



Contribution à l'étude du rôle de la SELENOT dans le neurodéveloppement : effet de l'invalidation de son gène sur la migration des neuroblastes lors de la corticogenèse

Emmanuelle Carpentier

► To cite this version:

Emmanuelle Carpentier. Contribution à l'étude du rôle de la SELENOT dans le neurodéveloppement : effet de l'invalidation de son gène sur la migration des neuroblastes lors de la corticogenèse. Neurobiologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR081 . tel-03775023

HAL Id: tel-03775023

<https://theses.hal.science/tel-03775023>

Submitted on 12 Sep 2022

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 MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Contribution à l'étude du rôle de la SELENOT dans le neurodéveloppement : effet de l'invalidation de son gène sur la migration des neuroblastes lors de la corticogenèse

**Présentée et soutenue par
EMMANUELLE CARPENTIER**

**Thèse soutenue le 15/12/2021
devant le jury composé de**

MME ARIANE SHARIF	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE	Rapporteur du jury
MME ISABELLE BARDOU	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. VINCENT LELIEVRE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE STRASBOURG 1 LOUIS PASTEUR	Président du jury
M. YOUSSEF ANOUAR	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par YOUSSEF ANOUAR (DIFFERENCIATION ET COMMUNICATION NEURONALE ET NEUROENDOCRINE)

À ma famille,

~ Remerciements ~

En premier lieu, la thèse que j'ai réalisée a été financée par le ministère de l'Education nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et a également été soutenue par l'aide d'organismes qui sont : l'Université de Rouen Normandie, l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDnBISE), l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB), ainsi que par le programme des fonds européen de développement régional (FEDER).

La soutenance de cette thèse a pu avoir lieu grâce aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie ainsi le Docteur **Ariane Sharif** et le Professeur **Vincent Lelièvre** pour avoir accepté d'examiner mes recherches en tant que rapporteurs, et le Docteur **Isabelle Bardou** d'avoir participé à ce jury en tant qu'examinateur.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire « Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine » (DC2N), dirigé par le Docteur **Youssef Anouar**. Au travers de ces lignes, je souhaitais vous remercier particulièrement pour m'avoir fait confiance et me faire entrer au sein de votre unité, mais également pour avoir accepté de reprendre ma thèse en tant que Directeur. J'ai en effet pu compter sur votre soutien pour trouver une solution quand il y en a eu besoin, pour avoir des échanges scientifiques qui m'ont aidé dans mes réflexions et également pour votre disponibilité.

Je remercie également tous les membres de l'équipe 1 pour les discussions que l'on a pu échanger, notamment lors du congrès à Marrakech avec le Professeur **Maïté Montero-Hadjadje**, au détour d'un café avec le Docteur **Lydie Jeandel**, autour d'une paillasse avec **Dorthe Cartier** en me partageant son expertise, ou bien encore avec **David Godefroy** et le Docteur **Loubna Boukhzar** dont les conversations ont été enrichissantes (ou même pour parler de la pluie et du beau temps !) et qui m'ont aidé pour la réalisation de certaines expérimentations.

Au sein de cette équipe, j'ai également rencontré des doctorants géniaux (et même pour certains des Docteurs maintenant !), que je remercie d'être eux-mêmes tout simplement, d'avoir partagé et rigolé ensemble. Je pense bien sûr à **Ophélie**, **Fanny**, **Lisa** et **Lina** qui ont été les

premières à m'intégrer dans l'équipe, à **Cédric** qui a commencé sa thèse en même temps que moi et à **Inès** la petite dernière à être arrivée dans l'équipe mais dont le cœur est grand !

Je remercie bien entendu tous les membres du laboratoire DC2N, avec qui j'ai pu discuter de près ou de loin, et qui ont été présent pour répondre à mes questions, aussi scientifiques qu'administratives soient-elles. Sans oublier **Marjorie**, toujours de bonne humeur et avec des discussions plus élégantes les unes que les autres (mais qu'on adore !).

Je pense également aux responsables et au personnel de l'animalerie. Je remercie chaleureusement le Docteur **Arnaud Arabo** et **Julie Maucotel** pour m'avoir fait partager leur savoir sur la gestion et le bien-être animal. Julie, tu as été plus qu'une responsable, tu as été une super rencontre, toujours disponible pour m'aider et pour aller boire un verre ! Je remercie également **Dominique**, **David** et **Stéphane** pour m'avoir aidé à surveiller mes souris tout au long de ces trois années.

La plateforme PRIMACEN fût d'une grande aide pour mes acquisitions ou encore mes analyses et pour cela je souhaite remercier le Docteur **Magalie Bénard** pour son expertise mais également sa disponibilité et sa gentillesse. Également, le Docteur **Ludovic Galas**, **Marine Di Giovanni** et **Damien Schapman** qui m'ont aidé avec l'utilisation des dispositifs.

Je souhaite remercier amicalement le Docteur **Laurent Poulain** qui a été présent pour moi lors de mes CSI mais également en dehors pour me soutenir et me conseiller.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe 4, qui comme dirait **Céline**, l'équipe dont je fais un peu partie étant donné que je suis présente à tous vos goûters, en pensant particulièrement à **Mélodie**, **Emilie**, **Saloua**, **Mouna** et plus spécifiquement encore à deux personnes.

D'abord **Marie-Anne**. Aaah, Marie-Anne... Nous avons commencé notre thèse en même temps et au hasard des pauses tu es devenue plus qu'une collègue, une amie. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, sans toutes ces discussions qui nous réchauffent le cœur autant qu'elles nous font rire. Bien que tu ais deux mains gauches, tu as toujours été là pour moi, aussi bien au labo qu'à l'extérieur (et même en visio quand le Covid-19 est venu nous dire bonjour). Pour ça et tout ce que tu sais, je te remercie.

Et puis **Marion**. Tu es déjà Docteur quand tu arrives à DC2N et tu as su nous partager tes conseils, ton expérience pour que nous réussissions au mieux (avec une bonne bouffée de sport !). Avec Marie-Anne, nous étions notre trio de rire, de partage. Tu as été comme une grande sœur lors de ma thèse et je te remercie d'avoir été présente pour moi, d'avoir pris le temps de me réconforter ou même pour ces discussions scientifiques qui m'ont aidé dans mon avancée. La thèse nous fait grandir, j'ai grandi avec vous et jamais je ne pourrais oublier tous ces moments partagés.

Pour finir, je tiens à dire merci à ma famille qui a cru en moi et m'a toujours poussé à réaliser le meilleur de moi-même. **Papa, Maman, Inès, Renan** : même s'il est difficile de comprendre les difficultés et la pression qu'éprouve parfois un doctorant, vous avez été là pour m'écouter et ma thèse est repartie de plus belle. Il n'y a pas seulement la famille que l'on a dès que l'on naît, mais il y a également **toi**, qui est arrivé près de moi au beau milieu de ma thèse et qui a su m'épauler lors de ces derniers mois. Je ne saurais comment vous remercier juste par ces quelques lignes et ma pudeur me dirige sur d'autres occasions pour vous témoigner tous mes remerciements.

~ Résumé étendu ~

Les fonctions cérébrales sont régies par le transfert d'informations d'une structure à une autre. Les neurones de projection sont l'unité fonctionnelle de la communication nerveuse et sont intégrés au sein du néocortex lors de la corticogenèse. Le développement de celui-ci commence dès l'embryogenèse avec la production des neuroblastes, par les cellules de la glie radiaire, qui migrent de façon laminaire jusqu'à leur destination, afin de se différencier pour former les six couches corticales du néocortex des mammifères. Pour ce faire, les neuroblastes sont soumis à de nombreux facteurs intra- et extracellulaires. Parmi eux, la régulation des taux d'espèces réactives de l'oxygène est primordiale, puisque les radicaux libres interviennent comme seconds messagers dans de nombreuses voies de signalisation, comme la prolifération et la différenciation cellulaire, mais à l'inverse, leur excès peut conduire à la mort cellulaire. Ainsi, les systèmes de défense antioxydants, comprenant les sélénoprotéines, assurent le maintien de l'homéostasie redox. Bien que la fonction d'oxydo-réduction conférée aux sélénoprotéines via la présence de sélénocystéine soit établie, la fonction et le mode d'action de certaines d'entre elles restent encore à établir. La sélénoprotéine T (SELENOT) fait partie de ces enzymes dont la fonction est peu comprise, mais dont de récentes recherches ont révélé son rôle lors du développement embryonnaire et dans la protection contre les dommages du stress oxydatif.

Le premier axe de recherche de ma thèse a permis de mieux caractériser le profil d'expression de la SELENOT au niveau cortical, lors de l'embryogenèse et des stades postnataux. Les données démontrent ainsi sa présence au moins dès le 12^{ème} jour embryonnaire au sein de toutes les couches corticales et son expression est augmentée tout au long de la vie de la souris *Mus musculus*. La SELENOT est donc requise à la fois pour le développement du système nerveux et également lors du vieillissement cérébral, mettant en jeu un métabolisme cellulaire différent de celui retrouvé pendant l'embryogenèse. L'analyse des populations neuronales a montré que la SELENOT est exprimée aussi bien dans les neurones immatures glutamatergiques et GABAergiques en prolifération et en migration, que ceux en différenciation au niveau de la plaque corticale, lors de l'embryogenèse. La SELENOT semble donc requise pour parfaire la mise en place du néocortex lors de ces divers processus.

Pour comprendre plus finement l'implication de cette sélénoenzyme lors de la migration des neuroblastes, nous avons utilisé un modèle d'inactivation ciblée, par électroporation *in utero*, afin d'induire la perte de la SELENOT au sein des cellules souches neurales localisées au bord des ventricules latéraux. L'absence de cette sélénoenzyme lors de l'embryogenèse induit alors des anomalies de positionnement des neuroblastes lors de leur migration, étant davantage localisés au niveau de la zone de migration plutôt qu'au niveau de la plaque corticale. La diminution du nombre de neurones immatures ayant atteint la plaque corticale 72 h après électroporation peut s'expliquer par la perte de polarité de ces neuroblastes invalidés. En effet, ces derniers présentent un angle de migration supérieur à celui des neuroblastes contrôles, induisant une perte de leur polarité et empêchant leur déplacement vers la surface du néocortex. De plus, l'inactivation de la SELENOT au niveau des cellules de la glie radiaire conduit à des anomalies de leur échafaudage puisque leurs prolongements, servant de support pour la migration des neuroblastes, deviennent discontinus. L'absence de la SELENOT a donc pour conséquence la perte de polarité des neuroblastes ainsi que l'irrégularité des prolongements de la glie radiaire, aboutissant à des anomalies de migration de ces cellules vers leur destination finale. En accord avec ces données, l'analyse des couches corticales chez la souris adulte dont le gène de la SELENOT a été invalidé au niveau des cellules neurales, démontre des altérations de positionnement des neurones de projection au niveau des couches profondes.

Les résultats obtenus indiquent alors l'importance de la SELENOT lors de la mise en place des neurones de projection et plus particulièrement pour leur migration. La SELENOT est donc un acteur essentiel lors de la corticogenèse, et semble être également nécessaire lors des processus de vieillissement cérébral. Ces données, ainsi que les récentes études publiées, laissent penser que la SELENOT pourrait agir en tant qu'agent neuroprotecteur permettant le maintien de l'homéostasie redox, mais également comme acteur clé dans la synthèse de protéines indispensables à la migration neuronale. La détermination des mécanismes moléculaires impliquant la SELENOT et ses différents partenaires lors de la mise en place du néocortex permettra à terme de mieux comprendre son mode d'action et ses effets sur la régulation des taux des radicaux libres en conditions physiologiques. Ces recherches pourront ainsi déboucher sur des pistes thérapeutiques dans les maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives impliquant le stress oxydatif.

~ Summary ~

Cerebral functions are mediated by the transfer of information from one structure to another. Projection neurons are the functional units of nerve communication and are integrated within the neocortex during corticogenesis. The development of the latter begins during embryogenesis with the production of neuroblasts, by radial glia cells, which migrate laminarly to their destination, in order to differentiate and to form the six cortical layers of the mammalian neocortex. For this, neuroblasts are affected by numerous intra- and extracellular factors. Among them, the regulation of the levels of reactive oxygen species is primordial, as free radicals may serve as second messengers in different cellular processes, such as cell proliferation and differentiation; however, their excess can lead to cell death. Thus, the antioxidant defence system, including selenoproteins, ensures the maintenance of redox homeostasis. Although the redox function of selenoproteins conferred via the presence of the selenocysteine amino acid is established, the function and mode of action of some of them has yet to be established. Selenoprotein T (SELENOT) is one of these enzymes whose function is poorly understood, although recent studies have revealed its role during embryonic development and in protection against damage from oxidative stress.

The first line of research of my thesis allowed to better characterize the expression profile of SELENOT at the cortical level, during embryogenesis and postnatal stages. These data showed its expression at least from the 12th embryonic day in all cortical layers and its increased expression throughout the life of the *Mus musculus* mouse. SELENOT is thus probably required both for the development of the nervous system but also during cerebral aging, which involves different cellular metabolic regulations compared to embryonic metabolism. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization analyses of neuronal populations showed that SELENOT is expressed in immature glutamatergic and GABAergic neurons in proliferative and migrating layers, as well as in those differentiating within the cortical plate during embryogenesis. Therefore, SELENOT could be involved in the different processes leading to the formation of the neocortex.

To determine the possible role of this selenoenzyme during neuroblast maturation, we used an *in-utero* electroporation method, which ensures a targeted invalidation of a gene of interest, to disrupt the SELENOT gene in neuronal progenitors located at the edge of the lateral

ventricles. The loss of this protein during embryogenesis induces neuroblast positioning abnormalities during their migration; the neuroblasts being localized rather in the migration zone than in the cortical plate. The decrease in the number of immature neurons that reached the cortical plate 72 hours after electroporation can be explained by the loss of polarity of these SELENOT-deficient neuroblasts. Indeed, the latter present a greater angle of migration than the control neuroblasts, triggering thus a loss of their polarity and their ability to move towards the neocortex surface. In addition, disruption of SELENOT in radial glia cells led to abnormalities in their scaffolding as their extensions, serving as a support for the migration of neuroblasts, become discontinuous. Therefore, the absence of SELENOT results in the loss of polarity of the neuroblasts as well as the irregularity of the radial glia extensions, resulting in abnormal migration of these cells to their final destination. In accordance, analysis of cortical lamination in adult knockout mice where SELENOT was disrupted in neural cells showed the alteration of deep projection neuron positioning.

The results obtained in this thesis highlight the importance of SELENOT during the establishment of projection neurons and particularly during the migration stages. SELENOT is therefore an essential player during corticogenesis, but probably also during cerebral aging processes. These data, as well as those recently published by our team, suggest that SELENOT could act as a neuroprotector by maintaining redox homeostasis and may also serve as a key effector in the synthesis of proteins essential for neuronal migration. Investigation of the molecular mechanisms involving SELENOT and its potential partners during the establishment of the neocortex will ultimately allow a better understanding of its mode of action and its effects on the regulation of free radicals under physiological conditions. These findings may allow to develop a therapeutic approach to treat neurodevelopmental and neurodegenerative diseases involving oxidative stress.

~ Productions Scientifiques ~

Articles scientifiques :

Emmanuelle Carpentier, Anthony Falluel-Morel, Lisa Brunet, Magalie Bénard, David Godefroy, Loubna Boukhzar, Arnaud Arabo and Youssef Anouar. (2021). SELENOT deficiency alters projection neuron migration during corticogenesis in mice. (En cours de soumission).

David Godefroy, Loubna Boukhzar, Ben Yamine Mallouki, **Emmanuelle Carpentier**, Yves Tillet, Youssef Anouar. (2021). SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study. (En cours de soumission).

Communication orale :

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. Selenoprotein T: an antioxidant enzyme required for neuronal migration during corticogenesis (23^{èmes} Journées de l'Ecole doctorale nBISE. 17-18 Mai 2021, virtuel).

Communications affichées :

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Vincent Roy, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. Selenoprotein T disruption-induced hyperactive behaviour is related to neuronal migration alterations during corticogenesis (22^{ème} Journée de LARC-Neurosciences. 19 Octobre 2018, Mont-Saint-Aignan, France).

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. Selenoprotein T is essential for neuroblast migration and survival during cortical development (22^{èmes} Journées de l'Ecole doctorale nBISE. 21 et 22 Mars 2019, Caen, France).

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. The hyperactive phenotype of selenoprotein T-deficient mice is related to alterations of neuronal migration during

corticogenesis (7^{ème} Colloque de la Société Méditerranéenne de Neurosciences. 23-27 Juin 2019, Marrakech, Maroc).

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. Neuronal migration during corticogenesis is altered in absence of Selenoprotein T (4^{ème} Journée Normande de Recherche Biomédicale. 19 Novembre 2019, Caen, France).

Emmanuelle Carpentier, Lisa Brunet, Matthieu T. Castex, Arnaud Arabo, Magalie Bénard, Marine Di Giovanni, Youssef Anouar and Anthony Falluel-Morel. Migration of projecting neurons in embryonic neocortex requires SELENOT expression (Colloque NeuroFrance 2021 de la Société des Neurosciences. 19-21 Mai 2021, virtuel).

~ Sommaire ~

Liste des figures et tableau	16
Liste des abréviations	17
Introduction	21
I] Le cortex cérébral	21
1.1) Place du néocortex au sein du système nerveux central	21
1.1.1) Le système nerveux central	21
a) Communication nerveuse et acteurs cellulaires	21
b) Embryogenèse et formation de l'encéphale	24
1.1.2) Le néocortex	30
a) Généralités sur le néocortex	30
b) Couches corticales et organisation cellulaire	31
1.2) Corticogenèse	33
1.2.1) Neurogenèse et migration	33
a) Neurogenèse néocorticale	33
b) Neurogenèse postnatale	36
c) Modes de migration des neuroblastes	37
d) Mise en place des interneurones	41
1.2.2) Diversification temporelle et spatiale	43
a) Spécification des neurones corticaux	43
c) Synaptogenèse et mort cellulaire programmée	44
b) Les neurotransmetteurs lors de l'embryogenèse	46
1.2.3) Importance des espèces réactives de l'oxygène	49
a) Délétères ou bénéfiques ?	49
b) Importance des ROS lors du neurodéveloppement	52
c) Quelques pathologies associées au stress oxydatif	54
II] Les sélénoprotéines	55
2.1) Origine et biosynthèse des sélénoprotéines	55

2.1.1) Le sélénium	55
a) Physicochimie du sélénium	55
b) Biodisponibilité du sélénium	56
c) Excès et déficience en sélénium chez l'Homme	57
2.1.2) Les sélénoprotéines	57
a) Découverte de la sélénocystéine	57
b) Biosynthèse des sélénoprotéines	58
c) Facteurs <i>cis</i> et <i>trans</i> régulateurs	59
2.2) Evolution et fonctions des sélénoprotéines	62
2.2.1) Le sélénoprotéome	62
a) Les sélénoprotéines chez les organismes vivants	62
b) Evolution du sélénoprotéome	63
2.2.2) Fonction des sélénoprotéines chez les mammifères	65
a) Les sélénoprotéines chez les mammifères	65
b) Mode d'action des trois familles principales des sélénoprotéines	66
c) Expression et rôle des autres sélénoprotéines	71
2.2.3) Régulation des sélénoprotéines	74
a) Absorption et transport du sélénium dans l'organisme	74
b) Cerveau : à l'apex de la hiérarchie de la régulation en sélénium	75
c) Régulation et dégradation des sélénoprotéines	77
2.2.4) Sélénoprotéines et pathologies	80
a) Anomalies liées au sélénium	80
b) Sélénoprotéines et altérations génétiques	81
2.3) Sélénoprotéines et ontogenèse	82
2.3.1) Les sélénoprotéines sont nécessaires au développement	82
a) Importance des sélénoprotéines dès l'embryogenèse	82
b) Implication dans des voies de signalisation	83
c) Un tissu, plusieurs sélénoprotéines	84
2.3.2) Sélénoprotéines et neurodéveloppement	85
a) Localisation et expression des sélénoprotéines au niveau cérébral	85

b) Quelques fonctions permettant le neurodéveloppement	86
2.4) La sélénoprotéine T	88
2.4.1) Structure de la sélénoprotéine T	88
2.4.2) Expression et localisation de la sélénoprotéine T	89
2.4.3) La sélénoprotéine T et ses fonctions	92
a) Mécanismes cellulaires	92
b) Implications de la SELENOT dans des pathologies	94
c) Implications lors du neurodéveloppement	95
Objectifs de thèse	99
Résultats	103
Article : SELENOT deficiency alters projection neuron migration during corticogenesis in mice	103
Discussion	141
I] Profil d'expression de la SELENOT chez la souris C57Bl6/J	142
1.1) L'expression de la SELENOT est augmentée durant la vie de l'animal	142
1.2) Localisation de la SELENOT lors de l'embryogenèse	144
II] SELENOT et migration des neuroblastes	145
2.1) Perte de la polarité des neuroblastes en absence de SELENOT	146
2.2) L'invalidation de la SELENOT induit des altérations de la glie radiaire	148
2.3) Le positionnement des neurones de projection au sein du néocortex est dépendant de l'expression de la SELENOT	150
2.4) Altérations de la migration des neuroblastes et déficiences fonctionnelles	151
2.5) Anomalies neurodéveloppementales en absence de SELENOT et TDAH	153
Conclusions	157
Références bibliographiques	163

~ Liste des figures et tableau ~

Figure 1 : Organisation fonctionnelle du système nerveux (SN)	22
Figure 2 : Formation du tube neural	25
Figure 3 : Régionalisation cérébrale	26
Figure 4 : Signaux cellulaires de l'induction neurale	28
Figure 5 : Migration intercinétique du noyau des cellules neuroectodermales lors de la neurogenèse	29
Figure 6 : Structure du néocortex chez l'Homme	32
Figure 7 : Prolifération de la glie radiaire par divisions symétriques et asymétriques	35
Figure 8 : Migration <i>inside-out</i> des neuroblastes lors de la corticogenèse	39
Figure 9 : Migration des interneurons lors de la corticogenèse	42
Figure 10 : L'expression dominante de NKCC1 ou KCC2 est responsable de la fonction excitatrice ou inhibitrice du GABA	47
Figure 11 : Chaîne de production des espèces réactives de l'oxygène	50
Figure 12 : Biosynthèse des sélénoprotéines chez les eucaryotes	60
Figure 13 : Structure des éléments SECIS présents chez les eucaryotes	61
Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant l'évolution du sélénoprotéome	64
Figure 15 : Mode d'action des glutathion peroxydases	67
Figure 16 : Mode d'action des thiorédoxine réductases	69
Figure 17 : Mode d'action des iodothyronine déiodinases dans la synthèse des hormones thyroïdiennes	71
Tableau 1 : Localisation et fonction des sélénoprotéines	73
Figure 18 : Absorption et transport du sélénium dans l'organisme	76
Figure 19 : Dégradation des ARNm non-sens par la voie NMD	79
Figure 20 : Expression et fonctions principales des sélénoprotéines lors du neurodéveloppement	87
Figure 21 : Structure génomique et protéique de la SELENOT	89
Figure 22 : Expression tissulaire de la SELENOT chez le rat	90
Figure 23 : Localisation de la SELENOT au sein du néocortex de rat	91
Figure 24 : Localisation subcellulaire de la SELENOT	92
Figure 25 : Représentation de la N-glycosylation au sein du réticulum endoplasmique par l'oligosaccharyltransférase de type A	94
Figure 26 : Invalidation conditionnelle de la SELENOT et diminution transitoire du volume des aires cérébrales	96
Figure 27 : Effet de l'invalidation de la SELENOT lors du neurodéveloppement	97

~ Liste des abréviations ~

ADN	acide désoxyribonucléique
ApoER2	récepteur des lipoprotéines à très faible densité de type 2
ARN	acide ribonucléique
ARNt/m	ARN de transfert/messenger
ATP	adénosine-triphosphate
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
BMP	protéine morphogénétique de l'os
CP	plaque corticale
Cys	cystéine
DCX	doublecortine
DIO	iodothyronine déiodinase
E10	10 ^{ème} jour embryonnaire
eEFsec	facteur d'élongation eucaryotique spécifique de la Sec
EG	éminence ganglionnaire
EGL/M/C	éminence ganglionnaire latérale/médiale/caudale
EJC	complexes de jonction d'exon
ERAD	<i>endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
FT	facteur de transcription
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAD	acide glutamique décarboxylase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GPX	glutathion peroxydase
GSH	glutathion
HT	hormone thyroïdienne
IUE	électroporation <i>in utero</i>
IZ	zone intermédiaire

KO	<i>knock-out</i>
MZ	zone marginale
NADPH	nicotinamine adénine dinucléotide phosphate
Ngn	neurogénine
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NOX	NADPH oxydase
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PP	pré-plaque
PTC	<i>premature termination codon</i>
RE	réticulum endoplasmique
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SBP2	SECIS-Binding Protein 2
Se	sélénium
Sec	sélénocystéine
SECIS	<i>SEC Insertion Sequence</i>
SecS	Sec synthétase
SELENO	sélénoprotéine
SELENOT	sélénoprotéine T
SEPHS2	sélénophostate synthétase
siARN	<i>small interfering ARN</i>
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SOD	superoxyde dismutase
SP	sous-plaque
SVZ	zone sous-ventriculaire
TDAH	troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité
TXNRD	thiorédoxine réductase
VZ	zone ventriculaire
WT	<i>wild-type</i>

~ Introduction ~

I] Le cortex cérébral

1.1) Place du néocortex au sein du système nerveux central

1.1.1) Le système nerveux central

a) Communication nerveuse et acteurs cellulaires

Le système nerveux se divise en deux parties fonctionnelles, comprenant le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). Le SNC se compose alors de l'encéphale (communément nommé cerveau) et de la moelle épinière, tandis que le SNP est formé par les nerfs spinaux et les ganglions nerveux. Les corps cellulaires des neurones sont, en majeure partie, localisés au sein du SNC, mais les ganglions du SNP contiennent également les corps cellulaires d'une partie des neurones sensoriels ainsi que ceux de quelques neurones effecteurs non-moteurs. Les deux acteurs du système nerveux sont ainsi en constante relation afin de relayer les informations. En effet, lorsqu'un stimulus provenant du milieu environnant ou interne est perçu par les récepteurs, celui-ci est acheminé jusqu'au SNC par les voies afférentes où l'information est traitée. Le SNC répond ensuite à cette information via les voies efférentes du SNP jusqu'aux organes effecteurs afin de maintenir l'homéostasie du milieu interne. Les voies efférentes se divisent à leur tour en deux grandes parties, comprenant le système nerveux somatique (aussi qualifié « volontaire ») et autonome (ou « involontaire ») (Figure 1).

