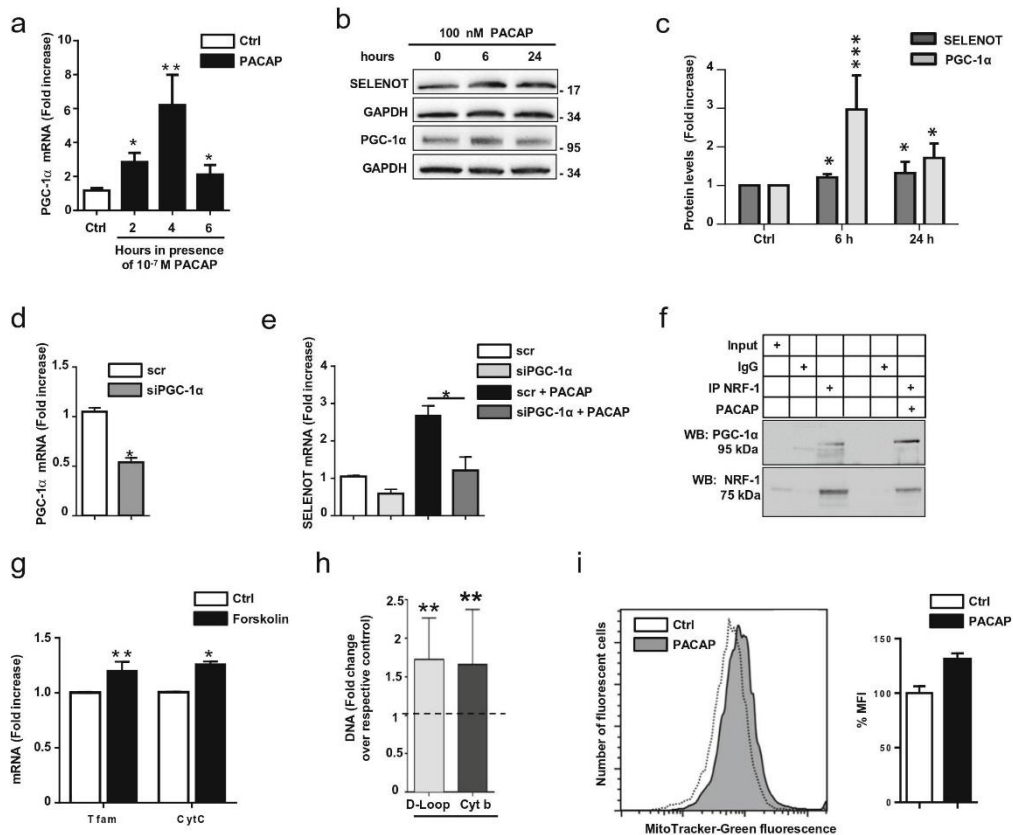


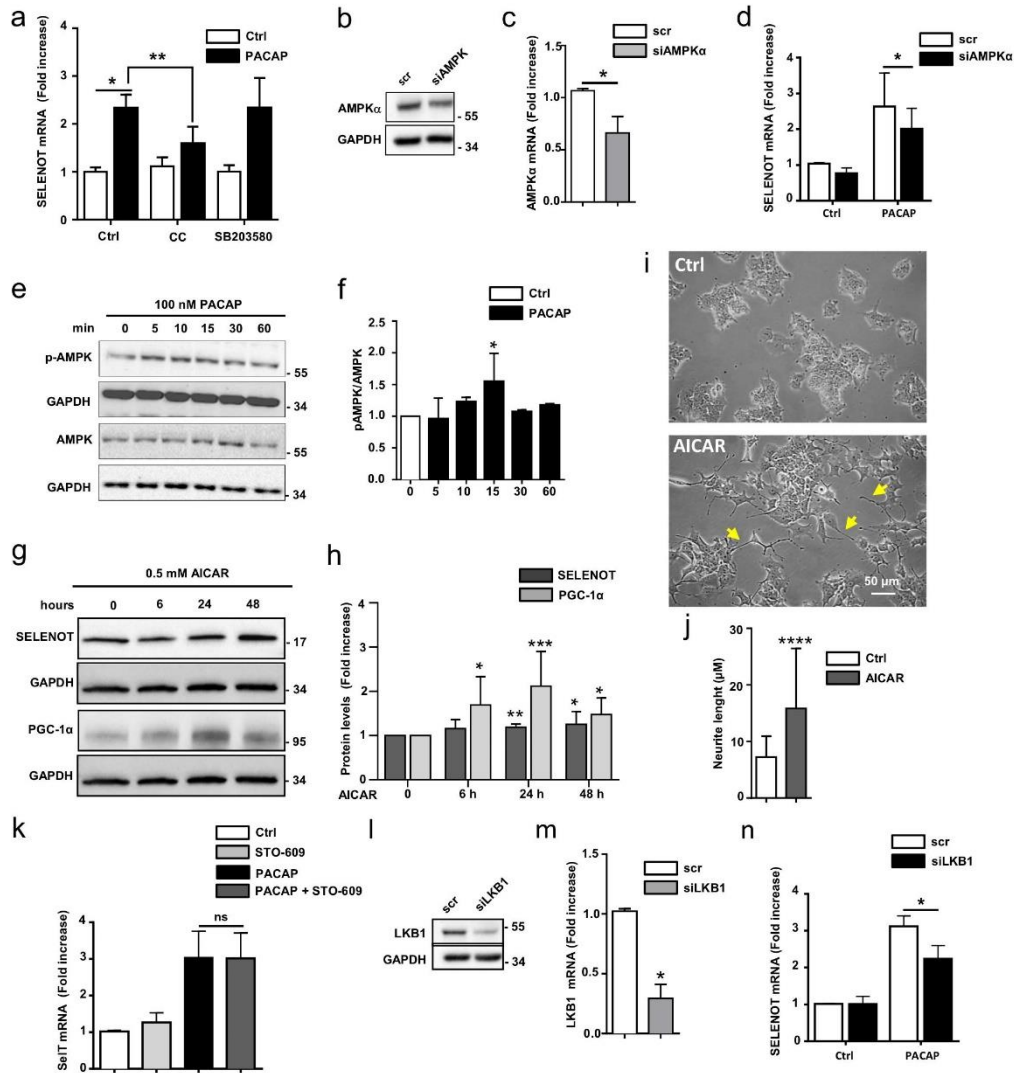
Fig. 3 PGC-1 α binds to NRF-1 and is essential to co-activate SELENOT gene transcription. **a** qRT-PCR analysis showing the time-dependent effect of PACAP (100 nM) on PGC-1 α mRNA levels. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 3-5$) (* P value < 0.05 ; ** P value < 0.01 , Mann-Whitney U test). **b, c** Western blot analysis of the time-dependent effect of PACAP (100 nM) on SELENOT and PGC-1 α expression. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 5-7$) (* P value < 0.05 ; *** P value < 0.001 , Dunn's multiple comparisons test). **d** Effect of PGC-1 α knockdown on PGC-1 α levels. A scrambled RNA was used as a control to assess the specificity of the interference strategy. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 4$) (* P value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **e** Effect of PGC-1 α knockdown on SELENOT gene expression after a treatment with PACAP (100 nM) for 6 h. A scrambled RNA was used as a control to assess the specificity of the interference strategy. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 5$) (* P

value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **f** Co-immunoprecipitation analysis of NRF-1 and PGC-1 α interaction in PC12 cells in basal conditions and after a treatment with PACAP (100 nM) for 6 h. IgG, non-specific control antibody. **g** qRT-PCR analysis showing the effect of forskolin (50 μ M, 6 h) on Tfam and CytC gene expression ($n = 3-6$). (* P value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **h** mtDNA copy number was assessed after a treatment with PACAP (100 nM) for 72 h as the ratio of mitochondria-encoded cytochrome b (Cyt b) and D-loop DNA copies to nucleus-encoded pyruvate kinase DNA copies via qPCR. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 5$) (** P value < 0.01 , Mann-Whitney U test). **i** Analysis by flow cytometry of the fluorescence of PC12 cells stained with MTG for 30 min, treated or not with PACAP (100 nM) for 72 h, and analyzed by flow cytometry. Graph illustrating a typical response. Data are presented as mean \pm SEM

expression (Fig. 4k), thus ruling out an effect of CAMKK in this cascade. In contrast, silencing LKB1 expression (80% of control, Fig. 4l, m) through siRNA treatment reduced by 40% PACAP-induced SELENOT gene expression (Fig. 4n), indicating that LKB1 participates, at least partially, in this signaling cascade.

Discussion

It has been shown that a major limitation in cell reprogramming efficiency is cell death at a check point before conversion, which could be overcome by antioxidant



treatments [39]. Indeed, nerve cell differentiation, or transdifferentiation, requires several biological events including cell growth arrest, cell survival, neurogenesis, and acquisition of functional characteristics, processes involving oxidative metabolism changes ineluctably resulting in high ROS production. PACAP is a potent PC12 cell neurogenic reprogramming factor [40–43], whose trophic effect is associated to its antioxidant action [13, 21–24]. Using the PACAP-regulated gene encoding SELENOT, a key antioxidant protein

[15, 16], we uncovered here an unprecedentedly described transcriptional network, which converges on the transcription factor NRF-1, and couples AMPK with SELENOT antioxidant response during PC12 cell reprogramming toward a neuroendocrine phenotype. Thus, in addition to the canonical PKA signaling pathway which exerts a prosurvival role in PC12 cells [4, 5, 44, 45], we found here that PACAP-induced PC12 cell differentiation also involves AMPK activation. The AMPK-activated pathway, which is the canonical

Fig. 4 AMPK activation promotes SELENOT gene expression and PC12 cell neuronal differentiation. **a** qRT-PCR analysis showing the effect of PACAP (100 nM) on SELENOT mRNA levels in the presence of SB203580 and compound C (CC). Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 4-8$) (* P value < 0.05 ; ** P value < 0.01 , Mann-Whitney U test). **b** Effect of AMPK α knockdown on AMPK α gene expression. A scrambled siRNA has been used as a control. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 4$) (* P value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **c** Effect of AMPK α knockdown on SELENOT gene expression in PC12 cells treated by PACAP (100 nM) for 6 h. A scrambled siRNA has been used as a control. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 5$) (* P value < 0.05 , two-way ANOVA). **e, f** Comparison of the levels of AMPK α protein phosphorylated at Thr¹⁷² with total levels of AMPK α protein in PC12 cells treated 5–60 min with vehicle or PACAP (100 nM). Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 3-5$) (* P value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **g, h** Western blot analysis of the time-dependent effect of AICAR (0.5 mM) on SELENOT and PGC-1 α protein levels. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 3-7$) (* P value < 0.05 ; ** P value < 0.01 ; *** P value < 0.001 , one-way ANOVA). **i, j** PC12 cells were incubated with AICAR for 24 h. **i** Neurite formation was observed on an inverted Microscope Nikon Eclipse TS100. **j** Neurite length was quantified. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n > 30$) (**** P value < 0.0001 , one-way ANOVA). **k** qRT-PCR analysis of the effect of STO-609, a CAMKK inhibitor, on SELENOT gene expression. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 5$). ns; non-specific. **l, m** Effect of LKB1 knockdown on LKB1 protein (**l**) and mRNA (**m**) expression. A scrambled siRNA has been used as a control. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 4$) (* P value < 0.05 , Mann-Whitney U test). **n** Effect of LKB1 knockdown on SELENOT gene expression in the absence or presence of PACAP 100 nM for 6 h. A scrambled siRNA has been used as a control. Data are presented as mean \pm SEM relative to control ($n = 4$) (* P value < 0.05 , two-way ANOVA)

signaling route to stimulate mitochondrial biogenesis, would also trigger a SELENOT-mediated antioxidant response, thus allowing PC12 cells to negotiate the metabolic changes and progress through neuroendocrine differentiation.

The intervention of AMPK in the antioxidant signaling cascade, in addition to the increase in mitochondrial biomass, supports the idea that there is a major metabolic change during PACAP-induced conversion of PC12 cells into neuroendocrine-like cells. AMPK is a key energy-sensing kinase and the guardian of energy homeostasis, which is thought to reduce protein synthesis and cell growth pathways that consume ATP, while activating carbohydrate and fatty acid oxidation to restore ATP levels [34, 46, 47]. It reprograms cellular metabolism through phosphorylation of numerous target proteins, including PGC-1 α . AMPK is generally activated in response to a low cellular energy charge [35] and is also a metabolic target of GPCRs, in particular Gs-coupled receptors positively linked to adenylate cyclase, such as β adrenoreceptors in adipocytes or the heart, and melanocortin receptors in the hypothalamus [38]. We provide herein the first evidence that AMPK is also activated by the PAC1/Gs-coupled receptor during neuroendocrine cell survival and differentiation, in agreement with previous reports showing a role of AMPK in the preservation of neuronal integrity [48–52]. For example, the AMPK/NRF-1 cascade has been proposed to contribute to mitochondrial biogenesis and ischemic tolerance in neurons [53].

AMPK also limits oxidative stress and protects against the toxicity of β -amyloid peptides in Alzheimer's disease [54], as well as the toxicity of mutant huntingtin [55] and that of α -synuclein [50]. In PC12 cells, AMPK protects against stress-induced apoptosis [56]. The underlying mechanism of the AMPK neuroprotective effect is poorly documented. In skeletal muscle, it has been shown that AMPK regulates NRF-1 binding activity, cytochrome c content, and mitochondrial density during exercise training or chronic energy deprivation [37]. Our study now demonstrates that AMPK, through a PGC-1 α /NRF-1 cascade, concurrently stimulates mitochondrial function and the antioxidant SELENOT during nerve cell conversion as shown using PC12 cells as a model. AMPK activation via AICAR treatment also stimulates neurogenesis in PC12 cells, as described previously in neurons [51], indicating that the dual action of this kinase to increase cell metabolism and eliminate oxidative stress allows the successful achievement of differentiation in nerve cells.

Our study also showed that NRF-1, a bZIP transcription factor which activates the expression of nuclear genes essential for mitochondrial biogenesis and function, and some key metabolic genes regulating cellular growth [25, 57], is also involved in the control of the essential SELENOT gene. Although large scale studies have been previously performed to identify NRF-1 target genes, based on bioinformatics and ChIP-seq analysis [25, 27, 58], SELENOT was not described as a NRF-1 target gene until now. In fact, many genes encoding detoxifying, antioxidant, and glutathione-biosynthetic and metabolic enzymes are under the control of Nrf2 which binds to the ARE cis-acting sequence, thus constituting the Nrf2 regulon [59], but a role of NRF-1 in the antioxidant defense strategy has been poorly documented as yet, except for the regulation of peroxiredoxin 3 and 5 genes [60]. NRF-1 binding sites are also present in the gene encoding bcl-2 [27], which affects the reprogramming and speed of neuron conversion through an antioxidant mechanism, independently of its canonical apoptotic function [39]. Also of note, several neurodegenerative disease-related genes linked to Parkinson and Alzheimer diseases [25] are putative NRF-1 targets as evidenced by Chip-seq analysis, such as the DJ-1 gene which is known for its antioxidant function in neurons [61]. Several other observations reinforce the idea that SELENOT is a key NRF-1 target gene. For instance, SELENOT gene knock-out [15] phenocopies NRF-1 gene abrogation in mice [62]. Both mutated mouse strains die at the time of embryo implantation. Mitochondrial DNA instability has been observed in NRF-1 null mice, but in comparison with Tfam-null mice, it has been proposed that mitochondrial dysfunction could not fully explain the early death of NRF-1-depleted mice [63], indicating that there are probably other vital NRF-1 targets such as SELENOT. In *Drosophila* and Zebrafish, disruption of NRF-1 orthologs leads to a severe neurological deficiency [64, 65]. NRF-1 null zebrafish are characterized by neuronal death and a marked brain size reduction [64], a phenotype which is reminiscent of that obtained in mice with SELENOT gene obliteration in

neuronal precursors [16, 18, 64]. Furthermore, NRF-1 activation stimulates neurite outgrowth [66], and SELENOT gene deficiency abrogates neurite outgrowth (this study). Altogether, these data show that NRF-1, in addition to its major role in mitochondrial biogenesis [25, 26, 67], is also able to trigger the antioxidant system during neural cell differentiation or reprogramming as observed here in PACAP-treated PC12 cells.

LKB1 is at least partially required for AMPK activation in PACAP-stimulated PC12 cells (this study) like in cortical neurons, although CaMKK β is also frequently described as a major effector of AMPK in neurons [51, 68]. The functional link between the PAC1 receptor and LKB1 is not known yet. The presence of a PKA phosphorylation site at Ser⁴³¹ of LKB1 [69] suggests that the PAC1-cAMP-PKA pathway [4, 5, 44, 70–73] might promote LKB1 activation. However, in a previous study the use of H-89, a PKA inhibitor, only partially inhibited PACAP-induced SELENOT gene expression [13], suggesting the existence of multiple signaling pathways leading to stimulation of SELENOT gene transcription in response to PACAP. In agreement, it is well established that neuritogenesis is cAMP-, Rap-1-, and ERK-dependent and requires the neuritogenic cAMP sensor Rapgef2, but is PKA-independent [4, 74], arguing again for the existence of alternative pathways activated by PACAP that remains to be fully elucidated.

Based on the data reported in the present study, we propose a model (Fig. 5) depicting the linear pathway involving LKB1, AMPK, PGC-1 α , and NRF-1 by which a neurogenic factor like PACAP connects mitochondrial biogenesis and an adaptive antioxidant response involving SELENOT. Using this signaling mechanism, PC12 cells can negotiate the metabolic changes necessary to avoid their demise, and achieve a successful PACAP-induced neuroendocrine differentiation. Our data are thus in line with a recent study showing that limiting oxidative stress allows cells to cross a metabolic checkpoint and to undergo neuronal reprogramming [39].

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

The 38-amino acid form of PACAP (PACAP-38) was obtained from Bachem (Merck Chimie, Fontenay-sous-Bois). Forskolin and STO-609 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and SB-203580, compound C, and AICAR from Abcam (Cambridge, UK).

Antibodies

Antibodies against phospho-AMPK α (p-AMPK α ; Thr¹⁷²) and AMPK α were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). A polyclonal SELENOT antibody was obtained from Acris Antibodies

GmbH (Herford, Germany), a mouse monoclonal anti-GAPDH from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), and a mouse anti- α -Tubulin from Sigma-Aldrich. A polyclonal antibody against PGC-1 α and a monoclonal NRF-1 antibody were acquired from Abcam.

Cell Culture and Treatments

PC12 cells were purchased from the European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) and maintained in Dulbecco's modified eagle medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% horse serum (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), 5% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, France), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was renewed every 2–3 days. PC12 cells were plated in six-well plates and were treated with 100 nM PACAP, 50 μ M forskolin, 100 μ M H₂O₂, or 0.5 mM AICAR before harvesting. Inhibitors were added 1 h before and during the 24-h treatment with PACAP. siRNA transfection was carried out using the Amaxa Nucleofactor system (Lonza). RNA isolation and protein extraction were carried out 48 and 72 h later in order to quantify the knockdown efficiency by qPCR and western blotting, respectively.

Production and Transduction of Lentivirus

The lentiviral constructs containing a shRNA (5'- UAU CUC CCU CAA CCA AUU UA -3') targeting rat SELENOT or a scrambled control shRNA (5'-GAG AAC GAG UCA CUU CACUAU-3') were generated in the VIRHD-EP vector [75]. The constructs were sequence-verified. HEK-293T cells were co-transfected using polyethyleneimine (Polysciences, Eppelheim, Germany) with the shRNA lentiviral vector along with pCMVdr8.74 (packaging) and pMD2.G (envelope) plasmids. Two days after transfection, the conditioned media were collected, supplemented with 8 μ g/ml polybrene, and added for overnight incubation to freshly plated PC12 cells for transduction. Two days after infection, the cells were selected in 1 μ g/ml puromycin.

Measurement of Cell Viability and Intracellular ROS Levels

The number of viable cells was determined using the CellTiter-Blue® cell viability assay (Promega, Charbonnières les Bains, France) and the levels of intracellular ROS were measured by using DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (Abcam) following the manufacturer instructions. The fluorescence of ROS-oxidized 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured at 530 nm. For the SELENOT rescue experiment, the pCMV vector containing the rat SELENOT cDNA mutated in the SELENOT shRNA recognition sequence was electroporated

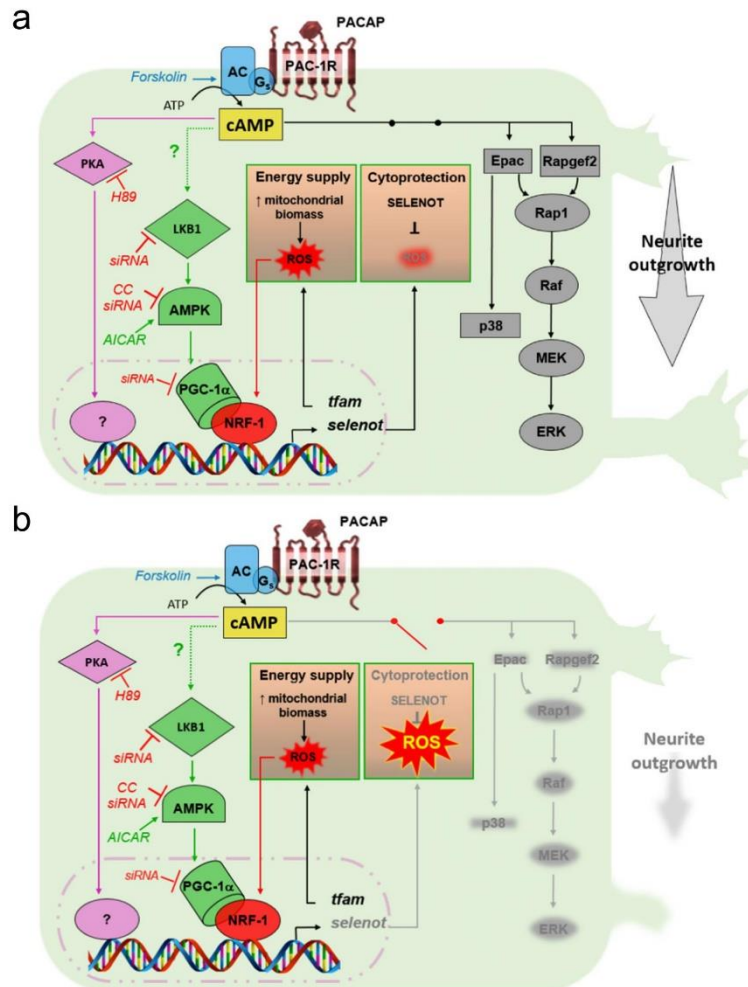


Fig. 5 Schematic representation summarizing how the LKB1/AMPK/PGC-1 α /NRF-1 signaling cascade connects metabolic changes and SELENOT antioxidant response during PACAP-induced PC12 cell neuroendocrine differentiation. **a** Elevation of cAMP following PAC1 receptor activation leads to activation of at least three cAMP sensors (PKA, Epac, and Rapgef2) all involved in some aspects of PC12 cell differentiation. In addition, the neurogenic PACAP/PAC1 system triggers PC12 cell differentiation through activation of phosphorylation cascades involving LKB1, AMPK, PGC-1 α , and NRF-1 as the downstream effector. On one side, PGC-1 α in association with NRF-1 orchestrates the transcriptional stimulation of mitochondrial genes, ultimately leading to an

increase in mitochondrial biomass, which is associated with ROS production and toxicity. On the other side, the PGC-1 α /NRF-1 complex also activates the gene transcription of SELENOT which plays an important role in ROS detoxification and cytoprotection. Using this mechanism, PC12 cells can negotiate the metabolic change elicited by PACAP, avoiding death and achieving neuronal differentiation through activation of other cAMP sensors, such as Epac, and Rapgef2, both involved in neurogenesis and other differentiation hallmarks. **b** Cytoprotection is failing in cells that lack SELENOT and ROS levels become toxic and prevent progression to other stages of differentiation

in stably SELENOT shRNA-expressing PC12 cells using the Amara Nucleofactor system (Lonza, Basel, Switzerland). ROS

levels were measured 48 h later as described above. The empty pCMV vector was used to assess the rescue specificity.

Analysis and Cloning of the SELENOT Gene Promoter

SELENOT gene upstream sequences (up to 10 kb) from different species (human, mouse, rat, cattle, chicken) were extracted from genomic databases (<http://www.ensembl.org/>), and interspersed repeats were masked with RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>). Alignment of the resulting DNA sequences using Multipipmaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>) revealed that the sequence conservation was maximal within a single short region (~300 bp) located upstream of the predicted transcription start site (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>). This region, with 37 nt from exon 1, was amplified by PCR from mouse tail genomic DNA (Supplementary Table S1). The PCR product was cloned in the pGL3-basic vector (Promega), placing the luc+ gene under the control of the SELENOT promoter (pGL3-SELENOT-306 vector). Two shorter SELENOT promoter fragments of 159 (pGL3-SELENOT-159) and 64 bp (pGL3-SELENOT-64) were amplified by PCR and cloned into the pGL3-Basic vector. Introduction of point mutations in the NRF-1 consensus sites was performed with the QuikChange II XL Site directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France) according to the instructions of the manufacturer. All constructs were verified by DNA sequencing (Beckman CEQ 8000/DNA Sequencer System, Beckman Coulter, Villepinte, France). Three putative NRF-1 binding sites were point-mutated on both sides of the palindromic binding site using appropriate primers (Supplementary Table S1).

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from PC12 cells using the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Contaminating genomic DNA was removed by DNase I treatment, and 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using the ImPromII™ Reverse-Transcription system (Promega). Real-time PCR was performed on the resulting cDNA using the Power SYBR Green® Master Mix (Life Technologies SAS, Division Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France) in the presence of 300 nM specific primers. Reactions were carried out using the ABI prism 7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies SAS). All the results have been normalized using the Gapdh gene used as a reference. Data analysis was carried out using the 2^{-(ΔΔC_T)} method (2^{-Δ(ΔC_T)}) and the results were presented as mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments, performed in triplicates. Primers used in this study are described in Supplementary Table S1.

Luciferase Assays

PC12 cells, grown in culture flasks until 80% confluency, were transiently co-transfected using the Amara Nucleofactor system (Lonza) with the SELENOT/firefly luciferase reporter constructs (pGL3-SELENOT plasmids) and the renilla luciferase control reporter. After cell lysis, luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luminiscence was measured with a FlexstationIII⁹⁶ fluorescence plate reader system (Molecular Devices, Saint-Grégoire, France). Results were obtained from at least three independent experiments performed in duplicate.

Chromatin Immunoprecipitation

PC12 cells, in basal conditions or after a treatment with PACAP (100 nM) for 6 h, were fixed 10 min at room temperature by 1% formaldehyde solution to crosslink DNA and proteins. After addition of glycine (0.25 M final concentration) to quench the crosslinking reaction and washing, the cells were resuspended in Tris-EDTA buffer containing protease inhibitors and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Chromatin samples were sheared for 8 cycles of 30 s ON/30 s OFF with the Bioruptor® Pico apparatus (Diagenode, Paris, France) to obtain DNA fragments with an average size of 500 bp. ChIP experiments were performed using a previously described procedure [76] with a rabbit polyclonal anti-NRF-1 antibody ChIP Grade (Abcam) or the non-specific control rabbit polyclonal anti-furin antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Immunohistochemistry

Immunocytochemistry was carried out on PC12 cells cultured in 12-well plates for 24 h and then treated with PACAP for 2 h. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. A saturation step (1 h at room temperature) was performed with 1% normal goat serum diluted in a PBS solution containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100, prior to overnight incubation with the mouse monoclonal NRF-1 primary antibody (1:2000) at 4 °C. An Alexa-conjugated goat anti-mouse (1:100) antibody (Invitrogen) was used as secondary antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were examined with a Leica SP2 upright confocal laser scanning microscope (DMRAX-UV) equipped with the Acousto-Optico Beam Splitter system (Leica, Nanterre, France) on the Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN, Rouen).

Western Blot

PC12 cells were homogenized in lysis buffer (Cell Signaling Technology), supplemented by 20 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄,

and protease inhibitors from Pierce (Thermo Fisher Scientific). Proteins were quantified using the Bradford method (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Fifty micrograms was separated on SDS-PAGE gels (12%), and transferred onto a PVDF membrane (Thermo Fisher Scientific). Membranes were blocked for 1 h with a solution containing 5% milk in PBS, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (1:1000 for p-AMPK α and AMPK α ; 1:500 for SELENOT; 1:5000 for GAPDH and α -Tubulin; 1:1000 for PGC-1 α ; and 1:1000 for NRF-1) in 5% milk in PBS. Incubation with secondary antibodies (diluted 1:5000) was performed for 1 h at room temperature in the same solution. The antigen-antibody complexes were visualized by a chemiluminescence ECL western blotting analysis system, the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Densitometric analysis was then performed using the Bio-Rad ChemiDoc illumination system with Image Lab software (Bio-Rad).

Co-immunoprecipitation

PC12 cells were homogenized at 4 °C with lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate supplemented with a protease inhibitor cocktail (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Ten minutes later, the lysates were cleared by centrifugation at 14,000 \times g for 10 min at 4 °C and protein quantitated by the Bradford method. Co-immunoprecipitation was performed by incubating 2 mg of proteins at 4 °C overnight with 5 μ g of a specific antibody and 25 μ l of PureProteome Protein A/G magnetic beads (Millipore, Molsheim, France). Beads were washed three times with PBS-Tween buffer and denatured with 1 \times Laemmli buffer at 95 °C for 5 min. Samples were analyzed by SDS-PAGE and western blotting.

Mitochondrial DNA Quantification

PC12 cells were treated or not with PACAP for 72 h. Total DNA was extracted using the DNeasy blood & Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed as described above. The mtDNA content was measured by calculating the ratio of mitochondrial D-Loop region and Cyt b gene to the nuclear Pklr gene (Supplementary Table 1).

Flow Cytometry

PC12 cells were grown to 80–90% confluence on collagen I-coated plates in the absence or presence of PACAP-38 (100 nM) for 72 h, before staining with 50 nM MTG (MitoTrackerGreen; Life Technologies SAS), for 30 min in the dark at 37 °C. Cells were then washed in PBS, trypsinized, collected by centrifugation at 200 \times g for 5 min, and analyzed with a FACSCanto (BD Bioscience, Le Pont de Claix,

France). Data were obtained from 2.10⁴ cells for each sample and analyzed using the FlowJo software (Three Star, Ashland, OR, USA).

Statistical Analysis

All data were obtained from at least three independent experiments and expressed as means \pm SEM or as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance was assessed through nonparametric tests (Mann-Whitney *U* test, Wilcoxon test, one-way ANOVA), or using a two-way ANOVA. A probability level of *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Author Contributions I.L. and Y.A. designed the experiments. H.A., D.C., A.H., A.-M.F.-B., C.B., H.P., D.-L.M. and A.S. performed the experiments; J.L. and O.B. helped to analyze the data, I.L. and Y.A. wrote the manuscript.

Funding This work was supported by Inserm (U1239), the Conseil Régional de Normandie, the University of Rouen Normandie and the European Union. Europe is involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Compliance with Ethical Standards

Competing Interests The authors declare they have no competing interest.

References

- Francis NJ, Landis SC (1999) Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu Rev Neurosci* 22:541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.541>
- Anderson DJ (1993) Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu Rev Neurosci* 16:129–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.001021>
- Huber K (2006) The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol* 298:335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.010>
- Emery AC, Eiden MV, Eiden LE (2014) Separate cyclic AMP sensors for neurogenesis, growth arrest, and survival of neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 289:10126–10139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529321>
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B et al (2006) The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 98:321–329. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03884.x>
- Grumolato L, Louiset E, Alexandre D, Ait-Ali D, Turquier V, Fournier A, Fasolo A, Vaudry H et al (2003) PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur J Neurosci* 17:71–82
- Ghzi H, Grumolato L, Thouennon E, Vaudry H, Anouar Y (2006) Possible implication of the transcriptional regulator Id3 in PACAP-induced pro-survival signaling during PC12 cell differentiation. *Regul Pept* 137:89–94. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.06.015>

8. Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:461–466. <https://doi.org/10.1073/pnas.012608999>
9. Deutsch PJ, Sun Y (1992) The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 267:5108–5113
10. Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424–2428
11. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106:499–509
12. Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 192:309–324. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01806.x>
13. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D et al (2008) Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* 22:1756–1768. <https://doi.org/10.1096/fj.06-075820>
14. Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L et al (2017) Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* 18:1935–1946. <https://doi.org/10.15252/embr.201643504>
15. Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S et al (2016) Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson’s disease. *Antioxid Redox Signal* 24: 557–574. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6478>
16. Castex MT, Arabo A, Benard M, Roy V, Le Joncour V, Prevost G, Bonnet JJ, Anouar Y et al (2016) Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol Neurobiol* 53:5818–5832. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9505-7>
17. Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Maneck DL, Chagraoui A, Prevost G, Elias S et al (2011) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* 152:4322–4335. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1246>
18. Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L (2018) Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076>
19. Prevost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y et al (2013) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154:3796–3806. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1167>
20. Rabinovitch RC, Samborska B, Faubert B, Ma EH, Gravel SP, Andrzejewski S, Raissi TC, Pause A et al (2017) AMPK maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Rep* 21:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.026>
21. Botia B, Seyer D, Ravn A, Benard M, Falluel-Morel A, Cosette P, Jouenne T, Fournier A et al (2008) Peroxiredoxin 2 is involved in the neuroprotective effects of PACAP in cultured cerebellar granule neurons. *J Mol Neurosci* 36:61–72. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9075-5>
22. Grumolato L, Elkahlon AG, Ghzili H, Alexandre D, Coulouam C, Yon L, Salier JP, Eiden LE et al (2003) Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. *Endocrinology* 144:2368–2379. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0106>
23. Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Xu Z, Tanaka S, Murai N et al (2014) PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity. *J Mol Neurosci* 54:370–379. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0309-4>
24. Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K et al (2010) Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* 42:397–403. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9350-0>
25. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y (2013) Pathway analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regul Syst Bio* 7:139–152. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S13204>
26. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23: 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>
27. Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7:2431–2445
28. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S et al (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115–124. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
29. Knutti D, Kralli A (2001) PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab* 12:360–365
30. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K et al (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
31. Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO (2007) Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 282:194–199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606116200>
32. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93: 884S–889S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>
33. Austin S, St-Pierre J (2012) PGC1alpha and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125:4963–4971. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
34. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
35. Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25:1895–1908. <https://doi.org/10.1101/gad.1742011>
36. Hardie DG (2014) AMPK—sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 20:939–952. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.013>
37. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF et al (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1340–E1346
38. Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T (2008) Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled

- receptors: potential utility in treatment of diabetes and heart disease. *Pharmacol Ther* 119:291–310. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.05.008>
39. Gascon S, Murenu E, Masserdotti G, Ortega F, Russo GL, Petrik D, Deshpande A, Heinrich C et al (2016) Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell* 18:396–409. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.003>
 40. Ravni A, Eiden LE, Vaudry H, Gonzalez BJ, Vaudry D (2006) Cycloheximide treatment to identify components of the transitional transcriptome in PACAP-induced PC12 cell differentiation. *J Neurochem* 98:1229–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03962.x>
 41. Seaborn T, Ravni A, Au R, Chow BK, Fournier A, Wurtz O, Vaudry H, Eiden LE et al (2014) Induction of Serpinb1a by PACAP or NGF is required for PC12 cells survival after serum withdrawal. *J Neurochem*. <https://doi.org/10.1111/jnc.12780>
 42. Manecka DL, Lelievre V, Anouar Y (2014) Inhibition of constitutive TNF production is associated with PACAP-mediated differentiation in PC12 cells. *FEBS Lett* 588:3008–3014. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.009>
 43. Manecka DL, Mahmood SF, Grumolato L, Lihmann I, Anouar Y (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neurogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL. *J Biol Chem* 288:14936–14948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.434597>
 44. Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP (1997) PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 16:323–333
 45. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK et al (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
 46. Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97:673–683. <https://doi.org/10.1002/jcb.20743>
 47. Hardie DG (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr* 93:891S–8896S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001925>
 48. Vazquez-Manrique RP, Farina F, Cambon K, Dolores Sequedo M, Parker AJ, Millan JM, Weiss A, Deglon N et al (2016) AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode, cellular and mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 25:1043–1058. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv513>
 49. Williams T, Courchet J, Viollet B, Brenman JE, Polleux F (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5849–5854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013660108>
 50. Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, Stefanis L, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, Paunovic V, Ardah MT et al (2014) The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis* 63:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.002>
 51. Dasgupta B, Milbrandt J (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7217–7222. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610068104>
 52. Dasgupta B, Milbrandt J (2009) AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev Cell* 16:256–270. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.005>
 53. Stetler RA, Leak RK, Yin W, Zhang L, Wang S, Gao Y, Chen J (2012) Mitochondrial biogenesis contributes to ischemic neuroprotection afforded by LPS pre-conditioning. *J Neurochem* 123(Suppl 2):125–137. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07951.x>
 54. Salminen A, Kaamiranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M (2011) AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 118:460–474. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07331.x>
 55. Ma TC, Buescher JL, Oatis B, Funk JA, Nash AJ, Carrier RL, Hoyt KR (2007) Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett* 411:98–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.039>
 56. Shaw MM, Gurr WK, McCrimmon RJ, Schorderet DF, Sherwin RS (2007) 5'AMP-activated protein kinase alpha deficiency enhances stress-induced apoptosis in BHK and PC12 cells. *J Cell Mol Med* 11:286–298. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00023.x>
 57. Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286:81–89
 58. Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, Kluger Y, Dynlacht BD (2004) A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 16:399–411. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.037>
 59. Kobayashi M, Yamamoto M (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzym Regul* 46:113–140. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.007>
 60. Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Kondo H, Tawara A, Sasaguri Y, Kohno K (2011) Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1055–1063. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5777>
 61. Chang C, Wu G, Gao P, Yang L, Liu W, Zuo J (2014) Upregulated Parkin expression protects mitochondrial homeostasis in DJ-1 knockdown cells and cells overexpressing the DJ-1 L166P mutation. *Mol Cell Biochem* 387:187–195. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1884-3>
 62. Huo L, Scarpulla RC (2001) Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* 21:644–654. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.2.644-654.2001>
 63. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231–236. <https://doi.org/10.1038/ng0398-231>
 64. Becker TS, Burgess SM, Amsterdam AH, Allende ML, Hopkins N (1998) Not really finished is crucial for development of the zebrafish outer retina and encodes a transcription factor highly homologous to human Nuclear Respiratory Factor-1 and avian Initiation Binding Repressor. *Development* 125:4369–4378
 65. DeSimone SM, White K (1993) The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 13:3641–3649
 66. Chang WT, Chen HI, Chiou RJ, Chen CY, Huang AM (2005) A novel function of transcription factor alpha-Pal/NRF-1: increasing neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* 334:199–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.079>
 67. Evans MJ, Scarpulla RC (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4:1023–1034
 68. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-

- activated protein kinase. *Cell Metab* 2:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
69. Collins SP, Reoma JL, Gamm DM, Uhler MD (2000) LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem J* 345(Pt 3):673–680
 70. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Anouar Y, Fournier A, Vaudry H (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 84:801–812
 71. Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T, Kashimoto K (2002) The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1–42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 23:1471–1478
 72. Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 269:6207–6214
 73. Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83–90
 74. Emery AC, Eiden LE (2012) Signaling through the neuropeptide GPCR PAC(1) induces neuritogenesis via a single linear cAMP- and ERK-dependent pathway using a novel cAMP sensor. *FASEB J* 26:3199–3211. <https://doi.org/10.1096/fj.11-203042>
 75. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN et al (2010) Canonical and non-canonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 24:2517–2530. <https://doi.org/10.1101/gad.1957710>
 76. Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR (2003) Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31:67–75

Annexe 2 : Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis

Forum Review Article

Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis

Hugo Pothion,^{a,b} Cédric Jehan,^{a,b} Hervé Tostivint,^c Dorthe Cartier,^{a,b}

Christine Bucharles,^{a,b} Anthony Falluel-Morel,^{a,b} Loubna Boukhzar,^{a,b} Youssef Anouar^{a,b,*}

and Isabelle Lihrmann^{a,b,*}

^aRouen-Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^bInstitute for Research and Innovation in Biomedicine, 76000 Rouen, France

^cPhysiologie moléculaire et Adaptation, UMR 7221 CNRS and Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

Running title: SELENOT: a guardian of ER homeostasis

Address correspondence to:

Dr Isabelle Lihrmann, Inserm, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Rouen-Normandie University, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France ; Tel: +33 2 35 14 66 26 ; Email address: isabelle.lihrmann@univ-rouen.fr

*Youssef Anouar and Isabelle Lihrmann equally contributed to this work.

7833 words

136 references

Color illustration: 7 (online 7).

Abstract

Selenoproteins incorporate the 21st amino acid selenocysteine into their polypeptide chain. Seven members of this family reside in the endoplasmic reticulum (ER), controlling the redox and ionic environment to maintain proteostasis. Noteworthy, selenoprotein T (SELENOT) is the only ER-resident selenoprotein whose gene disruption induces embryonic lethality. As expected for essential genes, its structure is remarkably conserved across eukaryotes. Its thioredoxin-like domain supports selenosulfide/disulfide reactions, an oxidoreductase activity which is essential to maintain ER redox homeostasis. Reduction of SELENOT expression in transgenic cell and animal models leads to an accumulation of reactive oxygen and nitrogen species, depletion of Ca²⁺ stores, and activation of the unfolded protein response (UPR). Expectedly, hormone secretion is impaired in endocrine and neuroendocrine cells due to ER stress. When ER stress could not be alleviated, cell viability is compromised. Mechanistically, SELENOT is anchored to the ER membrane and is able to bind the STT3A-type oligosaccharyltransferase complex in order to regulate *N*-glycan occupancy of specific substrates including glycohormones and GPI-anchored proteins which have key roles in cell adhesion and communication. Given the importance of limiting the ER stress that occurs in different pathologies such as neurodegenerative, cardiovascular, metabolic and immune diseases, further work should be performed to better understand the role of SELENOT, and to design small mimetics such as selenopeptides to improve ER proteostasis and to prevent ER stress. In this review, we present the current state-of-art on the role of SELENOT in ER homeostasis, based on our observations that SELENOT is essential to alleviate ER stress.

Key words:

selenoproteins, thiol-disulfide oxidoreductase, *N*-glycosylation, glycohormones, GPI-anchored proteins, secretory pathway

Abbreviations:

1R, 2R, two basal rounds of vertebrate genome doubling; 3R, teleost fish-specific genome doubling; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; AMPK, AMP-activated protein kinase; ASD, autism spectrum disorder; ATF6, activating transcription factor 6; BiP, 78-kDa glucose-regulated protein; bZIP, basic region-leucine zipper; Ca²⁺, calcium; CALR, calreticulin; CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II; CAMs, cell adhesion molecules; CANX, calnexin; Cbr3, carbonyl reductase 3; CDG, congenital disorders of glycosylation; CNS, central nervous system; CRF, corticotropin-releasing factor; Cys, C, cysteine; DAD1, defender against cell death 1; DHHC6, Asp-His-His-Cys single letters symbols; DIO, iodothyronine deiodinase; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid; eEFSec, eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER membrane-associated protein degradation; ERO1, ER oxidoreductin 1; GFP, green fluorescent protein; Glc, glucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GPI, glycosylphosphatidylinositol; GPI-AP, GPI-anchored protein; GPx, glutathione peroxidase; H₂O₂, hydrogen peroxide; HPA, hypothalamo-pituitary axis; IP3R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; IRE1, serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1; KCP2, Keratinocyte Associated Protein 2; KO, knock-out; LoF, loss-of-function; MAGT1/IAP, magnesium transporter protein 1; MAM, mitochondria-associated membrane; Man, mannose; MLC20, 20 kDa Myosin light chain; MLCK, Myosin light chain kinase; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NRF-1, nuclear respiratory factor 1; O₂⁻, superoxide anion; OH[•], hydroxyl radical; OST, oligosaccharyltransferase; OST4, OST 4-kDa subunit; OST48, OST 48-kDa subunit; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PD, Parkinson disease; PDI, protein disulfide isomerase; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PKA, protein kinase A; POMC, proopiomelanocortin; PRX4, peroxiredoxin 4; PSELT, SELENOT43-52; Rdx, thioredoxin-type selenoproteins; ROS, reactive oxygen species; RPN1, ribophorin 1; RPN2, ribophorin 2; RyR, ryanodin receptor; SBP2, SECIS binding protein; Se, selenium; Sec, U, selenocysteine; SECIS, selenocysteine insertion sequence; SELENOF, SEP15, selenoprotein F; SELENOH, selenoprotein H; SELENOK, SELK, selenoprotein K; SELENOM, SEPM, SELM, selenoprotein M; SELENON, SEPN1, SELN, selenoprotein N; SELENOS, SELS, VIMP, SEPS, selenoprotein S; SELENOT, SelT, selenoprotein T; SELENOV, selenoprotein V; SELENOW,

4

selenoprotein W; SelPep, brain-penetrant selenopeptide Tat; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SH3, Src-homology 3; SOD1, Cu/Zn-SOD, Cu/Zn-superoxide dismutase; SOD2, Mn-SOD, manganese superoxide dismutase; T3, 3,5,3'-triiodothyronine; T4, 3,5,3',5'-tetraiodothyronine; TMEM258, transmembrane protein 258; TrxR, thioredoxin reductase; TUSC3/N33, tumor suppressor candidate 3; UGGT, UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase; UPR, unfolded protein response; UTR, untranslated region; VCP, valosin containing protein; Xbp1, X-Box Binding Protein 1.

Introduction and scope

Reactive oxygen species (ROS) are radical or molecular species derived from molecular oxygen. Under physiological conditions, ROS are generated during aerobic respiration as a by-product of the mitochondrial electron transport chain. The incomplete reduction of oxygen to superoxide anions (O_2^-) is the first step of ROS formation (106,135). The forms of ROS that are relevant in the biological systems comprise free radicals like O_2^- and hydroxyl radical (OH^\bullet), and also non radical forms able to generate free radicals like hydrogen peroxide (H_2O_2). Although mitochondria are the main site of O_2^- and H_2O_2 production, the endoplasmic reticulum (ER) may be the most significant ROS producer in some cell types, in addition to peroxisomes. Importantly, the ER forms membrane contact sites with mitochondria (mitochondria-associated membrane, MAM) where redox-sensitive proteins are enriched. The latter include redox sensitive calcium (Ca^{2+}) handling proteins regulating ER-mitochondria Ca^{2+} flux and, consequently, redox-dependent mitochondrial metabolism. ROS rapidly diffuse across membranes through aquaporins and specific channels, and the ER has emerged as the most important contributor (60%) to cytosolic ROS in certain conditions (133).

The ER is involved in the synthesis of lipids, membrane proteins and proteins destined for secretion which represent up to one third of total cellular proteins. It is also the main organelle participating in the regulation of Ca^{2+} homeostasis. In the ER, disulfide bonds formation is catalyzed by protein disulfide isomerases (PDI) which act to stabilize the tertiary and quaternary structures of proteins. Two electrons are exchanged between a cysteine (Cys) residue of a substrate and PDI. Then, to restore PDI and start another cycle, two electrons are transferred from PDI to the ER oxidoreductase oxidoreductin 1 (ERO1), resulting in H_2O_2 production (Fig. 1) (103,122). One PDI, designated ERp57, mediates protein folding by promoting the formation of disulfide bonds in its newly synthesized glycoprotein substrates thanks to its interaction with the ER lectins calnexin (CANX) and calreticulin (CALR). The CANX/CALR cycle ensures the folding and the quality control sorting of folded glycoproteins from terminally misfolded glycoproteins destined to degradation (22,62). When the ER protein-folding capacity is overwhelmed, cells have to minimize the effects of oxidative damage resulting from ERO1 activity. To restore ER homeostasis, cells activate an evolutionarily conserved signal transduction pathway called

6

UPR (unfolded protein response), consisting in three mechanistically distinct branches, namely serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6), whose main purpose is to repress protein translation, to increase protein folding, and to enhance misfolded protein degradation *via* the ER-associated protein degradation (ERAD) pathway (45,46,127) (Fig. 1). In conditions that alter ER functions, principally overwhelmed protein folding capacity and oxidative stress, N-glycan synthesis inhibition (23), and Ca²⁺ depletion, cells undergo a condition termed ER stress. If ER stress is not resolved, accumulation of unfolded proteins and increased oxidative folding further enhance the production of ROS first in the ER, and then in the whole cell, thus irreversibly damaging biomolecules (25,51,103) and ultimately leading to ER stress-mediated apoptotic cell death. Although low ROS production is essential to maintain physiological functions (proliferation, signal transduction, host defense, gene expression), high levels of ROS are toxic for the cell (20,41,44,51,91,93). Consequently, ROS production, diffusion and trans-organellar transport are highly regulated. Most organelles are equipped with their own defence system. Among the most important are catalase and Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, SOD1) in peroxisomes, manganese superoxide dismutase (Mn-SOD, SOD2), and glutathione peroxidases (GPx) 1 and 4 in the mitochondria, and peroxiredoxin 4 (PRX4), GPx7 and 8 in the ER (133). Both peroxiredoxins and GPxs protect the organism from oxidative damage through the reduction of H₂O₂ in H₂O.