L'unité fonctionnelle du système nerveux est le neurone, spécialisé dans la signalisation électrique pour transmettre un message nerveux jusqu'à l'organe effecteur. Pour cela, le neurone est doué de plusieurs caractéristiques : il est excitable, c'est-à-dire qu'il est capable de modifier son potentiel de membrane de manière rapide et transitoire, le neurone est également capable de propager un signal électrique sous la forme d'un potentiel d'action, le long de son axone, et l'information codée par les signaux électriques est communiquée à la cellule suivante par transmission synaptique. Cette dernière se fait majoritairement par un processus chimique, libérant des neurotransmetteurs ou des neuromodulateurs au niveau des fentes synaptiques. Chez l'homme, nous dénombrons environ 86 milliards de neurones. Pour comparaison, 71 millions sont retrouvés chez la souris et près de 6,7 milliards chez le macaque. La proportion de neurones varie également en fonction des structures cérébrales. Le cortex cérébral représente 82% de la masse cérébrale chez l'Homme mais ne contient que 19% de la totalité des neurones,

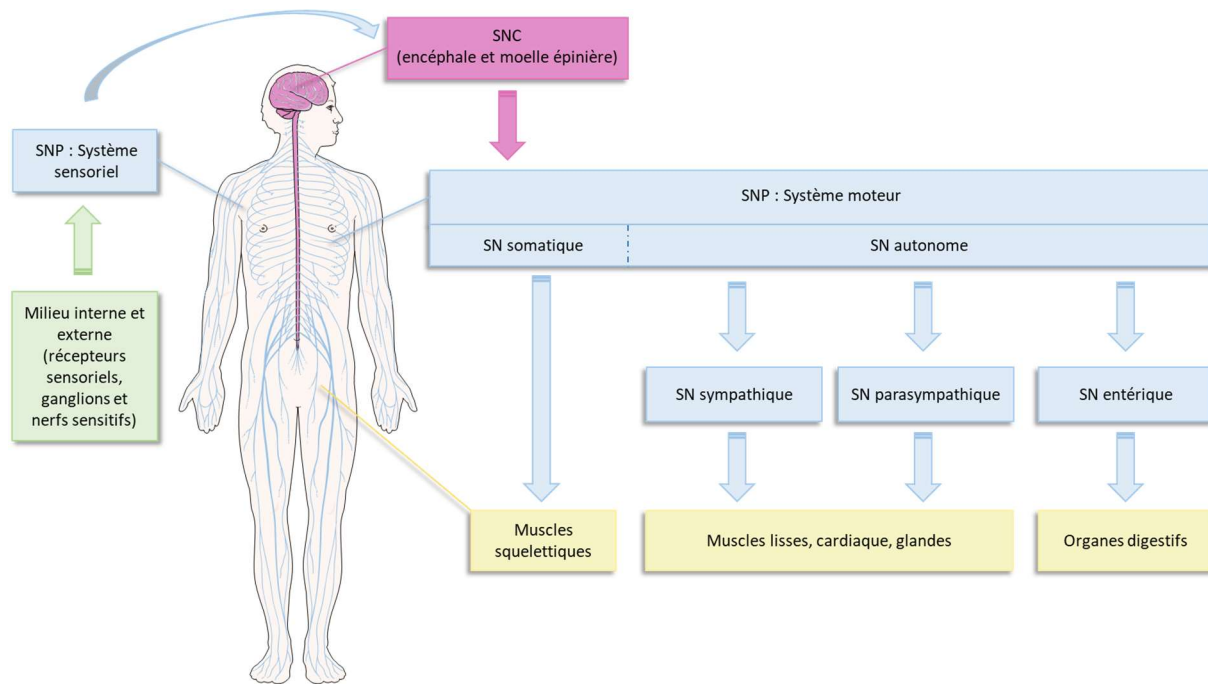


Figure 1 : Organisation fonctionnelle du système nerveux (SN). Le SN se divise en deux parties, comprenant le SN central (SNC) et le SN périphérique (SNP). Le SNC est composé de l'encéphale et de la moelle épinière, recevant et traitant les informations sensibles (partie verte). Ces informations sont transmises au niveau des organes effecteurs (partie jaune) en passant par le SNP (partie bleue). Les efférences motrices sont également divisées en plusieurs composantes, comprenant le SN somatique (volontaire) et autonome (involontaire). *Adapté de Purves et al., 2015. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

tandis que le cervelet qui représente 10% de la masse cérébrale, comprend à lui seul 80% des neurones totaux (Herculano-Houzel, 2009). Ce grand nombre de neurones se divise en plusieurs sous-populations en fonction notamment des neurotransmetteurs sécrétés, formant un réseau neuronal complexe afin de répondre au mieux aux différents stimuli perçus. Les neurotransmetteurs libérés ont alors des effets post-synaptiques excitateurs (acétylcholine, glutamate, cathécholamines, etc.) ou inhibiteurs (acide γ -aminobutyrique -GABA-, glycine). Les neuropeptides (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* -PACAP-, substance P, etc.) ont également une fonction de neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs et se distinguent simplement de la première catégorie de neurotransmetteurs par leur taille bien plus importante (de 3 à 36 acides aminés). Les neuropeptides sont parfois désignés sous le terme de neuromédiateurs pour les distinguer des neurotransmetteurs classiques.

Bien que les neurones soient doués de transmission électrique, il est bien établi que la communication nerveuse ne serait pas permise sans l'intervention d'autres acteurs cellulaires,

qui sont les cellules gliales. Ces dernières représentent la moitié des cellules composant le SNC de l'Homme et leur densité varie également en fonction des régions cérébrales (Lent et al., 2012). Les cellules gliales comprennent cette fois encore différentes populations cellulaires, qui sont les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et la microglie. Toutes ces populations neurales proviennent des cellules souches neurales, excepté la microglie qui est produite à partir du mésoderme. Leur appellation provient du terme « glia » signifiant « colle » en grec puisqu'elles ont longtemps été considérées comme le support des neurones. Cependant, ces cellules ont des fonctions variées et bien qu'elles ne conduisent pas d'influx nerveux, elles sont aujourd'hui reconnues aussi essentielles que les neurones pour le maintien et le fonctionnement du système nerveux.

Les cellules gliales les plus abondantes sont les astrocytes, qui occupent diverses fonctions au sein du SNC et ce dès le plus jeune âge. En effet, ces cellules semblent impliquées pour la migration des neuroblastes lors du développement postnatal (voir partie 1.2.1 b). Les astrocytes sont également un support métabolique important puisqu'ils permettent le transfert de nutriments du sang jusqu'aux cellules neuronales. Ces cellules sont aussi capables de moduler les vaisseaux sanguins afin de former la barrière hémato-encéphalique. De récentes études ont démontré l'importance des astrocytes dans la communication neuronale, à plusieurs niveaux. Premièrement, les astrocytes régulent la concentration ionique extracellulaire en ion potassium permettant le maintien de l'excitabilité neuronale. De plus, les chercheurs parlent aujourd'hui de synapses « tripartites » ne concernant pas seulement un neurone pré et post-synaptique, mais également l'intervention des astrocytes. Ces derniers sont en effet capables de capturer les neurotransmetteurs, comme le glutamate et le GABA, et l'adénosine-triphosphate (ATP) au niveau de la fente synaptique, ainsi que d'en sécréter certains. Ces cellules gliales interviennent ainsi dans la neurotransmission, mais aussi dans la formation, la maturation et l'élimination des synapses par la sécrétion de signaux chimiques (Allen and Eroglu, 2017). La perception de ces signaux par les neurones est rendue possible entre autres par la capacité des astrocytes à établir des jonctions communicantes entre eux ou avec les neurones.

En plus de leur rôle dans la communication nerveuse, les astrocytes interviennent dans des conditions pathologiques, lors d'infections pour la réparation tissulaire après lésion ou encore lors de maladies neurodégénératives. Leur action dans ces conditions spécifiques est possible par un processus nommé « activation astrocytaire », conduisant à la modification de leur morphologie ainsi que l'expression de certains de leurs gènes (Pekny et al., 2014).

La communication nerveuse est également aidée par les oligodendrocytes. La capacité principale de ces cellules gliales est l'élaboration de la gaine de myéline, riche en lipides, le long de l'axone des neurones. Les axones sont ainsi entourés de plusieurs segments de myéline, séparés par des nœuds de Ranvier. L'influx nerveux se déplace alors de manière saltatoire, augmentant la vitesse de conduction du potentiel d'action de 0,5 m/s à 150 m/s (Purves et al., 2015). Au niveau du SNP, ce rôle est attribué aux cellules de Schwann.

La défense immunitaire du SNC n'est pas réalisée par les cellules classiquement retrouvées au niveau périphérique, comme les macrophages, mais par les cellules microgliales. Celles-ci migrent vers le SNC lors du développement et restent dormantes. En conditions pathologiques, la microglie peut s'activer selon deux sous-types, M1 ou M2. Le sous-type M1 est la forme active de la microglie, mais non phagocytaire, lui permettant de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Le second sous-type, M2 est quant à lui protecteur puisqu'il sécrète, notamment, des molécules anti-inflammatoires et élimine les débris cellulaires par phagocytose (Hernandez-Ontiveros et al., 2013).

Enfin, la dernière classe de cellules gliales correspond aux cellules épendymaires. Ces dernières bordent les ventricules cérébraux permettant la production du fluide cébrospinal (ou liquide céphalo-rachidien). Les cellules épendymaires sont pourvues de cils favorisant la circulation de ce fluide et représentent une interface importante entre les parenchyme cérébral et le fluide cébrospinal.

Tous ces acteurs cellulaires permettent ainsi le bon fonctionnement du SNC, organe qui apparaît lors des premiers stades embryonnaires.

b) Embryogenèse et formation de l'encéphale

Le développement embryonnaire commence par la gastrulation. Au terme de celle-ci l'embryon sera composé de trois feuillets cellulaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. L'ectoderme est à l'origine de l'épiderme et des tissus nerveux. Le mésoderme permettra la formation de la plupart des tissus musculaires et squelettiques, du système urogénital, des vaisseaux sanguins et du cœur. Enfin, l'endoderme induira la formation des systèmes respiratoire et digestif. A la fin de la gastrulation, la corde dorsale (ou notochorde) est formée et constitue l'axe de symétrie principal de l'embryon. L'ectoderme est situé juste

au-dessus de la corde dorsale et comprend un feuillet cellulaire, le neuroectoderme, où découle le système nerveux (Figure 2(1)).

Le processus suivant, nommé neurulation, permet la formation de la plaque neurale par la différenciation d'une partie des cellules ectodermiques en précurseurs neuroectodermiques. Ces cellules constituent les cellules souches neurales et la plaque neurale donnera naissance aux SNC et SNP. En effet, les bords latéraux de la plaque neurale se replient pour former le tube neural responsable de la formation du SNC, tandis que les cellules dorsales situées à la limite des cellules non-neurales de l'ectoderme constituent les crêtes neurales qui donneront naissance au SNP (Figure 2(2,3)) (Fotos et al., 2011).

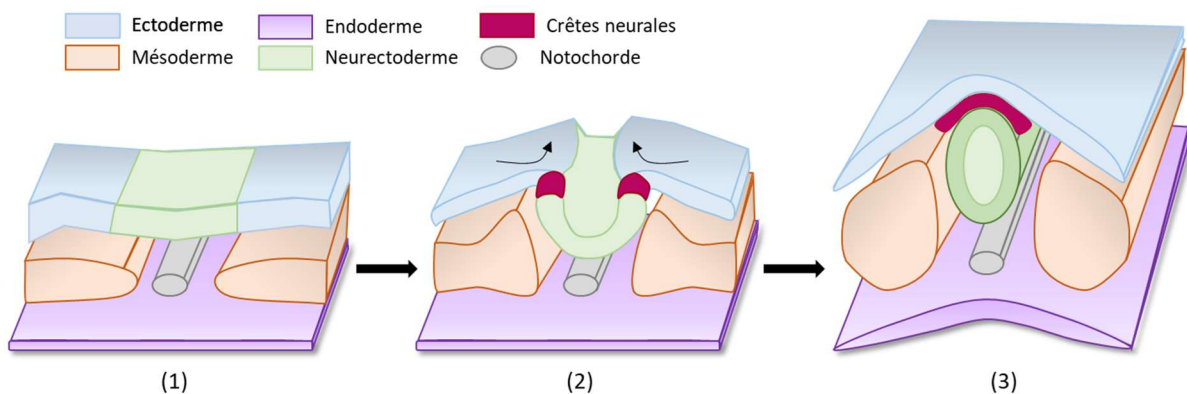


Figure 2 : Formation du tube neural. La première phase de formation du tube neural est la gastrulation (1), où découle les trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme (bleu), le mésoderme (orange) et l'endoderme (violet). A la fin de la gastrulation, la notochorde est également formée, constituant l'axe de symétrie de l'embryon. Au-dessus de la notochorde, une partie des cellules ectodermiques se différencient en précurseurs neuroectodermiques afin de former la plaque neurale (vert). (2) Lors du processus de neurulation, les bords de la plaque neurale se replient sur eux-mêmes. A ce stade, les cellules dorsales à la limite des cellules de l'ectoderme constituent les cellules de la crête neurale. (3) A la fin de la neurulation, les bords de la plaque neurale se sont fermés afin de former le tube neural, où découlera le SNC. Les cellules de la crête neurale, situées au-dessus du tube neural, formeront le SNP. *Adapté de Purves et al., 2015 et Fotos et al., 2011.*

Une fois ces structures initiées, le tube neural subit un ensemble de mouvements le courbant, le plissant et le resserrant. Au fur et à mesure que les feuillets embryonnaires se développent, le tube neural se ferme à différents points et progresse caudalement et rostralement. Ces modifications sont possibles au moyen de signaux que reçoit le tube neural

par la notochorde, la plaque du plancher et celle du toit. Cette succession de signaux aboutit à la subdivision du tube neural en ébauches des principales régions cérébrales qui sont le prosencéphale, le mésencéphale, le rhombencéphale et la moelle épinière (Figure 3A).

La lumière du tube neural subit également des mouvements morphogénétiques pour évoluer en ventricules cérébraux. Les ébauches continuent ensuite de se développer au cours de l'embryogenèse. Ainsi, les parties latérales du prosencéphale rostral se développent en télencéphale. C'est à partir de cette structure que se formera le cortex cérébral et l'hippocampe. En effet, ces deux derniers proviennent du développement de la partie dorsale des ventricules télencéphaliques. La partie caudale du prosencéphale formera quant à elle le diencephale où dérivera notamment le thalamus. Le mésencéphale évolue également afin de former les pédoncules cérébraux. Enfin, la partie rostrale du rhombencéphale forme le métencéphale, où découleront le cervelet et le pont, tandis que sa partie caudale évolue en myélencéphale, structure qui formera le bulbe rachidien (Figure 3B) (De Lahunta et al., 2016).

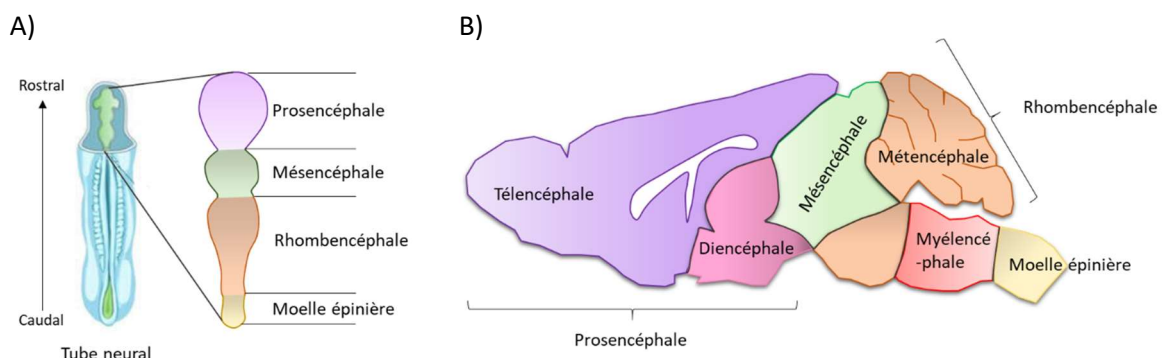


Figure 3 : Régionalisation cérébrale. **A)** Lors de l'embryogenèse, le tube neural se ferme en plusieurs points pour progresser caudalement et rostralement et se divise en plusieurs ébauches cérébrales : le prosencéphale, le mésencéphale, le rhombencéphale et la moelle épinière. **B)** Les signaux environnants perçus par ces ébauches permettent leur développement en de nouvelles régions cérébrales. Ainsi, les parties latérales au niveau rostral du prosencéphale deviennent le télencéphale (qui donnera le cortex cérébral et l'hippocampe). La partie caudale du prosencéphale forme le diencephale, structure comprenant entre autres, le thalamus. La partie rostrale du rhombencéphale se développe en métencéphale (composé du cervelet et du pont), tandis que sa partie caudale se transforme en myélencéphale (futur bulbe rachidien). Le mésencéphale évolue également et comprend les pédoncules cérébraux. La représentation est schématisée chez le rongeur. *Adapté de De Lahunta et al., 2016.*

L'identité régionale de l'embryon en développement est régie par les gènes à homéobox. Cette découverte fût effectuée chez la drosophile montrant que les gènes homéotiques déterminent la différenciation de l'embryon en plusieurs segments. Ces segments donneront ainsi la tête, le thorax et l'abdomen de la mouche. Les gènes à homéobox codent pour des protéines de liaison à l'ADN, induisant à leur tour l'expression de gènes morphogéniques. L'expression des gènes à homéobox dépend de leur localisation antéro-postérieure à l'axe de l'embryon. Cette organisation segmentaire est visible par de petits renflements, nommés rhombomères au niveau du rhombencéphale (Bass and Baker, 1997). Le tube neural présente également une succession de renflements transitoires, cette fois-ci nommée neuromères, qui permettent d'établir l'identité régionale du cerveau en développement. Chez les vertébrés, les gènes *Hox* (similaires aux gènes à homéobox de la drosophile) ne sont pas présents au niveau du prosencéphale et du mésencéphale. Cependant, le cerveau antérieur exprime tout de même des facteurs de transcription (FT) ayant un homéodomaine ou des motifs de liaison à l'ADN conservés, comme la famille de gènes *Pax* ou *Dlx* (Wigle and Eisenstat, 2008). Ces gènes permettent également au cerveau antérieur d'acquérir les changements morphologiques du tube neural en fonction d'une segmentation physique d'expression génétique.

Les gènes à homéobox déterminent ainsi la différenciation des tissus à des temps spécifiques. Mais le développement cérébral dépend également de la différenciation de cellules nerveuses spécifiques au sein de chaque région. C'est au début du XX^{ème} siècle que les signaux modulant la gastrulation et la neurulation ont été identifiés, notamment par l'utilisation de protocoles basés sur le transfert de tissus embryonnaires. Spemann a ainsi démontré que la partie dorsale du tube neural est le centre organisateur de l'axe de symétrie de l'embryon amphibien, en contrôlant les interactions cellulaires. En effet, Spemann et son équipe ont transplanté le tissu provenant de cette région au niveau ventral du tube neural d'un autre embryon au stade gastrula, engendrant la formation d'un second axe de symétrie et donc un second système nerveux (Spemann, 1903; Kuroda et al., 2004).

Ainsi, l'induction neurale est possible via des signaux cellulaires locaux ou provenant des tissus adjacents. Ces signaux sont produits par la notochorde, la plaque du plancher et du toit, le neuroectoderme, ainsi que d'autres tissus adjacents comme les somites. Les effets induits par ces signaux endogènes varient en fonction : i) d'un gradient de diffusion des signaux suivant l'éloignement de la source à la cible, ii) des récepteurs exprimés, ou encore iii) de la présence d'autres molécules de signalisation. Parmi les signaux conduisant à l'induction neurale, nous retrouvons l'acide rétinoïque, les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les protéines

morphogénétiques de l'os (BMP) ou les membres des familles Wnt et Sonic Hedgehog (Shh) (Figure 4) (Pera et al., 2014).

Pour exemple, la différenciation dorsale du tube neural est rendue possible par la stabilisation de la β -caténine, faisant partie de la voie canonique Wnt. La β -caténine va ainsi avoir deux rôles qui sont : i) l'inhibition de la transcription des gènes BMP (qui déclenchent l'ostéogenèse de cellules mésodermiques), ainsi que ii) l'augmentation de l'expression des antagonistes de la β -caténine, soit la noggin et la chordine. Ces deux antagonistes vont alors empêcher la fixation de la β -caténine à son récepteur et donc inhiber la différenciation épidermique des cellules dorsales (Kuroda et al., 2004). Ce mécanisme de régulation négative témoigne de la différenciation par défaut des cellules neuroectodermiques en neurones. Les effets permis par ces molécules de signalisation varient également en fonction du stade de développement. C'est le cas de la voie de signalisation Wnt, induisant la différenciation neurale au niveau dorsal de l'ectoderme lors du stade blastula, mais qui à l'inverse, inhibe le devenir neural au début de la gastrulation (Pera et al., 2014).

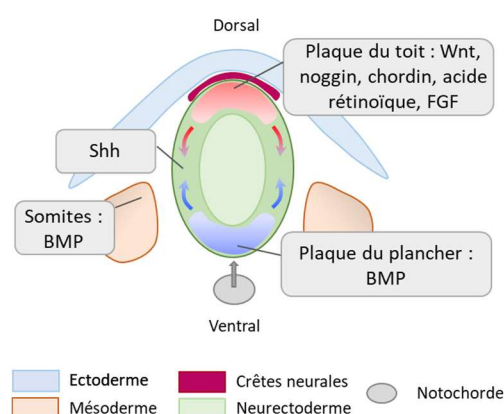


Figure 4 : Signaux cellulaires de l'induction neurale. L'induction neurale est possible selon la perception de signaux cellulaires environnants. Ces signaux sont sécrétés par la plaque du toit, celle du plancher, la notochorde ou encore les somites. Les effets engendrés par ces signaux endogènes dépendent de leur gradient de diffusion depuis leur source, de la présence de récepteurs sur les cellules cibles, ainsi que celle d'autres molécules de signalisation dans l'environnement. Shh, Sonic Hedgehog; BMP, protéine morphogénétique de l'os, FGF, facteur de croissance des fibroblastes. *Adapté de Pera et al., 2014; Purves et al., 2015.*

Une fois la segmentation du tube neural terminée, la neurogenèse peut commencer. Le tube neural initial ne comprend qu'une seule couche pseudostratifiée de cellules neuroectodermiques. Ces cellules vont alors se diviser, augmentant l'épaisseur du tube neural. Lors de la division, le noyau va effectuer une migration dite intercinétique selon l'axe apico-basal du tube neural, et ce, lié aux différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi, la synthèse de l'ADN a lieu au niveau de la zone basale du tube neural et lors de la mitose les noyaux

cellulaires sont situés au niveau apical du tube neural. Une fois la cytokinèse terminée, les deux cellules filles peuvent soit entrer dans un nouveau cycle de réplication au niveau de la zone ventriculaire (ou couche germinale), soit quitter le cycle cellulaire pour migrer au niveau basal du tube neural (en dessous de la couche marginale) (Figure 5). Les cellules quittant le cycle cellulaire peuvent alors se différencier soit en neurones immatures (ou neuroblastes) soit en spongioblastes, capables de donner les astrocytes et les oligodendrocytes.

Au terme du développement, les cellules de la couche germinale ne prolifèrent plus et deviennent des cellules épendymaires le long de la lumière du tube neural. Les cellules au niveau de la couche du manteau vont quant à elle migrer et former la matière grise, dont celle du cortex cérébral du télencéphale. Les neurones présents au niveau du néocortex établissent alors des prolongements axonaux, qui seront par la suite myélinisés par les oligodendrocytes et formeront la matière blanche. Ainsi, les précurseurs neuraux du neuroectoderme donneront l'ensemble des cellules nerveuses, excepté la microglie qui provient des cellules du mésoderme (De Lahunta et al., 2016).

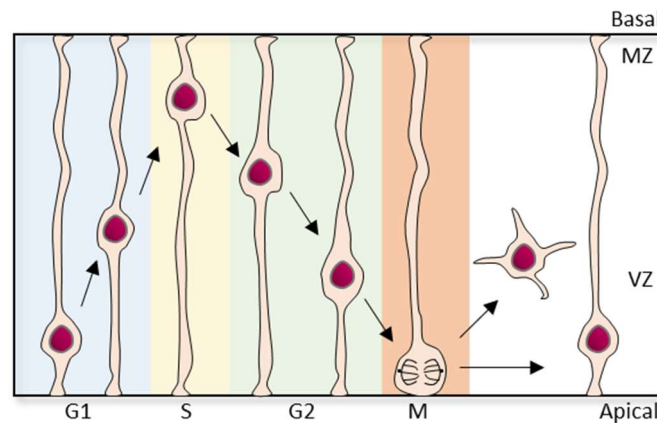


Figure 5 : Migration intercinétique du noyau des cellules neuroectodermes lors de la neurogenèse. Lors des différentes phases du cycle cellulaire, le noyau des précurseurs neuraux migre de manière intercinétique selon l'axe apico-basal. Le noyau se déplace ainsi le long du prolongement pour atteindre la surface externe (zone marginale, MZ) du tube neural (phase G1). La synthèse de l'ADN a lieu au niveau basal du tube neural (phase S). Ensuite, le noyau migre de nouveau vers la surface apicale (zone ventriculaire, VZ) du tube neural (phase G2) afin de se diviser pour donner naissance à deux cellules filles (phase M). Ces dernières vont alors soit entrer dans un nouveau cycle de réplication au niveau apical, soit migrer vers la MZ afin de former la plaque corticale. *Adapté de De Lahunta et al., 2016.*

Deux autres aspects importants pour le développement cérébral, sont la vascularisation et l'apoptose. Chez les vertébrés, le système vasculaire commence à se développer juste après la gastrulation via des signaux provenant du mésoderme. Ces signaux permettent la différenciation de cellules mésodermes en précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques. Ensuite, des signaux provenant de l'endoderme induisent la migration de ces cellules à leur site de vascularisation, afin de proliférer et se différencier en cellules endothéliales. L'angiogenèse correspond alors à la formation de capillaires sanguins à partir de ces vaisseaux préexistants. Les signaux angiogéniques sont principalement sécrétés en conditions hypoxiques. Les vaisseaux intracérébraux se mettent en place au niveau des couches profondes du tissu neuroectodermique en cohésion avec les phases de développement neuronal. La barrière hématoencéphalique est quant à elle en partie formée en réponse à des signaux neuraux (Wittko-Schneider et al., 2014).

Enfin, la mort cellulaire programmée ou apoptose, constitue un acteur important pour le bon développement du système nerveux. En effet, environ 50 à 70% des cellules neurales générées meurent par apoptose lors de l'embryogenèse, notamment pour permettre la fermeture du tube neural, éliminer l'excès cellulaire ou encore pour enlever les neurones n'ayant pas établi les connexions synaptiques adéquates (De Zio et al., 2005).

Ces étapes précoces de l'embryogenèse vont ainsi mener à l'élaboration des structures cérébrales, dont le néocortex.

1.1.2) Le néocortex

a) Généralités sur le néocortex

Comme nous l'avons vu précédemment, le cortex cérébral découle de la partie dorsale du télencéphale et représente, une fois mature, 82% de la masse cérébrale chez l'Homme, contre 42% chez la souris (Herculano-Houzel, 2009). La première démonstration témoignant de l'organisation des fonctions cérébrales suivant leur localisation fût réalisée au milieu du XIX^{ème} siècle par Paul Broca. Ce neuroscientifique français prouva en effet que la parole est possible par une aire cérébrale localisée au niveau d'une région spécifique du lobe frontal (Broca, 1865). Les recherches qui vont suivre vont confirmer cette démonstration et il est maintenant bien établi que les aires corticales se distinguent les unes des autres selon leur cyto-

architecture, leur disposition en colonne et en fonction de leurs connexions afférentes et efférentes.

Le cortex cérébral se divise en trois parties, apparues au cours de l'évolution, comprenant l'archicortex, le paléocortex et le néocortex. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous allons nous concentrer sur le néocortex, situé au niveau périphérique des hémisphères cérébraux et très développé chez les mammifères. Cette partie cérébrale peut être de 1,6 à 4,5 mm d'épaisseur chez l'Homme (Edwards et al., 2018) et est responsable des fonctions cognitives supérieures, comprenant le langage, la conscience, la perception sensorielle ou encore les commandes motrices volontaires. La cytoarchitecture du néocortex (densité, taille et type cellulaire) a pu être élucidée au moyen de techniques de coloration, telles que celles de Nissl et de Golgi, qui ont permis d'identifier plus de 40 aires corticales par le neurophysiologiste allemand, Korbinian Brodmann (Zilles, 2018). L'organisation en colonne et laminaire du néocortex a également pu être mise en évidence grâce à ces colorations, montrant la particularité de celui-ci d'être organisé en 6 couches.

b) Couches néocorticales et organisation cellulaire

Le néocortex comprend donc 6 couches qui se distinguent les unes par rapport aux autres suivant leur composition cellulaire, leur épaisseur et leur identité corticale. Les couches horizontales sont numérotées, suivant la numérotation grecque de I à VI, et selon leur position dorso-ventrale. Ainsi la couche numéro I est la plus superficielle (dorsale) et la couche numéro VI la plus interne (ventrale). Le néocortex possède une grande variété de neurones, dont les deux formes majoritaires sont les neurones pyramidaux (excitateurs) et les interneurones GABAergiques (inhibiteurs), qui représentent respectivement 70-80% et 20% des cellules. Ces neurones sont répartis de manière spécifique au sein du néocortex.

La couche I, aussi dite couche moléculaire, a une faible densité cellulaire contenant essentiellement des fibres nerveuses (axones et dendrites), des cellules gliales et des interneurones. La couche II (ou granulaire externe) comprend des cellules étoilées traitant les informations afférentes cortico-corticales. La couche III (ou pyramidale externe) contient quant à elle des neurones pyramidaux émettant des efférences cortico-corticales. La couche suivante, IV (ou granulaire interne), est constituée de cellules étoilées afin de recevoir les informations provenant du thalamus. La couche V (ou pyramidale interne) comprend les neurones pyramidaux ayant les somas les plus larges, qui émettent leurs axones au niveau des zones sous-

cérébrale et sous-corticale (striatum et thalamus). Enfin, la couche VI (ou polymorphe) contient cette fois encore des neurones pyramidaux afin de projeter vers le thalamus (Kwan et al., 2012). En plus de cette liste non exhaustive, les neurones de ces couches établissent également des interconnexions entre eux afin d'intégrer les informations (Figure 6). Ainsi, chaque couche corticale est constituée d'une population neuronale ayant des morphologies et des connexions distinctes.