It is worth noting that certain GPx (GPx 1, 2, 3, 4, and 6) contain the essential nutrient selenium (Se) and belong with other similar proteins to a family named selenoproteins. Cytosolic GPx1 was the first identified selenoprotein in the selenoprotein family. Other important members of this family include TrxR1 and TrxR2, which compose with NADPH and thioredoxin a major disulfide reductase system that controls cellular redox status (57,60). Selenoproteins incorporate Se in the form of one or more selenocysteine (Sec, the 21st amino acid) which, compared to Cys, has a slightly higher nucleophilicity, making it very efficiently targeted by electrophiles, and providing a higher resistance to irreversible inactivation by overoxidation (10,50,99). During atypical selenoprotein synthesis, the Sec residue is synthesized on its own tRNA, the tRNA[Ser]Sec

7
encoded by the *Trsp* gene, and incorporated in an unconventional fashion during translation. Selenoprotein transcripts harbour in their 3'-untranslated region (UTR), a SECIS (selenocysteine insertion sequence) element which is a 60 nucleotide-length RNA sequence that adopts a stem-loop structure. The SECIS element recruits a protein complex composed of SBP2 (SECIS binding protein 2), eEFSec (eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific) and other factors with the purpose to site-specifically deliver the Sec-tRNA^{Sec} at defined stop UGA codons in selenoprotein mRNA, thus incorporating Sec in the protein elongating chain (113) (Fig. 2). The number of genes coding for selenoproteins in eukaryotes is highly variable: 2 in worms, 3 in fruit flies, 24 in rodents, 25 in humans, and more than 30 in fish (17,57,70,74). Nevertheless, selenoproteins are not present in all forms of life (10). This is the case in higher plants, some fungal species, certain insects and yeast. In these organisms, Cys variants of some selenoproteins are found (70,73). There is a possibility that these organisms never made selenoproteins, or alternatively that they have lost the Sec insertion machinery during evolution. Less costly energetically, Cys-containing protein orthologues would thus be maintained in certain genomes (in drosophila for instance) in place of the Sec-containing forms. Inasmuch as Se is essential for life, the significance of selenoproteins for human health is increasingly recognized through the identification of patients with mutations in genes involved in the selenoprotein biosynthetic pathway (111). Mutations in Selenocysteinyl-tRNA(Sec) Synthase (SEPSECS) lead to neurodevelopmental disorders, and diseases associated with SBP2 alteration are characterized by impaired metabolism and action of thyroid hormones, bone growth and maturation deficits, azoospermia and other defects related to nervous system development or muscle, inner ear, skin and immune system function. Mutations in individual selenoproteins are also associated with diseases, including selenoprotein N (SEPN1, SELN, SELENON)-related myopathy, GPx4-related Sedagathian type spondylometaphyseal chondrodysplasia characterized by respiratory failure and bone defects, TrxR2-related dilated cardiomyopathy and familial glucocorticoid deficiency (60,107,108,116,134). Se deficiency or excess is also associated with health risk in humans (94), although long-term Se deficiency could be viewed as a mimic of calorie restriction, a condition known to increase lifespan (131).

Meanwhile, the role of about half of selenoproteins which were first described *in silico* by the Gladyshev laboratory is still unclear. This is the case for selenoproteins localized in the ER, which have for some of them a key role in the regulation of the ER redox balance and efficient quality control of glycoproteins. In this review, we will summarize the current knowledge on ER selenoproteins, focusing especially on SELENOT whose function is essential to maintain ROS and ER homeostasis.

ER-resident selenoproteins

Seven selenoproteins have been shown to reside in the ER. The luminal ones include selenoprotein F (SEP15, SELENOF) and selenoprotein M (SEPM, SELM, SELENOM). Others are associated to the membrane. The best characterized of them is type 2 iodothyronine deiodinase (DIO2) which catalyzes the conversion of prohormone thyroxine (3,5,3',5'-tetraiodothyronine, T4) to the bioactive thyroid hormone (3,5,3'-triiodothyronine, T3). The others are selenoprotein K (SELK, SELENOK), SELENON, selenoprotein S (SELS, VIMP, SEPS, SELENOS) and SELENOT. All of them are indisputably important to maintain ER homeostasis (67,88,99) and their function is just beginning to be understood. Several of them have a role in the regulation of Ca^{2+} homeostasis. For instance, SELENOK is associated through Src-homology 3 (SH3)/SH3 interactions with DHHC6 (single letter symbols representing Asp-His-His-Cys amino acid sequence), which is an ER membrane enzyme catalysing protein palmitoylation. SELENOK possibly serves as a co-factor, stabilizing the acyl-DHHC6 intermediate and reducing hydrolyzation of the thioester bond until transfer of the palmitoyl group on the target protein can occur (29). It has been shown that the DHHC6/SELENOK complex is required for the palmitoylation of certain proteins such as the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R), an essential step for the activation of this Ca^{2+} channel (30,126). The ryanodine receptor (RyR), another Ca^{2+} channel present in the sarcoplasmic reticulum, is a "redox sensor" regulated by a number of associated proteins, including SELENON with which it is physically associated, at least in zebrafish (54). SELENON is also associated with the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump, reducing its luminal Cys that are hyperoxidized by ERO1-generated peroxides (71). This oxidoreductase is considered as a prominent MAM-localized regulator of ER-mitochondria crosstalk, limiting Ca^{2+} efflux from the ER to mitochondria through the activation of SERCA by a reduction of its oxidation state (65,71,133). Mutations in

SELENON gene lead to myopathies (18,54,87), although its precise contribution to muscle development is not yet understood. SELENOM also influences Ca^{2+} homeostasis, but in contrast to SELENON and SELENOK, the underlying molecular mechanism is totally unknown. It has probably a major role in energy metabolism since its gene knockout (KO) in mouse leads to an obese phenotype (89,95). Other ER selenoproteins, such as SELENOF, SELENOK and SELENOS are involved in the folding and quality control of glycoproteins. SELENOF, which is ancestrally linked to SELENOM, directly participates to protein quality control though its binding to UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), an enzyme that specifically reglucosylates unfolded proteins in order to be recognized by CALR for recycling to the ER (132). SELENOS, in association with SELENOK, participates in the protein quality control process *via* its interaction with valosin containing protein (VCP), an ATPase present at the ER membrane which is associated with the ERAD complex (64). Finally, compelling data on SELENOT, i.e. sequence data, genetic information, in particular phenotypes of knockout animals, subcellular location and functional studies, also indicate a vital function in relation with its presence in the ER. The rest of this review will be focused on SELENOT for which major breakthroughs have been recently achieved.

SELENOT, an essential gene conserved across organisms

SELENOT was initially identified *in silico* using the computer program SECISearch, based on the recognition of the SECIS element and thermodynamic characteristics (59). Different Sec- and Cys-containing SELENOT orthologs have now been identified in numerous eukaryotes, including plantae, metazoans and some protists such as ciliates (Fig. 3, suppl Fig. S1) (72), but not in yeast and bacteria where apparently no homolog exists. The Cys substitution is present in the two *C. elegans* SELENOT isoforms (SelT-1.1 and SelT-1.2), in several insects (*Drosophila melanogaster*, *D. willistoni*, and *Culex quinquefasciatus*), land plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa japonica*, and *Zea mays*), and in *Kinetoplastida* (*Trypanosoma* and *Leishmania*) (69,79). Based on our phylogenetical analysis, it is noteworthy that in certain groups such as arthropods and archaeplastidia, the most basal species (e.g. Hyatella and Chlamydomonas, respectively) have a SELENOT-like isoform with a Sec in the redox center, while in the others (e.g. Arabidopsis and Drosophila, respectively), the Sec residue has been substituted by a Cys residue. These data strongly suggest that Sec to Cys substitution would be a recent acquisition, in these groups at least.

10

They also show that SELENOT exists in the form of Sec or Cys variants, and that the Cys isoforms appear as closely evolutionary related to Sec-containing SELENOT.

The SELENOT gene family has been strongly shaped during evolution. In humans, the gene is localized on chromosome 3 at position 3q25. It includes 6 exons with the Sec-encoding TGA codon in exon 2, the TAG stop codon in exon 5 and the SECIS element in exon 6 (8,38,79). Two processed pseudogenes, *SELENOTP1* (ENSG00000233846) and *SELENOTP2* (ENST00000603971.1) are also present in the human genome at positions 9p24 and 5q23, respectively. Interestingly, *SELENO1* is a nearly complete copy of the mRNA transcribed from the functional SELENOT gene, including the SECIS sequence, thus raising the interesting possibility that it might be functional. Like in humans, most species possess a single SELENOT gene albeit with exceptions. Nematodes for instance possess a single SELENOT gene, but as mentioned above, some taxa may have up to two (*C. elegans*) or three (*C. brenneri*) copies of the SELENOT gene (100). Likewise, three SELENOT-related genes, called *SelT1a*, *SelT1b* and *SelT2*, are present in some teleost species such as zebrafish (58) and goldfish (21), while two SELENOT genes, *SelT1* and *SelT2*, are present in spotted gar, a non-teleost ray-finned fish. Up to now, the phylogenetic status of the different SELENOT-related genes (*SelT1a*, *SelT1b* and *SelT2*) found in ray-finned fish was unknown. As shown in Fig. 4, synteny analysis shows that all these genes belong to a same paralogon, *i.e.* a set of paralogous chromosomal regions derived from a common ancestral region. According to Nakatani et coll. (83) this paralogon was already present in the last common vertebrate ancestor and was probably generated in 2R, the two whole genome duplication events that took place early during the vertebrate history. From these data, we can speculate that up to three SELENOT-related genes could have been present in the vertebrate ancestor. Among these three genes, only two, *SelT1* and *SelT2*, are still present in bony fish, and one, *SelT1*, in tetrapods, including human. Synteny analysis also suggests that the two copies of *SelT1*, *SelT1a* and *SelT1b*, present in zebrafish and goldfish, arose through 3R, the teleost fish-specific genome doubling.

The conservation of gene sequence during evolution is indicative of strong functional constraints leading to a very selective pressure, which is stronger when genes are essential. According to gene prediction and phylogenetic reconstruction methods, SELENOT, selenoprotein and non-selenoprotein orthologs included, is the most conserved

selenoprotein in vertebrates, with 95% amino acid identity between mammalian and chicken SELENOT for instance. There is also an impressive identity across all mammals even at the nucleotide sequence level, thus supporting an essential function (27,72,79) (suppl. Fig. S2). This seems indeed to be the case since SELENOT gene disruption is embryonic-lethal in mouse. No alive embryo could be found in the uterus of pregnant mice at the earliest embryonic stage analyzed, i.e. embryonic day 8 (14). However, the precise stage of pregnancy at which embryos die, i.e. before or after implantation is not known yet and remains to be determined. In humans, the dispensability of selenoprotein genes has recently been assessed by quantifying the natural occurrence of loss-of-function (LoF) variants. The intolerance of LoF between human and mice for the SELENOT gene is matching, indicating that SELENOT may be essential in humans as in mice. These findings do not support the possibility that SELENOP1 pseudogene would be functional in humans. It should be noted that at least three other mammalian selenoproteins, namely TrxR1, TrxR2 and GPx4, are also essential in mice. Among these, only TrxR1 seems also essential in humans as SELENOT (102). Further emphasizing the functional importance of SELENOT, its cellular levels are marginally impacted by Se deficiency (86,118). In addition, gene invalidation of SELENOP which transports Se throughout the body for its use in the synthesis of other selenoproteins has a moderate impact on SELENOT expression, except in the testis. Finally, the levels of SELENOT mRNA are significantly up-regulated between control and Se-supplemented conditions in HEK293 cells, whereas the levels of 19 other selenoprotein mRNAs remained insensitive to Se level variation (121). Taken together, these data show that in the hierarchy of selenoprotein production, SELENOT is among the highest priority selenoproteins, along with TrxR1, and that SELENOT expression cannot drop below a critical threshold.

SELENOT, an oxidoreductase associated with the ER membrane

Based on its structure, SELENOT is expected to be a selenosulfide/disulfide oxidoreductase, like all selenoproteins that have been functionally characterized. In addition to a 19-amino acid *N*-terminal signal peptide, it possesses 6 α -helices and 4 β -sheets with the $\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_2\text{-}\alpha_3\text{-}\alpha_4\text{-}\alpha_5\text{-}\beta_3\text{-}\beta_4\text{-}\alpha_6$ typical arrangement (8,27,79) (Fig. 5). The *N*-terminal redox motif, CVSU/C in most species, is located in a loop between the β_1 -sheet and the α_1 -helix, thus forming a typical domain characteristic of the thioredoxin-fold

12

proteins. By analogy to other thioredoxin-fold proteins such as thioredoxins, glutaredoxins, and protein disulfide isomerases, the redox center is presumed to confer to SELENOT an oxidoreductase activity. Using an assay based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) with NADPH, a TrxR-like activity of recombinant SELENOT was shown, which depends on Cys/Sec residues of the thioredoxin-like fold (14), although such activity remains to be established in a more physiological context. In contrast to many other thioredoxin-fold proteins, an additional feature of SELENOT is a conserved tGxFEL (conserved residues in capital letters, residues most often observed in the indicated position in small letters) stretch of amino acids in the C terminus, which is also present in selenoprotein W (SELENOW), selenoprotein V (SELENOV), selenoprotein H (SELENOH) and Rdx12, in mammals (27). This motif and the thioredoxin-fold domain constitute the genetic signature of a new family of thioredoxin-type selenoproteins named redoxins (Rdx), as defined by Dikiy et al. (27). In this family, SELENOT is the only member localized in the ER.

The ER localization of SELENOT has been established in plant, invertebrate and vertebrate species: in *Arabidopsis thaliana*, a classical model of higher plants, the SELENOT-like protein with the Sec/Cys substitution was identified in the ER fractions by mass spectrometry (85); in *C. elegans*, the two SELENOT isoforms also carrying the Sec/Cys substitution were detected in the ER by immunofluorescence (100); in a non-mammalian vertebrate, the goldfish *Carassius auratus*, genuine SELENOT was characterized in the cardiac sarcoplasmic reticulum (76); in mammals, SELENOT was found to be co-localized with several ER proteins, including an ER-targeted green fluorescent protein (GFP), the ER-resident protein BiP, which is also referred to as 78-kDa glucose-regulated protein, and keratinocyte associated protein 2 (KCP2) (38,40,92,96,120). How does SELENOT achieve its localization in the ER is still an open question. Intriguingly, a SELENOT lacking the N terminus exhibited a cytoplasmic localization that did not virtually differ from that of the full-length protein (27,38), suggesting that other sequences are required for the targeting of SELENOT to the ER. Some membrane proteins may be addressed to the ER by their membrane domains (6,12). Accordingly, SELENOT, unlike the structurally close SELENOW, harbors two hydrophobic amino acid stretches at positions 87-102 and 125-144, inserted between β_2 and β_3 sheets, that could allow a membrane insertion (27,38,79). Modeling studies suggest that the first hydrophobic segment likely contains one long amphipathic

helix which forms extensive contacts with the lipid bilayer, probably promoting monotopic attachment (67) (Fig. 6). A recombinant SELENOT devoid of the 87-102 hydrophobic region is no more confined to the ER, suggesting that at least this domain is required for ER localization (38). Other observations reinforce the idea that SELENOT is anchored to the ER membrane. SELENOT is detected in microsomal fractions prepared from mouse endocrine cells, although it is technically challenging to find it systematically (40). In addition, immunogold staining data show a close proximity of SELENOT signal with the ER membrane in rat anterior pituitary cells (40). Interestingly, a proportion of SELENOT is also observed in the cytoplasm with this approach, supporting the possibility of a partial cleavage of the signal peptide and a possible distribution of the protein between the ER and the cytosol. Several mechanisms might participate to SELENOT retention at the level of the membrane, including static retention and protein-protein interactions with other resident proteins (82,125). An important issue is whether SELENOT leaves the ER, since SELENOT does not display the KDEL tetrapeptide necessary for ER retention. This question cannot be answered yet based on the currently available data. Indeed, SELENOT has been described in the Golgi apparatus in one report (27), but SELENOT was not found in secretory granules by immunogold staining (40).

Together, these observations indicate that SELENOT is an atypical member of the Rdx family exhibiting membrane association and a main ER localization. Other locations for SELENOT have also been suggested but remain to be more accurately characterized, as in the Golgi apparatus or the cytoplasm.

SELENOT serves to maintain ER redox homeostasis

The next question is which pivotal role for SELENOT in the ER? The induction of the luminal chaperone BiP, due to its ability to alleviate proteotoxicity, is considered as a marker of ER stress (11,91). Overexpression of BiP in AtT20 cells that have been depleted in SELENOT is indicative of a stress in the ER, also visualized by an enlargement of the ER volume (Hamieh, et al. 2017). The transcripts of *atf6*, *choP* and *atf4* (two effector genes of the UPR), and that of the short form of X-Box Binding Protein 1 (Xbp1), were also significantly enhanced in line with the activation of the IRE1, PERK, ATF6 branches of the UPR (Fig. 1) (45,46). Unexpectedly, a lower degradation of misfolded proteins was observed, congruent with an inhibition of the ERAD pathway at the transcriptional level (40). Consistent with

14

UPR activation (Fig. 1), oxidative stress and decreased cell survival were reported after SELENOT gene knockdown in dopaminergic neurons, in cortical neuroblasts and in PC12 cells, indicating that oxidative stress could not be resolved despite UPR activation, at least in these cells (3,14,19). Also consistent with SELENOT redox function, its depletion in murine fibroblasts enhances the expression of several oxidoreductase genes, including carbonyl reductase 3 (Cbr3) a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family of proteins (112). In brain conditional SELENOT-deficient mice (*Nes-Cre/SeIT^{fl/fl}*), oxidative stress was detected in SELENOT-depleted immature neuroblasts, resulting in the loss of immature neurons but not glial cells, through apoptotic cell death (19). In addition, disruption of the SELENOT gene in these mice provoked early lethality and higher vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a neurotoxin used to generate animal models of Parkinson Disease (PD). In the nigrostriatal system of these mice, a marked oxidant/nitrosative stress was observed, associated with neurodegeneration, and decreased tyrosine hydroxylase activity and dopamine levels (14). Conversely, SELENOT expression limited the oxidative stress and neurodegeneration in the nigrostriatal pathway of wild-type mice after treatment with MPTP or rotenone, another neurotoxin used to model PD. Likewise, SELENOT also protects the heart against oxidative stress and ischemia, following an ischemic-reperfusion episode in rat (98).

Some Cys residues present in Ca²⁺-handling proteins are located in the ER lumen, regulating in a redox-dependent manner the activity of RyR, IP3R and SERCA (9). The crosstalk between Ca²⁺ and redox signalling is an important process which determines the amount of Ca²⁺ available in the cytoplasm and the mitochondria, and consequently the cell fate. Indeed, preventing IP3R-dependent Ca²⁺ leakage from the ER and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMKII) activation in the cytosol is sufficient to prevent the activation of proapoptotic pathways (45,119). SELENOT gene silencing in PC12 cells, in addition to disturbing the redox homeostasis, actually alters Ca²⁺ flux, and in these conditions, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-induced increase in [Ca²⁺]_i is abolished. This has been also demonstrated in rat primary gastric smooth muscle cells in which SELENOT knockdown reduces their Ca²⁺ content, myosin light chain kinase (MLCK) activity and the subsequent 20 kDa myosin light chain (MLC20) phosphorylation, two key elements in smooth muscle contraction (66).

Noteworthy, the redox center in SELENOT is necessary to preserve Ca^{2+} homeostasis, although its precise contribution to the regulation of Ca^{2+} flux has not yet been elucidated (38). Unlike ERp57 and SELENON which modulate SERCA activity, SELENOT ablation did not result in SERCA pump inhibition in PC12 cells (38), and the possibility that SELENOT interacts with IP3R, like ERO1 is not excluded (9). Alternatively, oxidative stress and UPR activation in SELENOT-deficient cells may be sufficient to promote Ca^{2+} leakage through the translocon (124).

SELENOT plays a role in *N*-glycosylation

In order to identify SELENOT partners and better understand the mechanisms underlying the function of SELENOT in ER homeostasis, a modified split-ubiquitin system for *in vivo* detection of interactions between transmembrane proteins in yeast has been used (40). Among the subset of putative candidates identified was KCP2, an ER-resident transmembrane protein described as a subunit of the oligosaccharyltransferase (OST) complex (96,97). OST catalyses the transfer “en bloc” of the high-mannose oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2 (Glc, glucose; Man, mannose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine) from the ER membrane onto Asn residues of a specific *N*-glycosylation acceptor sequence (Asn-X-Ser/Thr/Cys) in a neo-synthesized polypeptide (4). Mammalian OST is a hetero-oligomeric complex which exists in two paralogous forms containing either the catalytic subunit STT3A or STT3B (Fig. 6). The STT3A isoform is stably integrated into the translocon and catalyzes co-translational *N*-glycosylation, while the STT3B complex acts post-translationally as a proof-reader for sites missed by STT3A (15,101,114,115). Importantly, KCP2 is a specific subunit of the STT3A complex. Co-immunoprecipitation experiments have shown that native SELENOT does interact with KCP2, as well as with STT3A and OST48, a common subunit of the STT3A- and B-types OST complexes, but not with STT3B, suggesting that KCP2 likely provides the binding site of SELENOT to the STT3A complex (115). The levels of STT3A, OST48 and KCP2 are significantly reduced in a corticotrope cell line depleted in SELENOT, thus implicating SELENOT in the stability of the OST complex or its binding to the ribosome. Consistently, the association with the translocon is disrupted in STT3A complex devoid of KCP2 or DC2, another specific subunit of the STT3A complex which interacts with KCP2 (115). It is not yet established how SELENOT interacts with the STT3A complex. The seleno/disulfide oxidoreductase activity may be required for

16

SELENOT/STT3A interaction. Indeed, redox interactions have been demonstrated between ER SELENOF and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, and cytosolic SELENOW, which is distantly related to SELENOT, with 14-3-3 protein. In the latter case, the interaction with SELENOW interrupts 14-3-3 binding to Rictor, thus leading to the activation of the mTORC2/Akt pathway (1,27,53).

SELENOT itself is not *N*-glycosylated (40). This excludes the possibility that it physically interacts with the STT3A complex as a substrate, but rather as a modulator of *N*-glycosylation in the same way as KCP2 (97). Consistent with this hypothesis, SELENOT levels, like those of STT3A and KCP2, and to a lesser extent STT3B, are higher in professionally secreting cells and tissues (13,96). SELENOT gene silencing in endocrine cells leads to an alteration of *N*-glycan occupancy on specific substrates, including proopiomelanocortin (POMC), a 235-amino acid prohormone precursor harboring two *N*-glycosylation sites at positions 91 and 152, and a modified GFP engineered to detect impaired *N*-glycosylation (40). The issue of substrate specificity of SELENOT is not solved yet, but it is quite remarkable that SELENOT expression coincides with that of a number of glycosylated hormones or polypeptide precursors with disulfide bonds like POMC, somatostatin, FSH, TSH, and insulin (40,92,120). This observation has led us to speculate that SELENOT, owing to its oxidoreductase activity, might ensure the redox quality control of glycoproteins with disulfide bonds, like the other oxidoreductases TUSC3/N33 (tumor suppressor candidate 3) and MAGT1/IAP (magnesium transporter protein 1) in the STT3B-type OST (78), and their orthologues OST3/OST6 in the yeast OST complex (109). These oxidoreductases form transient mixed disulfide complexes with a set of substrates in order to slow glycoprotein folding and increase glycosylation efficiency. Since OST3/6, MagT1/IAP or TUSC33/N33 have no homolog in the STT3A complexes, it is tempting to speculate that SELENOT can exert the same function in the STT3A complex, provided that the SELENOT *N*-terminal redox CVSU motif faces the ER lumen (Fig. 6) (24). Remarkably, SELENOT, along with other factors of the glycoprotein quality control cycle (CANX for instance), was detected in haploid genetic screens designed to identify factors involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) deacylation (68). This step, which is *N*-glycan-dependent, enables GPI-anchored proteins (GPI-APs) to be transported from the ER to the Golgi and to be anchored to the plasma membrane. This finding suggests that GPI-APs are,

in addition to glyco hormones, other SELENOT targets. GPI-APs group comprises about 150 proteins, involved in diverse biological processes as immune recognition, cell adhesion and vertebrate organ development, a number of processes where SELENOT has also been implicated (19,100,112).