Les interneurones établissent quant à eux des connexions locales au sein du cortex. Ces neurones, ayant de courts axones, libèrent le neurotransmetteur GABA afin d'inhiber les neurones pyramidaux. Les interneurones GABAergiques regroupent une population hétérogène en fonction de leur morphologie, de leurs caractéristiques électrophysiologiques ou encore leur identité moléculaire, établissant des connexions spécifiques au sein des couches corticales (Kawaguchi and Kubota, 1997). Parmi ces sous-types d'interneurones, nous retrouvons par exemple les interneurones paravalbuminergiques, somatostatinerigiques (principalement retrouvés au niveau des couches profondes) et sérotoninergiques (abondants au niveau des couches superficielles).

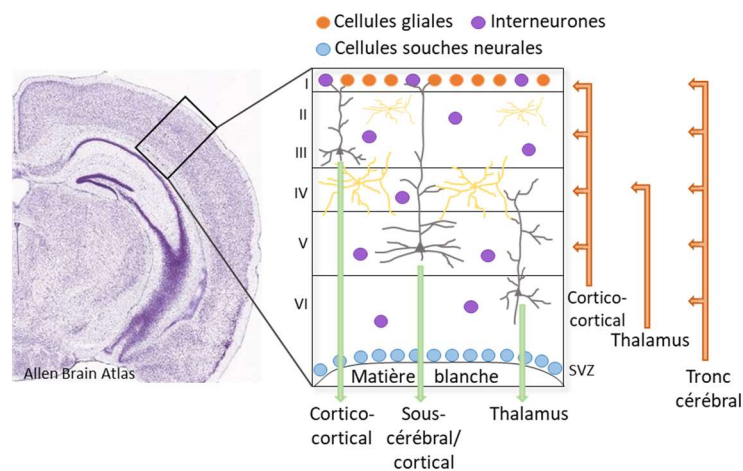


Figure 6 : Structure du néocortex chez l'Homme. Visualisation de la composition et des connexions cellulaires constituant les six couches du néocortex. La première couche (I) contient des fibres nerveuses, des cellules gliales et des interneurones. La couche II, tout comme la IV, comprennent des cellules étoilées (jaune) permettant de traiter les informations arrivant (flèches orange) respectivement, d'autres aires corticales ou du thalamus. Les couches III, V et IV sont quant à elles composées de neurones pyramidaux (gris) qui émettent les informations (flèches vertes) au niveau, respectivement, d'autres aires corticales, des zones sous-cérébrales et sous-corticales et au sein du thalamus. Ces neurones établissent également des interconnexions au sein des différentes couches. Le tronc cérébral émet des afférences au niveau de toutes les couches du néocortex. La couche sous-ventriculaire (SVZ) contient des cellules souches

neurales qui permettront la neurogenèse chez l'adulte. *Adapté de Kwan et al., 2012 et Purves et al., 2015.*

Toute cette population de neurones constituant le néocortex apparaît lors d'une fenêtre temporelle définie lors de l'embryogenèse. Ainsi, les neurones corticaux sont produits entre les semaines 5 et 20 de gestation chez l'Homme, ou pour autre exemple entre les jours embryonnaires (E) 11 et E19 chez la souris (Angevine and Sidman, 1961; Lodato and Arlotta, 2015). La production et la mise en place de ces neurones au sein du néocortex se font à des temps spécifiques du neurodéveloppement et suivant des mécanismes particuliers, que nous allons voir dans le chapitre suivant « Corticogenèse ».

1.2) Corticogenèse

1.2.1) Neurogenèse et migration

a) Neurogenèse néocorticale

Les neurones de projection (pyramidaux, glutamatergiques) formant le néocortex sont produits au niveau des zones germinales du télencéphale, bordant les ventricules latéraux, qui sont la zone ventriculaire (VZ) et la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les premiers neurones corticaux naissent au niveau de ces couches dès le stade E10,5 chez la souris et forment la pré-plaque (PP). Les neurones pyramidaux naîtront entre E11,5 et E17,5, avec un pic vers E14,5 et les premiers migreront au sein de la PP (Takahashi et al., 1995). La PP sera très rapidement divisée en deux, comprenant la MZ et la sous-plaque (SP). C'est entre ces deux couches que sera formée la plaque corticale (CP), par la prolifération et la migration des neurones immatures. Cette dernière est visible dès E13 et est à l'origine des différentes couches corticales I à VI (Smart and McSherry, 1982).

Au début du développement, les cellules neuroépithéliales prolifèrent par divisions symétriques afin d'augmenter le pool de cellules souches neurales. La capacité de ces cellules à maintenir leur état prolifératif est due à la signalisation Notch. Plus précisément, la fixation des ligands Delta ou Jagged sur le récepteur Notch permet le clivage de la partie intracellulaire du récepteur. Cette forme active permet l'expression de FT de type bHLH (*basic helix loop helix*), comme ceux appartenant à la famille des gènes *Hes* au sein de ces cellules. Ces FT vont alors réprimer l'expression d'autres FT de type bHLH, comme la neurogénine 2 (Ngn2) ou *Ascl1*. L'absence de la Ngn2 et *Ascl1* maintient ainsi l'état prolifératif de ces cellules (Paridaen and Huttner, 2014). De plus, l'état prolifératif des cellules neuroépithéliales ou leur

différenciation en cellules neurales dépend de l'oscillation d'expression des FT *Hes* au cours du temps. En effet, leur expression oscille sur des périodes de 2-3 h, modulant alors l'expression de *Ngn2*, *Ascl1* et *Delta* (Imayoshi et al., 2013).

Aux prémices de la neurogenèse, vers E10-E12, les cellules neuroépithéliales deviennent rapidement des cellules de la glie radiaire, caractérisée par la perte des jonctions serrées et l'émission d'un long prolongement qui s'étend jusqu'à la surface du cortex. Cette transition est en partie due à l'expression de facteurs de la famille *Hes*, qui régulent la voie Notch (Hatakeyama et al., 2004). Les cellules de la glie radiaire se distinguent par des marqueurs du neuroépithélium, comme la nestine ou des marqueurs spécifiques des astrocytes tels que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) ou encore le transporteur spécifique L-glutamate/L-aspartate (GLAST). Les cellules de la glie radiaire ont une capacité d'auto-renouvellement, notamment possible grâce à la présence du facteur de transcription Sox2. La glie radiaire va alors maintenir une activité de divisions symétriques pour augmenter le pool de cellules souches neurales, mais également générer des neurones immatures par divisions asymétriques. Ainsi, une des deux cellules filles restera au sein de la VZ pour poursuivre la neurogenèse, tandis que la seconde, différenciée en neuroblaste, quittera la VZ. La différenciation en neuroblaste peut également se produire indirectement à partir d'une cellule fille de la glie radiaire. En effet, la cellule fille peut quitter la VZ afin de devenir un progéniteur neuronal intermédiaire. Celui-ci est localisé, précocement au niveau basal de la VZ, ou au niveau de la SVZ, formée à partir de E13,5 (Figure 7) (Molyneaux et al., 2007). Les progéniteurs intermédiaires participent à l'expansion du nombre de neuroblastes par divisions symétriques et sont la principale source des neurones pyramidaux peuplant le cortex. Des études ont également mis en évidence les particularités du cycle cellulaire lors de ces processus. En effet, l'augmentation de la phase G1 est associée aux divisions neurogènes, tandis que la phase S dure plus longtemps chez les cellules de la glie radiaire en division symétrique, comparé à celles qui se divisent de manière asymétrique (Arai et al., 2011).

La deuxième phase de prolifération lors du neurodéveloppement permet une importante production de cellules gliales à partir des cellules de la glie radiaire. En effet, ces dernières ont la capacité de générer différentes populations neurales suivant le stade de développement. Ainsi, la glie radiaire produit des neurones aux stades précoces, puis génère des astrocytes à des stades plus tardifs, entre E17,5 et les premiers jours postnataux. Une étude a en effet caractérisé le devenir des cellules générées à partir de E18, et seul 30% à 40% d'entre elles se

différencieront en neurones, tandis que la seconde portion de ces cellules va acquérir des caractéristiques astrocytaires ou rester des cellules souches neurales (Levers et al., 2001).

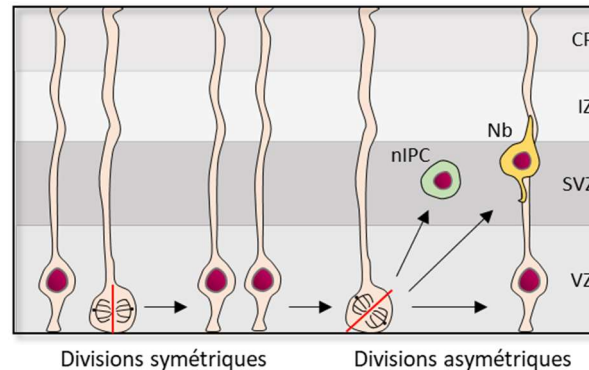


Figure 7 : Prolifération de la glie radiaire par divisions symétriques et asymétriques. Le corps cellulaire des cellules de la glie radiaire est localisé au niveau la VZ. L'expansion du nombre de cellules souches neurales se fait dans un premier temps par division symétrique des cellules de la glie radiaire. Puis, celle-ci va générer des neuroblastes par division asymétrique, donnant une nouvelle cellule de la glie radiaire et un neuroblaste qui migrera pour atteindre la CP. La glie radiaire peut également produire une cellule progénitrice intermédiaire neuronale (nIPC), qui sera localisée au niveau de la SVZ afin d'accroître le pool de neuroblastes. VZ, zone ventriculaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; IZ, zone intermédiaire ; CP, plaque corticale ; Nb, neuroblaste. *Adapté de Paridaen and Huttner, 2014.*

Enfin, les cellules de la glie radiaire sont également capables de produire des oligodendrocytes. Bien que le pic de production des oligodendrocytes se trouve vers la deuxième semaine postnatale, leurs progéniteurs sont présents dès E16 au niveau de la VZ. Cependant, les oligodendrocytes présents au niveau cortical lors de l'embryogenèse, proviennent des éminences ganglionnaires (EG) et de manière surprenante ils seront éliminés à la naissance pour être remplacés par ceux produits par la VZ et de nouveau par les EG (Parnavelas, 1999; Kessaris et al., 2006).

Cette capacité due à la glie radiaire est permise par des facteurs internes aux cellules mais également par des signaux extracellulaires, tels que les facteurs de croissance. Ainsi, le contrôle d'un ensemble de cascades de signalisation, comme les voies Notch, JAK/STAT ou encore les BMP, va soit inhiber le devenir astrocytaire, soit le promouvoir. Pour exemple, aux stades précoces du développement, le facteur de croissance platelet-derived growth factor (PDGF) induit une forte expression de la neurogénine 1 (Ngn1), un FT de type bHLH, qui favorise la différenciation neuronale. La Ngn1 agit par compétition vis-à-vis du FT STAT en

bloquant sa phosphorylation. Au contraire, à des stades plus tardifs, l'expression de Ngn1 diminue, permettant la phosphorylation de STAT par le facteur de croissance ciliary neurotrophic factor (CNTF), engendrant alors le devenir astrocytaire (Sauvageot and Stiles, 2002). De plus, Park et collaborateurs ont démontré que ces effets sont régulés dans le temps. En effet, l'exposition de CNTF sur des cellules corticales prélevées chez des rats à E14 ne permet pas la différenciation astrocytaire de ces cellules (Park et al., 1999).

Bien que la majorité des neurones pyramidaux soient produits entre le 11^{ème} et le 17^{ème} jour embryonnaire, la neurogenèse perdure après la naissance.

b) Neurogenèse postnatale

La genèse des neurones de projection lors de l'embryogenèse permet la formation des différentes couches corticales. Cependant, la production de neurones n'est pas restreinte à cette fenêtre temporelle. En effet, deux niches prolifératives connues existent au sein du cerveau adulte, localisées au niveau de la SVZ et du gyrus denté (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Kuhn et al., 1996). Après la naissance, certaines cellules de la glie radiaire deviennent astrocytaires, tandis que d'autres restent des cellules souches neurales. Ces cellules vont ainsi être quiescentes au sein de la SVZ afin de pouvoir donner des neuroblastes (Fagel et al., 2006). Contrairement aux stades embryonnaires, il a été démontré que ces neurones immatures sont en contact étroit avec les vaisseaux sanguins (Mirzadeh et al., 2008). Tout d'abord, les futurs neurones générés au niveau de la SVZ, migrent le long du flux migratoire rostral (RMS, ou *rostral migratory stream*), allant jusqu'aux bulbes olfactifs, afin de remplacer les interneurons à ce niveau (Biebl et al., 2000). De manière surprenante, chez les nouveau-nés mais pas chez l'adulte, des neurones immatures sont capables de quitter le RMS afin de peupler les couches corticales profondes. Ensuite, ils migrent radialement au niveau du corps calleux et du cortex, chez la souris jeune, en étant à étroite distance des prolongements des astrocytes, eux-mêmes à proximité des vaisseaux sanguins (Le Magueresse et al., 2012).

Bien que la prolifération des cellules neurales perdure de l'embryogenèse au postnatale, le nombre de cellules neuronales et non-neuronales varient en fonction du stade de développement. Bandeira et collaborateurs ont ainsi quantifié ces variations par la technique du fractionnement isotrope, consistant à isoler les noyaux présents dans une région d'intérêt et réaliser un comptage via un hématimètre. Ces chercheurs montrent alors que le nombre de neurones au sein du néocortex double lors de la première semaine postnatale, soit un gain de

24 millions de neurones ! Cependant, ils constatent une perte d'environ 65% du nombre de neurones lors de la 2^{ème} semaine postnatale, contre 90% de cellules non-neuronales en plus. Le nombre de neurones augmente de nouveau entre 15 et 25 jours de vie, afin d'atteindre un nombre identique à celui du rat adulte (Bandeira et al., 2009).

La prolifération neurale discontinue observée par ces auteurs est appuyée par une autre étude utilisant une autre méthode de quantification, l'estimateur par fractionnement optique. Cette méthode de comptage stéréologique non-biaisé en 3 dimensions permet d'estimer le nombre de noyaux à partir de tranches épaisses. Cependant, l'étude de Lyck et al. réalisée chez la souris, indique un doublement de la population neuronale lors de la 2^{ème} semaine postnatale et une diminution de ce nombre de 30% jusqu'au 35^{ème} jour de vie. Leur analyse démontre également une augmentation du nombre de cellules gliales entre les 2^{ème} et 4^{ème} semaines postnatales (Lyck et al., 2007). Malgré quelques disparités temporelles qui peuvent être liées à l'espèce, ces deux études démontrent bien la présence d'une neurogenèse postnatale au sein du néocortex.

Les neurones produits lors du développement postnatal vont alors peupler les structures corticales mises en place pendant l'embryogenèse, dont le néocortex, élaboré via la migration laminaire des neuroblastes.

c) Modes de migration des neuroblastes

La mise en place du néocortex est un mécanisme particulier dit « *inside-to-outside* ». Ainsi, les couches corticales profondes (V et VI) sont formées par les neuroblastes générés en premier et les couches superficielles (II, III et IV) sont peuplées par les neuroblastes nés plus tardivement. Le modèle de la souris Reeler, invalidée pour la reeline, témoigne de ce mode de migration laminaire. En effet, l'absence de reeline, qui est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, induit une inversion et une désorganisation dans la mise en place des couches corticales. Les couches V et VI sont alors positionnées en surface, tandis que les couches II et III sont en profondeur (Caviness, 1982). La reeline est sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius, qui forment la MZ, puis plus tard la couche I. Cette glycoprotéine serait perçue par les neuroblastes, via le récepteur des lipoprotéines à très faible densité (VLDLR) et le récepteur apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2), comme un signal d'arrêt de migration et engendre leur détachement de la glie radiaire (Rice and Curran, 2001).

Dès E11,5, les neuroblastes migrent des couches VZ/SVZ à la CP, en passant au-dessus des couches existantes. Pour cela, deux modes de migration sont observables au sein du néocortex. Aux stades précoces du développement, lorsque la PP se forme, les neuroblastes migrent essentiellement par translocation. Pour cela, les neuroblastes semblent hériter du prolongement de la glie radiaire qui leur a donné naissance. Les futurs neurones peuvent alors émettre un prolongement jusqu'à la surface basale (ou surface piaie) et perdre celui les rattachant à la surface ventriculaire (ou surface apicale). Ainsi, les cellules migrent par translocation en déplaçant leur noyau radialement le long de leur prolongement, afin de se positionner juste en dessous de la MZ, formant la PP, puis la CP par accumulation de neuroblastes (Figure 8) (Kriegstein and Noctor, 2004). Lors des stades de développement plus tardifs, lorsque la CP est plus large, le mode de migration le plus utilisé par les neuroblastes est la locomotion, plus lente que la translocation. Ce mécanisme a été mis en évidence par Rakic dans les années 70, montrant que les neuroblastes émettent un petit prolongement afin d'adhérer à celui de la glie radiaire, qui elle émet un long prolongement jusqu'à la surface piaie (Figure 8) (Rakic, 1972). La locomotion permet ainsi aux cellules d'atteindre leur destination par une succession d'étapes répétitives : extension du prolongement basal (*leading process*), dilatation de la partie basale du noyau, déplacement du centrosome au niveau de la dilatation, élongation et translocation du noyau, puis rétractation du prolongement apical (Schaar and McConnell, 2005; Nishimura et al., 2014).

La locomotion fait également intervenir de nombreuses molécules d'adhésion et d'interaction entre le neuroblaste et la glie radiaire. Parmi les nombreux acteurs intervenant, nous retrouvons des membres de la famille des intégrines, comme l' $\alpha 3$ et l' $\alpha 5$, qui sont des récepteurs localisés à la surface cellulaire et fixant les molécules de la matrice extracellulaire. Il a été montré que ces intégrines sont indispensables à la migration des neurones le long de la glie radiaire, puisque leur invalidation conduit respectivement, à l'agrégation des neurones immatures entre eux et à une perte d'adhésion des neuroblastes à la glie radiaire. Ces effets ont pour conséquence d'altérer l'organisation laminaire des couches corticales (Anton et al., 1999). Ce mode de migration, permet alors aux neuroblastes de passer au-dessus des cellules ayant déjà migrées et de se positionner juste en dessous de la MZ. Le passage des neuroblastes au travers des autres est cette fois encore relayé par des molécules d'adhésion, comme l'expression de la Cdk5 (*cyclin dependent kinase 5*). Cette dernière permet d'inhiber l'expression de la N-cadhérine au niveau de l'IZ, afin d'éviter l'agrégation des cellules entre elles et qu'elles puissent

migrer jusqu'à la CP (Kwon et al., 2000). La reeline, sécrétée au niveau de la MZ, intervient comme un signal inhibiteur de la locomotion, le neuroblaste se détache de la glie radiaire et termine sa migration au sein de la CP par translocation (Nadarajah and Parnavelas, 2002).

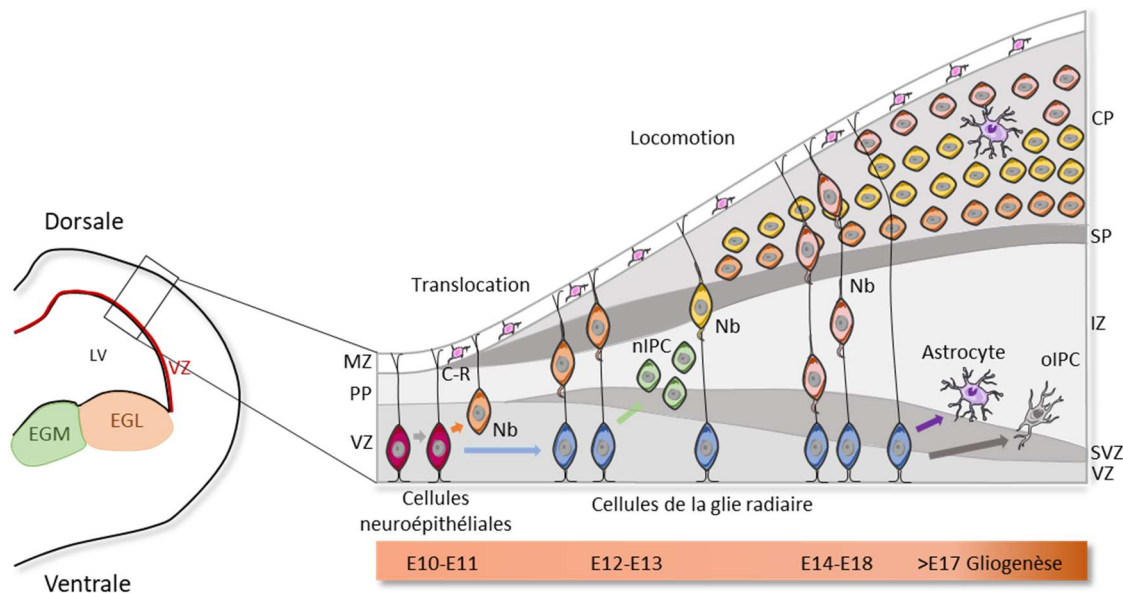


Figure 8 : Migration *inside-out* des neuroblastes lors de la corticogénèse. Les cellules neuroépithéliales prolifèrent au niveau de la VZ du télencéphale dorsal afin de donner des neuroblastes, à partir de E11,5. A ce stade, le neuroblaste (Nb) migre par translocation jusqu'à la PP. Les cellules de Cajal-Retzius (C-R) sécrètent de la reeline notamment reconnue comme un signal d'arrêt de la migration. Les cellules neuroépithéliales deviennent ensuite des cellules de la glie radiaire, vers E10-E12. A ces stades plus tardifs, les neuroblastes migrent par locomotion le long des prolongements de la glie radiaire jusqu'à la CP (accumulation de neuroblastes au sein de la PP), en passant au-dessus des cellules précédemment positionnées. La glie radiaire donne également des nIPC au sein de l'IZ, qui donneront des neuroblastes. A la fin de l'embryogenèse, à partir de E17, les cellules de la glie radiaire sont aussi capables de donner des astrocytes et des oIPC. n/oIPC, cellule progénitrice intermédiaire neuronale/oligodendrocytaire ; MZ, zone marginale ; PP, pré-plaque ; VZ, zone ventriculaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; IZ, zone intermédiaire ; SP, sous-plaque ; CP, plaque corticale ; LV, lumière ventriculaire ; EGM/L, éminence ganglionnaire médiale/latérale. *Adapté de Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009 et Nadarajah and Parnavelas, 2002. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

Lors de la corticogénèse, les neuroblastes migrent radialement jusqu'à 7 mm de distance chez un primate. Durant ce temps, ces cellules passent par 4 phases avant d'atteindre la CP. Tout d'abord, les neuroblastes générés migrent radialement afin de quitter la VZ pour se

positionner dans la SVZ. En second, ces cellules marquent une pause de 24 h au sein de la SVZ et l'IZ. A ce niveau, les neuroblastes adoptent une morphologie multipolaire, étendant et rétractant leurs prolongements de manière dynamique, et changent fréquemment de direction. Ensuite, la majeure partie d'entre eux passent par une troisième phase afin de ramener leur corps cellulaire au niveau ventriculaire. Vient ensuite la dernière phase où les neuroblastes, au niveau ventriculaire et dans la zone intermédiaire (IZ), adoptent une morphologie bipolaire afin de migrer radialement, entre 9 et 12 $\mu\text{m/h}$ (Tabata and Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004).

A la fin de la migration, les neuroblastes se différencient en neurones spécifiques de la couche corticale au sein de laquelle ils sont positionnés, en étendant leurs axones et dendrites. Leur date de naissance semble donc liée à leur identité laminaire et aux connexions qu'ils doivent former. L'évolution du néocortex en six couches laminaires permet ainsi d'entreposer un volume d'informations plus important et accessible plus rapidement.

Deux hypothèses ont été établies à la fin des années 80, afin de comprendre comment les neurones corticaux définissent leur différenciation et leur organisation au sein du néocortex. Rakic, en 1988, proposa tout d'abord l'hypothèse de la « *radial unit* » ou « *protomap* ». En effet, le néocortex est organisé en « unités prolifératives » au niveau de la VZ, où les cellules provenant d'une même unité migrent le long des mêmes fibres gliales. Une unité proliférative peut donc produire plusieurs phénotypes cellulaires suivant des mécanismes génétiques et épigénétiques différents, formant les différentes colonnes corticales (Rakic, 1988). Un an plus tard, une deuxième hypothèse, le « *protocortex* » émise par O'Leary s'oppose à celle du *protomap* et stipule que les neurones corticaux ont tous le même potentiel génétique, donc que la structure architectonique du néocortex adulte n'est pas établie à des stades précoces. Il propose alors que les caractéristiques des aires corticales ne sont pas prédéterminées au sein du neuroépithélium mais que l'organisation corticale est sous l'influence d'afférences externes, particulièrement celles provenant du thalamus (O'Leary, 1989).

L'épaisseur et les connexions corticales définissent le fonctionnement cérébral. Malheureusement, des défauts de migration lors de la corticogenèse induisent des pathologies. Deux pathologies connues, les désordres du spectre autistique (ASD) et la schizophrénie, sont associées à des anomalies de migration altérant l'organisation des colonnes corticales (Wegiel et al., 2010; Stachowiak et al., 2017). Ces pathologies humaines témoignent de l'importance de la bonne mise en place du néocortex pour les fonctions cognitives, motrices et psychiatriques.

Les deux types de lissencéphalies sont également dûs à des malformations corticales, mais à des niveaux différents. La lissencéphalie de type I induit une accumulation des neurones sous la PP, désorganisant le cortex en seulement 4 couches distinguables. Cette anomalie est en partie due aux mutations des gènes *Lis1* et de la doublecortine (*DCX*), impliqués respectivement dans la translocation du noyau lors de la locomotion ainsi que pour la prolifération et dans l'organisation des microtubules. À l'inverse, la lissencéphalie de type II (ou Cobblestone) induit une ectopie du néocortex où celui-ci voit son épaisseur augmenter. En effet, cette pathologie se traduit par une altération de l'interaction du prolongement de la glie radiaire avec la surface piaie. Les neuroblastes ont alors une migration excessive, allant au-delà des méninges (Fernández et al., 2016).

d) Mise en place des interneurones

Le néocortex compte également parmi ses cellules, les interneurones, qui se mettent en place lors de la corticogenèse. De nombreuses études réalisant des traçages cellulaires *in vivo*, sur tranches ou encore des cultures cellulaires, ont pu améliorer nos connaissances quant à leur mode de migration. Les interneurones proviennent des EG au niveau du télencéphale ventral, qui se découpent en trois zones, comprenant les éminences ganglionnaires médiale (EGM), latérale (EGL) et caudale (EGC) (Figure 9A). Ces zones sont visibles dès E11,5 chez le murin. L'EGM est la principale source puisqu'elle produit jusqu'à 50-60% des interneurones corticaux chez la souris. Cependant, des chercheurs ont pu observer que contrairement aux rongeurs, la majorité des interneurones corticaux chez le primate proviennent des zones prolifératives du néocortex et seul 35% dérivent des EG (Kelsom and Lu, 2013). La genèse des interneurones est donc distante du néocortex, les obligeant à migrer de manière tangentielle, à une vitesse d'environ 60 $\mu\text{m/h}$ (Polleux et al., 2002; Ang et al., 2003).

Débutant à E12,5 chez les rongeurs, les interneurones émettent un prolongement afin de scruter l'environnement et changer de direction. Leur migration est alors guidée par des chimiokines, comme les sémaphorines 3A et 3F qui sont chimiorépulsantes afin de contourner le striatum (Marín et al., 2001), ou encore une isoforme de la neuréguline 1 qui permet l'attraction des interneurones au niveau cortical (Figure 9B) (Flames et al., 2004).

Les premiers interneurones GABAergiques au sein du néocortex sont observables à E12,5 au niveau de la PP. Vers E14-15, ces cellules utilisent trois routes de migration tangentielles pour intégrer le néocortex, le long de la MZ, de la SP et au sein de l'IZ/SVZ

(Figure 9B) (Anderson et al., 2001; Ang et al., 2003). Ensuite, les interneurones vont migrer de manière radiaire pour peupler les différentes couches corticales et leur migration au sein du néocortex sera terminée à la naissance. La position laminaire des interneurones serait déterminée selon des signaux reçus dans la VZ, émis par les neuroblastes déjà présents et par l'action de FT spécifiques (Kelsom and Lu, 2013). Pour exemple, l'équipe de Lodato a montré que l'absence du FT Fezf2 (libéré par les neurones corticaux des couches profondes et régulant l'identité de leurs projections), induit une diminution du nombre d'interneurones somatostatinerigiques et paravalbuminergiques, spécifiquement dans la couche V (Lodato et al., 2011). De plus, leur période de naissance intervient dans leur position finale. En effet, dans le modèle murin reeler, la lamination des interneurones se trouve inversée, comme les neurones de projection. Les interneurones vont donc peupler les mêmes couches corticales que les neuroblastes générés au même moment (Pla et al., 2006).

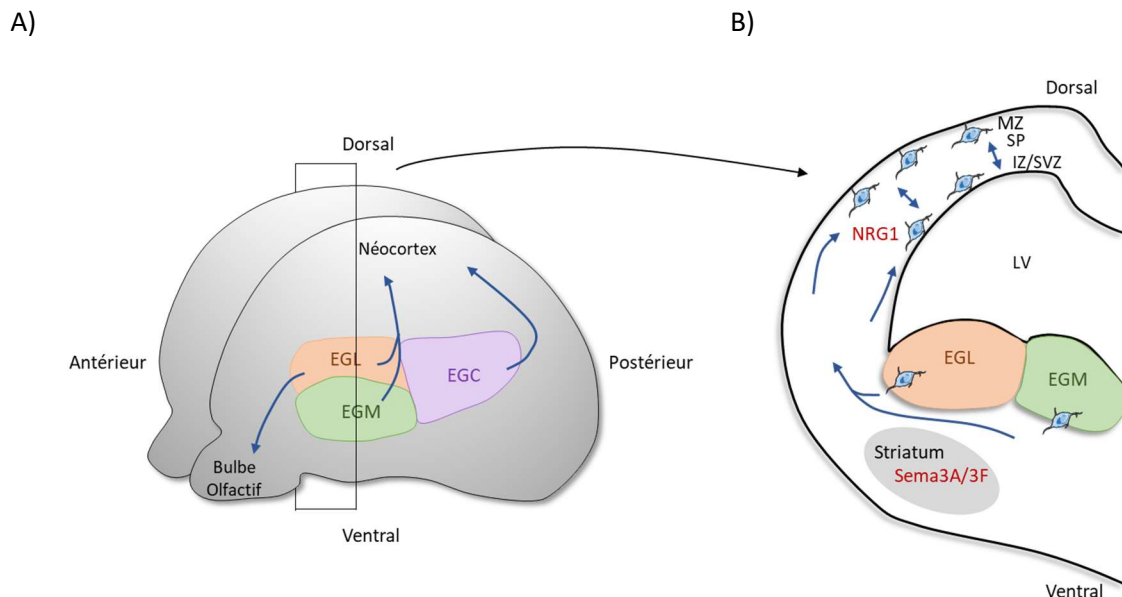


Figure 9 : Migration des interneurones lors de la corticogenèse. A) Les interneurones sont générés au sein des éminences ganglionnaires (EG), localisées au niveau du télencéphale ventral et migrent pour atteindre le néocortex et les bulbes olfactifs. Les EG se divisent en trois zones : latérale (EGL), médiale (EGM) et caudale (EGC). **B)** Les interneurones migrent de manière tangentielle, des EG jusqu'au néocortex, en empruntant trois routes à E14-E15 : le long de la MZ, de la SP et de l'IZ/SVZ. Ensuite, les interneurones migrent radialement pour se disperser au sein des différentes couches corticales. Les chimiokines guident leur migration, comme les sémaphorines 3A et 3F (Sema3A/3F) qui sont répulsifs au niveau du striatum ou à l'inverse la neuréguline 1 (NRG1) qui les attirent au niveau cortical. MZ, zone marginale ; SP, sous-plaque ; IZ, zone intermédiaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; LV, lumière ventriculaire. D'après Kelsom and Lu, 2013 et Wonders and Anderson, 2006.

Les interneurons GABAergiques ont également un véritable rôle dans la genèse et la migration des neurones. Le GABA agit comme un excitateur lors du développement précoce, modulant la prolifération en fonction du type de progéniteurs. En effet, l'exposition du GABA au niveau de la VZ stimule la prolifération des progéniteurs, tandis qu'elle l'inhibe au niveau de la SVZ (Haydar et al., 2000). La concentration de GABA présente dans l'environnement module également la migration des interneurons et des neurones glutamatergiques GAD (acide glutamique décarboxylase) positifs/négatifs. Ainsi, une concentration micromolaire de GABA stimule la migration des neurones GAD positifs, tandis qu'une concentration plus faible (femtomolaire) stimule la migration des neurones GAD négatifs au niveau ventriculaire (Behar et al., 1998).

1.2.2) Diversification temporelle et spatiale

a) Spécification des neurones corticaux

Suite à leur migration, les neurones corticaux vont se différencier et établir leurs connexions. En fonction des couches corticales, différents sous-types cellulaires sont observables (c.f. partie 1.1.2. b) exprimant des FT différents, des fonctions et des morphologies distinctes. La première spécification temporelle que nous avons vue est liée à la date de naissance et le cycle cellulaire des cellules souches neurales. Dans les années 90, l'équipe de McConnell a démontré ce potentiel. En effet, le devenir des cellules souches neurales précoces transplantées dans une niche de cellules souches tardifs dépend de leur cycle cellulaire au moment de la transplantation. Ainsi, les cellules souches précoces transplantées se trouvant à la fin de leur cycle de réplication vont tout de même migrer au sein des couches profondes, tandis que ceux se trouvant en phase S sont multipotents et leur descendance migrera au niveau des couches superficielles (McConnell and Kaznowski, 1991). En revanche, les cellules souches neurales tardifs présentent moins de plasticité et leur transplantation au sein d'une niche proliférative plus jeune ne modifie pas leur migration jusqu'aux couches superficielles (Frantz and McConnell, 1996).

En fonction de leur localisation, les neurones corticaux vont exprimer des FT différents. Par exemple, le FT *Cux1* (*Cut-like homeobox 1*), modulant la prolifération et la différenciation cellulaire, est exprimé dans certaines cellules de la SVZ à des stades du développement tardif et également au sein de cellules des couches II-IV en postnatal. *Cux1* est donc un marqueur des cellules destinées aux couches superficielles (Nieto et al., 2004). Des projets d'hybridation *in*

situ à large échelle ou encore des modèles de souris transgéniques ont permis d'identifier de nombreux FT spécifiques des différentes couches corticales. Ainsi, Pou3f2 (*POU Class 3 Homeobox 2*) est localisé au niveau des couches II, III et V ; Foxp2 (*Forkhead box protein P2*) au sein de la couche VI ; ou bien Sox5 (*SRY-Box Transcription Factor 5*) dans la couche V.

Les FT peuvent également être spécifiques du type neuronal. Trois classes majeures de neurones de projection co-existent : commissuraux, corticothalamiques et sous-cérébraux. Le FT Lmo4 (*LIM Domain Only 4*) est spécifique des neurones commissuraux des couches II, III et V ; et Er81 (*ETS Translocation Variant 1*) des neurones cortico-corticaux et sous-cérébraux de la couche V (Molyneaux et al., 2007). Ces FT agissent sur la position de ces neurones mais également sur leur morphologie. Par exemple, l'absence du FT Fezf2 (*FEZ Family Zinc Finger 2*) ne modifie pas le nombre de neurones présents au sein de la couche V mais ces derniers ne projettent pas leurs axones jusqu'aux zones sous-corticales (Chen et al., 2005).

Les FT permettent alors la spécification des futurs neurones, indispensables pour émettre des connexions synaptiques appropriées.

b) Synaptogenèse et mort cellulaire programmée

La migration et la mise en place des neurones est également importante pour le développement physiologique des synapses. Celles-ci sont présentes dès l'embryogenèse, bien avant la fenêtre temporelle de synaptogenèse. En effet, chez le rat, les synapses GABAergiques sont visibles dès E16 au niveau de la MZ et de la SP, tandis que les synapses glutamatergiques ne sont visibles qu'à partir de E17 (König et al., 1975). Cependant, à ces stades de développement, les récepteurs GABA_A post-synaptiques au niveau cortical sont présents avant même que la libération présynaptique ne soit possible, soit E17 pour la souris (Verhage et al., 2000). Chez l'Homme, la mise en place des synapses commence vers la 20^{ème} semaine de gestation (correspondant aux 16-17^{ème} jours de gestation chez le rat, et 14-15^{ème} chez la souris). Leur densité augmente ensuite jusqu'à 2 ans et sont deux fois plus abondants qu'à l'âge adulte (Huttenlocher, 1979).

De plus, la mise en place des synapses est dépendante de la position appropriée des neurones au sein du néocortex. L'étude réalisée par Martineau et ses collaborateurs, diminuant l'expression de DCX, une protéine associée au microtubules, au sein des neuroblastes par électroporation *in utero*, démontre l'importance de l'organisation laminaire. En effet, la

diminution de DCX altère la polarité de migration des neuroblastes, induisant une position ectopique de ces cellules. Ces neurones, dont la position laminaire est perturbée, présentent moins de branches primaires, de ramifications et d'épines dendritiques que les cellules correctement positionnées. Pour conséquences, une densité plus faible de synapses glutamatergiques et GABAergiques est observable chez ces neurones, perturbant la transmission synaptique (Verhage et al., 2000).

Bien que certaines synapses soient présentes dès l'embryogenèse, la fenêtre temporelle d'intense synaptogenèse se produit lors des premières semaines postnatales chez la souris, avec un pic lors de la 2^{ème} semaine de vie (Li et al., 2010). Le surplus de synapses est ensuite éliminé afin de raffiner les circuits fonctionnels. Ce processus semble complet au niveau cérébral chez le rat vers 3-4 semaines postnatales, et jusqu'à l'adolescence chez l'Homme (Crain et al., 1973; Huttenlocher, 1979).

Les synapses, notamment par l'activation des récepteurs glutamatergiques (AMPA) et GABAergiques, sont nécessaires à la survie cellulaire (Heck et al., 2008). En effet, lorsque les neurones sont bien intégrés dans leur réseau fonctionnel, ces derniers émettent une activité électrique stable, possiblement renforcée par des facteurs trophiques. A l'inverse, ceux n'ayant pas d'activité synaptique, ont une perte d'activité et sont éliminés, ainsi que les neurones liés à de mauvaises cibles (Buss et al., 2006). Cette théorie « neurotrophique » permet d'expliquer le surplus de neurones produits lors du neurodéveloppement. Ainsi, entre 25% et 35% des neurones sont éliminés lors des premiers jours postnataux (Verney et al., 2000). L'élimination de ces neurones se fait via une mort cellulaire programmée, dont la forme majoritaire retrouvée pendant le développement est l'apoptose (Penaloza et al., 2006).

L'apoptose peut être activée suivant deux voies. La voie mitochondriale (ou intrinsèque) est par exemple déclenchée si les facteurs de croissance ou les supports neurotrophiques sont en quantité limitante ou encore si un stress métabolique apparaît. Les molécules pro-apoptotiques vont alors inhiber les anti-apoptotiques. La seconde, la voie extrinsèque est permise par la fixation de ligands sur des récepteurs de la famille TNF (*tumor necrosis factors*), activant également des molécules pro-apoptotiques, comme les caspases (Voss and Strasser, 2020). L'apoptose est un phénomène rapide, d'où la difficulté de trouver des techniques d'identification. Néanmoins, la méthode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), consistant à marquer l'ADN fragmenté, a permis de démontrer que 1,5% des cellules meurent par apoptose chez un embryon de souris à E10,5 (Ke et al., 2018). De plus, des études ont pu montrer des amas de cellules en apoptose chez la souris, à des stades

de développement et au sein de régions spécifiques, permettant ainsi la fermeture du tube neural et de l'intestin, l'homéostasie cellulaire ou encore, comme vu précédemment, l'élimination des cellules neuronales excessives en postnatale. Pour certains, l'apoptose n'est pas essentielle à la fermeture du tube neural, mais serait un mécanisme parallèle facilitant le remodelage de l'épithélium (Massa et al., 2009). D'autres études ont démontré que les souris invalidées pour des gènes impliqués dans l'apoptose intrinsèque présentent des défauts de fermeture du tube neural, une compression des ventricules cérébraux ou encore une exencéphalie (Cecconi et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Nonomura et al., 2013).

La mort cellulaire programmée des neurones ne dépend pas seulement de facteurs externes. En effet, dans leur étude, Southwell et *al.*, ont remarqué que les précurseurs d'interneurones provenant d'embryons à E13,5, transplantés au sein du néocortex de souris en postnatal engagent une mort cellulaire suivant le même profil de temps qu'*in vivo*, indiquant un mécanisme intrinsèque pour déclencher une mort cellulaire lors du développement (Southwell et al., 2012). Enfin, la mort cellulaire permet également d'éviter des troubles pathologiques en éliminant les cellules ayant des altérations génomiques, les neurones ayant migré à une place inappropriée, ceux projetant leur axone à de mauvaises cibles ou alors afin d'éliminer les neurites erronés plutôt que la cellule entière (Yamaguchi and Miura, 2015). La régulation du nombre de cellules au sein du cortex est en effet finement régulée. C'est à la fin des années 90 que Blaschke et ses collaborateurs ont mis en évidence ce phénomène au niveau des zones prolifératives, identifiant des cellules en mort cellulaire dès E10, avec un pic à E14 (Blaschke et al., 1996).

La mort cellulaire, dont l'apoptose, et la synaptogenèse sont alors des mécanismes essentiels au neurodéveloppement, aussi bien lors de l'embryogenèse qu'en postnatal. A l'instar de ces processus, d'autres facteurs interviennent lors de la corticogenèse, comme les neurotransmetteurs.

c) Les neurotransmetteurs lors de l'embryogenèse

Les neurotransmetteurs sont bien connus pour assurer la transmission du message nerveux d'une cellule à l'autre, mais ils sont également indispensables lors de la corticogenèse. Ces derniers sont présents avant la mise en place des synapses et agissent alors via des récepteurs canaux ioniques liés à des ligands. Parmi ceux impliqués, nous allons discuter de la glycine, du GABA, de la taurine et du glutamate.

Lors de l'embryogenèse, à E13, la glycine est 4 fois plus abondante que le GABA et est sécrétée par les neurones immatures et les cellules de la glie radiaire (Benítez-Díaz et al., 2003). Contrairement à l'adulte, la glycine est excitatrice aux stades précoces de développement et ce dû à une concentration intracellulaire en ion chlorure (Cl^-) importante. La concentration intracellulaire en Cl^- au sein des neurones immatures est due à une expression importante de NKCC1 et faible de KCC2, des cotransporteurs de Cl^- (Kaila et al., 2014). La glycine agit alors sur la prolifération des progéniteurs neuraux, puisque l'invalidation de son récepteur (GlyR) induit une réduction de cette population (Avila et al., 2014). De plus, la glycine module la migration, la croissance des neurites ainsi que la morphologie des dendrites des neurones. Ces mécanismes seraient possibles par l'effet dépolarisant de la glycine, induisant des influx de calcium (Ca^{2+}) capables de moduler le cycle cellulaire ou encore l'expression de gènes impliqués dans le neurodéveloppement (Brustein et al., 2013).

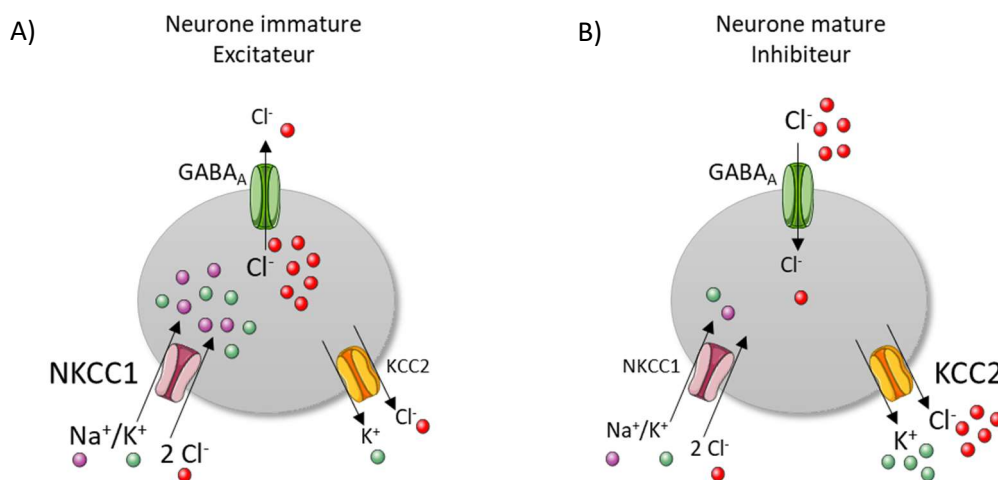


Figure 10 : L'expression dominante de NKCC1 ou KCC2 est responsable de la fonction excitatrice ou inhibitrice du GABA. **A)** Aux stades précoces du développement, la concentration intracellulaire de chlorure (Cl^-) est importante, due à l'expression prédominante du co-transporteur NKCC1, faisant entrer du sodium (Na^+), du potassium (K^+) et 2Cl^- dans la cellule. L'activation du récepteur γ -aminobutyrique de type A (GABA_A) induit alors l'efflux de Cl^- , ainsi qu'une excitation du neurone immature. **B)** En revanche, dans les neurones matures, l'expression du co-transporteur KCC2 est dominante, laissant sortir du K^+ et Cl^- hors de la cellule. La concentration intracellulaire de Cl^- est alors faible et l'activation du récepteur GABA_A induit un influx de Cl^- dans le neurone mature, ainsi qu'une inhibition de celui-ci. D'après Dammerman et al., 2000 et Ben-Ari, 2002. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.

Au même titre que la glycine, le GABA est excitateur lors de l'embryogenèse, également dû au différentiel d'expression de NKCC1 et KCC2 (voir la Figure 10 pour plus d'explications sur le mécanisme) (Dammerman et al., 2000; Ben-Ari, 2002). La synthèse du GABA est permise via l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et la majorité du GABA présent lors du développement proviendrait des interneurons migrant de manière tangentielle (Manent et al., 2005). L'épissage alternatif de la GAD module alors différents processus de la corticogenèse. Comme nous l'avons vu précédemment, les recherches montrent que le GABA a deux effets qui s'opposent sur la prolifération lors du développement. En effet, l'action dépolarisante du GABA augmente la prolifération au sein des cellules souches neurales de la VZ, alors qu'elle l'inhibe au niveau de la SVZ (Haydar et al., 2000).

Des études *in vivo* montrent également que l'inhibition du récepteur GABA_B induit un retard de migration radiaire des neurones pyramidaux. L'action du GABA sur ce récepteur affecte aussi la morphologie des neurones pyramidaux, puisque l'inhibition du récepteur GABA_B provoque un état multipolaire de ces cellules (altération de la polarisation, du nombre et de la taille des dendrites) (Bony et al., 2013). Cependant, des modèles invalidés (*knock-out*, KO) des enzymes du GABA, GAD_{65/67} ne montrent aucun défaut de migration des neuroblastes (Ji et al., 1999). Il est possible que des mécanismes de compensation se mettent en place, puisqu'il a été démontré que la taurine est un agoniste des récepteurs glycinergiques et GABA_A (Horikoshi et al., 1988).

En effet, la taurine, un acide aminé semi-essentiel, est impliquée dans l'osmorégulation et l'homéostasie calcique. Celle-ci est un des neurotransmetteurs les plus abondants lors de la corticogenèse (Benítez-Díaz et al., 2003) et est exprimée par les progéniteurs et neurones immatures au niveau de la MZ et la SP et serait apportée au fœtus via le placenta (Furukawa et al., 2014). La taurine a une action neuroprotectrice en réduisant l'apoptose et en augmentant la neurogenèse (Hernández-Benítez et al., 2009; Liu et al., 2013). De plus, il a été démontré que la taurine est essentielle à la différenciation et la migration des cellules au sein du cortex visuel (Palackal et al., 1986).

Un autre neurotransmetteur intervenant dans de nombreux processus du développement, et non des moindres, est le glutamate. Celui-ci est produit par les neurones glutamatergiques, comprenant les cellules de Cajal-Retzius (Ina et al., 2007). Un modèle de souris KO pour les transporteurs du glutamate, GLAST (*glutamate/aspartate transporter*) et GLT1 (*glutamate transporter 1*) témoigne d'une diminution de la prolifération, des anomalies de morphologie des neurones de la CP (forme arrondie), une croissance des neurites perturbée, ainsi que des

altérations de migration. En effet, les neuroblastes invalidés stagnent au niveau de la VZ et perturbent la lamination corticale, possiblement via une désorganisation des prolongements de la glie radiaire (Matsugami et al., 2006).

Ainsi, bon nombre de facteurs interviennent lors de la corticogenèse, aussi bien lors de la prolifération, de la migration et de la différenciation des neuroblastes. Depuis quelques années maintenant, il a été montré qu'une autre famille de molécules confère toute son importance à la vie de l'organisme, en modulant l'homéostasie redox. Cette homéostasie régit la survie cellulaire en contrant le stress oxydatif, mais également d'autres processus, dont ceux indispensables au neurodéveloppement.

1.2.3) Importance des espèces réactives de l'oxygène

a) Déléteres ou bénéfiques ?

L'oxygène (O_2) est bien connu pour être indispensable à la vie des organismes aérobiques, en produisant de l'énergie via la chaîne de transport d'électrons, située au niveau de la mitochondrie. Ces organismes se sont ainsi adaptés à l'oxygène en produisant des enzymes nécessaires à la consommation de l' O_2 , mais également à sa détoxification. En effet, des métabolites réduits sont produits lors de la consommation de l' O_2 , qui est l'accepteur final d'électrons, pour produire de l'eau lors de la chaîne de transport d'électrons, créant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS). Les ROS sont majoritairement produites par la mitochondrie et comptent entre 0,25% et 11% de l'oxygène consommé. Cette variation dépend du stade de respiration ainsi que de l'espèce étudiée. Ainsi, chez la souris, 2,3% de l' O_2 consommé est converti en ROS lors du stade 3 de la respiration (présence d'ADP, adénosine-diphosphate), tandis qu'au stade 4 (sans ADP), 11% de l' O_2 est transformé en ROS (Aon et al., 2012) ! La seconde voie prédominante de production des ROS est catalysée par les enzymes de la famille NOX (NADPH oxydases, pour nicotinamine adénine dinucléotide phosphate oxydases), qui sont des donneurs d'électrons permettant la réduction de l'oxygène. Leur rôle important a été démontré dans les neutrophiles, permettant une défense immunitaire en produisant des ROS afin de détruire les microorganismes (Hampton et al.,

1998), ainsi qu'au niveau des cellules vasculaires et cardiaques, modulant par exemple la vasodilatation ou l'infiltration des monocytes au sein des vaisseaux (Griendling et al., 2000).

Les ROS sont donc des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques ayant un électron non apparié, tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$), bien plus toxiques que l'oxygène. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), n'est pas une ROS à proprement parler, mais est également un intermédiaire réduit toxique de l'oxygène (Figure 11). Les ROS vont alors oxyder certains composés en arrachant un électron, un atome d'hydrogène ou encore en se fixant sur les doubles liaisons. Une surproduction de ROS au sein de la cellule induit un stress oxydant, se traduisant à terme, par l'apoptose ou la nécrose de la cellule, si les taux atteints sont devenus trop importants. Les ROS sont capables d'oxyder les chaînes latérales des acides aminés (oxydation des fonctions thiols de la cystéine ou encore oxydation d'une chaîne polypeptidique en arrachant un atome d'hydrogène sur un carbone d'une liaison peptidique), d'induire des peroxydations lipidiques modifiant l'élasticité et la fluidité des membranes, ou altérer la structure de l'ADN, particulièrement en oxydant la base guanine ou en cassant un simple brin (Murphy, 1996; Berlett and Stadtman, 1997; Lee et al., 2016).

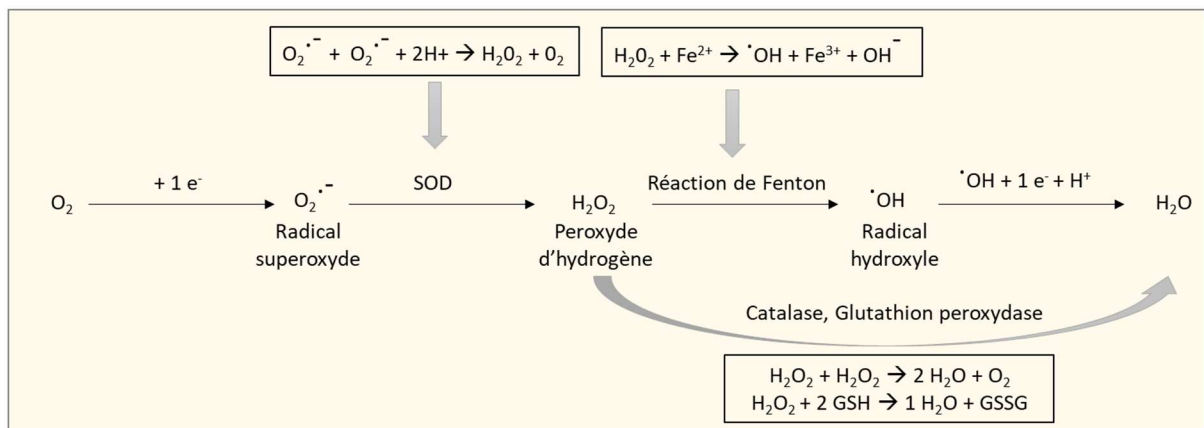


Figure 11 : Chaîne de production des espèces réactives de l'oxygène. L'oxygène (O_2) assimilé par l'organisme est converti en radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de celui-ci en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 peut alors soit être converti en radical hydroxyle ($\cdot OH$) par la réaction de Fenton, soit être directement converti en eau (H_2O) par le biais d'enzymes comme la catalase ou la glutathion peroxydase. Le radical hydroxyle généré à la suite de la réaction de Fenton, peut à son tour être converti en eau. GSH, glutathion ; GSSG, GSH oxydé. *Adapté de Migdal and Serres, 2011.*

Afin d'éviter ces effets délétères, il existe des systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, capables d'éliminer les ROS. L'apparition de ces systèmes évolue avec le développement embryonnaire. En effet, aux stades précoces, l'embryon va produire de l'énergie par glycolyse anaérobie et par phosphorylation oxydative. La mise en place du placenta induit une haute exposition à l'oxygène, avant que l'embryon n'ait développé ses systèmes de vascularisation (vers E10). L'arrivée de l'oxygène induira la formation des ROS au sein de la mitochondrie. Pour éviter les effets délétères des ROS, des antioxydants sont déjà présents chez l'embryon, hérités des gamètes mâles et femelles, comme le glutathion agissant principalement par la formation de liaisons disulfures ou par hydrolyse, la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation du radical superoxyde en H_2O_2 , ou encore la catalase et la glutathion peroxydase qui permettent la dismutation de l' H_2O_2 en eau (Figure 11). L'expression de ces enzymes augmente continuellement lors du développement embryonnaire, montrant l'importance de la régulation de l'homéostasie redox (Ufer and Wang, 2011; Lin and Wang, 2020). Il existe également d'autres molécules antioxydantes non enzymatiques, comme les vitamines C (ou ascorbate), E et A, qui peuvent par exemple, réduire les fonctions thiols oxydées du glutathion et éviter les peroxydations lipidiques, ainsi que les sélénoprotéines, comprenant la glutathion peroxydase, que nous allons voir plus en détail par la suite.

Il reste tout de même essentiel pour l'organisme de ne pas éliminer toutes les ROS, et de garder un certain équilibre, puisque ces dernières ont des fonctions physiologiques. En effet, les ROS sont connues pour servir de seconds messagers. Plusieurs études ont notamment démontré leur rôle dans la signalisation calcique. Ainsi, l'hydrogène peroxyde est capable d'induire la libération de calcium des cellules endothéliales en agissant via les récepteurs canaux ioniques $InsP_3$ (Inositol 1,4,5-triphosphate), localisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Ces canaux vont également permettre l'accumulation de calcium dans la mitochondrie lors d'un stress oxydant, qui peut être perçue comme un signal bénéfique afin d'induire la mort cellulaire. Les effets induits par l'activation des canaux $InsP_3$ sont dépendants de la concentration de ROS présentes, en stimulant ou inhibant la signalisation calcique (Ermak and Davies, 2001).