So far, SELENOT is the only ER selenoprotein for which the physical association with the STT3A complex has been demonstrated. It is now necessary and urgent to identify SELENOT redox partners, using thiol-trapping methods for example, to better understand at the molecular level the role of SELENOT in *N*-glycosylation. This essential co- or post-translational modification contributes to protein folding, stability and transport, and mediates cell adhesion and repulsion, protein dimerization properties, and other processes required when cells communicate with each other. A role of SELENOT in *N*-glycosylation could in fact provide the basis to understand a number of alterations in cell adhesion, differentiation and secretion, observed in genetically-engineered animals and cell models with SELENOT depletion (3,14,19,40,68,92,112).

SELENOT couples metabolic activity with differentiation and secretion

Initially, SELENOT was characterized as a gene overexpressed in PC12 cells exposed to PACAP (38), a model of neuroendocrine differentiation. When SELENOT gene expression was silenced, PACAP-induced neurogenesis was inhibited, and this was associated with oxidative stress and decreased cell viability. PACAP-induced SELENOT gene expression was found to rely in part on the activation of the canonical cAMP/protein kinase A (PKA) pathway, and to be Ca²⁺-dependent (38), which fits well with the trophic effects of the neuropeptide and its known transduction pathways in neuroendocrine cells. However, when the SELENOT gene promoter was characterized, additional signalling components impacting SELENOT expression were highlighted (3). Using comparative bioinformatic analysis (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>), several binding sites for nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) could be identified in the SELENOT promoter which are conserved in evolutionary distant species (from human to chicken). Chromatin immunoprecipitation experiments and promoter studies revealed that NRF-1 governs both basal and PACAP-induced SELENOT gene expression. NRF-1 is a basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor that activates the expression of nuclear genes essential for mitochondrial biogenesis and function, and some key metabolic genes regulating cellular

18
 growth (104,105). In line with these activities, NRF-1-dependent SELENOT expression was found to rely in part on the upstream activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key kinase which acts as a fuel gauge regulating energy metabolism by switching on catabolic pathways while switching off anabolic pathways and stimulating mitochondrial biogenesis (42,43). This cascade was also dependent on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), which is a transcriptional co-activator of NRF-1 and CREB, and which links external physiological stimuli to the regulation of mitochondrial biogenesis (130). Altogether, these observations indicate that PACAP reprograms cell metabolism *via* the activation of the AMPK/PGC-1 α /NRF-1 cascade and the concomitant stimulation of SELENOT expression. Such a signaling cascade could allow cells to cross a critical metabolic checkpoint (32) with a tight control of ER and oxidative stress, and to proceed successfully towards differentiation. Of note, PACAP also stimulates catecholamine secretion from PC12 cells, a process which may also require SELENOT as previously reported, linking SELENOT effects in secretion and differentiation (38,40,92). Overall, these observations suggest that SELENOT exerts a pivotal role in cell metabolism that could impinge various cellular functions.

Responsible for the correct folding, secretion and membrane insertion of proteins representing a third of the proteome in eukaryotic cells, the ER is crucial to achieve the extensive protein synthesis required to undergo normal development and maintenance of tissue homeostasis (47,61,110). ER structure is modified in order to adapt lipid and protein synthesis and Ca²⁺ storage. SELENOT is in fact widely and abundantly expressed during this period, in line with its role in cell metabolism and ER proteostasis (100,120). The SELENOT mRNA is detected at embryonic day 7 in rat embryo and placenta (38). A strong expression is observed at embryonic day 20 in many developing organs (brain, thymus, liver, kidney, testis, adrenal), whereas other organs like the gastrointestinal tract or the skeletal muscle showed a less intense expression (38,120). In the developing brain, a strong SELENOT signal is found in neural progenitors located in the subventricular zone, the intermediate zone and the cortical plate, and in neurons of the external germinative layer of the cerebellar cortex (120). This pattern is conserved during evolution since in *C. elegans* the SelT-1.1 isoform is expressed throughout development in most cells from pre-bean embryonic stages at the epidermal enclosure stage to the adult stage (100). When the

SELENOT gene was specifically disrupted in neural precursors (mutant *Nes-Cre/SelT^{fl/fl}* mice), several brain structures including the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum showed a significant growth retardation during the first postnatal week (19). Their volume reduction was associated with an increase in neuroblast death by apoptosis, which could be linked to an elevation of ROS levels. Despite a morphological compensation in adulthood, mutant mice exhibit hyperactive and anxiety-like behaviours, raising the possibility that SELENOT is also required for neural network maturation. Disturbances in ontogenesis are also observed in pancreatic islets of SELENOT-insKO mice, as morphometric analyses showed that the islets were smaller and their number increased in mutant mice compared to controls (92). In line with these developmental abnormalities, some data support a crucial role of SELENOT in adhesion processes. Hence, cell adhesion is impaired in murine fibroblasts with decreased SELENOT levels (112), and HEK293 cells depleted in SELENOT have a deficit in the maturation of GPI-APs, a class of proteins comprising adhesion molecules such as semaphorins, ephrins, NCAM etc. (56,123). These processes being fundamental during implantation and placentation, they may explain the embryonic lethality observed as early as embryonic day 8 in SELENOT-KO mice and which may occur earlier (14).

As mentioned above, SELENOT expression at adulthood is restricted to different endocrine cell types. It is highly abundant in the spermatogenic and the testosterone-producing Leydig cells of the testis (120), in lactotrope, gonadotrope, thyrotrope, corticotrope, and somatotrope cells of the pituitary (40), or in β and δ cells of the pancreas (92), suggesting its implication in major functions including growth, reproduction and energy metabolism. Endocrine cells are devoted to the regulation of body homeostasis, and selenoproteins such as SELENOT could play a key role in this vital process. For instance, the hypothalamo-pituitary axis (HPA) is responsible for the neuroendocrine adaptation to the stress response. This response is characterized by the hypothalamic release of corticotropin-releasing factor (CRF), which binds to CRF receptors on the anterior pituitary gland and stimulates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion. CRF was able to stimulate SELENOT expression in pituitary corticotrope tumour cells (AtT20) (40). In addition, CRF-induced ACTH secretion was abolished after SELENOT gene knockdown, indicating that SELENOT is essential to adapt secretion to environmental cues.

20

Supporting this idea, SELENOT levels are not homogeneous between pituitary cells of the same population, which may be related to their distinct secretory status, a phenomenon well described for different endocrine cell types (36,37,81). In the periphery, SELENOT was detected in β -pancreatic cells, and it has been shown that glucose tolerance after an oral administration is altered in conditional β -pancreatic cell SELENOT-KO mice, suggesting that SELENOT is essential to adapt insulin production/secretion to changing glucose levels (92). Further supporting a role in β cell function, SELENOT was also able to potentiate PACAP-induced insulin secretion.

In summary, SELENOT, as a target of the trophic AMPc/PKA and metabolic AMPK/PGC-1 α /NRF-1 signalling pathways, profoundly impinges ontogenesis, cell differentiation and secretion. These functional studies corroborate its implication in *N*-glycosylation and ER homeostasis, being overexpressed when the folding and quality control machinery has to adapt to the massive protein synthesis required to undergo normal development and maintenance of endocrine/neuroendocrine tissue homeostasis (47).

SELENOT promotes cell survival in pathophysiological stressful conditions

SELENOT expression has been shown to be upregulated after exposure to a number of noxious pathophysiological signals including oxidative stress, ER stress, inflammation, heavy metal and neurotoxin exposure. *In vitro*, exposure to oxidative stress (H₂O₂) or ER stress (tunicamycin or dithiothreitol) inducers leads to an increase in SELENOT levels, and cells in which SELENOT levels have been reduced experimentally were less resistant to all these stressors (3,14,19,40). SELENOT was hardly detected in the normal brain, but its expression increased in the rodent brain in hypoxic conditions (49) and in neurons and astrocytes of the nigrostriatal pathway in the mouse MPTP model of PD (14). These observations are consistent with data obtained in humans, i.e. SELENOT overexpression in the caudate putamen of *post-mortem* PD patients (14). When *Nes-Cre/SelT^{fl/fl}* mice were exposed to MPTP, the neurotoxin effect resulted in the death of the majority of KO animals within 2 h after injection, in contrast to WT animals which survived normally in these conditions (14). Likewise, SELENOT expression was undetectable in the adult heart, but cardiac SELENOT expression was induced after ischemic injury (98,99). SELENOT levels increased in liver and spleen in fish (*Carassius auratus*) after exposure to different

stressors, such as cadmium or H₂O₂ (21). Increased SELENOT expression was also observed in spleen and thymus during lipopolysaccharide-induced inflammatory response in pig (117). Furthermore, SELENOT was upregulated in the mouse liver during its regeneration after hepatectomy (120). It should be mentioned that SELENOT mRNA levels may vary oppositely according to the nature of the stress. For example, isoproterenol and T3 both induce cardiac hypertrophy, but SELENOT levels are either down or up-regulated by these agents, respectively (48). Likewise, in cancer cells, SELENOT is overexpressed in the hepatocarcinoma HepG2 and HU7 cell lines (39,136), while it is reduced in paracarcinoma and in gastric cancer, compared to controls (63).

Hence, these studies point to an important role of SELENOT in pathophysiological stressful situations. Together with the high SELENOT expression in endocrine cells which have to face a physiological stress during sustained secretion, these observations highlight the role of SELENOT in the ER, allowing different cells to cope with various stressors.

Conclusions and future directions

The ER is the principle subcellular compartment involved in the quality control and folding of secretory and membrane proteins. Protein folding in the ER is a complex and error-prone process. When misfolded proteins accumulate in the ER, reactive oxygen species increase and Ca²⁺ leaks from the ER, thus compromising cell viability if the stress is not resolved (20,22,25,41,91,129). ER stress actually contributes to the aetiology of many human diseases. For instance, the accumulation of misfolded and aggregated proteins is a common characteristic of neurodegenerative diseases (106). It is also the hallmark of cancer, diabetes, metabolic syndromes, cardiovascular and inflammatory/immune diseases, many diseases for which the restoration of ER homeostasis is proposed as a new potential therapeutic target (31,34,55,77,128). Because UPR activation is inextricably linked to the maintenance of ER and cell homeostasis, finding UPR biomarkers and targets is a major therapeutic issue (7).

Major breakthroughs have recently been made on the function of SELENOT, showing that it is essential to life and to cope with cellular stress situations, making it one of the most important selenoproteins. Even if the precise function of this selenoprotein remains to be further investigated, recent data identified SELENOT as an ER-resident protein and a partner of KCP2, a subunit of the STT3A-type OST complex involved in co-

22
translational *N*-glycosylation. Through its involvement in *N*-glycosylation, a process which is essential for glycoprotein quality control system, it is very likely that SELENOT plays a crucial role to maintain ER homeostasis when cellular metabolic activity increases, such as in secreting or in differentiating cells, to ultimately ensure that its protein-folding capacity is not overwhelmed (Fig. 7A, B). Owing to the important biological functions of oligosaccharides in glycoproteins, incorrect synthesis of these compounds results in diverse human diseases with up to 100 inherited disorders, named congenital disorders of glycosylation (CDG) (52). SELENOT could be a candidate gene in these diseases, but the possibility of a genetic alteration in SELENOT has not yet been documented, neither in these diseases nor in any other pathology, while mutations or polymorphisms in two other ER-resident selenoproteins, SELENON and SELENOS, are associated with human pathophysiological conditions, such as myopathies and inflammation, respectively (26,87). The increase in SELENOT expression found in the caudate putamen of PD patients and in different pathophysiological animal models also suggests that SELENOT could be a new biomarker of these disorders (14). Mainly expressed during embryogenesis, SELENOT contributes to the development of many organs including the brain and the pancreas. The studies performed with the mutant *Nes-Cre/SelT^{fl/fl}* mice provide valuable clues regarding the role of SELENOT during neurogenesis. Indeed, the volume reduction of several brain structures (neocortex, cerebellum and hippocampus) observed during the first postnatal week and the hyperactive behaviour observed in this mutant at adulthood indicate that SELENOT is also critical for the formation of functional neural circuits. The recent finding of SELENOT requirement for the *N*-glycan-dependent maturation of GPI-anchored protein is highly relevant in this regard. Indeed, it is now well established that a subset of GPI-APs, as CAMs, have an impact on brain development and function through their involvement in neuritogenesis and synaptogenesis (75,84). Also, a number of neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorder (ASD), are associated with mutations of several GPI-APs including contactin-4, -5, -6 (90) and Ntm (16). Further studies are warranted to confirm in *Nes-Cre/SelT^{fl/fl}* model the influence of SELENOT on GPI synthesis. Altogether, these observations suggest that SELENOT participates in various physiological processes including hormone/peptide secretion, growth, neuroprotection/regeneration and inflammation, or pathological conditions such as cancer which are associated to an

increase in energy demand and stress. In particular, altered *N*-glycosylation and ER stress which are observed in the hypothalamus and pancreas, may lead to metabolic perturbations, and *in fine*, to obesity, diabetes and the metabolic syndrome, as recently reported for the ER-resident SELENOM-deficient mice (33).

A better understanding of the mechanisms linking ER selenoproteins and protein folding and redox homeostasis regulation might lead to the development of novel therapeutic targets for different human diseases. In support of this notion, it is interesting to note that a SELENOT-derived peptide, SELENOT43-52 (PSELT) encompassing the Sec-containing redox motif inhibits oxidative and nitrosative stress and exerts a potent pharmacological post-conditioning protective effect in the heart after ischaemic injury (98). PSELT-dependent cardioprotection is accompanied by a significant increase in phosphorylated Akt, Erk-1/2 and Gsk3 α - β and a reduction of apoptosis. Another brain-penetrant selenopeptide-TAT (SelPep) composed of a TAT peptide attached to a stretch of amino acids derived from the C terminus of SELENOP has been designed to deliver Se into the cells. SelPep possesses a wide therapeutic window *in vitro* and *in vivo* for hemorrhagic stroke and possibly other central nervous system (CNS) and non-CNS conditions associated with ferroptotic death. It drives a TFPA2c and Sp1-dependent transcriptional response, including genes of the selenome, to counteract reactive lipids and cell death (5). Our preliminary results indicate that PSELT could exert protective effects in various diseases, associated with cellular stress and degeneration. This opens a new avenue in clinical research, especially for different degenerative and metabolic diseases associated with oxidative and ER stress, for which no preventive or curative therapies are currently available.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, Rouen Normandie University, Conseil Régional de Normandie, the FEDER program of the European Union (ERDF) (PACT-CBS 2016-2019 and PHEDERCPG 2017-2019 programs). Europe gets involved in Normandie with ERDF. HP was supported by a fellowship from the Federation Hospitalo-Universitaire "SURFACE".

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Aachmann FL, Fomenko DE, Soragni A, Gladyshev VN, and Dikiy A. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* 282: 37036-37044, 2007.
2. Abascal F, Zardoya R, and Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104-2105, 2005.
3. Abid H, Cartier D, Hamieh A, Francois-Bellan AM, Bucharles C, Pothion H, *et al.* AMPK Activation of PGC-1alpha/NRF-1-Dependent SELENOT Gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress. *Mol Neurobiol* 56: 4086-4101, 2019.
4. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, and Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35: 74-82, 2010.
5. Alim I, Caulfield JT, Chen Y, Swarup V, Geschwind DH, Ivanova E, *et al.* Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke. *Cell* 177: 1262-1279, 2019.
6. Allen KN, Entova S, Ray LC, and Imperiali B. Monotopic membrane proteins join the fold. *Trends Biochem Sci* 44: 7-20, 2019.
7. Almanza A, Carlesso A, Chintia C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B *et al.* , Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* 286: 241-278, 2019.
8. Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, and Boukhzar L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* 127: 145-152, 2018.
9. Appenzeller-Herzog C, and Simmen T. ER-luminal thiol/selenol-mediated regulation of Ca²⁺ signalling. *Biochem Soc Trans* 44: 452-459, 2016.
10. Arner ES. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* 316: 1296-1303, 2010.
11. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, and Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326-332, 2000.

12. Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1496-1500, 1980.
13. Bonkobara M, Das A, Takao J, Cruz PD, and Ariizumi K. Identification of novel genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes. *Br J Dermatol* 148: 654-664, 2003.
14. Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, *et al.* Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 24: 557-574, 2016.
15. Braunger K, Pfeffer S, Shrimal S, Gilmore R, Berninghausen O, Mandon EC, *et al.* Structural basis for coupling protein transport and N-glycosylation at the mammalian endoplasmic reticulum. *Science* 360: 215-219, 2018.
16. Brevik EJ, van Donkelaar MM, Weber H, Sanchez-Mora C, Jacob C, Rivero O, *et al.* Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 171: 733-747, 2016.
17. Castellano S. On the unique function of selenocysteine - insights from the evolution of selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1463-1470, 2009.
18. Castets P, Lescure A, Guicheney P, and Allamand V. Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J Mol Med (Berl)* 90: 1095-1107, 2012.
19. Castex MT, Arabo A, Benard M, Roy V, Le Joncour V, Prevost G, *et al.* Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol Neurobiol* 53: 5818-5832, 2016.
20. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, and Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8: 213, 2014.
21. Chen W, Zhang Z, Yan F, Jiang X, Qin S, and Dong H. Identification of three selenoprotein T paralogs in goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis in response to environmental stressors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 203: 65-75, 2017.
22. Cherepanova N, Shrimal S, and Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 41: 57-65, 2016.

23. Cherepanova NA and Gilmore R. Mammalian cells lacking either the cotranslational or posttranslational oligosaccharyltransferase complex display substrate-dependent defects in asparagine linked glycosylation. *Sci Rep* 6: 20946, 2016.
24. Cherepanova NA, Shrimal S, and Gilmore R. Oxidoreductase activity is necessary for N-glycosylation of cysteine-proximal acceptor sites in glycoproteins. *J Cell Biol* 206: 525-539, 2014.
25. Chong WC, Shastri MD, and Eri R. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A vicious nexus implicated in Bowel Disease pathophysiology. *Int J Mol Sci* 18: pii: E771, 2017.
26. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, *et al.* Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 37: 1234-1241, 2005.
27. Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, *et al.* Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* 46: 6871-6882, 2007.
28. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113, 2004.
29. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Hondal RJ, Rozovsky S, Urschitz J, and Hoffmann PR. Selenoprotein K Increases Efficiency of DHH6 Catalyzed Protein Palmitoylation by Stabilizing the Acyl-DHHC6 Intermediate. *Antioxidants (Basel)* 7: 4, 2017.
30. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, Osterheld HJ, Hess FM, Mercier F *et al.* Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16478-1683, 2014.
31. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, *et al.* Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 23: 1144-1170, 2015.
32. Gascon S, Murenu E, Masserdotti G, Ortega F, Russo GL, Petrik D, *et al.* Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell* 18: 396-409, 2016.

33. Gong T, Hashimoto AC, Sasuclark AR, Khadka VS, Gurary A, and Pitts MW. Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant activity. *Antioxid Redox Signal*, 2019.
34. Gonzalez-Teuber V, Albert-Gasco H, Auyeung VC, Papa FR, Mallucci GR, and Hetz C. Small Molecules to improve er proteostasis in disease. *Trends Pharmacol Sci* 40: 684-695, 2019.
35. Gouy M, Guindon S, and Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221-224, 2010.
36. Gracia-Navarro F, Malagon MM, Castano JP, Garcia-Navarro S, Sanchez-Hormigo A, Luque RM *et al*. Secretory plasticity of pituitary cells: a mechanism of hormonal regulation. *Arch Physiol Biochem* 110: 106-112, 2002.
37. Grindeland RE, Kraemer WJ, and Hymer WC. Two types of rat pituitary somatotrophs secrete growth hormone with different biological and immunological profiles. *Growth Horm IGF Res* 36: 52-56, 2017.
38. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, *et al*. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* 22: 1756-1768, 2008.
39. Guariniello S, Di Bernardo G, Colonna G, Cammarota M, Castello G, and Costantini S. Evaluation of the selenotranscriptome expression in two hepatocellular carcinoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst)*: 419561, 2015.
40. Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, *et al*. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* 18: 1935-1946, 2017.
41. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, *et al*. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 15: 481-490, 2013.
42. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25: 1895-1908, 2011.
43. Hardie DG. AMPK-sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 20: 939-952, 2014.

44. Haynes CM and Ron D. The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123: 3849-55, 2010.
45. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 89-102, 2012.
46. Hetz C and Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 69: 169-181, 2018.
47. Hillary RF and FitzGerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci* 25: 48, 2018.
48. Hoffmann FW, Hashimoto AS, Lee BC, Rose AH, Shohet RV, and Hoffmann PR. Specific antioxidant selenoproteins are induced in the heart during hypertrophy. *Arch Biochem Biophys* 512: 38-44, 2011.
49. Ikematsu K, Tsuda R, Tsuruya S, and Nakasono I. Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display. *Forensic Sci Int* 169: 168-172, 2007.
50. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, *et al.* Selenium utilization by gpx4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis. *Cell* 172: 409-422, 2018.
51. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73-82, 2017.
52. Jaeken J and Peanne R. What is new in CDG? *J Inherit Metab Dis* 40: 569-586, 2017.
53. Jeon YH, Ko KY, Lee JH, Park KJ, Jang JK, and Kim IY. Identification of a redox-modulatory interaction between selenoprotein W and 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1863: 10-18, 2016.
54. Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, *et al.* Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12485-12490, 2008.
55. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, *et al.* ER stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 40: 1337-1343, 2017.
56. Kinoshita T and Fujita M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J Lipid Res* 57: 6-24, 2016.

57. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, *et al.* Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443, 2003.
58. Kryukov GV and Gladyshev VN. Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells* 5: 1049-1060, 2000.
59. Kryukov GV, Kryukov VM, and Gladyshev VN. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* 274: 33888-33897, 1999.
60. Labunskyy VM, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 94: 739-777, 2014.
61. Laguesse S, Creppe C, Nedialkova DD, Prevot PP, Borgs L, Huysseune S, *et al.* A dynamic unfolded protein response contributes to the control of cortical neurogenesis. *Dev Cell* 35: 553-567, 2015.
62. Lamriben L, Graham JB, Adams BM, and Hebert DN. N-Glycan-based ER molecular chaperone and protein quality control system: the calnexin binding cycle. *Traffic* 17: 308-326, 2016.
63. Lan X, Xing J, Gao H, Li S, Quan L, Jiang Y, *et al.* Decreased expression of selenoproteins as a poor prognosticator of gastric cancer in humans. *Biol Trace Elem Res* 178: 22-28, 2017.
64. Lee JH, Park KJ, Jang JK, Jeon YH, Ko KY, Kwon JH, *et al.* Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K binding to p97(VCP) protein is essential for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 290: 29941-29952, 2015.
65. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, and Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1569-1574, 2009.
66. Li JP, Zhou JX, Wang Q, Gu GQ, Yang SJ, Li CY, *et al.* Se enhances MLCK activation by regulating selenoprotein T (SelT) in the gastric smooth muscle of rats. *Biol Trace Elem Res* 173: 116-125, 2016.
67. Liu J and Rozovsky S. Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* 23: 795-813, 2015.

68. Liu YS, Guo XY, Hirata T, Rong Y, Motooka D, Kitajima T, *et al.* N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing. *J Cell Biol* 217: 585-599, 2018.
69. Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, and Gladyshev VN. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Res* 34: 4012-4024, 2006.
70. Lobanov AV, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1424-1428, 2009.
71. Marino M, Stoilova T, Giorgi C, Bachi A, Cattaneo A, Auricchio A, *et al.* SEP1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. *Hum Mol Genet* 24: 1843-1455, 2015.
72. Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, *et al.* Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* 7: e33066, 2012.
73. Mariotti M, Salinas G, Gabaldon T, and Gladyshev VN. Utilization of selenocysteine in early-branching fungal phyla. *Nat Microbiol* 4: 759-765, 2019.
74. Martin-Romero FJ, Kryukov GV, Lobanov AV, Carlson BA, Lee BJ, Gladyshev VN, *et al.* Selenium metabolism in Drosophila: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem* 276: 29798-29804, 2001.
75. Maydan G, Noyman I, Har-Zahav A, Neria ZB, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, *et al.* Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation in PIGN. *J Med Genet* 48: 383-389, 2011.
76. Mazza R, Gattuso A, Imbrogno S, Boukhzar L, Leo S, Mallouki BY, *et al.* Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Biol* 222, 2019.
77. Mercado G, Castillo V, Soto P, and Sidhu A. ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Res* 1648: 626-632, 2016.
78. Mohorko E, Owen RL, Malojcic G, Brozzo MS, Aebi M, and Glockshuber R. Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Structure* 22: 590-601, 2014.