Une étude plus récente a démontré l'importance des ROS comme molécule signal dans la génération de facteurs de croissance. Plus précisément, l'hydrogène peroxyde agit comme molécule signal afin de transactiver le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), au niveau de la mitochondrie. Cette reconnaissance induit par la suite l'activation des cibles en aval, tel que JNK (*Jun N-terminal Kinase*) et Akt pouvant entre autres stimuler ou inhiber

l'apoptose (Chen et al., 2004). Les ROS peuvent également moduler la mort cellulaire, activée par la protéine p53. En effet, des recherches effectuées sur cellules cancéreuses ont démontré que les kinases et acétylases activées au sein de la cellule dépendent du niveau des ROS, induisant des modifications post-transcriptionnelles de p53 bien définies, et donc des cascades de signalisation différentes (Gogna et al., 2012).

Les ROS peuvent alors être délétères pour l'organisme s'ils sont produits en excès, mais un niveau basal au sein des cellules leur confère des fonctions physiologiques, comme la régulation calcique ou l'apoptose. Cependant, le rôle des ROS ne s'arrête pas là puisque leurs mécanismes d'action sont indispensables au neurodéveloppement.

b) Importance des ROS lors du neurodéveloppement

Le rôle de second messager assuré par les ROS est indispensable au neurodéveloppement. Le Belle et ses collaborateurs ont en effet démontré qu'un niveau élevé de ROS (produit par la mitochondrie ou encore le réticulum endoplasmique) au sein des cellules souches neurales stimule leur auto-renouvellement au niveau des neurosphères. Ces auteurs ont notamment montré que l'ajout du facteur de croissance BDNF à des cultures de cellules souches et de progéniteurs neurales, augmente la production du radical superoxyde, produit par la voie NOX et stimule l'auto-renouvellement de ces cellules. A l'inverse, le blocage de la voie NOX, et donc de la production du radical superoxyde inhibe l'effet prolifératif du BDNF, montrant l'importance des ROS dans cette voie trophique. Les auteurs ont également montré que le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches neurales est modulé par les ROS via la voie de signalisation PI3K/Akt (voie régulant l'homéostasie cellulaire en modulant l'apoptose, le cycle cellulaire et la croissance). En effet, une concentration élevée de H₂O₂ générée au sein de ces cellules oxyde directement la protéine PTEN (qui inhibe la voie PI3K/Akt) et renforce la phosphorylation de la protéine Akt. La voie PI3K/Akt n'est donc pas inhibée en présence des ROS et engendre la prolifération et la différenciation des neuroblastes. Cependant, une même concentration de ROS au sein de cellules en cours de différenciation induit leur mort par apoptose, montrant l'importance de la régulation des taux de ROS pour stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire, ou au contraire les inhiber. Enfin, l'équipe de Le Belle a également remarqué que la SVZ semble être la zone la plus riche en ROS comparé aux tissus voisins, et que la neurogenèse au niveau de cette zone diminue fortement lorsque les niveaux de ROS endogènes sont diminués (Le Belle et al., 2011).

Le niveau de ROS intracellulaire varie alors en fonction de l'état de différenciation des cellules et de l'avancée du développement. Une étude récente portant sur la régulation de la neurogenèse corticale en fonction du stress oxydatif a mis en lumière l'augmentation du stress oxydatif entre E11,5 et E17,5 au niveau cortical chez la souris, ainsi qu'une augmentation du taux de ROS au sein de la VZ et des cellules de la glie radiaire en culture. Cette même étude démontre aussi que la modulation d'expression de gènes est liée au stress oxydant au sein des cellules de la glie radiaire lors du développement cortical. Par exemple, des gènes antioxydants tels que les peroxirédoxines *Prdx2* et *Prdx6*, ou des gènes de la famille de la glutathion peroxydase diminuent progressivement entre E11,5 et E17,5, tandis que des gènes comme *Nos1*, qui synthétise le radical oxide nitrique augmente. Afin de comprendre l'importance de la modulation des ROS lors du développement cortical, les auteurs ont invalidé des souris pour le gène *PRDM16*, ce qui entraîne une augmentation des taux de ROS et du stress oxydatif chez ces animaux. Les souris, invalidées pour ce gène de manière conditionnelle au sein des cellules de la glie radiaire présentent, 21 jours après la naissance, une diminution de l'épaisseur des couches superficielles et à l'inverse, une augmentation de celle des couches profondes. Ces variations sont accompagnées d'une modification de la densité et de la position des cellules au sein du cortex. En effet, l'augmentation de ROS stimule la division des cellules de la glie radiaire à E13,5 (moment où les cellules des couches profondes sont générées). A l'inverse, à E15,5, quand les cellules des couches superficielles commencent à apparaître, les auteurs ont observé que les forts taux de ROS induisent une diminution du nombre de cellules de la glie radiaire, ainsi qu'une sortie du cycle cellulaire prématurée chez ces souris invalidées (Chui et al., 2020), témoignant de la nécessité d'une régulation fine des niveaux de ROS pour moduler la prolifération cellulaire à des temps précis.

A l'instar des effets des ROS dans les processus de prolifération et de différenciation, qui restent encore peu compris, ces molécules oxydantes sont également impliquées dans les phénomènes de polarisation et d'adhésion des neurones. Comme nous avons pu le voir avec l'étude de Chui et al., l'augmentation des ROS induit des anomalies de formation des couches corticales. Des études complémentaires avaient en effet montré qu'un excès de ROS induit la perte du segment initial de l'axone (permettant le maintien de la polarité neuronale et la génération des potentiels d'action) (Clark et al., 2017), ou à l'inverse, qu'un faible taux de molécules oxydantes altère l'acquisition de la polarité neuronale, ainsi que la croissance axonale. Une production basale de ROS est ainsi indispensable pour maintenir la dynamique du cytosquelette d'actine. La présence intracellulaire de ROS peut donc agir localement, afin

de permettre une régulation fine de certains processus, comme la régulation des prolongements neuronaux ou la stimulation de molécules d'adhésion, indispensables à la migration des neuroblastes (Arai et al., 1998; Wilson et al., 2015).

c) Quelques pathologies associées au stress oxydatif

Le stress oxydatif, engendré par une perte de la balance oxydants / antioxydants, peut ne pas être contrôlé et être un facteur aggravant de certaines pathologies, touchant le système nerveux central aussi bien lors du développement, qu'à l'âge adulte. Même si les ROS sont indispensables au neurodéveloppement, des études récentes ont pu mettre en avant la responsabilité de ces molécules dans l'initiation et le développement de certaines pathologies.

Les enfants prématurés sont extrêmement vulnérables à l'environnement et peuvent développer diverses maladies comme la leucomalacie périventriculaire, associées au stress oxydatif. En effet, les membranes des neurones de nouveau-nés prématurés sont riches en acides gras polyinsaturés, qui en font des cibles préférentielles pour la peroxydation. La leucomalacie périventriculaire est une maladie témoignant de ce phénomène, ayant pour conséquence des lésions kystiques au niveau de la matière blanche, proche des ventricules. Les hémorragies intraventriculaires, présentes chez les prématurés dues à un réseau vasculaire immature, produisent des quantités importantes de fer. Pendant leur maturation, les précurseurs d'oligodendrocytes accumulent ce fer, qui convertit l' H_2O_2 en $\cdot\text{OH}$. Les ROS étant plus toxiques au sein des cellules précurseurs, ces derniers meurent par apoptose, induisant une nécrose diffuse dans le tissu cérébral (Shim and Kim, 2013).

Le stress oxydatif est également impliqué dans la sévérité de maladies neurodégénératives comme dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les patients atteints de ces pathologies, ainsi que les organismes modèles associés, présentent des taux élevés de ROS et de protéines oxydées au niveau cérébral. Par exemple, le MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium), une toxine induisant chez l'animal des symptômes similaires à ceux des Parkinsoniens, produit de l'anion superoxyde, qui altère les mitochondries. De plus, la mutation du gène *PINK1* chez certains patients inhibe l'action du complexe 1 de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie, et induit une surproduction de ROS, via la voie NADPH oxydase, ainsi qu'une augmentation de calcium. Ces effets ont pour conséquence la libération de molécules pro-apoptotiques. De plus, il a été proposé que la production de ROS dans les

neurones participe à l'agrégation toxique de l' α -synucléine, induisant la perte des neurones dopaminergiques. Le dysfonctionnement des mitochondries est également retrouvé dans la genèse de la maladie d'Alzheimer. En effet, tout comme *PINK1* dans la maladie de Parkinson, la protéine β -amyloïde augmente les taux de ROS et de calcium intracellulaire. Ces taux sont augmentés via l'activation de la voie NOX par la protéine β -amyloïde, et donc par l'intermédiaire de la production d'oxyde nitrique, détruisant les astrocytes et les neurones (Gandhi and Abramov, 2012).

Les différents travaux énumérés jusqu'ici nous témoignent ainsi de l'importance du maintien de la balance oxydants / antioxydants, nécessaire aussi bien à la signalisation cellulaire qu'à la neuroprotection. Les effets délétères que peut engendrer un excès de ROS, que ce soit pendant la mise en place du SNC, ou à l'âge adulte, peuvent être contournés par l'action de molécules antioxydantes, comme la SOD, les vitamines E et C ou encore la catalase. Dans le cadre des travaux de cette thèse, nous allons particulièrement nous intéresser à d'autres molécules antioxydantes, qui sont les sélénoprotéines.

II] Les sélénoprotéines

2.1) Origine et biosynthèse des sélénoprotéines

2.1.1) Le sélénium

a) Physicochimie du sélénium

Le sélénium (Se) est un micronutriment, élément non renouvelable, mais essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, notamment pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Découvert en 1817, par Jöns Jakob Berzelius, un chimiste et physicien suédois, le Se a longtemps été considéré comme toxique. Ce métalloïde fait partie de la famille des chalcogènes au même titre que le soufre et l'oxygène. Le Se et le soufre sont très similaires en termes d'électronégativité, d'état oxydatif ou encore de rayon ionique, leur conférant un fort pouvoir réducteur. Cependant, le Se contient un rayon atomique plus élevé que le soufre, le rendant plus nucléophile, signifiant que le Se cède plus facilement des électrons à un donneur adjacent afin d'établir une liaison covalente (Wessjohann et al., 2007). Ainsi, les protéines à Se catalysent plus efficacement des réactions de transfert à un ou deux électrons, que les protéines soufrées. Une autre caractéristique qui différencie les composés sélénés et soufrés est la constante d'acidité, ou pK_a . En effet, celle-ci est plus faible pour les composés sélénés, leur permettant

ainsi d'être déprotonés, donc capables d'engager des réactions chimiques à pH physiologique, contrairement aux composés soufrés qui sont sous forme inerte à ce même pH (Arnér, 2010). Des travaux sur *Escherichia coli* ont pu mettre en évidence la nucléophilie du Se par le biais de la substitution d'un acide aminé soufré par un composé sélénié dans une protéine, réduisant le potentiel redox de cette protéine (cédant davantage ses électrons) et permettant une activité d'oxydo-réduction plus importante (Metanis et al., 2006).

Le Se est également attractif pour l'industrie, comptabilisant une production annuelle estimée à environ 2800 tonnes, avec des applications en électronique, en métallurgie (protection contre la corrosion), ou encore dans l'industrie pharmaceutique (supplément alimentaire et traitement de maladies de la peau) (Mehdi et al., 2013). Ces données sont alors en faveur de l'importance des composés séléniés et justifie également la conservation de leur métabolisme chez de nombreuses espèces au cours de l'évolution.

b) Biodisponibilité du sélénium

Le Se est présent dans l'environnement sous forme organique : la sélénométhionine et la sélénocystéine, et non organique : le sélénite, sélélide, sélénate et Se. Il a été observé que la sélénométhionine est plus rapidement et totalement absorbée par rapport au sélénite (Duntas and Benvenga, 2015). Néanmoins, les différentes formes du Se peuvent être absorbées par le petit intestin, par les mêmes voies permettant l'absorption du soufre, pour ensuite être métabolisées et incorporées aux protéines contenant du Se (Roman et al., 2014). Le Se est principalement retrouvé dans la viande et les céréales, dépendant de la composition du sol. En effet, les sols argileux, acides et arides sont plus pauvres en Se que les sols tropicaux qui sont alcalins et riches en matière organique (Mehdi et al., 2013). Ainsi, le Se entre dans la chaîne alimentaire par le biais des plantes et de leur biodisponibilité en Se. Celle-ci dépend donc de la composition du sol, en fonction par exemple, du pH, de la minéralogie, de la température et de l'acidité du sol. Plus le sol est alcalin, plus le Se devient du sélénate soluble, facilement assimilable par les plantes.

Un autre point intervenant dans la biodisponibilité du Se est la capacité des plantes à assimiler et accumuler le Se. Trois classes se distinguent ainsi, les végétaux non-accumulateurs donc faibles en Se, comme le blé ; ceux qui accumulent le Se de manière secondaire, les Se-accumulateurs secondaires, comme le brocoli ou l'oignon ; et les Se-accumulateurs. Le seul

apport alimentaire possible en tant que Se-accumulateur sont les noix du Brésil, produites par l'arbre *Bertolletia excelsa*, puisqu'un excès de Se est toxique pour l'organisme (Rayman, 2008).

c) Excès et déficience en sélénium chez l'Homme

C'est en 1856 qu'un médecin de l'armée américaine décrit pour la première fois la toxicité du Se, après observation de signes cliniques chez des chevaux qui ingéraient des plantes sélénifères, comme la perte de leur fourrure et une nécrose au niveau de leurs sabots (Hatfield et al., 2014). Par la suite, en 1985, des symptômes ont été identifiés aux Etats-Unis chez des patients qui consommaient des comprimés supplémentés en Se. En effet, ces personnes avaient des nausées, des douleurs abdominales ou bien encore développaient une neuropathie périphérique (Morris and Crane, 2013).

A l'inverse d'une sélérose, une déficience en Se peut également avoir des effets délétères. C'est en 1935 que la maladie de Keshan a été identifiée comme associée à une déficience en Se, provoquant une cardiomyopathie endémique chez les femmes et enfants vivant dans la région de Keshan en Chine (Duntas and Benvenga, 2015). Certaines études ont rapporté que de faibles taux de sélénium sont retrouvés dans plusieurs pathologies neurologiques. Ainsi, une déficience en Se est aussi associée à un risque plus important chez les enfants de développer une épilepsie, est retrouvée chez des patients atteints de la maladie de Parkinson ou encore associée à un affaiblissement des fonctions cognitives (Pillai et al., 2014).

Les effets délétères du manque de Se peuvent être évités par un apport quotidien, recommandé par le Comité scientifique de l'alimentation humaine, d'environ 55 µg (Duntas and Benvenga, 2015). Cet apport permet ainsi au Se d'être métabolisé par l'organisme, mettant en jeu sa forme biologique, la sélénocystéine.

2.1.2) Les sélénoprotéines

a) Découverte de la sélénocystéine

Le Se a été reconnu comme un antioxydant pour la première fois dans des érythrocytes de rat, en protégeant leur membrane cellulaire contre les dommages du stress oxydatif. Peu de temps après, l'équipe de Thressa C. Stadtman a remarqué que le Se est lié de manière covalente à un résidu sélénocystéine (Sec) au niveau d'une protéine d'intérêt (Cone et al., 1976). La Sec

est le 21^{ème} acide aminé naturel, permettant la synthèse des protéines à Se ou sélénoprotéines, constituant la forme principale sous laquelle le Se est retrouvé dans la cellule, et présente au niveau du site actif des sélénoprotéines. Cet acide aminé est un analogue de la cystéine qui diffère par la présence du Se à la place d'un atome de soufre, et ces deux résidus participent à l'activité d'oxydo-réduction. De plus, ces auteurs ont remarqué une faible échangeabilité entre ces deux résidus au cours de l'évolution des vertébrés (Castellano et al., 2009).

La Sec est conservée dans les trois domaines du vivant : les eucaryotes, les archées ainsi que les eubactéries, et a même été observée chez des virus. La Sec est l'unique acide aminé connu chez les eucaryotes pour être produit lors de la biosynthèse de son ARN de transfert (ARNt), l'ARNt[Ser]^{Sec}. Le gène codant cet ARNt particulier, nommé *Trsp*, a été séquencé chez le poulet et contrairement aux autres ARNt, son expression est sous l'influence de trois régions promotrices (une TATA box, une séquence promotrice distale et une proximale) (Labunsky et al., 2014). Bösl et collaborateurs ont montré que la délétion homozygote du gène *Trsp* induit une léthalité embryonnaire, peu de temps après l'implantation (Bösl et al., 1997). Concernant la Sec, cet acide aminé a la particularité, contrairement à la cystéine, d'être codé par un codon UGA, habituellement reconnu comme un codon stop par la machinerie cellulaire (Labunsky et al., 2014). L'origine de l'insertion de la Sec par le codon UGA reste actuellement en débat. D'un côté, l'équipe d'August Böck suggère que le codon UGA était un codon sens pour la Sec chez les espèces anaérobiques et que l'arrivée de l'oxygène l'a restreint à ce codon. Celui-ci aurait alors évolué en un codon stop dans le monde aérobie, puisqu'il a été très peu utilisé comme codon sens. D'un autre côté, l'équipe de Vadim N. Gladyshev propose que l'insertion de la Sec par le codon UGA serait plutôt un processus récent puisque les sélénoprotéines sont absentes chez beaucoup d'organismes anaérobiques, mais très conservées chez les vertébrés (Gonzalez-Flores et al., 2013).

b) Biosynthèse des sélénoprotéines

Les sélénoprotéines sont codées par 25 et 24 gènes dans les génomes humain et murin, respectivement (Kryukov et al., 2003). La synthèse des sélénoprotéines est un mécanisme coûteux pour la cellule, mais qui est rentabilisé par une meilleure efficacité catalytique de ces protéines par rapport aux protéines dépendantes de la Cys (Arnér, 2010). Le Se est donc incorporé dans les protéines sous la forme de Sec et ce mécanisme se produit lors de la biosynthèse de l'ARNt de la sélénocystéine. Celui-ci est le plus long ARNt retrouvé chez les

eucaryotes avec 90 nucléotides (Lee et al., 1989) et son identification a été réalisée dans du foie de rat grâce à du sélénite marqué au Se radioactif, permettant de localiser le résidu Sec sur l'ARNt (Hawkes et al., 1982).

Cependant, l'expression simple de l'ARNt de la Sec n'est pas suffisante pour permettre la synthèse des sélénoprotéines, puisque celui-ci doit subir plusieurs modifications avant d'être intégré aux protéines en formation. Premièrement, l'ARNt[Ser]^{Sec} est aminoacétylé par une sérine via la seryl-tRNA synthétase (SerRS) (Figure 12A). Chez les bactéries, la forme aminoacétylée est directement convertie en Sec sur l'ARNt. En revanche, chez les archées et les eucaryotes, une étape de phosphorylation de la sérine est nécessaire, par la O-phosphoryl tRNA^{Sec} kinase (PSTK). En parallèle, la source de Se comme le sélénite, est métabolisée en monosélénophosphate ($\text{H}_2\text{SePO}_3^-$) par la sélénophostate synthétase (SEPHS2), afin d'être intégrée à l'ARNt. Ainsi, la sérine phosphorylée comprise sur l'ARNt est convertie en Sec par le biais de la sélénocystéine synthétase (SecS) ayant pour substrat le monosélénophosphate. L'ARNt[Ser]^{Sec} est ensuite transloqué dans le noyau au moyen du complexe protéique SECp43/eEFSec/SBP2, pour s'associer à un ARN messenger (ARNm) spécifique des sélénoprotéines. Le complexe formé est ensuite exporté dans le cytoplasme pour être traduit en protéine via le ribosome et par le biais de divers facteurs *cis* et *trans* régulateurs (Figure 12B) (Allmang et al., 2009).

c) Facteurs *cis* et *trans* régulateurs

La biosynthèse des sélénoprotéines est possible au moyen de différents facteurs *cis* et *trans* régulateurs. Le facteur *cis* régulateur symbolique de ce mécanisme est la séquence d'insertion de la Sec (*SEC Insertion Sequence*, SECIS) qui permet au codon UGA d'être reconnu comme un codon d'insertion de la Sec et non comme un codon stop. Cette structure fût découverte en 1991 par l'équipe de Berry et se situe au niveau de la région 3' non traduite de l'ARNm, après le codon stop, chez tous les eucaryotes (Berry et al., 1993).

La SECIS est une structure tige-boucle particulière de cet ARNm. En effet, la SECIS de type I est formée de deux hélices séparées par une boucle interne et contient une boucle apicale formée par la deuxième hélice (Figure 13). Juste au-dessus de la boucle interne, la SECIS contient quatre paires de bases consécutives, dit « *Quartet non-Watson-Crick* » formant le « noyau » de la SECIS.

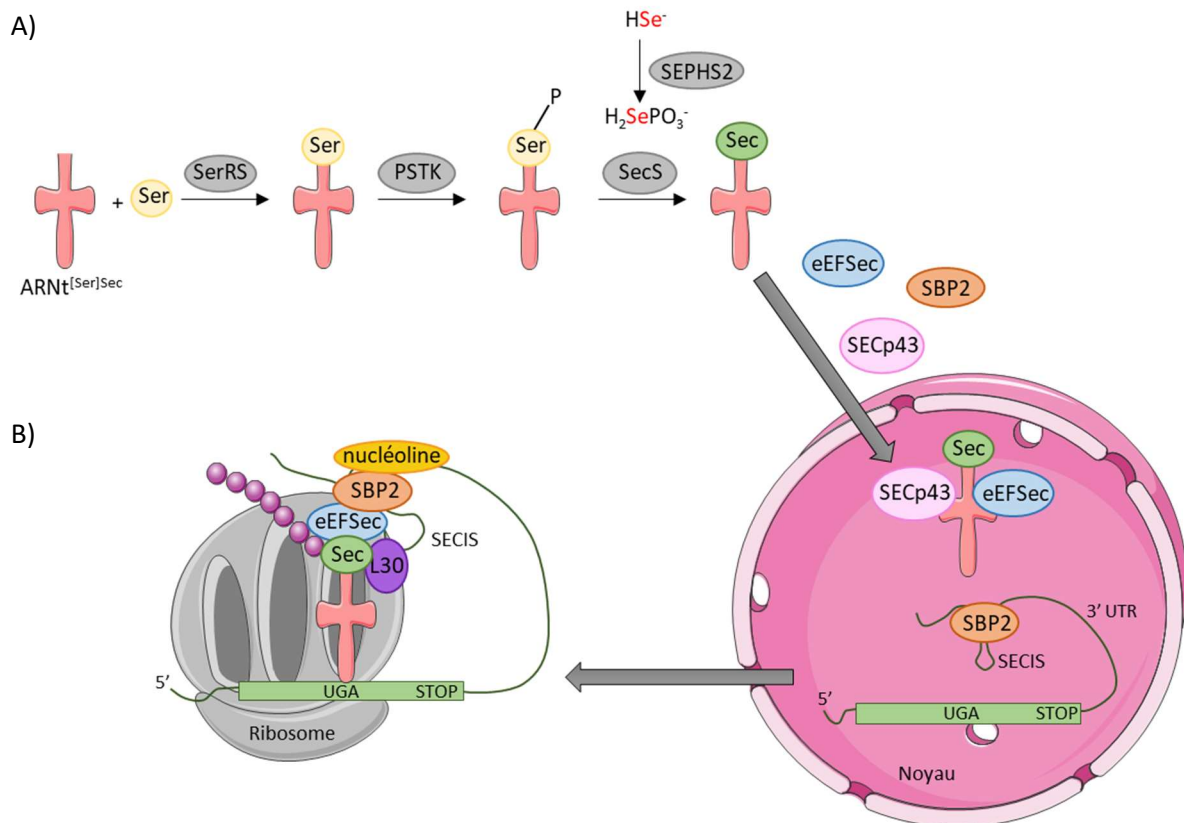


Figure 12 : Biosynthèse des sélénoprotéines chez les eucaryotes. **A)** La synthèse de l'ARNt[Ser]^{Sec} commence par une aminoacétylation par une sérine via la SerRS, puis cet ARNt est phosphorylé sur la sérine par la PSTK. En parallèle, le Se est métabolisé en sélénophosphate par la SEPHS2 afin d'être intégré à la place de la sérine via la SecS. L'ARNt[Ser]^{Sec} est ensuite transporté dans le noyau à l'aide du complexe SECp43/eEFSec/SBP2. A ce niveau, SBP2 permet la liaison de l'ARNt à l'élément SECIS situé au niveau de la région 3' non traduite de l'ARNm des sélénoprotéines. **B)** Lors de la traduction et l'arrivée du ribosome au niveau du codon UGA, SBP2 permet la liaison entre la SECIS et le ribosome. eEFSec va quant à lui recruter l'ARNt[Ser]^{Sec} au niveau du site A du ribosome et la protéine ribosomale L30 facilite la libération de la Sec vers la chaîne peptidique en formation. *Adapté d'Allmang et al., 2009 et Chavatte et al., 2005. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

Ce noyau structural est essentiel pour l'incorporation de la Sec *in vivo* et est un prérequis pour que la SECIS puisse interagir avec la protéine SBP2 (*SECIS-Binding Protein 2*), un facteur *trans* régulateur, que nous allons développer ci-dessous. Le noyau de la SECIS inclut également deux paires de bases en tandem GA/AG, caractéristique des motifs dits « *kink-turn* ». Il existe également une SECIS de type II possédant une troisième hélice et une boucle apicale plus petite comparée au type I (Figure 13). La SECIS de type II constituerait d'ailleurs la majeure partie des éléments SECIS d'après des outils informatiques (Allmang et al., 2009).

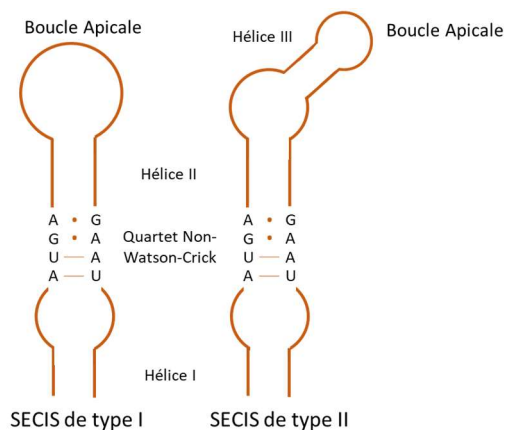


Figure 13 : Structure des éléments SECIS présents chez les eucaryotes. Représentation des éléments SECIS de type I et II présents au sein de l'ARNm des sélénoprotéines. Ces structures sont composées d'une boucle apicale, de 2 (type 1) ou 3 (type 2) hélices séparant les boucles internes, ainsi qu'un quartet de base « non-Watson-Crick » et deux paires de bases en tandem GA/AG permettant l'interaction des facteurs *cis* et *trans* régulateurs. D'après Labunsky et al., 2014.

La SECIS permet l'interaction de l'ARNm des sélénoprotéines avec des facteurs *trans* régulateurs. Nous retrouvons, parmi ces facteurs, SBP2 qui est un facteur limitant de la biosynthèse des sélénoprotéines. Cette protéine contient notamment un domaine de liaison à l'ARN, de type L7Ae, appartenant à la famille des protéines interagissant avec les motifs *kink-turn*, rendant possible la liaison entre le quatuor de la SECIS et SBP2. De plus, cette protéine contient une série d'acides aminés permettant la liaison entre la SECIS et le ribosome, essentielle à la traduction des sélénoprotéines. SBP2 contient également un domaine d'interaction avec le facteur *trans* eEFSec, pour facteur d'élongation eucaryotique spécifique de la Sec (Allmang et al., 2009). eEFSec intervient dans le recrutement spécifique de l'ARNt[Ser]^{Sec} au niveau du site A du ribosome et rend ainsi possible l'insertion de la Sec à la chaîne peptidique en formation, avec l'aide de SBP2 (Figure 12B). Le complexe eEFSec/SBP2 est dépendant de la séquence SECIS sur l'ARNm. Cependant, chez les bactéries, ce complexe est remplacé par une seule protéine, SelB, potentiellement dû au fait que la séquence SECIS sur l'ARNm des bactéries est moins distante du codon UGA que chez les eucaryotes (Labunsky et al., 2014).

Bien que la découverte de protéines impliquées dans l'insertion de la Sec sur l'ARNm date des années 1990, les mécanismes d'action moléculaires de certaines d'entre elles restent encore incertains. C'est le cas de la protéine ribosomale L30 rapportée comme participant à la biosynthèse des sélénoprotéines chez les eucaryotes. Celle-ci est localisée au niveau de la grande sous-unité ribosomale, 60S, mais peut également être retrouvée sous forme libre dans la cellule. La protéine L30 présente un motif de liaison à l'ARN de type L7Ae, similaire à celui de SBP2. Cependant, les acides aminés de ce motif ne sont pas conservés chez SBP2, suggérant

une interaction différente de ces deux protéines avec la séquence SECIS. La protéine L30 serait alors dédiée à faciliter la libération de la Sec du site A du ribosome (Chavatte et al., 2005). Une étude *in vitro* a pu montrer que la nucléoline, un facteur régulant la transcription, lie également la SECIS avec une affinité spécifique importante, dans le cas de sélénoprotéines fortement exprimées (Miniard et al., 2010).

La cellule met ainsi en jeu un ensemble de facteurs *cis* et *trans* régulateurs afin de permettre la biosynthèse des sélénoprotéines. Rappelons que ces dernières sont dépendantes de la biodisponibilité du Se présent dans l'environnement, nécessitant alors une régulation de la synthèse du sélénoprotéome chez les êtres vivants.

2.2) Evolution et fonctions des sélénoprotéines

2.2.1) Le sélénoprotéome

a) Les sélénoprotéines chez les organismes vivants

L'ensemble des sélénoprotéines présentes chez un organisme est nommé sélénoprotéome. Les outils bioinformatiques de type BLAST, notamment grâce à « *SECISearch* » (reconnaissance d'éléments SECIS dans le génome) ont permis de montrer que ces protéines sont retrouvées dans les trois domaines du vivant. Elles sont ainsi retrouvées chez la moitié des eucaryotes, chez 25% des bactéries et chez 15% des archées. Une centaine de familles de sélénoprotéines sont aujourd'hui recensées, témoignant également d'une grande disparité du sélénoprotéome entre les espèces (Hatfield et al., 2014). En effet, le sélénoprotéome le plus abondant a été observé chez une algue brune, *A. anophagefferens*, contenant 59 sélénoprotéines (Gobler et al., 2013). A l'inverse, certains organismes comme la levure, *S. cerevisiae*, ou les plantes supérieures, *O. sativa*, ne contiennent aucune sélénoprotéine (Lobanov et al., 2007). Et comme nous l'avons vu, les mammifères contiennent un sélénoprotéome intermédiaire avec 25 et 24 gènes de sélénoprotéines identifiées dans les génomes humain et murin, respectivement (Kryukov et al., 2003). La diversité observée chez les différents organismes vivants peut s'expliquer par l'étude de l'évolution du sélénoprotéome.

b) Evolution du sélénoprotéome

Les sélénoprotéines retrouvées chez les bactéries et archées sont principalement impliquées dans les processus cataboliques, alors qu'elles sont dédiées aux fonctions de régulation et d'oxydo-réduction anabolique chez les eucaryotes. Ainsi, Gladyshev et collaborateurs proposent l'hypothèse que l'absence d'homologie d'utilisation des sélénoprotéines par les procaryotes et les eucaryotes proviendrait d'une adaptation de ces dernières au cours de l'évolution. En effet, la complexification des voies et de la régulation redox chez les eucaryotes aurait augmenté l'utilisation de la Sec par ces derniers (Gladyshev and Kryukov, 2001). Concernant les procaryotes, seuls les archées méthanogènes et majoritairement les bactéries anaérobiques et hyperthermophiles expriment des sélénoprotéines, sûrement en adaptation à des conditions de vie particulières, nécessitant une efficacité catalytique plus importante (Zhang et al., 2006; Rother and Quitzke, 2018). Au contraire, le sélénoprotéome est plus diversifié chez les eucaryotes, puisqu'il est exprimé à la fois chez des espèces unicellulaires comme les parasites, chez les végétaux ou encore chez les mammifères (Figure 14) (Lobanov et al., 2007).

L'équipe de Gladyshev appuie également l'idée d'une évolution du sélénoprotéome chez les vertébrés par le fait que certaines sélénoprotéines ne sont retrouvées que chez ces organismes, comme la sélénoprotéine P, et qui en outre, contient entre 10 et 17 résidus Sec suivant les espèces (Gladyshev and Kryukov, 2001). De plus, le poisson zèbre est un exemple de vertébré contenant jusqu'à 38 sélénoprotéines et possédant des gènes en double copie, dont celui de l'ARNt[Ser]^{Sec}, ainsi que des gènes homologues distants de certaines sélénoprotéines (Xu et al., 1999; Kryukov and Gladyshev, 2000). La préservation de ces duplications témoigne du bénéfice apporté par le sélénoprotéome au cours de l'évolution chez les vertébrés. L'étude du sélénoprotéome montre également une conservation de certaines sélénoprotéines entre les espèces. Pour exemple, 80% des familles de sélénoprotéines humaines sont retrouvées chez l'algue brune *A. anophagefferens*, ainsi que des sélénoprotéines jusque-là détectées uniquement chez les bactéries, certainement acquises par transfert latéral de gène (Gobler et al., 2013).

Cependant, plusieurs événements de perte de sélénoprotéines sont notables chez certaines classes d'eucaryotes au cours de l'évolution. En effet, aucune sélénoprotéine ou protéine liée à la machinerie cellulaire de biosynthèse de la Sec n'est retrouvée chez les champignons, suggérant une perte de ces gènes à la base de ce règne.

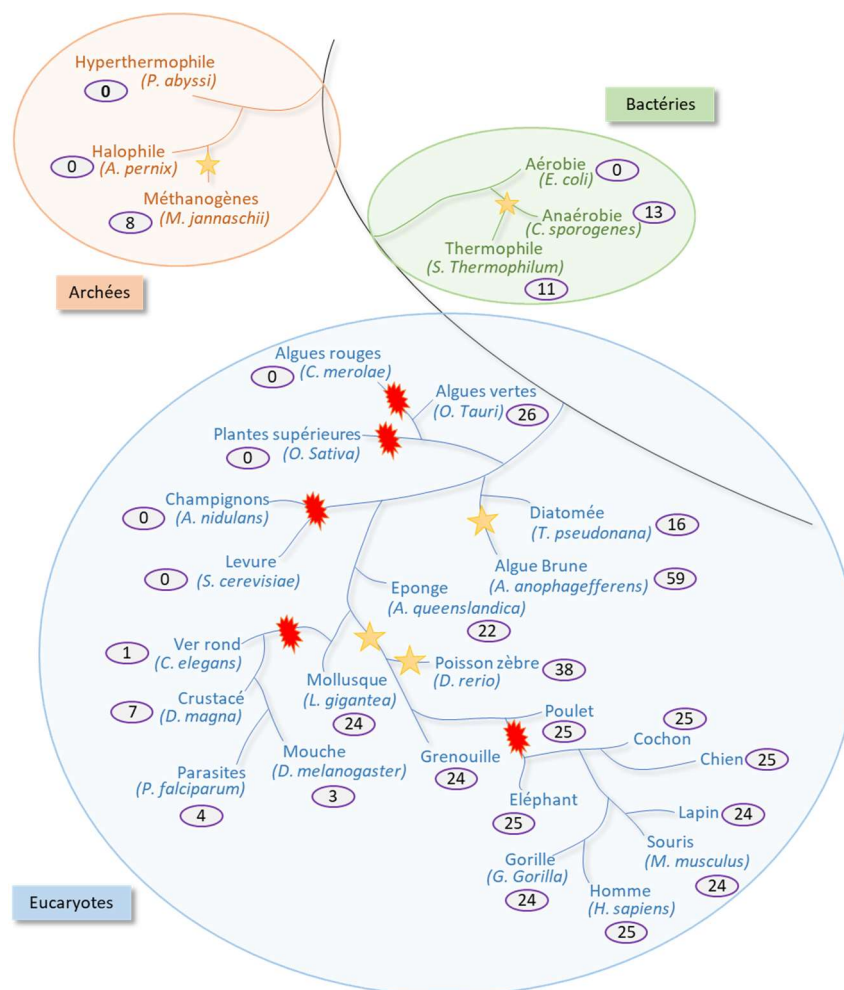


Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant l'évolution du sélénoprotéome. Les sélénoprotéines sont présentes au sein des trois domaines du vivant : archées, bactéries et eucaryotes, avec tout de même des disparités entre les espèces. En effet, le nombre de sélénoprotéines présentes au sein d'un être vivant (indiqué dans les ronds violets) varie entre 0 et 59. Le sélénoprotéome est exprimé au sein de diverses espèces d'eucaryotes, à la fois chez des espèces unicellulaires, des végétaux et les mammifères. Au cours de l'évolution, des événements de gain (étoiles jaunes) ou de perte (explosion rouge) de sélénoprotéines se sont produits, pouvant expliquer la variation du nombre de sélénoprotéines entre les différentes branches. *Arbre phylogénétique élaboré à partir des études de Mariotti et al., 2012; Lobanov et al., 2007; Lobanov et al., 2009; Kryukov and Glyshev, 2004; Zhang and Gladyshev, 2005; Jiang et al., 2012 et Gobler et al., 2013.*

Aussi, comparé aux algues vertes, les sélénoprotéines ont été perdues chez les plantes supérieures au cours de l'évolution ou ont été remplacées par des protéines homologues contenant la Cys (Lobanov et al., 2007). Ces conversions sont également retrouvées à la base du règne des vertébrés, avec 12 conversions du résidu Sec en Cys, dont 8 apparaissant lors de la division des mammifères (Figure 14) (Mariotti et al., 2012). La teneur en oxygène plus élevée

dans l'air, aurait alors abouti à la sélection des protéines chez les organismes terrestres, en perdant les sélénoprotéines les plus sensibles à l'oxydation (Lobanov et al., 2007).

Bien que le sélénoprotéome chez les organismes vivants se diversifie au cours de l'évolution, un nombre important de ces protéines reste présent chez les vertébrés. En effet, parmi les 45 sélénoprotéines répertoriées au sein de cette branche du vivant, 27 sont uniquement retrouvées chez les vertébrés, provenant soit du sélénoprotéome ancestral, soit obtenues par duplication de gènes (Mariotti et al., 2012). La transcription et conservation de ces sélénoprotéines témoignent de l'importance de leur rôle biologique. Les récentes études portant sur l'analyse des fonctions de ces sélénoprotéines ont d'ailleurs permis de les classer selon leur fonction.

2.2.2) Fonction des sélénoprotéines chez les mammifères

a) Les sélénoprotéines chez les mammifères

L'équipe de Hatfield et Galdyshev a détecté, au plus, 25 sélénoprotéines dans le génome des mammifères et les ont divisées en deux groupes : les sélénoprotéines de ménage et celles liées au stress. Les sélénoprotéines de ménage seraient moins sensibles aux déficiences en Se puisqu'elles établiraient des fonctions critiques dans la survie cellulaire. À l'inverse, les protéines à Se liées au stress seraient moins essentielles à la survie de la cellule et leur expression diminuerait en cas de déficience pour cet oligoélément (Mariotti et al., 2012). Il existe ainsi une hiérarchie d'expression afin de maintenir un niveau adéquat de certaines sélénoprotéines, comme celles de ménage, lors d'une déficience en Se.

Parmi ces 25 sélénoprotéines, la Sec est systématiquement retrouvée au niveau de leur site catalytique. La première sélénoprotéine identifiée chez les mammifères fût la glutathion peroxydase 1, impliquée dans l'homéostasie redox en dégradant l'hydrogène peroxyde (Schweizer et al., 2004). L'activité d'oxydo-réduction des sélénoprotéines est liée à la Sec, positionnée à leur extrémité C ou N-terminale. En effet, la mutation du résidu Sec en un autre acide aminé abolit l'activité catalytique des sélénoprotéines (Zhong and Holmgren, 2000). Pourtant, les fonctions biologiques des sélénoprotéines au niveau cellulaire montrent des disparités, classant ces protéines en plusieurs familles. Les trois familles les mieux caractérisées à ce jour sont les glutathion peroxydases (GPX), les thiorédoxines réductases (TXNRD) et les iodothyronines déiodinases (DIO). Les autres sélénoprotéines retrouvées dans les bases de

données sont les sélénoprotéines (SELENO) H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V, W, F et SEPHS2, dont les fonctions et mécanismes d'action sont plus ou moins bien connus (Labunskyy et al., 2014).

b) Mode d'action des trois familles principales de sélénoprotéines

Les sélénoprotéines faisant partie de la famille des glutathion peroxydases sont retrouvées dans les trois domaines du vivant et cinq GPX contenant un résidu Sec sont dénombrées chez les mammifères (Kryukov et al., 2003). Ces protéines diffèrent en fonction de leur substrat et de leur localisation tissulaire, avec la GPX1 retrouvée au niveau cytosolique de manière ubiquitaire, la GPX3 étant la seule GPX extracellulaire et localisée au niveau plasmatique ou en encore la GPX6 exprimée au niveau de l'épithélium olfactif et lors du développement embryonnaire (Pillai et al., 2014). La hiérarchie des sélénoprotéines discutée précédemment, en fonction de la disponibilité du Se, est aussi présente au sein d'une même famille. Effectivement, l'équipe de Sachdev a montré que l'expression de la GPX1 est faible en cas de déficience en Se et augmente suite à l'administration de ce dernier, tandis que l'expression de la GPX4 reste inchangée. Ainsi, la GPX1 peut être considérée comme une sélénoprotéine liée au stress et la GPX4 comme une protéine à Se de ménage (Weiss and Sunde, 2001).

Le rôle des GPXs est de réduire l'hydrogène peroxyde, H_2O_2 en eau, ainsi que les lipides hydroperoxydes afin de maintenir une homéostasie redox au sein de la cellule. Le mécanisme d'oxydo-réduction des GPXs fût caractérisé en premier chez la GPX1, la sélénoprotéine la plus abondante chez les mammifères. Le cycle catalytique de la GPX1 débute par la réduction de l'hydrogène peroxyde en eau, oxydant la GPX1. La réduction de cette dernière nécessite l'intervention d'un glutathion (GSH) qui sera oxydé afin de restaurer le site actif de GPX1. Le glutathion pourra à son tour être réduit par le biais d'une glutathion réductase et la consommation de NADPH (Figure 15) (Kraus et al., 1980; Lubos et al., 2011).

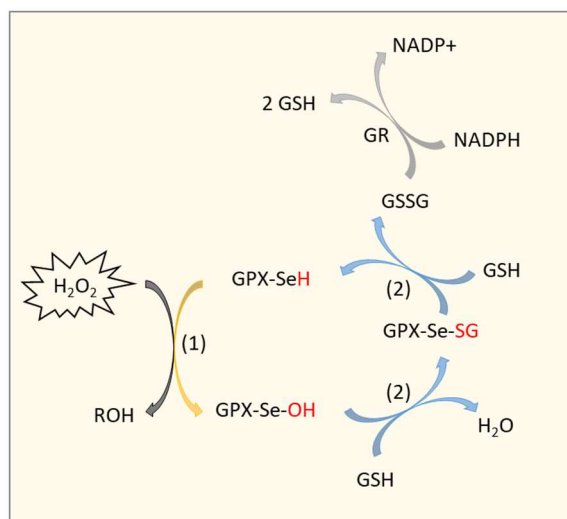


Figure 15 : Mode d'action des glutathion peroxydases. Le cycle catalytique des GPXs nécessite la modification du site actif de la Sec par l'intermédiaire d'isoformes stables. Celui-ci débute par (1) une oxydation du groupement sélénié (-SeH) en acide séléinique (-Se-OH), suite à l'interaction avec un hydrogène peroxyde (H_2O_2). Ce dernier est alors réduit sous une forme inactive (R-OH). (2) La GPX oxydée est ensuite réduite grâce à un premier résidu glutathion (GSH) créant un pont sélénodisulfide avec Se-OH et libérant l'oxygène sous forme d'une molécule d' H_2O . Cet intermédiaire, constitué d'un pont sélénodisulfide glutathiolé (Se-SG) est de nouveau réduit par un échange thiol-disulfide via un second GSH, restaurant le site actif de la GPX. Le GSH oxydé (GSSG) est ensuite réduit en 2 molécules de GSH par l'action de l'enzyme glutathion réductase (GR), dépendante du co-facteur NADPH. *Adapté de Lubos et al., 2011 et Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013.*

L'hydrogène peroxyde est une molécule de signalisation importante, régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore des fonctions mitochondriales (D'Autréaux and Toledano, 2007). Ainsi, bon nombre des rôles physiologiques de cette molécule sont régulés par l'activité de la GPX1. Cette dernière a également une influence sur les processus métaboliques puisque sa surexpression induit une résistance à l'insuline chez les souris (McClung et al., 2004). L'action biologique des GPXs provient également de leur conformation. Les GPXs 1-3 et 6 sont des homotétramères contenant un repliement de type thiorédoxine, ainsi que 7 feuillets β et 4 hélices α . Cette structure, contenant l'acide aminé Sec, permet alors à ces enzymes de réaliser les réactions d'oxydo-réduction. La GPX4 est quant à elle la seule à être monomérique et permet la réduction des phospholipides hydroperoxydes (Martin, 1995; Labunskyy et al., 2014). Cette sélénoprotéine est également impliquée dans la régulation de la mort cellulaire. En effet, la ferroptose est une mort cellulaire régulée, se rapprochant de la nécrose. La ferroptose est déclenchée lors d'une peroxydation lipidique

excessive des membranes plasmiques, due à une accumulation de fer dans la cellule, provenant d'une forte production de ROS, notamment par la réaction de Fenton. Il a été démontré que la GPX4 est une enzyme clé dans la régulation de la ferroptose, puisqu'elle permet de réduire la GSH et ainsi éviter les peroxydations lipidiques (Dixon et al., 2012; Yang et al., 2014).

La seconde famille regroupant des sélénoprotéines à action commune est celle des thiorédoxines réductases, également retrouvées au sein des trois domaines du vivant (Napolitano et al., 2019). Chez les mammifères, trois isoformes ont été identifiées. Tout d'abord TXNRD1 qui est localisée au niveau du cytosol et du noyau, TXNRD2 ayant des fonctions mitochondriales et TXNRD3 exprimée de manière tissu-spécifique au niveau des testicules (Sun et al., 1999; Arnér, 2009). Ces sélénoprotéines sont homodimériques faisant partie du groupe des pyridine-nucléotide-disulfide oxydoréductases. Les TXNRD présentent alors un groupement flavine adénine dinucléotide (FAD), ainsi qu'un pont disulfure situé à l'extrémité C-terminale. Ce dernier motif contient la Sec et représente leur site actif. Ces sélénoenzymes sont recrutées pour la réduction des ponts disulfures des thiorédoxines. Pour cela, un premier échange d'électrons a lieu entre le co-facteur NADPH et le FAD. Ce dernier transfère à son tour ces électrons au niveau du site actif de la TXNRD, réduisant le pont disulfure de cette même sous-unité. Les électrons sont ensuite transférés à la deuxième sous-unité de l'homodimère, formant un motif sélénothiol capable de réduire les thiorédoxines oxydées. (Figure 16) (Zhong et al., 2000). Cette famille est composée d'un dernier membre, la thiorédoxine/glutathione réductase, encore peu décrite et ayant une structure similaire à la TXNRD1, mais avec un domaine supplémentaire de type glutarédoxine en N-terminal (Su et al., 2005).

Les TXNRD sont engagées dans différents processus physiologiques tels que l'homéostasie redox, la régulation de facteurs de transcription ou encore l'apoptose. En effet, les échanges d'électrons entre les TXNRD et les thiorédoxines permettent la réduction des domaines de liaison à l'ADN de certaines protéines comme NF- κ B ou encore p53, un suppresseur de tumeur (Pillai et al., 2014). Les TXNRD sont également importantes pour le développement. Une étude menée par Jakupoglu et collaborateurs portant sur la mutation des gènes des TXNRD 1 et 2 indique une létalité embryonnaire vers 10,5 et 13,5 jours de gestation, respectivement.

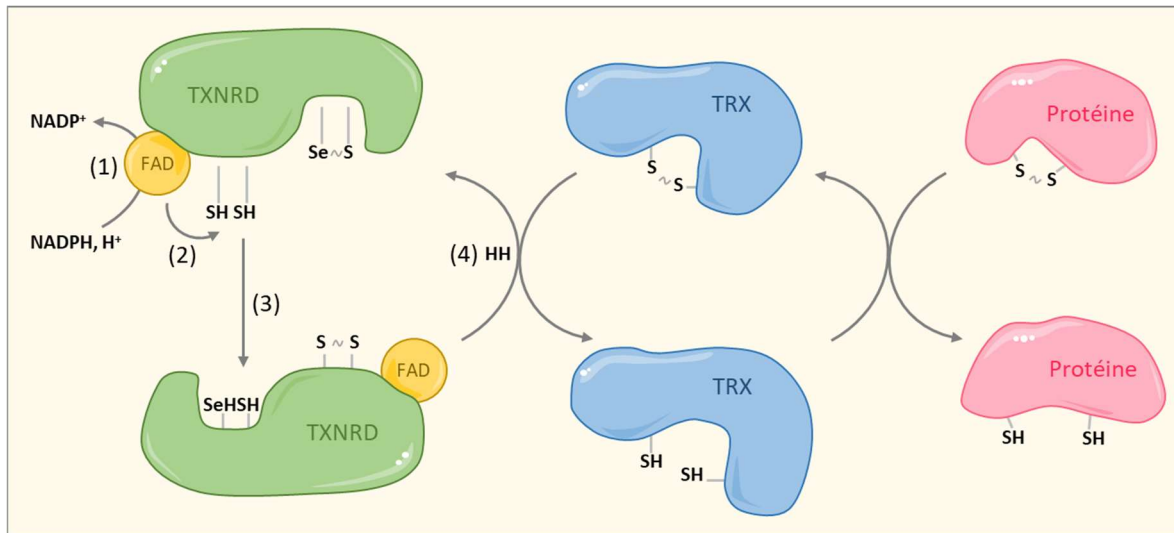


Figure 16 : Mode d'action des thiorédoxine réductases. La première étape du cycle catalytique des TXNRD correspond à (1) la réduction du motif flavine adénine dinucléotide (FAD) par la NADPH au niveau d'une des deux sous-unités de l'homodimère. (2) Les électrons transférés au groupement FAD sont ensuite redirigés vers le site actif de la même sous-unité, réduisant le pont disulfure en motif dithiol (SH / SH). (3) Le motif dithiol réduit ensuite le site actif au niveau C-terminal de la seconde sous-unité de l'homodimère, formant un motif séléniothiol (SeH / SH). (4) Ce dernier peut alors faire un échange d'électrons afin de réduire le pont disulfure de son substrat, la thiorédoxine (TRX), elle-même oxydée après réduction d'une autre protéine. *Adapté de Lee et al., 2013 et Mustacich and Powis, 2000. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

L'invalidation de la TXNRD1 induit une diminution de la prolifération cellulaire et un retard de développement, alors que l'invalidation de TXNRD2 témoigne de son importance pour le développement cardiaque, montrant des fonctions non redondantes entre les deux enzymes (Jakupoglu et al., 2005). Concernant la troisième TXNRD, plusieurs études ont permis de définir son expression exclusivement testiculaire qui permet la formation de ponts disulfures au niveau des protéines membranaires des spermatozoïdes et ainsi le développement et la maturation du sperme (Su et al., 2005). L'expression de ces sélénoprotéines est donc répandue au sein de tout l'organisme, au niveau du rein, du foie, des muscles ou encore cérébral, mais leur expression reste cependant tissu- et cellule-spécifique (Arnér, 2009).

La dernière famille de sélénoprotéines sont les iodothyronines déiodinases, dont les trois membres ont une fonction dédiée à la synthèse et au métabolisme des hormones thyroïdiennes (HT). Les DIO1, 2 et 3 sont retrouvées dans les trois domaines du vivant, montrant leur importance au cours de l'évolution (Phatarphekar et al., 2014; Sun et al., 2017). Cependant, ces

sélénoprotéines diffèrent les unes des autres par leur localisation et leur mode d'action. La DIO1 est abondamment exprimée au niveau du foie, de la thyroïde ou encore de la glande pituitaire. La DIO2 est également exprimée au niveau de la thyroïde mais aussi, entre autres, au sein du SNC et du muscle squelettique. La DIO3 est quant à elle retrouvée au niveau du SNC mais davantage au sein des tissus embryonnaires et néonataux (Köhrle, 2000). Concernant la localisation intracellulaire, les DIO1 et 3 sont présentes au niveau de la membrane plasmatique, alors que la DIO2 est localisée au niveau du RE (Labunsky et al., 2014). Le taux d'expression des DIO1 et 3 est dépendant de la biodisponibilité du Se, mais ce phénomène ne fût pas démontré pour la DIO2, indiquant une hiérarchisation de leur expression (Köhrle, 2000).

L'action de ces sélénoenzymes est permise par le résidu Sec localisé au niveau de leur site actif en N-terminal. Ces DIO ont toutes un domaine transmembranaire au niveau N-terminal suivi d'un repliement de type thiorédoxine et ont une conformation en homodimère (Callebaut et al., 2003). La fonction biologique des DIO est donc liée à l'activité des hormones thyroïdiennes. La pro-hormone thyroxine (T4) est sécrétée sous forme inactive et peut être convertie en forme active tri-iodothyronine (T3). Cette réaction est réalisée par monodéiodation, c'est-à-dire par clivage d'un atome d'iode au niveau d'un anneau phénol, réaction catalysée par les DIO1 ou 2. A l'inverse, la DIO3 permet l'inactivation de l'hormone T3 en la convertissant en diiodothyronine (T2). Dans des conditions plus spécifiques, la DIO1 peut aussi inactiver la T3 ou conduire à la formation de la T3 inverse, rT3, également inactive (Figure 17) (Bianco et al., 2002). De plus, il est généralement admis que la DIO1 régule les niveaux circulants de l'hormone T3 et que les deux autres DIO sont impliquées dans la régulation intracellulaire de ces hormones de manière tissu-spécifique (Gereben et al., 2008). Ces différents niveaux de régulation interviennent pour divers processus biologiques s'exerçant lors du développement, de la régulation de la thermogenèse au sein du tissu adipeux brun ou encore lors de la régénération tissulaire (Dentice et al., 2010).

Bien que les fonctions biologiques de ces trois familles soient bien caractérisées, le rôle ou mode d'action spécifique des autres sélénoprotéines reste à ce jour partiellement ou non élucidé.

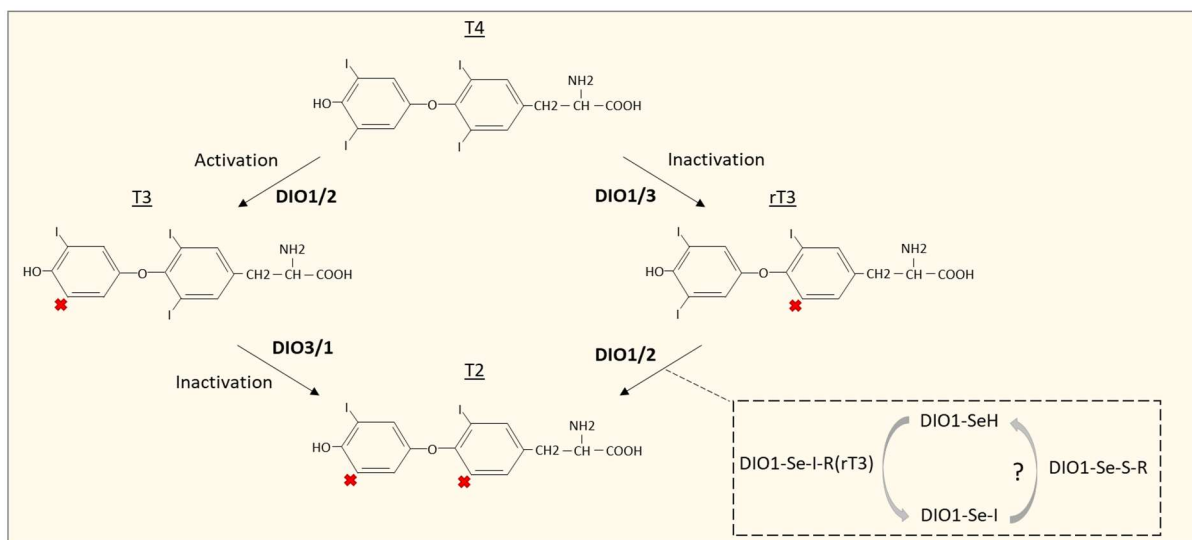


Figure 17 : Mode d'action des iodothyronine déiodinases dans la synthèse des hormones thyroïdiennes. La pro-hormone thyroxine (T4) inactive peut être activée en tri-iodothyronine (T3) par monodéiodation via la DIO 1 ou 2. Les DIOs clivent ainsi un atome d'iode au niveau d'un phénol en 5'. La T3 peut à son tour être inactivée en diiodothyronine (T2) par une seconde monodéiodation au niveau du phénol en position 5, par les DIOs 3 et 1. Si la monodéiodation de T4 a lieu au niveau du phénol en position 5 par les DIOs 1 ou 3, la réaction produit la T3 inverse (rT3), également inactive. Le mode d'action des DIO est représenté par l'action de la DIO1 convertissant la rT3 en T2 (carré pointillé). Le site actif de la DIO1 contenant la Sec (-SeH) lierait alors l'atome d'iode de la rT3 afin de former un groupement sélénium iodure (-Se-I). La DIO1 serait ensuite réduite au moyen de co-facteurs thiol et par un composé soufré non élucidé (S-R), qui la libérerait de l'atome d'iode. *Adapté de Maia et al., 2011 et Bianco et al., 2002*

c) Expression et rôle des autres sélénoprotéines

Nombreuses autres sélénoprotéines sont également présentes dans le génome mais ne sont pas classées au sein d'une famille particulière. Les sélénoprotéines H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V, W, F et SEPHS2 sont ainsi exprimées chez les mammifères. Parmi elles, la SELENOW est la plus petite sélénoprotéine retrouvée dans cette branche du vivant (Zhang et al., 2006). Cette enzyme fait également partie d'une sous famille, dénommée famille Rdx (pour redoxines), comprenant alors les sélénoprotéines W, T, H et V. Ces sélénoenzymes sont caractérisées par la présence d'un motif conservé Cys-x-x-Sec (où x représente tout acide aminé), ainsi qu'un repliement de type thiorédoxine. Ce dernier, formé par différents feuilletts β entourés d'hélices α , permet une activité d'oxydo-réduction par la formation d'un pont disulfure avec la protéine cible (Dikiy et al., 2007).