79. Moustafa ME and Antar HA. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* 50: 736-747, 2012.
80. Muffato M, Louis A, Poinsel CE, and Roest Crolius H. Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics* 26: 1119-1121, 2010.
81. Murburg MM, Wilkinson CW, Raskind MA, Veith RC, and Dorsa DM. Evidence for two differentially regulated populations of peripheral beta-endorphin-releasing cells in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1033-1040, 1993.
82. Naismith TV, Dalal S, and Hanson PI. Interaction of torsinA with its major binding partners is impaired by the dystonia-associated DeltaGAG deletion. *J Biol Chem* 284: 27866-27874, 2009.
83. Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, and Morishita S. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res* 17: 1254-1265, 2007.
84. Ng BG and Freeze HH. Human genetic disorders involving glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors and glycosphingolipids (GSL). *J Inherit Metab Dis* 38: 171-178, 2015.
85. Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TP, *et al.* Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics. *Plant Physiol* 160: 1037-1051, 2012.
86. Novoselov SV, Kim HY, Hua D, Lee BC, Astle CM, Harrison DE, *et al.* Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxid Redox Signal* 12: 829-838, 2010.
87. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, *et al.* Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* 12: 1045-1053, 2003.
88. Pitts MW and Hoffmann PR. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium* 70: 76-86, 2018.
89. Pitts MW, Reeves MA, Hashimoto AC, Ogawa A, Kremer P, Seale LA, *et al.* Berry MJ. Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *J Biol Chem* 288: 26121-26134, 2013.

90. Poot M. A candidate gene association study further corroborates involvement of contactin genes in autism. *Mol Syndromol* 5: 229-235, 2014.
91. Preissler S and Ron D. Early events in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, 2019.
92. Prevost G, Arabo A, Jian L, Queleynec E, Cartier D, Hassan S, *et al.* The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154: 3796-3806, 2013.
93. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, and Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* 148: 183-193, 2016.
94. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356: 233-241, 2000.
95. Reeves MA, Bellinger FP, and Berry MJ. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid Redox Signal* 12: 809-918, 2010.
96. Roboti P and High S. Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *J Cell Sci* 125: 220-232, 2012.
97. Roboti P and High S. The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *J Cell Sci* 125: 3474-3484, 2012.
98. Rocca C, Boukhzar L, Granieri MC, Alsharif I, Mazza R, Lefranc B, *et al.* A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta Physiol (Oxf)* 223: e13067, 2018.
99. Rocca C, Pasqua T, Boukhzar L, Anouar Y, and Angelone T. Progress in the emerging role of selenoproteins in cardiovascular disease: focus on endoplasmic reticulum-resident selenoproteins. *Cell Mol Life Sci* 76: 3969-3985, 2019.
100. Romanelli-Cedrez L, Carrera I, Otero L, Miranda-Vizuete A, Mariotti M, Alkema MJ, *et al.* Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 108: 174-182, 2017.

101. Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, and Gilmore R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136: 272-283, 2009.
102. Santessmasses D, Mariotti M, and Gladyshev VN. Tolerance to selenoprotein loss differs between human and mouse. *Mol Biol Evol* 37:341-354, 2020.
103. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, and Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11: 2409-2427, 2009.
104. Satoh J, Kawana N, and Yamamoto Y. Pathway Analysis of CHIP-Seq-Based NRF1 Target Genes Suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regul Syst Bio* 7: 139-152, 2013.
105. Scarpulla RC, Vega RB, and Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23: 459-566, 2012.
106. Scheper W, and Hoozemans JJ. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol* 130: 315-31, 2015.
107. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, *et al.* Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 120: 4220-4235, 2010.
108. Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 8: 160-171, 2011.
109. Schulz BL, Stirnimann CU, Grimshaw JP, Brozzo MS, Fritsch F, Mohorko E, *et al.* Oxidoreductase activity of oligosaccharyltransferase subunits Ost3p and Ost6p defines site-specific glycosylation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11061-11066, 2009.
110. Schwarz DS and Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73: 79-94, 2016.
111. Schweizer U and Fradejas-Villar N. Why 21? The significance of selenoproteins for human health revealed by inborn errors of metabolism. *FASEB J* 30: 3669-3681, 2016.

112. Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, and Hatfield DL. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol* 87: 953-961, 2009.
113. Shetty SP and Copeland PR. Selenocysteine incorporation: A trump card in the game of mRNA decay. *Biochimie* 114: 97-101, 2015.
114. Shibatani T, David LL, McCormack AL, Frueh K, and Skach WR. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44: 5982-5992, 2005.
115. Shrimal S, Cherepanova NA, and Gilmore R. DC2 and KCP2 mediate the interaction between the oligosaccharyltransferase and the ER translocon. *J Cell Biol* 216: 3625-3638, 2017.
116. Sponholz S, von der Hagen M, Hahn G, Seifert J, Richard P, Stoltenburg-Didinger G, *et al.* Selenoprotein N muscular dystrophy: differential diagnosis for early-onset limited mobility of the spine. *J Child Neurol* 21: 316-320, 2006.
117. Sun LH, Pi DA, Zhao L, Wang XY, Zhu LY, Qi DS, *et al.* Response of selenium and selenogenome in immune tissues to lps-induced inflammatory reactions in pigs. *Biol Trace Elem Res* 177: 90-96, 2017.
118. Sunde RA. Selenium regulation of selenoprotein enzyme activity and transcripts in a pilot study with Founder strains from the Collaborative Cross. *PLoS One* 13: e0191449, 2018.
119. Tabas I and Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13: 184-190, 2011.
120. Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka DL, Chagraoui A, *et al.* The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* 152: 4322-4335, 2011.
121. Touat-Hamici Z, Legrain Y, Bulteau AL, and Chavatte L. Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 289: 14750-14761, 2014.
122. Tu BP and Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341-346, 2004.

123. Um JW and Ko J. Neural Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in synaptic specification. *Trends Cell Biol* 27: 931-945, 2017.
124. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, *et al.* Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117: 4135-4142, 2004.
125. Vander Heyden AB, Naismith TV, Snapp EL, and Hanson PI. Static retention of the luminal monotopic membrane protein torsinA in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 30: 3217-3231, 2011.
126. Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E, *et al.* Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. *J Immunol* 186: 2127-2137, 2011.
127. Walter P and Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1086, 2011.
128. Wang M and Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529: 326-335, 2016.
129. Wang Q, Groenendyk J, and Michalak M. Glycoprotein quality control and endoplasmic reticulum stress. *Molecules* 20: 13689-13704, 2015.
130. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124, 1999.
131. Yim SH, Clish CB, and Gladyshev VN. Selenium deficiency is associated with pro-longevity mechanisms. *Cell Rep* 27: 2785-2797 e3, 2019.
132. Yim SH, Everley RA, Schildberg FA, Lee SG, Orsi A, Barbati ZR, *et al.* Role of Selenof as a Gatekeeper of Secreted Disulfide-Rich Glycoproteins. *Cell Rep* 23: 1387-1398, 2018.
133. Yoboue ED, Sitia R, Simmen T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis* 9: 331, 2018.
134. Yu SS, Du JL. Selenoprotein S: a therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? *Cardiovasc Diabetol* 16: 101, 2017.
135. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 4350965, 2016.

36

136. Zhao H, Tang J, Xu J, Cao L, Jia G, Long D, et al. Selenoprotein genes exhibit differential expression patterns between hepatoma HepG2 and normal hepatocytes LO2 cell lines. *Biol Trace Elem Res* 167: 236-41, 2015.

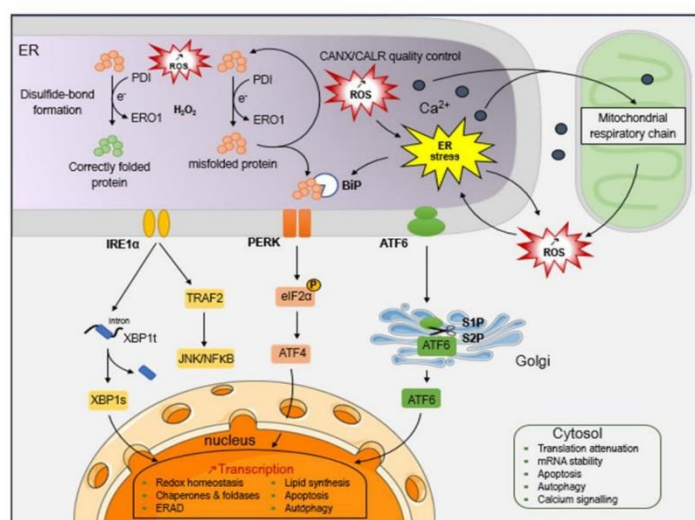


FIG. 1. Redox signaling and unfolded protein response. Protein folding requires disulfide-bond formation through the protein disulfide isomerase (PDI) activity which becomes reduced. PDI activity restoration by ERO1 generates ROS through hydrogen peroxide formation (H_2O_2). If a protein is properly folded, it is secreted to its final destination. Otherwise, the quality control system mediated by the lectins calnexin (CANX) and calreticulin (CALR) affects the misfolded protein to a new folding/isomerization cycle, increasing the H_2O_2 levels, or it is retrotranslocated into the cytosol where it will be degraded. Elevation of H_2O_2 and ROS induces the exit of Ca^{2+} from the ER cisternae to the cytosol, which penetrates in mitochondria where it stimulates the respiratory chain and generates ROS. Reciprocally, mitochondrial ROS could increase ROS and Ca^{2+} levels in the ER, promoting protein misfolding and ER stress. In order to alleviate improperly folded protein load, cell activates several signalling pathways named the unfolded protein response (UPR). The UPR modifies the gene expression of chaperones to promote protein folding and lipid synthesis, and upregulates ER membrane-associated protein degradation (ERAD) genes to eliminate misfolded proteins or genes involved in redox homeostasis. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

Pothion et al. Fig. 2

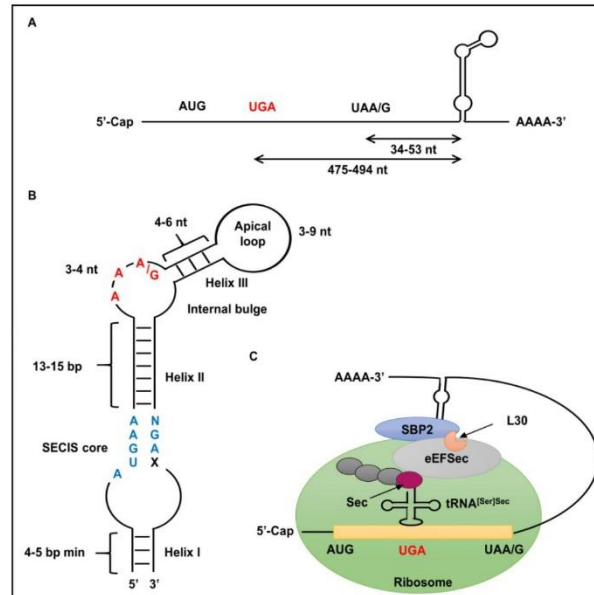


FIG. 2. Mechanism of UGA-selenocysteine recoding. (A) 2D Structure of the conserved SECIS element in mammals. Two nucleotide motifs are essential for conversion of UGA to Sec codon, including a non-Watson-Crick tandem paired quartet (blue font letters) formed with the AUGA and GA sequences located at the 5' and 3' ends, respectively, of the conserved SECIS core, and the unpaired AAA/G nucleotides present in an internal bulge (red font letters). (B) Organization of the SECIS element in the 3' end of the selenoprotein mRNA sequence. (C) Sec-insertion machinery in eukaryotes. During protein translation, the SECIS element recruits a protein complex including SBP2 and the specific elongation factor eEFSec, along with other less known proteins comprising the ribosomal protein L30. This complex allows the interaction between the SECIS element and the ribosome, a step which is necessary to convert the UGA into a Sec codon. eEFSec, eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific; SBP2, SECIS binding protein 2; Sec, selenocysteine; SECIS, selenocystein insertion sequence. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

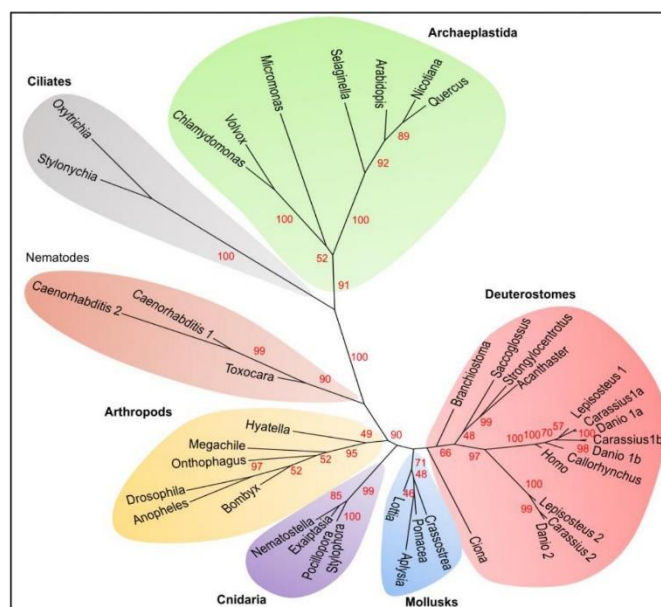


FIG. 3. Phylogenetic tree of SELENOT based on Maximum Likelihood method. Protein sequences from 41 representative species of eukaryotes were aligned with MUSCLE (28). The unrooted phylogenetic tree was constructed by Seaview using the PhyML algorithm (35). The best amino acid substitution model for the alignment was determined to be LG+I+G+F using ProtTest (2) on the University of Vigo server (http://darwin.uvigo.es/software/protest2_server.htm). The robustness of the tree was assessed by the bootstrap procedure with 1000 replications. Bootstrap values lower than 40 have been removed. The sequences and their accession numbers are given in Figure S1. The alignment on which the tree was constructed is displayed in Figure S2. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

Downloaded by UPPSALA UNIVERSITETSBIBLIOTEK from www.liebertpub.com at 06/13/20. For personal use only.
 Antioxidants and Redox Signaling
 Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis (DOI: 10.1089/ars.2015.7931)
 This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.

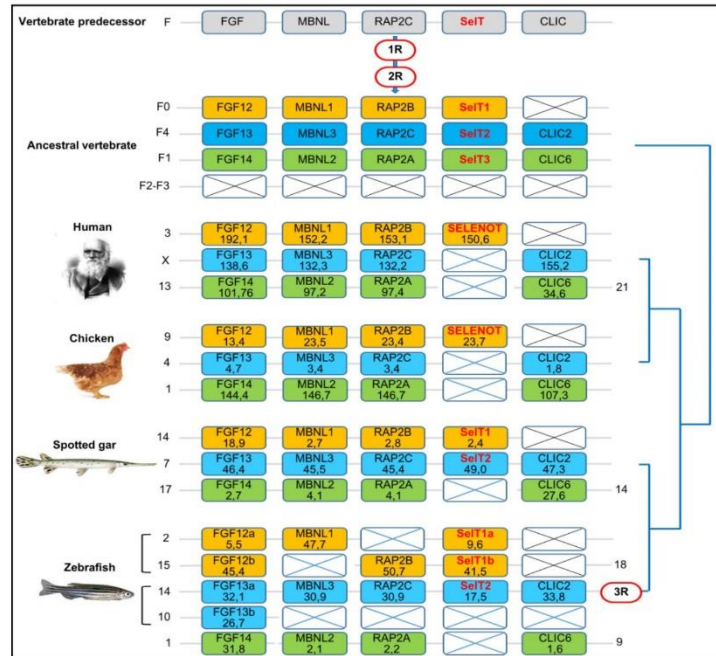


FIG. 4. The evolutionary history and analysis of chromosomal regions and conserved synteny of the *SELENOT*-related genes and their neighboring gene families. Synteny was carried out by using Genomicus (80). The gene repertoire present in the vertebrate predecessor is displayed in the top panel, the duplication scheme further displays which orthologs were retained in the vertebrate ancestor following two basal rounds of vertebrate genome doubling (1R and 2R), and finally the last four panels display the gene repertoire present in human, chicken, spotted gar and zebrafish. Crosses indicate gene loss or gene not (yet) identified. Each paralogon member is presented in a separate color. F designates one of the chromosomes of the vertebrate predecessor prior to 1R and 2R, according to the Nakatani's nomenclature (83). F0-F4 correspond to the different daughter chromosomes of F following 1R and 2R. The detailed chromosomal locations of genes displayed in this map are included in Table S1. 3R, teleost fish-specific genome doubling; SeIT, SELENOT, selenoprotein T. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

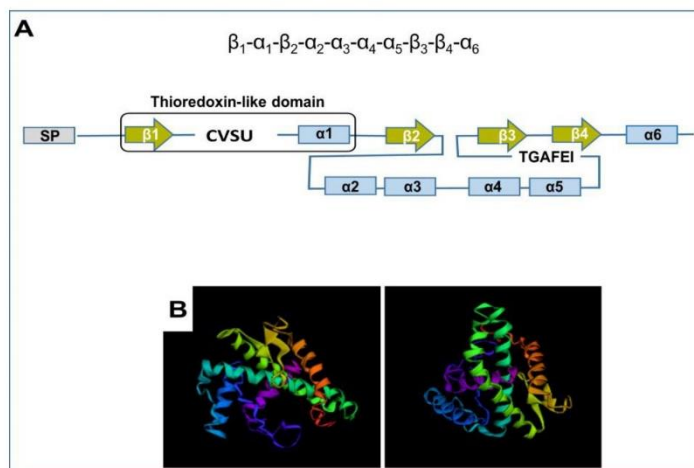


FIG. 5. SELENOT protein structure. (A) SELENOT from *Rattus norvegicus* secondary structure. α , α -helix and β , β -sheet. The CXXU redox motif and conserved TGAFEI signature of thioeredoxin-type selenoproteins (redoxins) are indicated. (B) Two 3D models of SELENOT predicted by the QUARK server (Xu and Zhang 2012). Rdx, Redox. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com.ars.

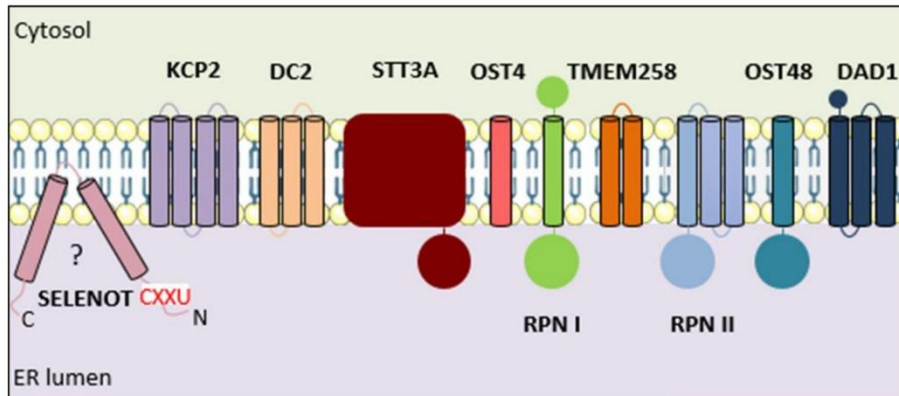


FIG. 6. Subunit composition of the eukaryotic A type-OST complex. STT3A is the catalytic subunit of this complex, which also comprises 6 accessory subunits in common with the STT3-B complex, including RPN1, RPN2, OST48, DAD1, TMEM258, and OST4. KCP2 and DC2 are specific subunits of the STT3A complex. SELENOT is presented as a putative monotopic protein. DAD1, defender against cell death 1; KCP2, Keratinocyte Associated Protein 2; OST, oligosaccharyltransferase; OST4, OST 4-kDa subunit; OST48, OST 48-kDa subunit; RPN1, ribophorin 1; RPN2, ribophorin 2; TMEM258, transmembrane protein 258. (modified from (15). To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

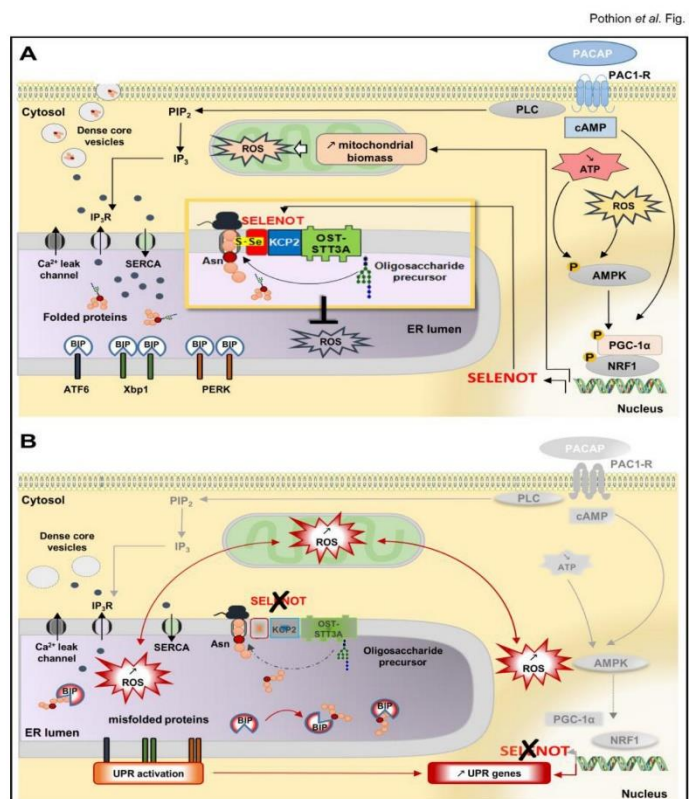


FIG. 7. Scenario proposed to explain how SELENOT preserves ER homeostasis after exposure to physiological and pathophysiological stresses. (A) SELENOT is associated with the STT3A-type OST complex in the ER membrane, where it could assist folding of certain glycoproteins. It is induced by physiological (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), low ATP) or harmful (oxidative stress, heavy metal, inflammation) signals *via* activation of PKA and AMPK, in order to preserve ER folding homeostasis. Correctly folded proteins are addressed to their final destination through the secretory pathway. (B) In SELENOT-deficient cells, the oligosaccharide precursor is not transferred to a number of glycoproteins. Accumulation of misfolded proteins triggers the unfolded protein response (UPR) and the transcriptional expression of UPR target genes. An insufficient UPR response leads to a major impairment of redox and Ca²⁺ homeostasis, Ca²⁺ leaks from the ER lumen following IP₃R oxidation, oxidative stress develops due to protein overload, leading to mitochondrial dysfunction and ultimately causing cell death.

44

AMPK, AMP-activated protein kinase; Asn, asparagine; ATF6, activating Transcription Factor 6; BiP/GRP78, heat shock 70 kD protein 5; cAMP, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; IP3R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; KCP2, Keratinocyte Associated Protein 2; NRF-1, nuclear respiratory factor 1; OST, oligosaccharyltransferase; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PAC1R, PACAP type 1 receptor, PERK, eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; ROS, reactive oxygen species; S, sulfur; Se, selenium; SELENOT, selenoprotein T; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; UPR, unfolded protein response; Xbp1, X-Box Binding Protein 1. To see this illustration in color, the reader is referred to the online version of this article at www.liebertpub.com/ars.

TABLE S1. Chromosomal location of gene orthologs in the synteny analysis of the *SELENOT* loci. All human gene names in the table are approved HGNC symbols and the genes from other species have been given the name of their human orthologs. Chromosomal locations of genes are expressed in Mb. Blanks represent genes that have not been found in the current genome databases. The chromosomal locations of the genes are color-coded as in Fig 2. Mb, megabase; SELENOT, selenoprotein T.

FIG. S1. Amino acid sequences of the different SELENOT used for phylogenetic analysis and their accession numbers. Conserved selenocysteine (U) and cysteine (C) amino acids are colored in yellow and blue, respectively. Conserved X (X being a stop codon which has not been recoded in *Sec in silico*, is in green.