De plus, plusieurs de ces enzymes sont localisées au niveau du RE, comprenant les SELENOF, K, M, N, S et T. Les SELENOF et T ont un rôle dans le contrôle qualité lors de la synthèse protéique, connu sous le terme UPR pour *unfolded protein response*, et dans la régulation du stress du RE, tandis que les SELENOK et S sont impliquées dans la dégradation des protéines mal conformées (réponse ERAD pour *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Korotkov et al., 2001; Shchedrina et al., 2011; Hamieh et al., 2017). Les SELENOM et N permettent quant à elles une régulation de la libération calcique (Labunskyy et al., 2014). D'un point de vue physiologique, l'activité redox de la SELENON permet la régulation de l'oxydation d'un résidu Cys au niveau du récepteur de la ryanodine. Ainsi, lors de la contraction musculaire, la SELENON permet l'affinité de liaison entre la ryanodine et son récepteur, en modulant l'état oxydé du résidu, et donc la libération de calcium (Jurynek et al., 2008).

La localisation tissulaire ou subcellulaire des sélénoprotéines peut être ubiquitaire ou à l'inverse restreinte pour certaines d'entre elles, comme la SELENOV qui est majoritairement exprimée au niveau des testicules. Cependant, une étude récente, utilisant des souris KO pour la SELENOV a démontré que son absence au niveau testiculaire, n'induit pas d'anomalies morphologiques du sperme, des testicules, ni de reproduction. Néanmoins, ces souris KO présentent une accumulation de masse grasse plus importante que celle des souris sauvages (*wild-type*, WT), suggérant un rôle de la SELENOV dans le métabolisme lipidique ainsi que dans la dépense énergétique (Mariotti et al., 2012; Chen et al., 2021). L'expression ubiquitaire est notamment identifiée pour la SEPHS2, puisqu'elle permet la production de sélénophosphate et est donc un régulateur de la synthèse des sélénoprotéines (voir partie 2.1.2 b) (Xu et al., 2007). La SELENOR (ou méthionine sulfoxyde réductase B1) est également largement exprimée puisque sa fonction consiste à réduire la méthionine des protéines, permettant ainsi leur activation ou inactivation lors de différents processus biologiques (Kryukov et al., 2002).

Bien que de nombreuses sélénoprotéines caractérisées ont une fonction d'oxydo-réduction par le biais du résidu Sec (résumé dans le Tableau 1), la SELENOP a un rôle particulier vis-à-vis des autres sélénoprotéines puisqu'elle constitue un transporteur du Se dans l'organisme, avec une demi-vie de 3 h à 4 h (Burk et al., 1991). Cette sélénoprotéine contient 10 résidus Sec chez l'homme et le rongeur, ainsi que deux éléments SECIS, permettant le transport de plusieurs molécules de Se, allant du foie jusqu'aux autres tissus par la voie sanguine. Le Se libéré dans les tissus distants permet alors la synthèse des autres sélénoprotéines (Burk and Hill, 2005; Lobanov et al., 2008).

Sélénoprotéines	Localisation tissulaire et/ou subcellulaire	Fonction(s)	Références
SELENOF (Sep15)	RE, très exprimée au niveau de la prostate, foie et rein	Contrôle qualité/repliement des protéines (UPR), homéostasie redox	Korotkov et al., 2001 ; Gladyshev et al., 1998 ; Kasaikina et al., 2011
SELENOH	Nucléole, divers tissus et très exprimée en fin d'embryogenèse	Régulation de gènes pour la synthèse du glutathion	Novoselov et al., 2007 ; Panee et al., 2007
SELENOI	Ubiquitaire, particulièrement au niveau cérébral (cervelet)	Biosynthèse phosphatidyléthanolamine	Horibata and Hirabayashi, 2007
SELENOK	Membrane RE, divers tissus	Associée au système de dégradation des protéines mal conformées (ERAD), réponse au stress du RE, régulation calcique, homéostasie redox	Verma et al., 2012 ; Hoffmann et al., 2007 ; Shchedrina et al., 2011
SELENOM	RE, divers tissus et très exprimée au niveau cérébral	Antioxydante, régulation calcique	Reeves et al., 2010
SELENON	Membrane RE, très exprimée lors de l'embryogenèse, ubiquitaire	Développement et différenciation musculaire (embryonnaire et suite à une lésion), régulation calcique	Petit et al., 2003 ; Jurynek et al., 2008, Hoffman et al., 2007
SELENOO	Mitochondrie, ubiquitaire, très exprimée au niveau du foie	Non déterminée	Dudkiewicz et al., 2012
SELENOP	Ubiquitaire, plasma, très exprimée au niveau du foie	Transporteur du Se, antioxydant, hépatokine	Burk and Hill., 2005 ; Hill et al., 2003 ; Misu et al., 2010
SELENOS	Membrane RE, divers tissus	Associée au système de dégradation des protéines mal conformées (ERAD), régulation inflammation, homéostasie redox	Hoffmann et al., 2007 ; Curran et al., 2005 ; Shchedrina et al., 2011
SELENOT	RE, Ubiquitaire, exprimée lors de l'embryogenèse	Régulation calcique, ontogenèse, intervient dans l'UPR, homéostasie redox, adhésion cellulaire	Dikiy et al., 2007 ; Grumolato et al., 2008 ; Hamieh et al., 2017 ; Sengputa et al., 2009
SELENOV	Placenta, testicules, tissus adipeux	Métabolisme énergétique	Mariotti et al., 2012 ; Chen et al., 2021
SELENOW	Cytosolique, Ubiquitaire, très exprimée au niveau cérébral et musculaire	Développement et régénération musculaire, régulation redox, interaction avec la protéine 14-3-3 (cycle cellulaire, apoptose...)	Gu et al., 2000 ; Dikiy et al., 2007
SEPHS2 (SPS2)	Ubiquitaire	Synthèse sélénophosphate, autorégulateur synthèse sélénoprotéines	Xu et al., 2007
MSRB1 (SELENOR)	Cytosol et noyau, très exprimée dans le foie, rein, au niveau cardiaque et du SNC	Réduction de la méthionine sulfoxyde, antioxydante	Kryukov et al., 2002 ; Jung et al., 2002

Tableau 1 : Localisation et fonction des sélénoprotéines. Enumération des sélénoprotéines non classées, présentes dans les génomes humains et murins. Leur localisation tissulaire et/ou subcellulaire ainsi que leur fonction sont indiquées en face de chacune d'entre elles. RE, réticulum endoplasmique ; UPR, unfolded protein response.

L'équipe de Köhrle a montré que l'inactivation du gène de la SELENOP chez la souris induit une accumulation de Se au niveau hépatique, ainsi qu'une diminution drastique du taux de Se au niveau cérébral et testiculaire (Schomburg et al., 2003). Mais la SELENOP ne permet pas seulement le transport du Se puisqu'elle a également une fonction antioxydante. En effet, Burk et collaborateurs ont montré, chez la souris, que cette sélénoprotéine protège les cellules endothéliales du foie de la nécrose et de la peroxydation lipidique suite à l'injection d'une substance contenue dans les herbicides (Burk et al., 1997). De plus, la SELENOP se comporte comme une hépatokine, dont les taux sont élevés chez des patients atteints du diabète de type 2, conduisant à une résistance à l'insuline et une hyperglycémie. L'absence de SELENOP semble également bénéfique pour la résistance à l'exercice au niveau du muscle squelettique,

par l'augmentation des taux de ROS permettant la phosphorylation de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*), impliquée dans l'homéostasie énergétique (Misu et al., 2010; Misu et al., 2017).

Le Se agit alors dans l'organisme par ces diverses sélénoprotéines, après avoir été ingéré et transporté. Cependant, des actions anti-oxydantes excédentaires peuvent avoir des effets néfastes pour l'organisme (stress de réduction), obligeant ce dernier à réguler l'afflux du Se au sein des tissus.

2.2.3) Régulation des sélénoprotéines

a) Absorption et transport du Se dans l'organisme

Le Se, ingéré par l'organisme, arrive au niveau du duodénum et du caecum où il est majoritairement absorbé par les mêmes transporteurs que les acides aminés soufrés. Les mécanismes d'absorption sont dépendants des formes organiques ou inorganiques sous lesquelles le Se est présent. Le taux d'absorption des formes organiques est supérieur à 90%, il est complet pour le sélénate bien qu'une proportion importante soit relarguée dans les urines et enfin environ 50% du sélénite alimentaire est absorbé mais sa rétention est plus conséquente que le sélénate (Fairweather-Tait et al., 2010). Les formes organiques, comme la sélénométhionine, sont transportées au travers de la membrane des cellules épithéliales via des transporteurs actifs, sodium-dépendants. Ce système est le transport habituel des acides aminés neutres au niveau de l'intestin. Le sélénite et le sélénate, quant à eux inorganiques, traversent la membrane de ces cellules, respectivement, par diffusion passive ou au moyen d'un cotransport avec le sodium (Nickel et al., 2009).

Les formes organiques et inorganiques du Se sont alors transportées de l'intestin jusqu'au foie. La sélénométhionine se fixe de manière non spécifique à des protéines comme l'albumine ou l'hémoglobine pour être transloquée, alors que la sélénocystéine et les autres formes inorganiques sont transportées tel quel par des mécanismes encore non élucidés (Roman et al., 2014). La SELENOP est principalement synthétisée au niveau du foie où elle peut lier le Se puis le livrer aux autres tissus via son transport par le plasma (Carlson et al., 2004). Une fois arrivée au tissu cible, la SELENOP délivre le Se par endocytose en se fixant à ApoER2, faisant partie de la famille des récepteurs LDL (*low density lipoprotein*). Des études sur des modèles murins invalidant ApoER2 démontrent une diminution de la concentration de Se au niveau cérébral et testiculaire, mais son taux n'est pas perturbé au niveau d'autres organes comme le

rein ou le muscle (Burk et al., 2007). L'équipe d'Olson et *al.* a ainsi démontré que l'apport de Se au niveau du rein est possible au moyen du récepteur mégaline, également transloqué par endocytose. L'apport en Se aux différents organes dépend ainsi des récepteurs exprimés par ces derniers : les testicules expriment ApoER2, le rein exprime le récepteur mégaline, tandis que le cerveau exprime les deux récepteurs (Figure 18) (Olson et al., 2008).

Le foie régule la distribution du Se dans l'organisme en fonction des besoins physiologiques et l'excédent de Se est excrété. Pour cela, le Se passe sous la forme de sélénide afin d'être incorporé dans des sucres sélénisés pour être éliminé par les urines. En cas de forts taux de Se à excréter, un groupement méthyl est ajouté au sélénide, le convertissant en diméthylsélénide, afin d'être éliminé par la respiration et les fèces (Ohta and Suzuki, 2008). Outre son élimination, le Se peut être recyclé au moyen de la Sec lyase qui catalyse la dégradation de la Sec en L-alanine et Se. La Sec lyase est exprimée au sein de différents tissus, de manière plus importante au niveau du foie et du rein (Mihara et al., 2000). Le Se recyclé lors de la dégradation des sélénoprotéines est une source alternative pour leur biosynthèse. En effet, le Se se fixe sur la Sec lyase qui est capable de le transférer au niveau du noyau et de livrer le Se à la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines (Kurokawa et al., 2011).

b) Cerveau : à l'apex de la hiérarchie de la régulation en Se

Bien que le cerveau ne soit pas l'organe comprenant la plus grande quantité de Se, de nombreuses études réalisées entre les années 1970 et 2000 démontrent l'importance du celui-ci au niveau cérébral. En effet, contrairement à d'autres organes comme le foie ou le rein, les taux de Se au niveau cérébral restent maintenus en cas de déficience. Pour exemple, Kühbacher et collaborateurs ont montré que des rats déficients en Se ont une baisse de 29% de la teneur en Se au niveau cérébral, alors que cette diminution atteint les 90-99% au niveau du foie et du rein (Kühbacher et al., 2009).

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'homéostasie cérébrale du Se est notamment possible grâce à la SELENOP, puisque son invalidation, sans régime dépourvu en Se, induit une diminution du taux de Se particulièrement au niveau cérébral (Schomburg et al., 2003).

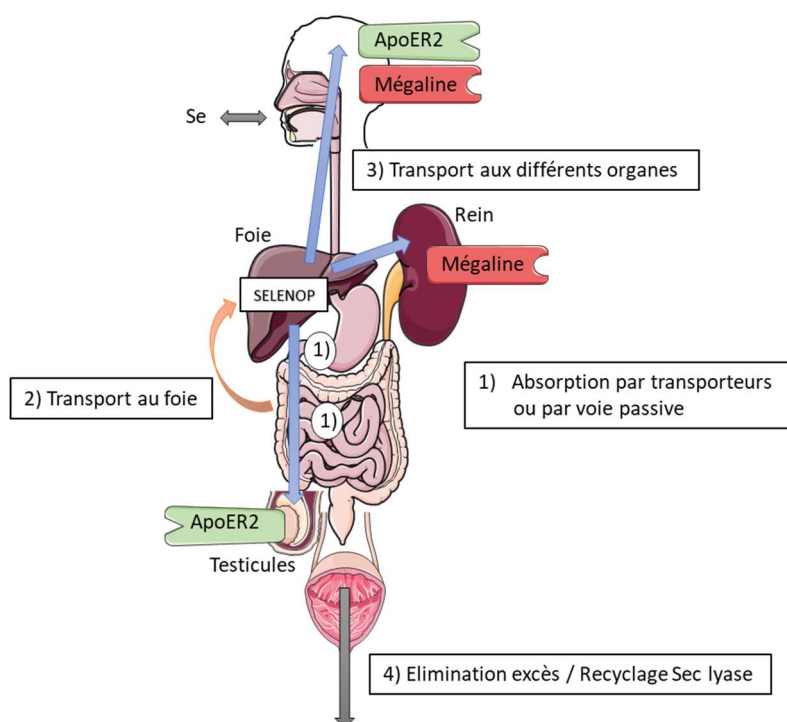


Figure 18 : Absorption et transport du sélénium dans l'organisme. Le Se est ingéré par voie digestive et transite jusqu'au duodénum et caecum. 1) A ce niveau, les formes organiques du Se sont absorbées par des transporteurs actifs, tandis que les formes inorganiques le sont par diffusion passive ou au moyen d'un cotransport à sodium. 2) Le Se est ensuite transporté jusqu'au foie, lieu de production de la SELENOP. Cette sélénoprotéine va alors lier plusieurs atomes de Se afin de les transporter jusqu'aux organes cibles par voie plasmatique. 3) Une fois la SELENOP arrivée à sa destination, celle-ci délivre le Se par endocytose en se fixant à différents récepteurs. Ainsi, la libération du Se au niveau cérébral est possible via les récepteurs ApoER2 et mégaline, par le récepteur ApoER2 au niveau testiculaire et seulement par la mégaline au niveau du rein. 4) L'excédent de Se est éliminé par les urines. En cas de taux trop important de Se, ce dernier peut également être converti en diméthylsélénide afin d'être éliminé par la respiration et les fèces. Enfin, le Se peut aussi être recyclé au sein de divers tissus grâce à la Sec lyase. *Adapté de Fairweather-Tait et al., 2011; Olson et al., 2008 et Ohta and Suzuki, 2008. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

Le transfert du Se de la circulation sanguine périphérique aux cellules épithéliales des plexus choroïdes et des vaisseaux sanguins cérébraux est possible par endocytose de la SELENOP avec le récepteur ApoER2 présent au niveau de la barrière hématoencéphalique. Le Se est ainsi amené aux neurones, exprimant ce récepteur, et possiblement à d'autres cellules neurales via le liquide interstitiel produit par les cellules des plexus choroïdes (Clatworthy et al., 1999; Burk et al., 2014). En effet, le Se est davantage retrouvé au niveau de la matière grise que de la matière blanche permettant l'expression des 24 sélénoprotéines au niveau cérébral

chez la souris, plus particulièrement au niveau neuronal au sein du néocortex, de l'hippocampe, du cortex cérébelleux et du bulbe olfactif (Zhang et al., 2008; Kühbacher et al., 2009).

Contrairement à d'autres tissus, la concentration cérébrale en Se reste stable même en condition de déficience en Se, afin d'établir une défense antioxydante constante. De plus, bien que les mécanismes d'interaction entre la SELENOP et le récepteur mégaline au niveau cérébral ne soient pas encore démontrés, l'expression des deux récepteurs (mégaline et ApoER2) dans ce tissu témoigne de l'importance d'un système continuellement fonctionnel pour l'apport de Se. En effet, une faible teneur en Se au niveau plasmatique, ainsi qu'une diminution de l'activité des GPX ont été mises en évidence chez des enfants et adolescents épileptiques (Ashrafi et al., 2007). Qui plus est, le Se a été décrit comme impliqué dans le bon fonctionnement de la neurotransmission. Castaño et al., ont démontré une augmentation de dopamine et de sérotonine, ainsi qu'une diminution de noradrénaline au niveau du cortex préfrontal de rats ayant eu un régime déficient en Se (Castaño et al., 1997).

c) Régulation et dégradation des sélénoprotéines

Les différentes maladies recensées, ainsi que les études *in vitro* et *in vivo*, ont montré que l'expression des sélénoprotéines est régulée suite à la biodisponibilité du Se et selon une hiérarchie. Ainsi, lors d'un faible apport en Se, l'expression des sélénoprotéines considérées comme liées au stress diminue, comme GPX1 ou la SELENOW, alors que l'expression des sélénoenzymes de ménage, comme la GPX4, n'est pas modifiée (Sunde et al., 2009). La baisse d'expression des sélénoprotéines alors considérées comme non essentielles est en partie due à la dégradation des ARN non-sens par la voie dite « *nonsense-mediated decay* » (NMD).

La voie NMD est un mécanisme de contrôle ciblant les ARNm ayant un codon stop prématuré (PTC, *premature termination codon*) situé 50 à 55 nucléotides en amont de la dernière liaison exon-exon. Ce codon stop peut être acquis de manière aléatoire, par une mutation sur la séquence d'ADN ou encore par épissage alternatif de l'ARN. La traduction de protéines ayant un PTC induit la formation de protéines tronquées ayant soit un gain de fonction, soit une perte d'activité qui peuvent devenir, dans un cas comme dans l'autre, délétères pour la cellule. Chez les eucaryotes, la machinerie ribosomale va glisser le long de l'ARNm lors de la traduction, en éliminant un à un les complexes de jonction d'exon (EJC) jusqu'à arriver au codon stop physiologique. L'EJC est un complexe protéique positionné 20 à 24 nucléotides avant chaque jonction exon-exon (Figure 19A). Lors de la présence d'un PTC

sur l'ARNm, le ribosome s'arrête à son niveau. Les EJC qui n'ont donc pas été enlevés de l'ARNm sont un signal recrutant le complexe protéique du NMD. Les protéines du complexe NMD recrutent d'autres protéines, notamment des endonucléases et des kinases qui vont ainsi couper l'ARNm au niveau du PTC. L'enclenchement de la dégradation de l'ARNm implique la dissociation des sous-unités ribosomales et l'action d'exosomes et d'exonucléases (Figure 19B) (Hug et al., 2016).

Les sélénoprotéines utilisent le codon UGA pour intégrer la Sec lors de la traduction et sont donc des cibles potentielles pour le NMD. C'est le cas pour les SELENOW, P, H et GPX1 qui sont dégradées par le NMD en cas de déficience en Se. En revanche, la GPX4, aussi prédite comme sensible au NMD, voit son expression demeurer stable lors d'une déficience en Se et n'est donc pas dégradée, indiquant alors que d'autres mécanismes de régulation doivent exister (Seyedali and Berry, 2014).

Toujours au niveau transcriptionnel, eIF4a3, un facteur d'initiation de la traduction des eucaryotes, fût également démontré comme un régulateur de l'expression des sélénoprotéines. Celui-ci fait partie du complexe EJC, capable de se lier de manière compétitive à l'élément SECIS, empêchant la liaison de SBP2 ainsi que l'insertion de la Sec et participe alors à l'activation du NMD. Induit en cas de déficience en Se, eIF4a3 se lie préférentiellement aux éléments SECIS des protéines liées au stress, comme la GPX1, mais a peu d'affinité pour les éléments SECIS de sélénoprotéines de ménage comme la GPX4 ou la TRXND1, probablement à cause des boucles apicales des éléments SECIS qui diffèrent entre ces deux groupes (Budiman et al., 2009). De nombreux facteurs intervenant dans la biosynthèse des sélénoprotéines sont capables de lier l'élément SECIS, comme SBP2 ou encore la nucléoline. Ces différents facteurs peuvent ainsi intervenir dans la régulation des sélénoprotéines, en fonction de la hiérarchie de celles-ci. C'est en effet ce qu'a démontré l'équipe de Squires, montrant que SBP2 se lie avec plus d'affinité à certaines sélénoprotéines par rapport à d'autres, modulant ainsi la sensibilité du NMD pour les sélénoprotéines (Squires et al., 2007). Pour autant, la voie NMD a des limites, puisqu'elle ne dégrade que les ARNm dont le PTC est à plus de 50-55 nucléotides de la dernière jonction exon-exon.

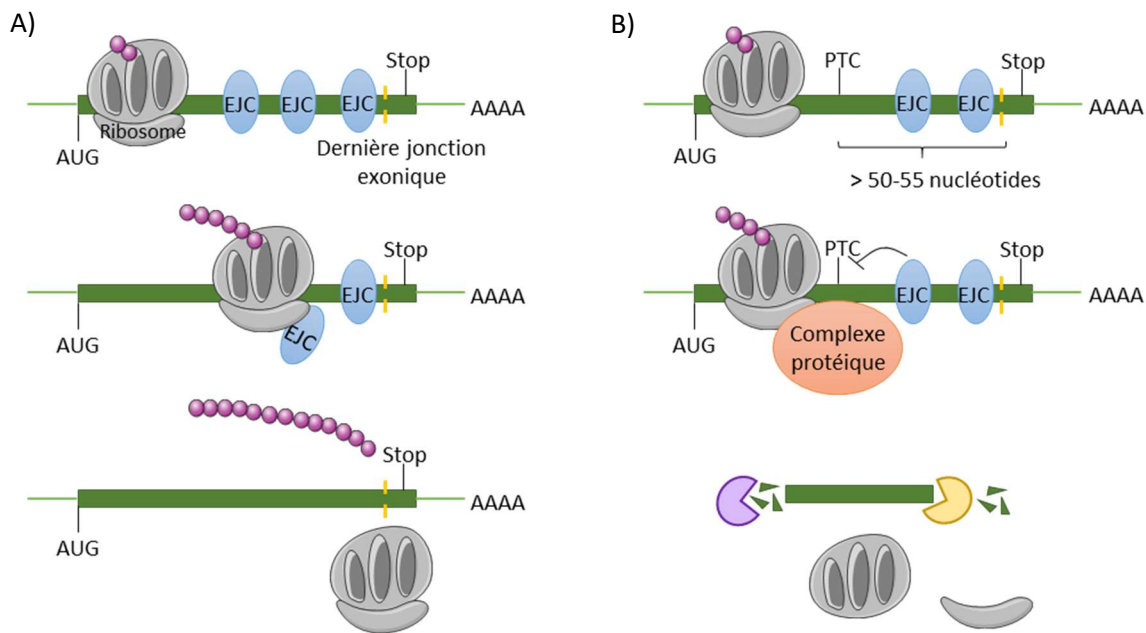


Figure 19 : Dégradation des ARNm non-sens par la voie NMD. A) Lors de la traduction, le ribosome glisse le long de l'ARNm, éliminant un à un les complexes de jonction entre exons (EJC). Ces derniers sont situés 20-24 nucléotides avant chaque jonction exonique. La traduction se termine lorsque le ribosome atteint le codon stop. B) Un codon stop prématuré (PTC) induit l'arrêt du ribosome à son niveau si celui-ci est situé à plus de 50-55 nucléotides de la dernière jonction exonique. Dans ce cas, les EJC restants sont un signal pour le recrutement du complexe protéique NMD permettant la dissociation du ribosome. La présence du complexe protéique NMD induit également la dégradation de l'ARNm notamment par des endonucléases et l'exosome. *Adapté de Kurosaki et al., 2019. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

Cependant, la SELENOW fait partie des sélénoprotéines dont l'expression diminue fortement en cas de déficience en Se, bien que son codon UGA, codant la Sec, n'est situé que 15 nucléotides en amont de la dernière jonction exonique (Sunde and Raines, 2011).

Au-delà du NMD ou de l'intervention de protéines spécifiques, un autre mécanisme de régulation des sélénoprotéines a pu être démontré. Celui-ci concerne les isoformes de l'ARNt de la Sec en fonction de sa méthylation. Chez les mammifères, l'ARNt[Ser]^{Sec} existe sous deux isoformes, différant par la présence ou non d'une méthylation au niveau de la paire de base en position 34. L'expression des isoformes dépend de la biodisponibilité en Se, induisant une expression de l'isoforme non méthylée en cas de faible concentration de Se et une diminution de la présence de l'isoforme méthylée. Il est également important de noter que les sélénoprotéines liées au stress, comme la GPX1, les SELENOT ou W par exemple, requièrent

l'isoforme méthylée pour leur biosynthèse (Carlson et al., 2009). La teneur en Se régule alors le ratio d'expression des deux isoformes de l'ARNt[Ser]^{Sec}, et ainsi le taux d'expression des différentes sélénoprotéines.

Les mécanismes de régulation mis en place permettent à l'organisme d'ajuster sa production de sélénoprotéines, selon leur hiérarchie d'expression, et ainsi maintenir une homéostasie redox physiologique et par conséquent l'activité de processus biologiques. Cependant, dans certains cas, la machinerie cellulaire ne peut faire face à des déficiences en sélénoprotéines, induisant des pathologies.

2.2.4) Sélénoprotéines et pathologies

a) Anomalies liées au sélénium

Au cours des deux dernières décennies, il a été montré que le Se est lié de manière directe ou indirecte à bon nombre de maladies humaines. La maladie de Keshan, une cardiomyopathie, a été la première à témoigner des effets néfastes d'une déficience en Se. Plusieurs études se sont ainsi succédées montrant que le stress oxydatif est un des principaux facteurs du développement et de la progression de pathologies. En ce sens, l'étude de cohortes de patients, ainsi que la mise en place de modèles de souris déficientes en Se ont permis de montrer que les sélénoprotéines permettent un maintien de l'homéostasie redox évitant la survenue de différentes pathologies. En effet, un apport en Se a notamment des effets bénéfiques sur l'augmentation de l'activité des GPX et des TXNRD et la réduction des dommages oxydatifs causés par une ischémie-reperfusion cardiaque (Tanguy et al., 2011a).

Les déficits en Se agissent également sur les systèmes biologiques en altérant l'immunocompétence des patients, par exemple au niveau thyroïdien ou encore en permettant la progression d'infections virales comme le HIV (Duntas and Benvenga, 2015). De plus, la perte de l'homéostasie redox suite à un faible apport en sélénium est impliquée dans l'incidence du diabète de type 2, ainsi que dans la baisse de fertilité et dans le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou les désordres dépressifs (Roman et al., 2014). Les études réalisées sont basées principalement sur l'activité des trois grandes familles de sélénoprotéines, indiquant qu'elles diminuent les risques de cancer, comme TXNRD1 permettant l'activation du suppresseur de tumeur p53 (Young et al., 2010). En

revanche, il est admis que la GPX2 est surexprimée lors d'un cancer et stimule la prolifération des cellules tumorales, en diminuant leur stress oxydatif interne (Emmink et al., 2014).