FIG. S2. Sequence alignment of the SELENOT proteins used for the phylogenetic analysis. Conserved selenocysteine (U) and cysteine (C) are colored. The alignment was made using Muscle (Edgar, 2004) and then manually optimized. SelT, selenoprotein T.

Ciliates

>Oxytricha trifallax EJY85907.1

MNSGREEPDSKKAASSASAERDQNRHQNEGQNGYQQRQQQNGNQQAEGGVNTRILMIF
 VGCFVMDVTRSFFAADEPDEAKKVNQHQHSHGEGHEHGNLHETEYMKEASRYNREDSDEQA
 DMQSGGVRIQDSSIGKEIPVEEYENGLQRKGNFLQVKYIEQSAPVIVTGGFFPPGPTKLLAQVFSF
 VQMGFILFIFMGDALFRALNKPVELYTRISQNKWGWVIGTWFIGGQLQGALLQTGAFEILVNDNLEF
 SKIASGRMPDLNIINNIFEKYNVILG

>Stylonychia lemnae CDW88939.1

MNNTKLVLMIFLGSMAFDLISRSEFASEDQEAQVNPNSQMSQSSDESMLHNTTEYQGSADSADR
 EHAYISSQSRGVKITDSSKGELEVEEDFGNGKVRKSGKSKQRADTSEMGNFLQLKKYIESSAPEVFTG
 GEYPPSPSKQMLAQLFSAQMGFILFIVGDSIFRALNKPVPFQYRISNRWTWVIGAWFIGAQVQN
 GLLSSGAFEIYVNDALEFSKITSGRMPDMTDIRIFKKHSIEL

Archaeplastida

>Micromonas pusilla EEH60129.1

MADATAARAPAANASRRPATTAGFNPTGALVVAVLLAFAGADVFTTYKDHAASASPELAPNEFAV
 ADPTSLGGKVHISFCTKUNYRGGYVHVTEIQKSFPGMEVVGSHHPPTATNAALAKAVGFAQFSAIAA
 TFGAQVFPALGMAVPSFVAGMAENKLSAGAAFFLGNTLSQNLNLTGAFEVYDGDVVFSLKNEKR
 LPNVQEILRGLSRVGRARKRAAETARLEEAT

>Volvox carteri f. nagariensis EFJ52661.1

MQLNIAKALLLIGVLMFSADVMSMFGGARVQSPIDPDGGLSLGGRVHISFCSSUGMRGAFGQVQ
 QLVRTRFPGVEVHGTTYPLPAWKRPVTAARSIQMTALAFCIAGDHIFRQLGMQPVAWYTQNVASNR
 PGAVMGVWVFGNMLITNLQNTGAFIYFDGQLIFSKLAEGRMPTMAELLGPMAYFATGAGGGSRT
 AMTDAAAAARAGGNAPRDSRARPAGNGAGVVAPEPDHDGEL

>Chlamydomonas reinhardtii XP_001689814.1

MQGLHKGAILLGIVALFIGADCFGMGGSKAPSQARVQSAMDPDGGLSLGGKLHVSFCNSUGMRGA
 FVQVMELARRRYPGLEVVGTPYPLPAWKVPVVKALQVVQFGLLGMCLAGDKVFAALGVPVPAWYTQ
 NVASNRFGAAMGVWVFGNMVVTNMQNTGAFEVFFNGDLIFSKLAEGRMPSVPELISPMQAFFEGP
 AGLHVGGAGASRP

>Selaginella moellendorffii XM_002988172.2

MASERLQQAILLPLLLMACDVWTAVRSLPAKHHHSDRQPPQEQQVQPPYVPGAKDAASYGKGFHI
 SFCTSCSFKNQAMQTKTMLETLPVPGTVVLSNYPPPFHKRMLSKIVPAIQFGGIGVALAGEQIFPMLGY

46

AAPPAWYNTFRQNKFGAVASCWLIGNFLQNALLGTAFAFEVYDGDVFSKLQTKRFTDDELDSIGK
LLVRKTGTVY

>Arabidopsis thaliana AED97080.1

MDRAQLILLGLPIFLFCSDLNLFPTPPPKPQPHRPHQPPHIPHQHRPNAIIPETLDFPSQTSGLGGAIGY
GNTVEINFCVSCSYKGTAVTMKKMLETAFPLDVLANYPPPAPKRLAKVVPVQMGVIGMIVAGDR
ILPMIGITNPPAWFHSLRANRFGSMASWTLIGNFLQSYLQSSGAFEVHCNGEPVFSKLEGRFPGEIELR
DLISKTLTRPSILTGSY

>Quercus suber XM_024037879.1

MDRAQLFLLGIPMFLFCTDIVNLFIPPPKVPPTNQFHYKPPNPITQQPILNQLHFPTQKSSGIVGGGIS
LGSTVINFCSSCSYRGNVATMKNMLDTSFPGINVVLANHPPPLPKRLLSKAVPVVQFGIIGTIMAGEQI
FPRLGFAAPPWFYSLRANKFRSIASWLLGNFIQSFLQSSGAFEVYCNELVFSKLEKFRPSEIELRDL
VGRKLSRIVDGGGGVWS

>Nicotiana tabacum XM_016582076.1

MDRTQLLLVLPLFLFISDLNLFPTPPKQSSDHHHHHQLPSVIQQPPQLDFPTQKTAGIGAVGIG
NTVSIDFCSSCFRGTAVTMKNMLENQFPGVHVLANYPPPLPKRLLSKVVPVQFGVIGLVMGGEQI
FPRLGFAVPPWFYHLRANRFGTMATTWLLGNFFQSMLQSSGAFEVYCNELVFSKLEKFRPSEIEL
KDLVGRRIANPRVVDGLGASSWS

Cnidaria

>Pocillopora damicornis XM_027191873.1

MASSVYLVAAVLSVFLMTVKEIIFPTNVQASNPEKMDRLQKAAVFTGPTIKFLYCYSXGYRKFVEEYQAQ
FIHQNFPKVRIEGDNYPFRPRQMLASVLSLAKLAVMAIVLLGERLQIWESLNDPPQAYIWATQNKM
YACILIFFVTNMIIEGQLISTGAFEVSLNDMPIWWSKLESGRLPNPSELHQIENQLKFSPIH

>Nematostella vectensis XM_001622890.1

GYQRVFEYQAQFLRQNFPHLNVESNYPPRPRQILASVISMALIAIGIIMLGEQVRLFENLNITPPEIYT
WAVNNKMYSCILIFFLSNMIIEGQLISTGAFEVSNFNDMPVWSKLQAGRLPSPNELHQIVENQMKFTSAA
Q

>Exaiptasia pallida XM_021051722.1

MASRGILVVGALSFLMTVKEILFPNNSAQDPNSMNTMKRAAMFSGPTIKVLYCYSXGYRRVFEEY
AQFLNQNFPKLQIVGDNYPPRPRQMLASIMSFTKLLIIGLIIFGERLQIFENFNIQPPPIYQWAVQNKM
YSCILIFFLSNTIEGQLVSTGAFEVTFNDIPVWSKLQAGRLPSPSELHQIVENQMKFSSPTQ

>Stylophora pistillata XM_022923423.1

MVRIEGDNYPPrPRQMLASVLSIAKLAVMAIVLLGERLQIWESLNIDPPQAYIWATQNKMYACILIFF
VTNMIIEGQLISTGAFEVSLNDMPIWSKLESGRLPNPNEHQIENQLKFSPSH

Arthropods

>Hyalella azteca XM_018169076.1

MADRAGTNLLILAALAGCLVVFDFLPSASSVKEPPAMKMTKIMGPSLRFLYCYSXGYQKVFFQYATML
QDKYPHISIMGDNYPPTWRQYIAQILSLAKILLVICVSNINIFQHLGLPTPAYWTWSSNKIYGCLMIF
FLSNAIEGQLISTGAFEIQFNDVPVWSKLETGRIPQPELFIIDNHIRLDQNPWSVSDSI

>Megachile rotundata XM_003706379.2

MLRRMKLILCFIVLCASSTKADDNQVSLTKLGAAGPTLKFYCYSCGYRKVYEEYVILRQKYPQLIEGE
NYPNPPGYNMLIAKILGFAKISLIILIVSGIDLQPLPSLWQWCIDNRFYSCIMIFFFCNAIEGQLISSGAFEI
HFNDVPVWSKLETGR

IPQPLELFIIDTHLNMQYADVDIG

>Bombyx mori XM_004921481.3

MNIYYCYSCGYKKVFEDYAGIIQQKYPEISVIGANYDPPGFNMYSRIIGFGKMLVIMCISGVNIFAWL
NKPQPAWWSWCLNKLYACMMMFFLANMIEGQLISSGAFEISLNNIPLWSKIETGRIPQPELFIID
NTLQ

>Onthophagus taurus M_023063420.1

MHHKIAAIRLAIVLVCALAYSESNEQVPVPKFSQNVATLKVLYCYS CGYRKAFDEYASIIQQKYPDIID
GRNYDPPGLNMFLARLLGVKLMVIVCILGGVNFNYINQVQPSWWEWCIQNKMYSLMLFFLSNIE
SQLIQSGAFEISLNDVPVWSKLETGRIPQPAELFIIDSQMQFTADLNSGFAK

>Drosophila melanogaster NM_135053.4

MERLTGRNVALLVLCAGYALVFAEGEKEIPVTKFGQNIAPTMTFLYCYS CGYRKAFEDYVGLLGEKYP
QIQVNGGNYDPPGLNYYLSKMIFALKIIIVSVVSAVSPFTFLGLNTPSWWSHMQANKIYACMMIFFLG
NMLEAQLISSGAFEITLNDVPVWSKLTGRFPSPPELFIIDNHLQFTEKVQENPDFVK

>Anopheles gambiae XM_319979.4

LLAAVLLAGLAVSMVEAEKEIPLTKFSQDVGNYGATMTFLYCYS CGYRKAFDDYHNLILEKYPEITIRGSN
YDPSGVNMLLSKVLVTKLLIAALMSNYDIGRIGNPFAGWWQWCFNNKLYASMMIFFLGNLEAQ
LISSGAFEITLNDVPVWSKLETGRFPAPQEMFQIIDNHLQFANKIEPNPDFVK

Nematodes

>Caenorhabditis1 elegans 1 NM_077529.2

MSRFGVFIIGVLFFMSVCDVLRTEESHSHDENHVHEKDDFEAEFGDETDSSQFSQSGTEEDHIEVREQSSF
VKPTAVHHAKDLPTLRIFYCVSCGYKQAFDQFTTFAKEKYPNMPIEGANFAPVLWKAYVAQALSFKM
AVLVLVLGGINPFRFGLGYPQILQHAHGKMSMSSMLVFMGLNLVEQSLISTGAFEVYLGNEQIWSKIE
SGRVPSPQEFMQLIDAQLAVLGKAPVNTESFGEFQQT

>Caenorhabditis2 elegans NM_073340.2

MSRSGAIIIGLFFIASIFDVFRAEKEPPAEDSRLEDYLSSELETTAIPTVVNENSHSQDVVDSGFSKDLPLKT
ILYCVSCGYKQAFNQFYFAKEKYPGLVIEGGNFSPDFWKGLAQIVGVAKIGLIAIVITGNSNPFYIGFGY
PQILQTAHYNRFSYS
LLVFMIGNLFESTLSSTGAFEIFLGDKQIWSKISKERVPTQEEFLNLIDLQLKTIR

>Toxocara canis KHN71009.1

MRFLAASQLPNFAPQVACMVSICGHVRLRVDRCLNSRLGVIIIGAALALSRLDIYGHVEHSEDEHDV
DDDAAFSKEFGDEEMNHDEAEQEIPVRTSSSHFTAPHTLKNLPTMKFLFCVSCGYRQAFDEFSRFVH
EKYPSMKIDGSNYAPVAWKAILAQFIGFSKIALIVLIVMGRDPFASIGRPTPSIFSWALNNKLSMMLFL
LSNAIESSLMSTGAFEIYLGDEQIWSKLESGRVPSPAELMQIIDQHMEITGAKVSDTFSSFE

Mollusks

>Lottia gigantea XM_009058326.1

GYKRAFDQYAEAIHQRFPGITIEGGQYPAPSMRALIAQILSIKLVIIIGFVVSQHNPFTLLNIPTPSVYEW
TQNKIYACLMVFFISNAIEGQLISTGAFEISFNDVPIWSKLETGRIPSPSEMFQILDNHMLNNQS

>Aplysia californica XM_005106681.2

MTLKSLEDIVNNLCLNTRYRKYVFEQYQAALHERFPALTIVGDHYPPPVRSSLAQALGIIFILIGLVVTG
YNPFPSLNLQTPSIYTWATENKLYACLMLFFISNAIEGQLISTGAFEISFNDVPIWSKLETGRIPSPSEMFQ
MIENNLRYVQSNS

>Pomacea canaliculata XM_025223426.1

MADLGHLSFLALCIGVLLFTWKDLSFSQESAPTKTVRAPKLSQIAAPTLKFLFCYSXGYRKYVFEQYQAAL
HERFPGLKIEGDNYPAPKAMLAQVLSVAKLVIALIVSGYNPFTFLNVATPSVYTWATENKMYACL
MFFISNAIEGQMISTGAFEISFNDVPIWSKLESGRIPSPQEMFEMVGNVMRLGPK

>Crassostrea gigas XM_011443922.2

MADRMGQLAMVVFSAIIFLTWRDLSHTEQTNIEKDIKAPKLSKFAGPTLKFMFCSXGYRKVFDQYA
 QLLHERFPALDIQGDNYPPPSGRAAVAQFLSIFKLFVIVMIVSGQNPFPHLNMETPSLFNWATENKIYA
 CLMVFFISNAIEGQMISTGAFEVTFNDVPVWSKLETGRIPQPNEMFQIENHMRLYTNPQG

Deuterostomes

>Acanthaster planci XM_022239460.1

MANGTLIYGLVFLCLGLITLRELTQTEATPNERPAMKLSQFTGPTLKILYCISUGYRQVFEESHRLRTRY
 QLSIEGENFPAHPVRRYLASALGILKIGLILIVSGSNPFPALSLETPGFWNWAIENKVYSCLMLFFISNAIE
 TQLLSTGAFEISLND

MPVWSKLESGKVPRYQELVNILESNMKLSYQL

>Strongylocentrotus purpuratus XM_011667980.1

MEAISXGYRQVFEESHRLRQRYPDRLIEGNNFPAHPLRRYVASFLAMAKIVLIGLVACGYDPFPMFNM
 ETHPVWSWAIQNKIYACMMLFFISNAIEGQLLSTGAFEVTFNGMPIWSKIESGKVPKPELVQILENTM
 KLSYRQI

>Saccoglossus kowalevskii NM_001199883.1

MAEYGVGFVAILLAYLTFVAVRDFTPINQVEAEQDVSLPKLKHFGGPPVIRFMYCISUGYRRLFEESQ
 VIRQKYPGVQIEGENFPHLIKQYLANLIGMLKFIAMVIGSINPFAMFNMETPNFWTYAMQNKMYA
 CLMLFFITNFIESQLLSTGAFEIAFNVDVQVWSKLESGRVPQPNELFQILDNQLNFNFRS

>Ciona intestinalis XM_004225781.4

MANFSLVSLFIVGAIFMSWKDLNRNVEVEAGSASEDAPIPKLNQFTVPVVKFLICQSUGYRRAFEIYA
 QIINQRYSEVRIDGGNYPPKFNQMAAMVLSVIKFMILGICILTVGNPFKVGKMETPQIYHWARENMIY
 ACIMLFFFSNAIETQLTSTGAFEILLNDVTIWSKLSGRVPRVDELQIIDSQINVGKMNPTDNFVQS

>Branchiostoma floridae XM_002603424.1

MAEPTQVFLAGLALFFSVTWRDMSQLANVAADEDNEPVGKLFQGTNPVLKFTFCYSUGYKNVF
 QQYAQAIQQNYPELRIEGGNYPPPAYRQYLAGFLSILKFVVICIVSGKNIFSQNLMDTPNVWWTWALE
 NKIYACMMVFFISNAVEGQLMSTGAFEITFNDVPIWSKLSGRVPAGQELFQILDNQMKLFNSNMKP
 PFTA

>Callorhinchus milii XM_007902466.1

MAAGGALSFSLLFLALVCLHHAGQGRADKRLKMQYATGPVLRFCISXGYRRVFEESHRLRQRYPDI
 HIEGENYLPQPLYRHLASFLSVFKLVLIIGLIVGRDPFSLGMQAPSIWHWSQQNKIYACMMVFFLSNM
 IENQCMSTGAFEITLNDVPVWSKLESGHLPMSQQLVQILDNEMKLNVMDSIPLHRS

>Lepisosteus2 XP_006637484.2

MERRRLSFALLLGLLALYSASADHPGKLLKMQFSTGPLLKFQICVSUGYRRVFEETRVLNQRYPDIRE
GENYLPLPVYRHIAFSLVFKLAVIGLILGKDPFAVFGMQAPGLWQWQANKIYACMMVFFLSNMVE
NQCMSTGAFEITLNDVPVWSKLESGHLPSMQQLVQILENEMKLNARMDSLPHHRS

>Lepisosteus1 XP_006632984.2

MAEYSQAGILMALLLFTVTVRDIYLGKNWAQQQQQQAADSLGVGPGGLRDGDYQKPAKQKMY
TGPVLKFQFCISUGYSRVFEESRSISQLYPDIREGENYPTKPIRYIASFISYFKLIAIALIVSGYNPFPVLG
MDTPRIWTWSQENKIFSLMTEFFSNMLETHFLSTGAFEITLNDVPVWSKLQSGHVPNIQELFQILDN
HLKMNQVDKISFPTP

>Carassius1a KX442566

MRWLPLSVLLWACSLYSASADNNGVKKMKVQFATGPLLKFQICVSUGYKRVFEETQALYQRYPDIRE
IEGENYLPLPVYRHIAFSLMFKLLIGVIIVGKDPFALFGMQAPGLWVWSQENKIYACMMVFFSNMI
ENQCMSTGAFEVTLNDVPVWSKLESGHLPSMQQLVQILENEMKMNVMHMDTLPHHRS

>Carassius1b KX442567

METRCLCILLVCVLSLNHPTADNGSVKKMKMQYTGMPLLKFQFCVSUGYRRVFEETRVLTQRYPDIRE
EGENFLPHPIYRHIAFFSVFKLAVIGLILGKDPFTFFHMETPGIWIWVKENKIYACMMVFFLSNMIENQ
CMSTGAFEITLNDVPVWSKLQAGHLPSMQQLVQILENEMKLSAHMDSLTHRRA

>Carassius2 KX442568

MAEYSQTGILTALLLFTVTVKDIYVGRNSMTQQDSAGPEINTQRQNKHTLYTGPVLKFQFCISUGYSK
VFQEYSRSISQLYPDIREGENYPPKINKYVGNLISYFKLLAIALIVTGQNPQFMGMDTPRIWSWGQE
NKIFSLMAFFISNMLETHFPSTGAFEVTLNDVPIWSKLQSGYVNIQELFQILDNHLKMNQVGKMN
PSP

>Danio1a NP_840075.2

MGKMRWLPFSALLLWALCLHSASADNNGVKKMKMQFATGPLLKFQICVSUGYKRVFEETQALYQR
YPDIREGENYLPLPLYRHIAFSLMFKLLIGVIIVGKDPFALCGMQAPGIWVWSQENKIYACMMVFFS
NMI
ENQCMSTGAFEITLNDVPVWSKLESGHLPSMQQLVQILENEMKMSMHMDTLPPhQS

>Danio1b NP_840077.3

METRCLYLLVCVLSVNHATADNGSIKKMKMQYTGMPLLKFQICVSUGYRRVFEETRVLTQRYPDIRE
GENFLPQPLYRHIAFSLVFKLVIGLILGKNPFTYLHIETPGIWLWAQENKIYACTMVFFLSNMIENQC
MSTGAFEVTLNDVPVWSKLQSGHLPSMQQLVQILENEMKLSVHMDSLPHHRA

Downloaded by UPPSALA UNIVERSITETSBIBLIOTEK from www.liebertpub.com at 06/13/20. For personal use only.
Antioxidants and Redox Signaling
Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis (DOI: 10.1089/ars.2019.7931)
This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copyediting and proof correction. The final published version may differ from this proof.



>Danio2 NP_001091957.2

MAEYSQTGILTALLLFTVVTVKDIYVGRNSVTQQENTGPDINTQRQNKHTFYTG PVLKFQY CISUGYSK
VFQEYSRSISQLYPDRIEGDNYPPK PINKYLG NFLSYFKLLAIALIVTGQNP FQMFGMNTPRIWAWGQE
NKIFSCLMAFFISNMLETHFLSTGAFEITLNDIPIWSKLQSGYV PNIQELFQILDNHLKMNQADKMNFPSP

>Homo sapiens AAH09611.2

MRLLLLLLVAASAMVWSDASANLGGMP SKRLKMQYATGPLLKFQICVSUGYRRVFE EYMRVISQRYP
DIRIEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLI GLIIVGKDPFAFFGMQAPSIWQWGQENK VYACMMVFFLSN
MIENQCMSTGAFEITLNDVPPVWSKLESGHLP SMQQLVQILDNEMKLNHMHMSIPHHRSP

Annexe 3 : déclaration d'invention PSELT pour le traitement des
lésions nerveuses

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

DECLARATION D'INVENTION (HORS LOGICIEL)

Cette déclaration est préalable à toute évaluation et protection

OUVERTURE DU DOSSIER

REFERENCE CELLULE DE VALORISATION : (à remplir par La Cellule)

Cette Déclaration d'Invention (DI) est liée à : Traitement des lésions nerveuses

Un nouveau projet



Un projet en cours (projet de valorisation déjà débuté (ex : amélioration d'un projet existant), s'il y'a eu des modifications par rapport au projet d'origine bien remplir la partie « de l'invention à l'innovation »).

Objectifs de la DI

Dépôt de brevet

Transfert de Savoir-faire

Le PSELT est un nouveau peptide que nous avons développé à partir de la sélénoprotéine T, une protéine antioxydante neuroprotectrice. Le peptide correspond au cœur actif de la protéine et son activité neuroprotectrice n'a jamais été décrite précédemment. En revanche, l'activité protectrice de ce peptide contre les effets délétères de l'ischémie/reperfusion du cœur a été récemment brevetée par notre Unité. Nos études récentes sur le traitement des lésions nerveuses périphériques a révélé un effet bénéfique du PSELT au niveau de la récupération fonctionnelle du nerf lésé dans un modèle de lésion du nerf facial chez le rat. Nous nous proposons de protéger cette découverte qui pourrait avoir des applications médicales dans un domaine où aucun traitement médicamenteux n'est disponible actuellement.

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

DE L'INVENTION A L'INNOVATION

Titre de l'invention

Utilisation du peptide PSELT pour le traitement de lésions nerveuses périphériques

Descriptif de l'invention (Résumé de 10-15 lignes)

Joindre en annexe les plans, schémas, dessins, photographies, ou tout autre document nécessaire à la description des dispositifs, les formules et étapes d'élaboration des produits.



Le système nerveux périphérique est doué de capacités de régénération spontanées ; toutefois, la récupération fonctionnelle est très incomplète en cas de lésion nerveuse grave, ce qui représente une source de handicap pour les patients. Un traitement chirurgical est habituellement pratiqué mais la récupération est loin d'être optimale. Plusieurs stratégies ont émergé ces dernières années afin de renforcer les capacités intrinsèques de l'organisme mais les résultats ne sont pas satisfaisants. Nous présentons ici l'intérêt d'un peptide nommé PSELT dérivé de la sélénoprotéine T, une protéine protectrice pour les cellules neurales et myocardiques dans des conditions cytotoxiques, pour le traitement des lésions nerveuses périphériques. Nos résultats obtenus dans un modèle de lésion du nerf facial réalisé chez le rat ont démontré un effet bénéfique de ce peptide. En effet, 3 mois après la lésion, les rats ayant reçu l'administration du peptide PSELT montraient de meilleures performances motrices, une meilleure conduction nerveuse et une meilleure régénération nerveuse accompagnée d'une meilleure myélinisation des fibres nerveuses. Ces résultats suggèrent que le peptide PSELT pourrait représenter une nouvelle thérapie pour le traitement des lésions nerveuses périphériques.

Description du contexte

Autrement dit, comment ou pour quelles raisons avez-vous réalisé l'invention ?

Il est aujourd'hui admis que le système nerveux périphérique possède des capacités de régénération spontanées. Cependant lorsqu'un nerf périphérique est gravement atteint, les capacités de régénération ne sont pas suffisantes pour permettre une récupération satisfaisante des fonctions motrices du nerf. Actuellement, le traitement le plus efficace contre ce type de lésion reste la chirurgie, mais la récupération est généralement incomplète et s'accompagne de lésions secondaires comme les syncynésies, c'est-à-dire des contractions musculaires involontaires, indiquant une repousse nerveuse imparfaite, ce qui peut représenter un handicap pour les patients. Différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées et développées ces dernières années comme la thérapie cellulaire ou le développement de conduits composés de substances naturelles ou synthétiques. L'objectif de ces nouvelles thérapies est de renforcer les capacités intrinsèques de l'organisme dans les processus de régénération. Cependant, leur efficacité reste comparable voire inférieure à celle de la chirurgie.

Les chercheurs de l'unité INSERM 1239 (laboratoire de Différenciation et de Communication Neuronale et Neuroendocrine) ont identifié une nouvelle sélénoprotéine dans le système nerveux, la sélénoprotéine T, un membre de la famille des sélénoprotéines qui sont caractérisées par la présence de sélénium dans leur chaîne peptidique. Ce sélénium, porté par l'acide aminé sélénocystéine, confère aux sélénoprotéines une grande résistance aux phénomènes d'oxydo-réduction faisant des sélénoprotéines des acteurs importants dans le contrôle de l'équilibre redox et des taux des radicaux libres. Il est maintenant bien démontré que les radicaux libres contribuent à la genèse de pathologies variées comme les maladies neurodégénératives ou les lésions ischémiques. Les travaux menés au sein

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création :Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		



du laboratoire ont montré que cette protéine pouvait protéger les cellules neurales dans une lignée de cellules de neuroblastome immortalisées et dans un modèle murin mimant la maladie de Parkinson (Boukhar et al., 2016). Plus récemment, en collaboration avec une équipe italienne dirigée par le Pr Angelone à l'Université de Calabre, les chercheurs de notre équipe ont montré qu'un peptide dénommé PSELT dérivé de la sélénoprotéine T et possédant le centre redox CVSU exerce une activité protectrice dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rat. Ces travaux ont révélé que les effets protecteurs de la sélénoprotéine T n'étaient pas restreints aux cellules neurales puisque l'application du peptide PSELT a permis de diminuer la taille de la nécrose post-ischémique et d'améliorer la récupération des capacités de contraction cardiaque (Rocca et al., 2018).

Les phénomènes ischémiques sont également présents lors des lésions nerveuses périphériques lorsque la barrière hémato-nerveuse est atteinte. L'hypoxie qui en découle peut altérer la survie et l'activation des cellules de Schwann qui sont les cellules primordiales dans la régénération nerveuse. **Le laboratoire de chirurgie expérimentale EA3830** travaille sur la régénération des nerfs périphériques notamment sur un modèle de lésion du nerf facial. Nous avons voulu tester si l'application du peptide PSELT, à l'image des résultats obtenus sur le cœur de rat, pouvait moduler l'environnement lésionnel après une lésion d'un nerf facial et améliorer ainsi la récupération nerveuse.

Le peptide utilisé dans cette étude, de séquence FQICVSUGYR, a été produit en phase solide dans la plateforme Primacen à l'aide du synthétiseur peptidique Liberty Microwave-assisted automated peptide synthesizer (CEM, Saclay, France), et a été purifié par HPLC sur des colonnes 21.2 x 250 mm Jupiter C18 (5 µm, 300 Å) (Phenomenex, Le Pecq, France) avec un degré de pureté supérieur à 98.6% comme décrit précédemment (Touchard et al., 2020).

Dans notre modèle d'étude, des rats Long-Evans femelles âgées de 8 semaines furent utilisées. Elle ont été sédationnées avec de l'isoflurane, et leur nerf facial fut d'abord exposé puis sectionné au point de sortie du foramen stylo-mastoïdien. Une perte de substance nerveuse de 3 mm était comblée avec un manchon d'interposition d'origine veineuse prélevé quelques minutes auparavant sur le même animal. Ce manchon veineux a pour fonction de maintenir notre produit pharmacologique dans le site de lésion et de servir de tuteur à la repousse axonale. A l'aide d'une seringue Hamilton, le peptide PSELT à la concentration de 10^{-6} M dans du Matrigel®, une matrice de membrane basale (groupe PSELT) ou du Matrigel® seul (groupe contrôle) ont été administrés dans ce manchon veineux. Quarante-huit heures après la lésion, le nerf facial droit a été exposé de nouveau afin de lui administrer une nouvelle dose de peptide PSELT à la concentration de 10^{-6} M dans du Matrigel® ou une dose de Matrigel® seul. Pour éviter de léser la veine, le produit cellulaire a été cette fois injecté dans le site de lésion autour de la veine. Pour évaluer l'intérêt de cette thérapie dans un contexte clinique, notre groupe PSELT a été comparé à un groupe de rats dans lequel les deux rameaux du nerf facial lésé étaient reliés directement par une suture épineurale (groupe ES), un modèle de chirurgie qui peut être employé directement en clinique en cas de lésion nerveuse.

Trois mois après la lésion, les rats ont été placés dans un dispositif de contention afin d'évaluer l'influence du peptide PSELT sur la récupération fonctionnelle. Le nerf facial est un nerf mixte avec une composante motrice responsable de la motricité de la face et notamment des vibrisses chez le rat. Nous avons donc, par enregistrement vidéo, évalué le mouvement des vibrisses *via* trois paramètres mesurés couramment dans la littérature : (I) l'amplitude de protraction, c'est-à-dire la différence entre l'angle le plus postérieur et l'angle de plus antérieur ; (II) la vitesse de protraction et (III) la fréquence de protraction, c'est-à-dire le nombre de cycle protraction-rétraction effectué par l'animal en une seconde. L'analyse des enregistrements vidéo montrent que les rats ayant reçu le peptide PSELT ont une amplitude et une vitesse de protraction significativement supérieure à celles des rats des groupes contrôles (** *P*-value < 0,01 ; ANOVA test) et ES (** *P*-value < 0,01 ; ANOVA test) (voir Figure 1).

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

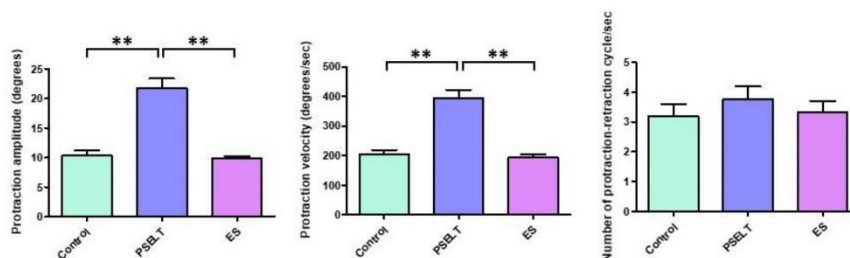


Figure 1: Effet d'une thérapie au PSELT sur les performances motrices du nerf facial trois mois après sa lésion

Pour expliquer ces différences fonctionnelles, nous avons évalué la conduction nerveuse. Après les enregistrements vidéo, les rats ont été de nouveau sédatisés et leur nerf facial droit a été exposé. En amont de la lésion, le nerf facial a été stimulé par une électrode (1 mV durant 500ms) et le signal électrique a été enregistré au niveau des vibrisses (rangée C). Les potentiels évoqués moteurs enregistrés ont été analysés au niveau de leur amplitude et de leur durée, deux paramètres impactés après une lésion. En accord avec les résultats des enregistrements vidéo, les analyses électrophysiologiques ont montré des différences statistiquement significatives avec une plus grande amplitude et une moins longue durée des potentiels évoqués moteurs chez les rats du groupe PSELT comparés aux groupes contrôles (* P -value < 0,05 ; ** P -value < 0,01 ; ANOVA test ; # Mann-Whitney U test) et ES (** P -value < 0,01 ; *** P -value < 0,001 ; ANOVA test), indiquant une meilleure conduction nerveuse chez ces animaux (voir Figure 2).

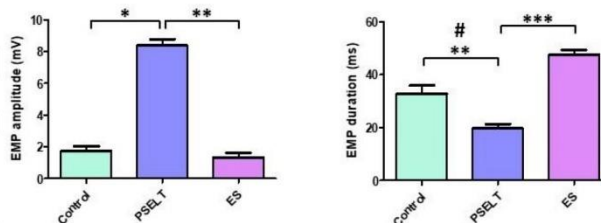


Figure 2: Effet d'une thérapie au PSELT sur la récupération de la conduction nerveuse 3 mois après la lésion du nerf facial

Pour tenter de comprendre l'effet du peptide PSELT sur la conduction nerveuse, nous avons réalisé des analyses histologiques des nerfs faciaux lésés. Des coupes transverses ont été réalisées au cryostat et marquées avec un anticorps dirigé contre le marqueur axonal neurofilament 200KDa (NF200) pour délimiter le nerf (le périneurium nerveux étant représenté par les lignes pointillées jaunes) (voir Figure 3).

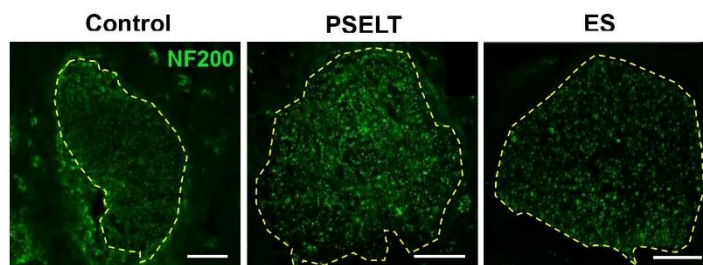


Figure 3: Sections transversales du nerf facial 3 mois après la lésion
 (Barre d'échelle, 150 μ m)

Les analyses à l'aide du logiciel ImageJ montrent un diamètre nerveux plus important dans le groupe PSELT et ES par rapport au groupe contrôle (* P -value < 0,05 ; ** P -value < 0,01 ; ANOVA test), suggérant une meilleure régénération des nerfs dans ces groupes. (voir Figure 4).

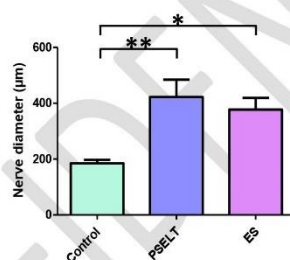
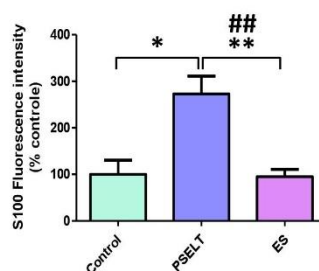




Figure 4: Effet d'une thérapie au PSELT sur le diamètre du nerf facial 3 mois après sa lésion

Il a été précédemment montré que les cellules de Schwann ont un rôle central dans le processus de régénération nerveuse. Nous avons donc marqué des coupes transversales de nerf avec un anticorps dirigé contre la protéine S100, un marqueur des cellules de Schwann afin d'estimer la proportion de ces cellules dans nos différents groupes d'animaux. La quantification de l'intensité de fluorescence du marqueur S100 a été réalisée à l'intérieur de 5 aires de 5 mm^2 par nerf pour couvrir l'hétérogénéité du tissu nerveux. La quantification à l'aide du logiciel ImageJ montre une intensité de signal plus forte



	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

dans le groupe PSELT comparé aux groupes contrôles (* P -value < 0,05 ; ANOVA test) et ES (** P -value < 0,01 ; ## Mann-Whitney U test) (Figure 5).

Figure 5: Effet d'une thérapie au PSELT sur l'intensité de fluorescence du S100 dans le nerf facial 3 mois après la lésion

Une fois la zone lésionnelle nettoyée de ses débris, les cellules de Schwann participent au processus de régénération axonale en formant les colonnes de Büngner à l'intérieur desquelles le cône de croissance puis les axones s'allongent pour atteindre leur cible. Cette élongation est guidée par chimiotactisme grâce à des facteurs neurotrophiques produits et sécrétés par les cellules de Schwann. Enfin, une fois que ces axones ont atteint leur cible, les cellules de Schwann myélinisent les axones pour les protéger et améliorer leur conduction. Nous nous sommes donc demandés si cette augmentation de l'intensité des cellules de Schwann observée chez les rats ayant reçu le peptide PSELT se traduisait par une meilleure repousse axonale et une meilleure myélinisation de ces axones nouvellement formés. Les sections transversales des nerfs ont été marquées avec des anticorps dirigés contre le neurofilament NF200 et la protéine 0 (P0), une protéine de la myéline. Les analyses par immunofluorescence ont montré de nombreux neurones myélinisés (flèche bleue) et non myélinisés (flèche rose) (figure 6).

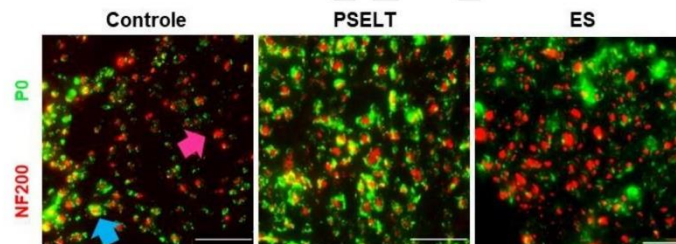




Figure 6: Immunofluorescence des axones (NF200) enveloppés ou non par la myéline (P0) (barre d'échelle, 25 μ m)

Le comptage des axones myélinisés et non myélinisés, réalisé à l'aide du logiciel ImageJ dans 5 aires de 5 mm² ont révélé un plus grand nombre total d'axones (+41%) et une myélinisation environ deux fois plus importante dans le groupe PSELT comparé aux groupes contrôles et ES (* P -value < 0,05 ; ANOVA test) (Figure 7).

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création :Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

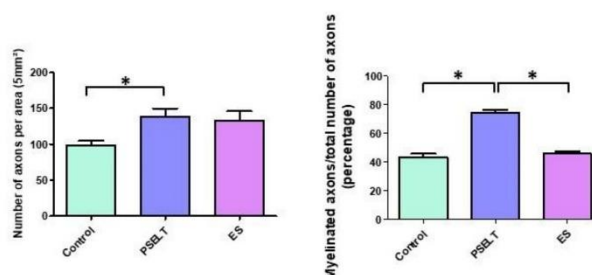


Figure 7: Quantification du nombre total d'axones et de leur myélinisation 3 mois après la lésion

L'ensemble de ces données montre que dans notre modèle de lésion du nerf facial, une administration de peptide PSELT à la concentration de 10^{-6} M au moment de la lésion puis 48 h après améliore la récupération fonctionnelle du nerf. Cette amélioration s'explique par une meilleure conduction nerveuse qui elle-même trouverait son origine dans un plus grand nombre de cellules de Schwann. La présence d'un plus grand nombre de cellules de Schwann dans le site de régénération permettrait ainsi une meilleure repousse axonale et une meilleure myélinisation des fibres nouvellement formées comme observé dans nos travaux.

Comment définissez-vous l'invention ?

- | | | | |
|--|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Un nouveau procédé de fabrication | <input type="checkbox"/> | Un nouvel appareil ou machine | <input type="checkbox"/> |
| Une nouvelle biotechnologie | <input type="checkbox"/> | Un nouveau produit | <input type="checkbox"/> |
| Un nouvel usage d'un produit ou d'un procédé existant | <input checked="" type="checkbox"/> | Un nouveau composé chimique | <input type="checkbox"/> |
| Une amélioration d'un produit ou d'un procédé existant | <input type="checkbox"/> | Autre (merci de préciser) : | <input type="checkbox"/> |

Quel(s) problème(s) technique(s) l'invention permet-elle de résoudre ?



Cette invention permettrait d'améliorer les capacités de l'organisme à régénérer et à rétablir la fonction motrice d'un nerf périphérique lésé, et ainsi améliorer la prise en charge de ces lésions dont la récupération fonctionnelle après suture reste très modeste.

L'application

- Quel est le principal domaine de l'application envisagé ?

Régénération et récupération fonctionnelle des nerfs périphériques atteints par des lésions diverses accidentelles, pathologiques, etc.

- Y'a-t-il d'autres applications possibles ?

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

[A Compléter]

- Quels ont les arguments en faveur de l'invention (originalité, avantages) ?

Ce peptide présente comme avantage une utilisation simple avec une application directement sur la lésion au sein d'une chambre de confinement qui peut être naturelle ou synthétique. Son deuxième avantage est l'absence de risque de rejet immunitaire par l'organisme receveur. Le peptide est de petite taille et peut être synthétisé en grandes quantités à l'état quasi-pur. Actuellement, il n'existe pas de médicament ayant la capacité d'améliorer la régénération et la récupération fonctionnelle des nerfs lésés. Or, le nombre de personnes souffrant de lésions de nerfs périphériques est estimé à environ 300 000 patients en Europe et 200 000 aux Etas-Unis.

- Connaissez-vous des produits ou procédés concurrents ? Oui Non

Si oui, lesquels ?

[A Compléter]

- Quelles sont les limites des méthodes ou produits existants pour répondre à ces besoins ?

[A Compléter]

- L'application entre-t-elle dans un domaine ayant des normes/ standards (AFNOR ...)

[A Compléter]

VALIDATION DE L'INVENTION

- L'appareil, le produit ou le procédé a t'il déjà été testé ? Oui Non

Si oui, est-il possible de faire une démonstration ?

(Echantillon, maquette, prototype disponible)

Oui Non

- L'invention présente-t-elle des inconvénients ou limitations ? Peuvent-ils être surmontés ? De quelle manière ? Si vous le pouvez, comment évaluez-vous le passage à l'échelle industrielle (de 0 → Très Facile à 10 → Très difficile).

La synthèse de ce peptide est tout à fait abordable et peut être adaptée à une production à grande échelle à l'instar d'autres peptides utilisés en thérapie. L'administration locale est aussi faisable et ne devrait pas poser de problèmes particuliers.



VALORISATION DE L'INVENTION

- Connaissez-vous des entreprises intéressées par votre invention ?

Oui Non

Si Oui, veuillez renseigner les questions a & b, sinon merci de passer directement au point suivant.

a. Merci de lister les entreprises connues :

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création :Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

Regeneron Pharmaceuticals (<https://www.regeneron.com>)

b. Avez-vous déjà contacté certaines de ces entreprises ? Oui Non

Si Oui, veuillez renseigner les questions i & ii, sinon merci de passer directement au point suivant.

i. Merci d'indiquer les noms et coordonnées :

[A Compléter]

ii. existe-t-il un accord de confidentialité (NDA) signé ? Oui Non

Si oui, joindre une copie du ou des accord(s) et préciser si le contrat est géré par l'université.

- Envisagez-vous la création d'une entreprise ?

Oui Non Création en cours

Si Oui, veuillez renseigner les questions a & b, sinon merci de passer directement au point suivant.

a. Merci de préciser le projet et son état d'avancement (e.g. création en cours, etc) :

[A Compléter]



b. Des personnes de l'équipe envisagent-elles d'y participer? Oui Non

Si Oui, veuillez indiquer les noms et la forme de coopération qu'elles envisagent (mise à disposition, consultance, concours scientifique...)

[A Compléter]

- Quel type de valorisation est envisagé ? Cession de quote -part ; Licence ; Transfert de Savoir-Faire ...)

Licence

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

PROTECTION DE L'INVENTION

ETAT DE L'ART

- Votre Laboratoire a-t'il déjà déposé une demande de **brevets** (ou autre type de protection, ex : enveloppe SOLEAU) liée à l'invention ?

Oui Non

Si Oui, précisez dans la mesure du possible le n° de dépôt, la date de dépôt, le titre de la demande et le nom du déposant.

Un brevet a été déposé conjointement par INSERM Transfert et Université de Calabre sur l'Utilisation du PSELT dans les maladies cardiaques :

METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR PROVIDING CARDIOPROTECTION IN SUBJECTS WHO EXPERIENCED A MYOCARDIAL INFARCTION, EP2018/076735, 2 octobre 2018.

- Savez-vous si d'autres brevets existent déjà dans le domaine de l'invention ?

Listes de brevets accessibles sur Espacenet.com & bases-brevets.inpi.fr

Oui Non Ne dispose pas de l'information

Si Oui, merci de donner si possible, les références et de préciser succinctement en quoi votre invention se différencie de ce(s) brevet(s).

[A Compléter]

- Quelles sont les connaissances scientifiques et technologiques **antérieures** à l'invention ?

Lister la bibliographie que vous estimez **pertinente** et joindre une copie ou des abstracts des documents les plus **importants**.

Nous joignons un article en cours de préparation sur la découverte comportant toutes les références bibliographiques pertinentes au domaine de recherche.

- Lister les **MOTS-CLES** représentatifs de votre invention :

Régénération, lésion nerveuse, récupération motrice, peptide, antioxydant, neuroprotection, sélénoprotéine



DIVULGATIONS ECRITES OU ORALES DE L'INVENTION

Toute divulgation d'une invention peut mettre en péril son caractère de « nouveauté », critère indispensable pour déposer un brevet.

- Dans le passé, avez-vous déjà divulgué sur tout ou partie de l'invention ?

Oui Non

Si oui, listez les différentes communications déjà effectuées en précisant le type (publication, conférence, poster, soutenance de thèse/stage/HDR ...), le titre, la date, les auteurs, le journal ou le

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

contexte de la communication et joindre une copie (pour les thèses, les tenir à disposition ou ne transmettre que les pages pertinentes).

[A Compléter]

- **Aujourd'hui, avez-vous l'intention de divulguer sur l'invention ?** Oui Non

Si oui, listez les différents projets en précisant le type de communication envisagée (publication, conférence, poster, soutenance de thèse/stage/HDR ...), le titre, la date prévue, les auteurs, le journal, le contexte de la communication et joindre une copie des projets.

Thèse de Mr Hugo Pothion prévue le 18 septembre 2020 dont le titre est : Contribution au développement de stratégies thérapeutiques pour la récupération fonctionnelle de processus neurogénératifs : apports du peptide PSELT dérivé de la sélénoprotéine T et de cellules souches.

Article relatant les résultats obtenus sur les effets du peptide PSELT dans la réparation du nerf facial chez le rat avec le titre : Therapeutic benefit of the SELENOT mimetic PSELT in facial nerve regeneration.

Traçabilité DE L'INVENTION

Existe-t-il un cahier de laboratoire (ou tout autre mode de traçabilité) permettant de dater, d'identifier le ou les inventeurs, et de suivre l'activité inventive ?

Oui Non

Si Oui, merci de préciser le mode de traçabilité utilisé.

Cahier de laboratoire et données numériques.

Cadre Contractuel

- **L'invention est-elle issue d'une collaboration ?** Oui Non

(Autre organisme de recherche, industriel ...)

Si oui, préciser les nom et coordonnées du/des organisme(s) partenaire(s), les nom et fonction du contact, les références du contrat, l'organisme gestionnaire et joindre une copie du contrat

Thèse en codirection entre l'Unité INSERM U1239 (Youssef Anouar) et l'EA 3830 (Jean-Paul Marie)



- **L'invention est-elle issue d'un contrat Européen ?** Oui Non

Si oui, préciser le Numéro du Contrat et l'organisme gestionnaire (notamment s'il y a un accord de consortium) et joindre une copie du contrat.

[A Compléter]

- **L'invention est-elle issue d'autres types de contrats ou subventions ? (ANR, AFM, ARC, EMBO, Ligue contre le Cancer, MENRT, PREDIT, ANRT...)** Oui Non

FHU SURFACE

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création :Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

- Avez-vous utilisé du matériel (produits biologiques, chimiques ...) obtenu auprès de sociétés ou autres équipes de recherche ? Oui Non

Si oui, préciser le type de matériel.

[A Compléter]

- Avez-vous signé un accord de transfert de matériel (MTA) ? Oui Non

Si oui, préciser le nom de l'établissement gestionnaire et joindre la copie du contrat dans le cas où le gestionnaire n'est pas l'université.

[A Compléter]

Régime de propriété envisagé :

Pleine propriété Etablissement un tiers Copropriété Pleine propriété à un tiers

En cas de copropriété ou pleine propriété à un tiers :

Merci d'indiquer les noms et coordonnées des établissements impliqués.

INSERM

- Normandie Valorisation sera-t-il l'organisme gestionnaire de la copropriété ? Oui Non

Si Non, merci d'indiquer les nom et coordonnées de l'établissement gestionnaire.

[A Compléter]



- Normandie Valorisation sera-t-il l'organisme valorisateur de l'invention ? Oui Non

Si Non, merci d'indiquer les nom et coordonnées de l'établissement valorisateur.

[A Compléter]

Informations complémentaires que vous jugez utiles

[A Compléter]

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création :Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE A L'INTERESSEMENT

Lister de façon exhaustive **tous** les inventeurs, et **seulement** les inventeurs, quel que soit leur statut et leurs employeurs, en précisant leur **part inventive respective**.



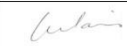


La signature datée de tous les inventeurs est indispensable pour attester d'une répartition d'un commun accord des parts d'inventivité entre eux.

!/ Définition inventeur : est considérée comme inventeur, toute personne, chercheur, ingénieur, technicien ... ayant contribué directement à la conception et/ou à la réalisation de tout ou partie d'une invention. Il doit y avoir un apport inventif à la concrétisation de l'invention. Cette désignation se fait de façon objective, indépendamment de toute autre considération, qu'elle soit honorifique, de préséance, hiérarchique ou financière.



!/ Ne pas confondre co-inventeur d'une invention et co-auteur d'une publication scientifique !

Par la signature du présent document, les inventeurs ci-dessous mentionnés

- certifient avoir conçu et réalisé l'invention décrite dans la présente déclaration ;
- certifient ne pas connaître à ce jour d'autre inventeur impliqué dans la conception et / ou réalisation de cette invention ;
- désignent Mr/Mme [Nom et prénom du chargé de Valorisation référent], comme unique interlocuteur de Normandie Valorisation. Mr/Mme [NOM] assurera notamment les échanges d'informations/Décisions, de documents entre inventeurs et Normandie Valorisation ;
- s'engagent à communiquer au plus tôt tous les changements d'adresse pro et/ou perso ou de statut.

Nom et Prénom des Inventeurs	Lieu d'exercice (n°d'unité, entreprise...)	Employeur lors de l'obtention des résultats	Contribution à l'invention (%)	Date	Signature
POTHION Hugo	INSERM U1239/EA3830	Université de Rouen	30	22 juin 2020	
ANOUAR Youssef	INSERM U1239	INSERM	30	22 juin 2020	
MARIE Jean-Paul	EA3830	Université de Rouen	15	22 juin 2020	
GUEROUT Nicolas	EA3830	Université de Rouen	15	22 juin 2020	
LIHRMANN Isabelle	INSERM U1239	INSERM	10	22 juin 2020	
TOTAL			100%		

Si le dossier présente un caractère d'urgence du fait d'une divulgation imminente, ce document peut nous être retourné dans un premier temps avec seulement la signature de l'inventeur principal. L'exemplaire complet de la déclaration d'invention signée par tous les inventeurs devra nous être retourné ultérieurement dans les meilleurs délais.

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

FICHE INDIVIDUELLE D'INVENTEUR

Veuillez remplir **une fiche par inventeur agent public**

La signature datée des fonctionnaires et agents publics est indispensable pour la prise en compte par leur employeur des versements de la prime au dépôt de brevet et des futurs intéressements.

Veiller à multiplier cette page autant de fois que nécessaire afin de conserver la pagination de la DI au moment de sa finalisation.

A noter qu'en cas d'exploitation, une **copie du bulletin de salaire délivré au moment de l'invention vous sera demandée pour le versement de la prime d'intéressement** (vous pourrez masquer les parties chiffrées de votre rémunération et autres éléments que vous souhaitez garder confidentiel).

Pour les **inventeurs stagiaires/étudiants**, joindre une copie de **l'accord de cession de droit**, s'il en existe un.

!! A noter : Lors d'une demande de brevet, l'adresse de chaque inventeur est rendue public. Si vous ne souhaitez pas que votre adresse personnelle apparaisse sur la demande, il est recommandé de n'indiquer que l'adresse professionnelle.



Nota : Le traitement de données personnelles est régi par le RGPD (règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données).) et la loi française n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (modifiée). Dans le cadre de ses fonctions, l'URN et son mandataire Normandie Université, par le biais de Normandie Valorisation (ci-après le « responsable du traitement ») seront amenés à avoir accès à vos données personnelles et à effectuer des traitements les concernant. Dans le cadre des actions de protection de la propriété intellectuelle, le responsable du traitement pourra également être amené à confier un traitement de données personnelles à un tiers (Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle, ci-après le « sous-traitant du traitement »). Le responsable du traitement s'engage à la mise en œuvre de mesures techniques et organisationnelles appropriées afin de se conformer au RGPD et ainsi garantir la protection des droits de la personne concernée. Il s'engage par là même à ce que tous ses sous-traitants respectent cette obligation. Veuillez noter que vous avez la possibilité de rectifier, compléter, mettre à jour, ou effacer les données à caractère personnel vous concernant à tout moment en contactant : dpo@normandie-univ.fr ou dpo@univ-rouen.fr

INVENTEUR	Situation lors de l'obtention des résultats		Situation actuelle (si différente)	
Nom : ANOUAR Nom de jeune fille : Prénom : YOUSSEF Date de naissance : 14/01/1962 Nationalité : Française Adresse personnelle : 1 résidence Henri Fauman, 76230 Quincampoix	Employeur : INSERM Statut : Directeur de recherche Date début/fin de contrat de travail : Mars 1996	Adresse professionnelle : Tel pro. :0632398524 Email pro. :youssef.anouar@univ-rouen.fr	Employeur : Statut : Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : Email pro. :
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Conception et suivi de la réalisation du travail objet de l'invention				
Invention : <input checked="" type="checkbox"/> De mission <input type="checkbox"/> Hors Mission attribuable <input type="checkbox"/> Hors Mission non attribuable				
Si l'inventeur est stagiaire, étudiant (Hors doctorant), un engagement de confidentialité a-t-il été signé ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si Oui, merci de joindre la copie d'accord de confidentialité signé.				

- Je certifie n'avoir fait aucune divulgation autres que celles indiquées dans la présente Déclaration d'Invention
- Je certifie l'exactitude des informations contenues dans la présente Déclaration d'Invention, notamment le statut que j'occupais au moment de l'invention et le nom de mon employeur au moment de l'invention

Date et Signature : 22 juin 2020



	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

FICHE INDIVIDUELLE D'INVENTEUR

Veuillez remplir **une fiche par inventeur agent public**

La signature datée des fonctionnaires et agents publics est indispensable pour la prise en compte par leur employeur des versements de la prime au dépôt de brevet et des futurs intéressements.

Veiller à multiplier cette page autant de fois que nécessaire afin de conserver la pagination de la DI au moment de sa finalisation.

A noter qu'en cas d'exploitation, une **copie du bulletin de salaire délivré au moment de l'invention vous sera demandée pour le versement de la prime d'intéressement** (vous pourrez masquer les parties chiffrées de votre rémunération et autres éléments que vous souhaitez garder confidentiel).

Pour les **inventeurs stagiaires/étudiants**, joindre une copie de l'**accord de cession de droit**, s'il en existe un.

/\A noter : Lors d'une demande de brevet, l'adresse de chaque inventeur est rendue public. Si vous ne souhaitez pas que votre adresse personnelle apparaisse sur la demande, il est recommandé de n'indiquer que l'adresse professionnelle.



Nota : Le traitement de données personnelles est régi par le RGPD (règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données).) et la loi française n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (modifiée). Dans le cadre de ses fonctions, l'URN et son mandataire Normandie Université, par le biais de Normandie Valorisation (ci-après le « responsable du traitement ») seront amenés à avoir accès à vos données personnelles et à effectuer des traitements les concernant. Dans le cadre des actions de protection de la propriété intellectuelle, le responsable du traitement pourra également être amené à confier un traitement de données personnelles à un tiers (Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle, ci-après le « sous-traitant du traitement »). Le responsable du traitement s'engage à la mise en œuvre de mesures techniques et organisationnelles appropriées afin de se conformer au RGPD et ainsi garantir la protection des droits de la personne concernée. Il s'engage par là même à ce que tous ses sous-traitants respectent cette obligation. Veuillez noter que vous avez la possibilité de rectifier, compléter, mettre à jour, ou effacer les données à caractère personnel vous concernant à tout moment en contactant : dpo@normandie-univ.fr ou dpo@univ-rouen.fr

INVENTEUR	Situation lors de l'obtention des résultats		Situation actuelle (si différente)	
Nom : POTHION Nom de jeune fille : Prénom : Hugo Date de naissance : 14/04/1992 Nationalité : Française Adresse personnelle : 34 rue de Buffon 76000 Rouen	Employeur : Université de Rouen Statut : Doctorant Date début/fin de contrat de travail : Octobre 2016/Mars 2020	Adresse professionnelle : Tel pro. :0666319446 Email pro. :potionh@gmail.com	Employeur : Statut : Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : Email pro. :
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Conception et suivi de la réalisation du travail objet de l'invention				
Invention : <input checked="" type="checkbox"/> De mission <input type="checkbox"/> Hors Mission attribuable <input type="checkbox"/> Hors Mission non attribuable				
Si l'inventeur est stagiaire, étudiant (Hors doctorant), un engagement de confidentialité a-t-il été signé ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si Oui, merci de joindre la copie d'accord de confidentialité signé.				

- Je certifie n'avoir fait aucune divulgation autres que celles indiquées dans la présente Déclaration d'Invention
- Je certifie l'exactitude des informations contenues dans la présente Déclaration d'Invention, notamment le statut que j'occupais au moment de l'invention et le nom de mon employeur au moment de l'invention

Date et Signature : 23 juin 2020



	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

FICHE INDIVIDUELLE D'INVENTEUR

Veuillez remplir **une fiche par inventeur agent public**

La signature datée des fonctionnaires et agents publics est indispensable pour la prise en compte par leur employeur des versements de la prime au dépôt de brevet et des futurs intéressements.

Veiller à multiplier cette page autant de fois que nécessaire afin de conserver la pagination de la DI au moment de sa finalisation.

A noter qu'en cas d'exploitation, une **copie du bulletin de salaire délivré au moment de l'invention vous sera demandée pour le versement de la prime d'intéressement** (vous pourrez masquer les parties chiffrées de votre rémunération et autres éléments que vous souhaitez garder confidentiel).

Pour les **inventeurs stagiaires/étudiants**, joindre une copie de l'**accord de cession de droit**, s'il en existe un.

!\A noter : Lors d'une demande de brevet, l'adresse de chaque inventeur est rendue public. Si vous ne souhaitez pas que votre adresse personnelle apparaisse sur la demande, il est recommandé de n'indiquer que l'adresse professionnelle.



Nota : Le traitement de données personnelles est régi par le RGPD (règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données).) et la loi française n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (modifiée). Dans le cadre de ses fonctions, l'URN et son mandataire Normandie Université, par le biais de Normandie Valorisation (ci-après le « responsable du traitement ») seront amenés à avoir accès à vos données personnelles et à effectuer des traitements les concernant. Dans le cadre des actions de protection de la propriété intellectuelle, le responsable du traitement pourra également être amené à confier un traitement de données personnelles à un tiers (Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle, ci-après le « sous-traitant du traitement »). Le responsable du traitement s'engage à la mise en œuvre de mesures techniques et organisationnelles appropriées afin de se conformer au RGPD et ainsi garantir la protection des droits de la personne concernée. Il s'engage par là même à ce que tous ses sous-traitants respectent cette obligation. Veuillez noter que vous avez la possibilité de rectifier, compléter, mettre à jour, ou effacer les données à caractère personnel vous concernant à tout moment en contactant : dpo@normandie-univ.fr ou dpo@univ-rouen.fr

INVENTEUR	Situation lors de l'obtention des résultats		Situation actuelle (si différente)	
Nom : MARIE Nom de jeune fille : Prénom : Jean-Paul Date de naissance : 22/08/1958 Nationalité : Française Adresse personnelle :	Employeur : Université de Rouen-CHU de Rouen Statut : PU-PH Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : 33 (0)2 32 88 66 12 Email pro. : Jean-Paul.Marie@chu-rouen.fr	Employeur : Statut : Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : Email pro. :
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Conception et suivi de la réalisation du travail objet de l'invention				
Invention : <input checked="" type="checkbox"/> De mission <input type="checkbox"/> Hors Mission attribuable <input type="checkbox"/> Hors Mission non attribuable				
Si l'inventeur est stagiaire, étudiant (Hors doctorant), un engagement de confidentialité a-t-il été signé ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si Oui, merci de joindre la copie d'accord de confidentialité signé.				

- Je certifie n'avoir fait aucune divulgation autres que celles indiquées dans la présente Déclaration d'Invention
- Je certifie l'exactitude des informations contenues dans la présente Déclaration d'Invention, notamment le statut que j'occupais au moment de l'invention et le nom de mon employeur au moment de l'invention

Date et Signature : 23 juin 2020



	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

FICHE INDIVIDUELLE D'INVENTEUR

Veuillez remplir **une fiche par inventeur agent public**

La signature datée des fonctionnaires et agents publics est indispensable pour la prise en compte par leur employeur des versements de la prime au dépôt de brevet et des futurs intéressements.

Veiller à multiplier cette page autant de fois que nécessaire afin de conserver la pagination de la DI au moment de sa finalisation.

A noter qu'en cas d'exploitation, une **copie du bulletin de salaire délivré au moment de l'invention vous sera demandée pour le versement de la prime d'intéressement** (vous pourrez masquer les parties chiffrées de votre rémunération et autres éléments que vous souhaitez garder confidentiel).

Pour les **inventeurs stagiaires/étudiants**, joindre une copie de l'**accord de cession de droit**, s'il en existe un.

!\A noter : Lors d'une demande de brevet, l'adresse de chaque inventeur est rendue public. Si vous ne souhaitez pas que votre adresse personnelle apparaisse sur la demande, il est recommandé de n'indiquer que l'adresse professionnelle.



Nota : Le traitement de données personnelles est régi par le RGPD (règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données).) et la loi française n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (modifiée). Dans le cadre de ses fonctions, l'URN et son mandataire Normandie Université, par le biais de Normandie Valorisation (ci-après le « responsable du traitement ») seront amenés à avoir accès à vos données personnelles et à effectuer des traitements les concernant. Dans le cadre des actions de protection de la propriété intellectuelle, le responsable du traitement pourra également être amené à confier un traitement de données personnelles à un tiers (Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle, ci-après le « sous-traitant du traitement »). Le responsable du traitement s'engage à la mise en œuvre de mesures techniques et organisationnelles appropriées afin de se conformer au RGPD et ainsi garantir la protection des droits de la personne concernée. Il s'engage par là même à ce que tous ses sous-traitants respectent cette obligation. Veuillez noter que vous avez la possibilité de rectifier, compléter, mettre à jour, ou effacer les données à caractère personnel vous concernant à tout moment en contactant : dpo@normandie-univ.fr ou dpo@univ-rouen.fr

INVENTEUR	Situation lors de l'obtention des résultats		Situation actuelle (si différente)	
Nom : GUEROUT Nom de jeune fille : Prénom : Nicolas Date de naissance : 05/10/1980 Nationalité : Française Adresse personnelle : 2 rue du sergent Picard, 76150 Maromme	Employeur : Université de Rouen Statut : Maître de conférences Date début/fin de contrat de travail : septembre 2014	Adresse professionnelle : Tel pro. : 02.35.14.83.90 Email pro. : nicolas.guerout@univ-rouen.fr	Employeur : Statut : Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : Email pro. :
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Conception et suivi de la réalisation du travail objet de l'invention				
Invention : <input checked="" type="checkbox"/> De mission <input type="checkbox"/> Hors Mission attribuable <input type="checkbox"/> Hors Mission non attribuable				
Si l'inventeur est stagiaire, étudiant (Hors doctorant), un engagement de confidentialité a-t-il été signé ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si Oui, merci de joindre la copie d'accord de confidentialité signé.				

Je certifie n'avoir fait aucune divulgation autres que celles indiquées dans la présente Déclaration d'Invention
 Je certifie l'exactitude des informations contenues dans la présente Déclaration d'Invention, notamment le statut que j'occupais au moment de l'invention et le nom de mon employeur au moment de l'invention

Date et Signature : 23 juin 2020



	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

FICHE INDIVIDUELLE D'INVENTEUR

Veuillez remplir **une fiche par inventeur agent public**

La signature datée des fonctionnaires et agents publics est indispensable pour la prise en compte par leur employeur des versements de la prime au dépôt de brevet et des futurs intéressements.

Veiller à multiplier cette page autant de fois que nécessaire afin de conserver la pagination de la DI au moment de sa finalisation.

A noter qu'en cas d'exploitation, une **copie du bulletin de salaire délivré au moment de l'invention vous sera demandée pour le versement de la prime d'intéressement** (vous pourrez masquer les parties chiffrées de votre rémunération et autres éléments que vous souhaitez garder confidentiel).

Pour les **inventeurs stagiaires/étudiants**, joindre une copie de l'**accord de cession de droit**, s'il en existe un.

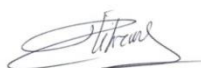
!\A noter : Lors d'une demande de brevet, l'adresse de chaque inventeur est rendue public. Si vous ne souhaitez pas que votre adresse personnelle apparaisse sur la demande, il est recommandé de n'indiquer que l'adresse professionnelle.

Nota : Le traitement de données personnelles est régi par le RGPD (règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016, relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données).) et la loi française n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (modifiée). Dans le cadre de ses fonctions, l'URN et son mandataire Normandie Université, par le biais de Normandie Valorisation (ci-après le « responsable du traitement ») seront amenés à avoir accès à vos données personnelles et à effectuer des traitements les concernant. Dans le cadre des actions de protection de la propriété intellectuelle, le responsable du traitement pourra également être amené à confier un traitement de données personnelles à un tiers (Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle, ci-après le « sous-traitant du traitement »). Le responsable du traitement s'engage à la mise en œuvre de mesures techniques et organisationnelles appropriées afin de se conformer au RGPD et ainsi garantir la protection des droits de la personne concernée. Il s'engage par là même à ce que tous ses sous-traitants respectent cette obligation. Veuillez noter que vous avez la possibilité de rectifier, compléter, mettre à jour, ou effacer les données à caractère personnel vous concernant à tout moment en contactant : dpo@normandie-univ.fr ou dpo@univ-rouen.fr



INVENTEUR	Situation lors de l'obtention des résultats		Situation actuelle (si différente)	
Nom : LIHRMANN-BISSON Nom de jeune fille : LIHRMANN Prénom : Isabelle Date de naissance : 05/05/1959 Nationalité : Française Adresse personnelle : 19 rue de la Haizette, 27310 Saint-Ouen-de-Thouberville	Employeur : INSERM Statut : Chargée de recherche Date début/fin de contrat de travail : Mars 1989	Adresse professionnelle : Tel pro. : 02.35.14.66.26 Email pro. : isabellelihrmann@gmail.com	Employeur : Statut : Date début/fin de contrat de travail :	Adresse professionnelle : Tel pro. : Email pro. :
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Conception et suivi de la réalisation du travail objet de l'invention				
Invention : <input checked="" type="checkbox"/> De mission <input type="checkbox"/> Hors Mission attribuable <input type="checkbox"/> Hors Mission non attribuable				
Si l'inventeur est stagiaire, étudiant (Hors doctorant), un engagement de confidentialité a-t-il été signé ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si Oui, merci de joindre la copie d'accord de confidentialité signé.				

- Je certifie n'avoir fait aucune divulgation autres que celles indiquées dans la présente Déclaration d'Invention
- Je certifie l'exactitude des informations contenues dans la présente Déclaration d'Invention, notamment le statut que j'occupais au moment de l'invention et le nom de mon employeur au moment de l'invention

Date et Signature : 23 juin 2020



Page 18 sur 19

	Ref : Déclaration d'invention Labo Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.XXX	
	Date de création : Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	
Déclaration d'invention Hors Logiciel		

VISAS

Directeur de INSERM U1239: ANOUAR, Youssef

Avis motivé :

Avis très favorable

Date : 22/06/2020

Signature :



Représentant légal de l'URN : [Nom, Prénom, Titre]

Avis motivé :

Date :

Signature :

Responsable du Projet : [ANOUAR, Youssef]

Avis motivé : Très favorable

Date :

Signature :

Responsable de la Cellule de Valorisation de l'URN : [Nom, Prénom, Titre]

Date :

Signature :

Responsable Normandie Valorisation : [Nom, Prénom, Titre]

Date :

Signature :

Abstract

Peripheral nervous system has intrinsic regeneration abilities, but motor recovery is insufficient in the most severe cases of lesions. Although surgery remains the “gold standard” therapeutic approach, its efficiency is often limited, and various alternate strategies have been developed such as stem cell-based therapy. However, uncomplete nerve regeneration is also observed, and several approaches aim to improve the potential of these cells. Among them, redox environment modulation using antioxidant molecules is one of the most promising. Selenoprotein T (SELENOT) is an oxidoreductase which is a member of the selenoprotein family, one of the most important family of antioxidant enzymes in the organism. Recently, a mimetic peptide (PSELT) derived from SELENOT has shown a cardioprotective and a neuroprotective effect in a noxious environment. The first part of this study aimed at evaluating the therapeutic potential of PSELT in a facial nerve injury model in rat. In a second part, we asked whether PSELT could improve a stem cells-based therapy using boundary cap (BC) stem cells, a stem cell population located in the dermis which showed a high neurogenic potential. Immediately and 48 hours after the surgery, PSELT was injected into a free femoral vein interposition graft bridging the stumps of an axotomized facial nerve at the level of the exit point of the stylomastoid foramen. Three months later, motor performance of the vibrissae has been analyzed. PSELT significantly improved motor recovery compared to control, and end suture-treated animals. These results were confirmed by electrophysiological and histological analysis which highlighted a better nerve regeneration, an increased myelination and a more specific innervation of the whisker pad in the PSELT-treated group. Combination of PSELT with BC-derived stem cells did not improve further nerve regeneration compared to the PSELT-based therapy alone, both at the clinical and histological levels. Altogether, our results indicate that PSELT offers a therapeutic advantage to treat peripheral nerve lesion compared to surgery and cell therapy approaches, and thus constitutes a valuable candidate for regenerative medicine.

Key words: axotomy, boundary cap, facial nerve, motor unit, myelin, peptide, PSELT, selenoprotein, SELENOT, stem cells

Résumé

Le système nerveux périphérique a des capacités intrinsèques de régénération, mais la récupération motrice est insuffisante dans les cas de lésions les plus graves. Si la chirurgie reste l'approche thérapeutique "de référence", son efficacité est souvent limitée et diverses stratégies alternatives ont été développées, comme la thérapie à base de cellules souches. Cependant, on observe également une régénération incomplète des nerfs, et plusieurs approches visent à améliorer le potentiel de ces cellules. Parmi celles-ci, la modulation de l'environnement redox à l'aide de molécules antioxydantes est l'une des plus prometteuses. La sélénoprotéine T (SELENOT) est une oxydoréductase qui fait partie de la famille des sélénoprotéines, l'une des plus importantes familles d'enzymes antioxydantes dans l'organisme. Récemment, un peptide mimétique (PSELT) dérivé de SELENOT a montré un effet cardioprotecteur et neuroprotecteur dans un environnement nocif. La première partie de cette étude visait à évaluer le potentiel thérapeutique du PSELT dans un modèle de lésion du nerf facial chez le rat. Puis, nous avons recherché si le PSELT pouvait potentialiser l'effet thérapeutique d'une thérapie basée sur les cellules souches dérivées des capsules frontières (CF), une population de cellules souches située dans le derme qui a montré un fort potentiel neurogène. Immédiatement et 48 heures après l'opération, le PSELT a été injecté dans une chambre de régénération d'origine veineuse dont le rôle était de réunir les deux rameaux d'un nerf facial axotomisé au niveau de la sortie du foramen stylo-mastoïdien. L'évaluation motrice des vibrisses, réalisée trois mois après la lésion, a montré que PSELT améliorait la récupération motrice de manière plus efficace comparée aux animaux témoins et à ceux ayant reçu un traitement chirurgical standard. Ces bénéfices cliniques ont été confirmés par des analyses électromyographiques et histologiques qui ont révélé une meilleure repousse nerveuse, une meilleure myélinisation et une réinnervation plus fine des muscles cibles. La combinaison de PSELT avec des cellules souches dérivées des CF n'a pas potentialisé la régénération nerveuse par rapport à la thérapie basée sur le PSELT seul, tant au niveau clinique qu'histologique. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que le PSELT offre un avantage thérapeutique pour traiter les lésions des nerfs périphériques par rapport aux approches de chirurgie et de thérapie cellulaire, et constitue donc un candidat précieux pour la médecine régénérative.

Mots clés : axotomie, capsule frontière, cellule souche, myéline, nerf facial, peptide, PSELT, sélénoprotéine, SELENOT, unité motrice