Pour autant, les pathologies liées aux sélénoprotéines ne dépendent pas toutes de l'apport en Se puisqu'elles peuvent également être acquises suite à des anomalies génétiques.

b) Sélénoprotéines et altérations génétiques

La première maladie génétique non héréditaire liée à une sélénoprotéine fût découverte dans le cas d'une dystrophie musculaire congénitale caractérisée par une détresse respiratoire et une rigidité des vertèbres. Ces symptômes proviennent d'une mutation non-sens au niveau de la SELENON, traduisant le codon de la Sec en codon stop et amenant ainsi la production d'une protéine tronquée. En effet, la perte de fonction de la SELENON induit des anomalies de l'homéostasie calcique, puisque cette sélénoenzyme n'est plus capable de réguler l'activité du récepteur à la ryanodine (Moghadaszadeh et al., 2001; Jurynek et al., 2008). Une récente étude a pu démontrer que l'activité redox de la SELENON au sein du RE est dépendante des niveaux calciques et que cette sélénoprotéine transmembranaire modifie son organisation structurale en fonction des taux de calcium présents au niveau du RE (Chernorudskiy et al., 2020).

Les altérations génétiques peuvent provenir directement de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines, faisant intervenir les éléments *cis* et *trans* régulateurs. C'est en 2005 qu'une étude a pu établir le lien entre les symptômes de patients et des mutations sur le gène de SBP2. En effet, des mutations non-sens sur ce gène induisent une baisse des taux plasmatiques en sélénoprotéines (SELENOP et GPX3) ainsi qu'une diminution de l'activité de la DIO2 au niveau des fibroblastes de ces patients. Les mutations de SBP2 ont pour conséquences un métabolisme thyroïdien anormal avec des taux en T3 trop faibles par rapport à la normale (Dumitrescu et al., 2005). Une jeune fille Brésilienne montrant un métabolisme thyroïdien anormal présentait une mutation au niveau du gène de SBP2. Cette patiente souffrait également d'obésité ainsi que de retard mental et de troubles moteurs profonds (Azevedo et al., 2010). Une autre cohorte de patients a été décrite comportant des mutations au niveau de la SecS, enzyme permettant la conversion de la Sec sur l'ARNt. Ces patients présentaient une atrophie cérébro-cerebelleuse progressive et notamment un retard mental profond.

Les déficiences en Se, ainsi que les mutations identifiées sur les gènes du sélénosome témoignent une nouvelle fois de l'importance de cet oligoélément pour le bon fonctionnement

de l'organisme. Les pathologies décrites indiquent également que les sélénoprotéines ont un rôle lors du développement, à la fois au niveau périphérique et du SNC.

2.3) Sélénoprotéines et ontogenèse

2.3.1) Les sélénoprotéines sont nécessaires au développement

a) Importance des sélénoprotéines dès l'embryogenèse

Le rôle des sélénoprotéines lors du développement est entre autres démontré grâce à des modèles d'inactivation génétique envers une protéine cible ou en invalidant la totalité des sélénoprotéines. Ainsi, l'inactivation complète de *Trsp*, le gène codant l'ARNt^{[Ser]Sec}, chez l'animal induit une létalité embryonnaire avant 6,5 jours de gestation (Bösl et al., 1997). De plus, son inactivation au sein d'organes spécifiques montre l'importance des sélénoprotéines lors du développement, aussi bien au niveau des cellules épithéliales, de la peau ou du muscle cardiaque, conduisant pour ce dernier à une létalité 12 jours après la naissance (Shrimali et al., 2007; Hatfield et al., 2014). De même, des modèles murins KO pour les sélénoprotéines TXNRD 1 et 2 (Conrad et al., 2004; Jakupoglu et al., 2005), la GPX4 (Yant et al., 2003), ainsi que la SELENOT (Boukhzar et al., 2016) indiquent leur(s) fonction(s) essentielle(s) lors du développement puisque leur inactivation induit une létalité embryonnaire entre E6,5 et E13.

La fonction capitale de chacune de ces sélénoprotéines lors du développement est pourtant différente. Concernant les deux TXNRD, la létalité induite par leur inactivation est due à des fonctions non redondantes. En effet, les embryons KO pour la TXNRD1 présentent un retard de croissance avec un défaut de formation du mésoderme aboutissant à une absence de gastrulation (Bondareva et al., 2007). L'inactivation de la TXNRD2 perturbe quant à elle l'hématopoïèse ainsi que le développement cardiaque, augmente l'apoptose au niveau du foie et la sensibilité des fibroblastes au stress oxydatif (Conrad et al., 2004).

La létalité embryonnaire induite par l'absence de la GPX4 peut s'expliquer en fonction de l'expression de ses isoformes. L'expression physiologique de la GPX4 mitochondriale (m-GPX4) diminue une fois le milieu de la gestation atteint, moment du pic de neurogenèse (E14,5) et l'utilisation de siRNA envers la m-GPX4, ayant une action anti-apoptotique, provoque un retard neurodéveloppemental qui proviendrait d'une apoptose excessive au niveau du cerveau postérieur. De plus, une apoptose excessive devient préjudiciable pour le développement du

SNC, puisque la fin de la gestation permet la maturation des cellules générées, accompagnée d'une baisse de l'apoptose. L'ensemble de ces données indiquent que l'absence de m-GPX4 provoque une apoptose exacerbée tout au long du neurodéveloppement embryonnaire. Enfin, la létalité embryonnaire observée suite au KO de la GPX4 est de surcroît due à l'absence de l'isoforme nucléaire de la GPX4, nécessaire au développement cardiaque (Borchert et al., 2006).

En revanche, les mécanismes induisant la létalité embryonnaire en l'absence de la SELENOT n'ont pas encore été élucidés. Bien que l'absence indépendante de chaque sélénoprotéine n'induit pas obligatoirement une létalité embryonnaire, le rôle de certaines d'entre elles dans l'ontogenèse fût également recherché.

b) Implication dans des voies de signalisation

Les DIO et leur action dans la régulation des hormones thyroïdiennes ont fait l'objet de nombreuses études. Lors du développement, les HT interviennent notamment lors de la différenciation cellulaire en inhibant leur potentiel prolifératif. Pour exemple, la régulation d'un taux excessif de HT évite une différenciation prématurée des neurones pyramidaux et de leurs épines dendritiques (Pasquini and Adamo, 1994). Les DIO 2 et 3 vont alors moduler la concentration de T3 circulante et intracellulaire. Cette régulation est également requise pour le développement et l'homéostasie musculaire. En effet, la différenciation musculaire est associée à une augmentation des niveaux des HT au sein des myoblastes. La DIO2 permet ainsi une augmentation rapide de T3 induisant l'expression du facteur de transcription MyoD, qui permet à son tour la formation des myotubes et inhibe la prolifération cellulaire. L'expression de DIO2 est sous le contrôle du facteur de transcription FoxO3, membre de la famille de FoxO régulant la myogenèse et connu pour activer la transcription de MyoD (Dentice et al., 2010).

Certaines voies de signalisation ont un rôle majeur lors du développement puisque leur ajustement permet soit la prolifération, soit la différenciation ou encore la maturation des tissus. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine a fait l'objet de nombreuses études permettant d'affirmer son rôle incontournable lors du développement. Brièvement, la fixation d'un ligand de la famille Wnt sur son récepteur Frizzled, induit la stabilisation et l'accumulation de β -caténine, pouvant désormais se lier à des FT, puisque cette protéine est normalement dégradée en l'absence de protéine Wnt. Pendant l'embryogenèse, les protéines Wnt sécrétées permettent la communication intercellulaire, interviennent dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur,

dans le maintien de la totipotence des cellules souches ou encore dans l'activation de leur différenciation (Steinhart and Angers, 2018). L'équipe de Kipp et collaborateurs s'est alors intéressée à l'expression de la GPX2 et des TXNRD2 et 3 au niveau de l'intestin, montrant que leur présence est régulée par la voie Wnt. La régulation de l'expression de ces sélénoprotéines au niveau des cryptes intestinales témoigne de leur importance pour la prolifération et l'apoptose des cellules lors du développement (Kipp et al., 2012).

c) Un tissu, plusieurs sélénoprotéines

Le développement musculaire fait intervenir plusieurs sélénoprotéines. Comme nous l'avons vu, la DIO2 est indispensable à l'expression du facteur de transcription MyoD pour la formation des myotubes. Cependant, en plus de sa forte expression lors de l'implantation et de la gastrulation, la SELENOW est fortement exprimée dans les myoblastes en prolifération (Roman et al., 2014). Cette sélénoprotéine serait ainsi impliquée dans la prolifération de ces cellules en modulant leur cycle cellulaire. En effet, la SELENOW interagit avec la protéine 14-3-3, impliquée dans divers processus cellulaires. Lors du cycle cellulaire, un arrêt se produit lors de la transition G2-M dû à l'interaction de la protéine 14-3-3 avec un autre acteur moléculaire. La SELENOW permet alors le redémarrage du cycle cellulaire lors de la transition G2-M en permettant la dissociation du pont disulfure de la protéine 14-3-3 avec ce second acteur moléculaire (Park et al., 2012). De plus, une étude chez le poisson zèbre a montré que le développement des fibres musculaires est possible, entre autres, grâce à l'action de la SELENON et sa capacité à libérer le calcium en interagissant avec la récepteur à la ryanodine (Jurynek et al., 2008).

Pour dernier exemple, les sélénoprotéines jouent également un rôle dans la fertilité lors de la spermatogenèse. Les thioredoxin/glutathione reductase (TGR) ainsi que la GPX4 interviennent dans le développement et renouvellement du sperme. En effet, les TGR isomérisent les ponts disulfures des spermatides, nécessaires à leur structure, tandis que la GPX4 permet la condensation de la chromatine lors de la maturation du sperme (Pfeifer et al., 2001; Su et al., 2005). Enfin, bien que la SELENOV soit exprimée dans les spermatocytes au niveau des tubes séminifères, sa fonction précise dans la spermatogenèse reste inconnue (Kryukov et al., 2003).

L'activité oxydoréductase des sélénoprotéines est primordiale pour l'ontogenèse des individus, ainsi que pour le fonctionnement de certains tissus comme les testicules ou le muscle, même chez l'adulte. Leur activité régit des processus périphériques mais également du SNC.

2.3.2) Sélénoprotéines et neurodéveloppement

a) Localisation et expression des sélénoprotéines au niveau cérébral

Nous avons précédemment pu voir que le cerveau est à l'apex de la hiérarchie pour le maintien de la présence de Se et que ce dernier est présent de manière plus importante au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébelleux et cérébral. De plus, les neurones sont identifiés comme le site premier d'expression des sélénoprotéines, comptant une expression abondante au niveau des neurones corticaux et hippocampiques. Cette même analyse a également permis de mettre en évidence l'expression de l'ARNm des 24 sélénoprotéines murines au niveau cérébral, avec une expression particulièrement importante des GPX4, SELENOK, M, W, et F dans certaines structures, dont le cortex cérébral (Zhang et al., 2008). Mais ces protéines sont également retrouvées dans différents types cellulaires neuraux, comme les astrocytes, la microglie ou les oligodendrocytes (Hoppe et al., 2008). Les GPX1 et 4 sont les formes majoritaires retrouvées au niveau du SNC. Tandis que la GPX1 est exprimée à la fois dans les neurones et les astrocytes, la GPX4 est retrouvée spécifiquement dans les neurones en condition physiologique, et ce dans toutes les couches corticales lors du développement murin, permettant son action antioxydante. La présence de celle-ci diminue lors de la maturation postnatale, mais reste présente chez la souris adulte. Cependant, en conditions pathologiques comme suite à une lésion cérébrale, l'expression de la GPX4 augmente, mais ce au niveau des astrocytes (Savaskan et al., 2007).

La SELENOW est également une des sélénoprotéines fortement exprimée au sein des neurones corticaux, hippocampiques et cérébelleux, voyant son expression augmenter continuellement lors du développement embryonnaire (Loflin et al., 2006). Plus précisément, cette protéine est localisée à la fois au niveau du soma et des prolongements cellulaires. De plus, la SELENOW ainsi que la GPX4, sont exprimées au niveau des synapses. Cependant, à l'inverse de la GPX4, la présence de la SELENOW est dépendante de la SELENOP, puisque son expression au niveau synaptique diminue fortement chez des souris invalidées pour la SELENOP (Raman et al., 2013). Ces données suggèrent alors leur implication dans

l'homéostasie redox lors du neurodéveloppement ainsi que dans le développement et le maintien des synapses.

Les sélénoprotéines sont ainsi largement exprimées au sein du SNC, avec des localisations tissulaires et subcellulaires à la fois communes et distinctes, leur permettant d'établir différentes fonctions notamment lors du neurodéveloppement.

b) Quelques fonctions permettant le neurodéveloppement

La TXNRD1 est fortement exprimée au niveau du tissu nerveux lors de l'embryogenèse, au niveau du tube neural ou du cerveau antérieur (Jakupoglu et al., 2005). Comme son KO total est létal, l'action de la TXNRD1 lors du développement cérébral a été étudiée dans un modèle d'inactivation conditionnelle utilisant le système Cre-lox sous l'influence du promoteur nestine (spécifique des cellules neurales). Les souris invalidées présentent un retard de croissance ainsi que des problèmes de coordination. Les auteurs ont alors poussé leurs investigations, montrant que l'absence de la TXNRD1 induit une baisse de la prolifération des cellules granulaires du cervelet, ainsi qu'une désorganisation des couches cérébelleuses due à un défaut de lamination des cellules de Purkinje. Ces anomalies engendrent alors une hypoplasie et une ataxie cérébelleuse, prouvant le rôle de la TXNRD1 dans la prolifération et la mise en place de ce tissu (Soerensen et al., 2008).

Le développement d'une seconde population neuronale est également impacté en l'absence de sélénoprotéines. Cela concerne les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV+). Ces interneurons sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif et expriment fortement le récepteur ApoER2 (Pitts et al., 2012). L'inactivation des sélénoprotéines spécifiquement dans ces interneurons engendre un blocage ou un retard de leur développement, en inhibant leur différenciation ou la prolifération de leurs progéniteurs. Ces anomalies se traduisent par une activité de type épileptique spontanée sur coupes d'hippocampe *in vitro*. Ces observations sont en partie retrouvées lorsque la GPX4 seule est invalidée au sein des interneurons PV+ (Wirth et al., 2010). L'implication des sélénoprotéines dans la prolifération cellulaire lors du neurodéveloppement est également proposée chez un autre modèle, le poisson zèbre. En effet, lors du développement du poisson zèbre, la SELENOH est exprimée au niveau des tissus prolifératifs comprenant la zone ventriculaire cérébrale. Les auteurs de ces travaux ont également montré que les cellules dont l'expression de la SELENOH est diminuée par des siRNA sont plus sensibles au stress oxydatif (Novoselov et al., 2007).

La neurotransmission est un mécanisme clé pour le fonctionnement de l'organisme, et agit dès le plus jeune âge, permettant une coordination des réseaux neuronaux lors du développement. Cependant, la transmission des messages nerveux demande de l'énergie aux cellules, pouvant alors engendrer un stress oxydatif. Des études ont révélé que l'inhibition de la GPX4 et la SELENOW par des siRNA, augmente la susceptibilité des neurones invalidés à déclencher une apoptose induite par un excès d' H_2O_2 (Savaskan et al., 2007; Chung et al., 2009). Nous avons précédemment vu que la GPX4 et la SELENOW sont exprimées au niveau des synapses et qu'un déficit en Se module les taux de neurotransmetteurs au niveau cortical. L'expression des sélénoprotéines pourrait alors contrôler l'homéostasie redox à ce niveau et éviter la mort neuronale suite à une activité nerveuse (voir Figure 20 pour le résumé des fonctions principales).

Nous avons vu que les sélénoprotéines sont indispensables au neurodéveloppement, par les diverses fonctions que nous avons pu évoquer. Néanmoins, le rôle et le mode d'action de chacune d'entre elles reste encore à élucider, à l'instar de la sélénoprotéine T, qui fera l'objet de la suite de cette introduction.

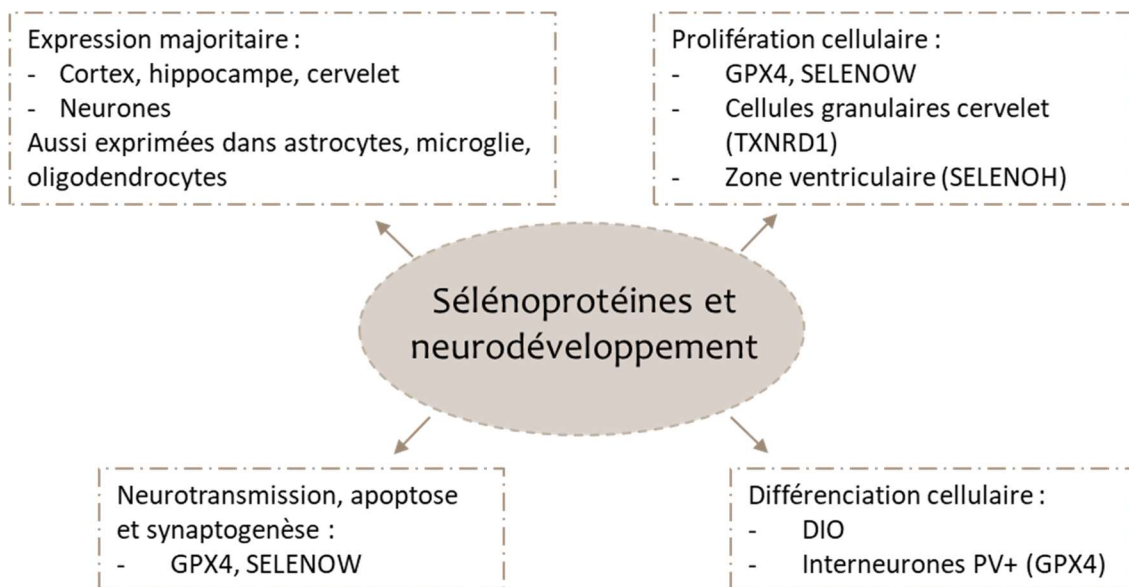


Figure 20 : Expression et fonctions principales de sélénoprotéines lors du neurodéveloppement. Les fonctions associées aux sélénoprotéines recensées ici, dépendent de leurs caractéristiques d'oxydo-réduction et ont été identifiées dans le modèle murin ou chez le poisson zèbre.

2.4) La sélénoprotéine T

2.4.1) Structure de la sélénoprotéine T

C'est à la fin des années 90 que la sélénoprotéine T (SELENOT) fut prédite pour la première fois au moyen d'approches bio-informatiques. Kryukov et ses collaborateurs ont en effet développé le programme SECISearch, permettant de détecter les éléments SECIS au sein des séquences nucléotidiques. Ainsi, ils ont identifié deux nouvelles sélénoprotéines, dont la SELENOT (Kryukov et al., 1999). De futures analyses génomiques ont mis en évidence la forte conservation de la SELENOT chez les mammifères. Par exemple, celle-ci contient 99% d'identité de séquence entre l'Homme et le rongeur (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*), ou encore une séquence totalement identique entre l'Homme et le Macaque Rhésus (*Macaca mulatta*). La SELENOT est également présente chez d'autres espèces, comme le coq (*Gallus gallus*, avec une identité de séquence de 95%), le poisson zèbre (*Danio rerio*) ou bien encore chez des plantes, comme l'algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*). De plus, les recherches ont pu identifier la présence d'homologues de la SELENOT chez des insectes (*Drosophila melanogaster*) ou bien des plantes terrestres (*Arabidopsis thaliana*), ayant un résidu cystéine à la place de la Sec (Moustafa and Antar, 2012), ce qui témoigne de la forte conservation de cette protéine au sein des espèces vivantes.

L'analyse structurale de l'ARNm de la SELENOT et de son gène montre que cette sélénoprotéine est codée par six exons. Le deuxième exon comprend le résidu Sec. L'élément SECIS est quant à lui positionné au niveau de la région 3' non-codante, 509 nucléotides en aval du codon UGA, permettant ainsi de pouvoir décoder le codon UGA en codon pour l'intégration de la Sec (Figure 21A). Des analyses par des programmes informatiques, tels que TargetP et NetNGlyc, indiquent également un domaine hydrophobe transmembranaire en N-terminal, vérifié expérimentalement par Grumolato et al. (2008), ainsi qu'un site potentiel de N-glycosylation. Ces auteurs et d'autres, ont également pu identifier le centre actif redox de la protéine et le motif Cys-x-x-Sec (CXXU) permettant l'activité oxydoréductase de la SELENOT (Grumolato et al., 2008; Moustafa and Antar, 2012; Boukhzar et al., 2016). A savoir que ce centre redox est similaire à celui retrouvé dans les thiorédoxines, les glutarédoxines et comme vu plus haut, chez les membres de la famille Rdx (Kryukov et al., 1999).

La séquence de la SELENOT exprimée chez les eucaryotes contient de plus l'élément SECIS de type II, avec le motif CXXU localisé entre le brin $\beta 1$ et l'hélice $\alpha 1$ (Figure 21B). La traduction de la SELENOT produit une protéine de 195 acides aminés, ayant un peptide signal

de 19 acides aminés, conservé chez les rongeurs et l'Homme (Grumolato et al., 2008), ainsi qu'un arrangement des structures secondaires et tertiaires similaires à celles retrouvées chez les protéines de type thiorédoxine et la SELENOW (Figure 21C) (Aachmann et al., 2007).

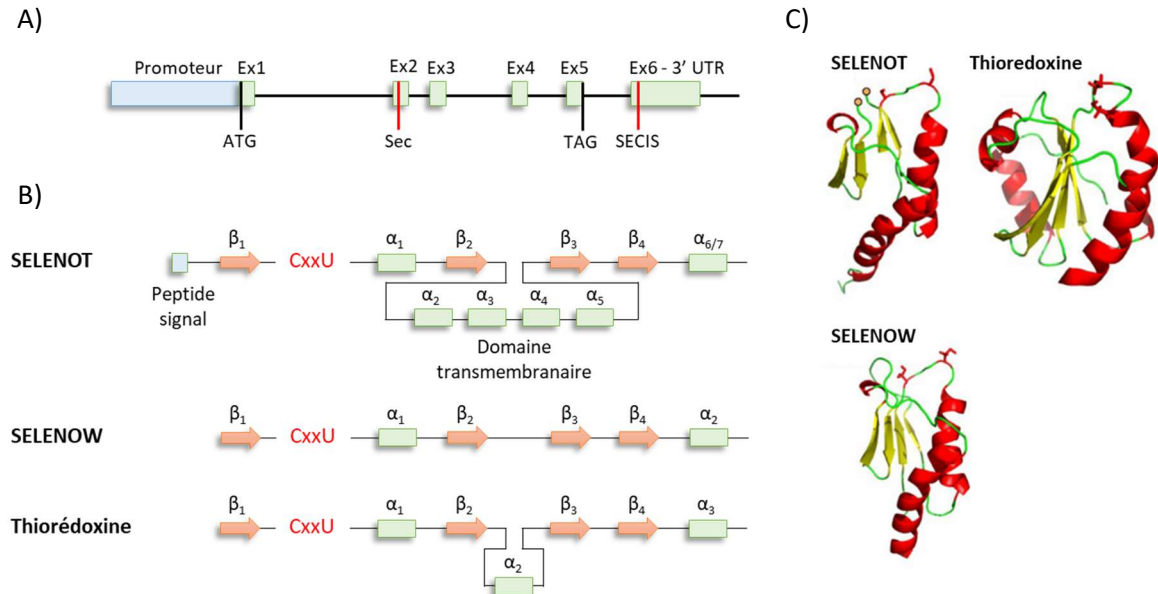


Figure 21 : Structure génomique et protéique de la SELENOT. **A)** Le gène de la SELENOT contient 6 exons (Ex, vert) après épissage. Les sites initiateur (ATG), de la Sec (TGA) et du codon stop (TAG) sont annotés. L'élément SECIS est localisé au niveau de la région 3' non-codante de l'ARNm. **B)** Représentation de la structure secondaire de la SELENOT, contenant un peptide signal et sa comparaison avec deux autres sélénoprotéines homologues, montrant des similarités d'organisation. Ces trois protéines ont en commun un motif de type thiorédoxine (β-α-β-β-α) et un site catalytique CxxU situé après le premier brin β1. La SELENOT contient en plus un domaine transmembranaire comprenant quatre hélices α localisées entre les brins β2 et β3, tandis qu'une seule hélice α est retrouvée pour la thiorédoxine. **C)** Représentation des structures tertiaires de ces trois sélénoprotéines homologues, montrant une forte similarité de repliement. *Adapté de Anouar et al., 2018 et Aachmann et al., 2007.*

2.4.2) Expression et localisation de la SELENOT

Les études réalisées au sein du laboratoire ont permis d'identifier l'expression de la SELENOT chez le rat, à différents stades du développement. En effet, cette sélénoenzyme est présente dès les premiers stades embryonnaires (premières observations réalisées par hybridation *in situ* à E7) de manière ubiquiste (Grumolato et al., 2008). Au 20^{ème} jour embryonnaire, les analyses de l'ARNm de la SELENOT et de sa protéine nous montrent sa

présence au sein de divers organes, de manière plus importante au niveau du cœur, de régions cérébrales, ainsi qu'au sein de tissus endocrines comme le foie et les testicules (Figure 22A).

Ces taux diminuent une fois l'âge adulte atteint, pour disparaître dans la plupart des organes, excepté au niveau cérébral et cardiaque, où une expression résiduelle est observée, ainsi qu'au niveau des tissus endocriniens, comme les testicules et la glande pituitaire, où cette fois une expression plus importante persiste (Figure 22B). L'étude plus approfondie au niveau du néocortex de rat, révèle une forte réduction de l'expression de la SELENOT entre les stades embryonnaires et adulte. Vers E15, la SELENOT est exprimée au sein des neurones immatures exprimant la nestine (marqueur des cellules souches et progéniteurs neuraux indifférenciés), dans les couches ventriculaires (zones de prolifération) et intermédiaire (zone de migration), ainsi qu'au niveau des neuroblastes en différenciation, exprimant la doublecortine (protéine associée aux microtubules exprimée par les précurseurs neuronaux et neurones immatures). Lors des deux premières semaines postnatales, la SELENOT est toujours présente au niveau de ces zones mais également au sein des astrocytes, exprimant le marqueur GFAP (filament intermédiaire présent dans les cellules gliales) (Figure 23) (Tanguy et al., 2011b).

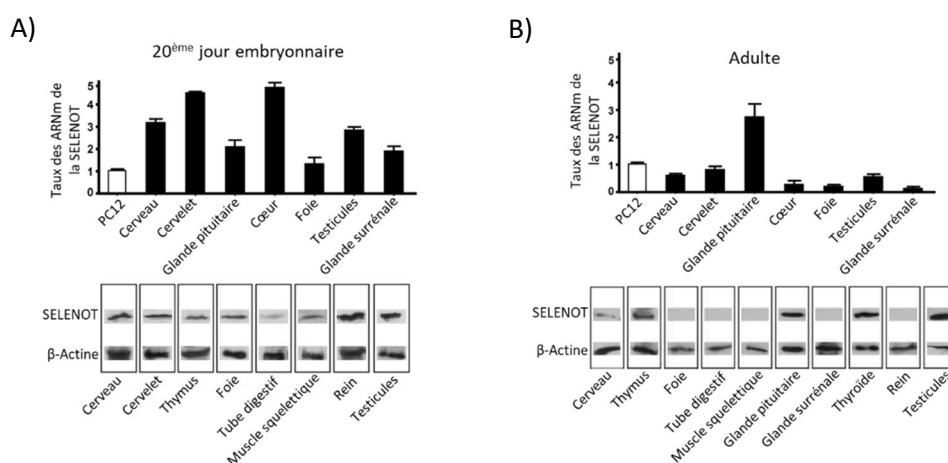


Figure 22 : Expression tissulaire de la SELENOT chez le rat. A) Au 20^{ème} jour embryonnaire, les taux relatifs de l'ARNm de la SELENOT sont importants, ainsi que les niveaux protéiques, notamment au niveau cérébral, cardiaque et des testicules. B) L'analyse tissulaire chez le rat adulte montre des taux plus faibles de l'ARNm de la SELENOT, ainsi qu'au niveau protéique, toutefois présents au niveau cérébral et des organes endocriniens. Les taux relatifs ont été obtenus par RT-qPCR et les niveaux protéiques par western blot. *Adapté de Tanguy et al., 2011b.*

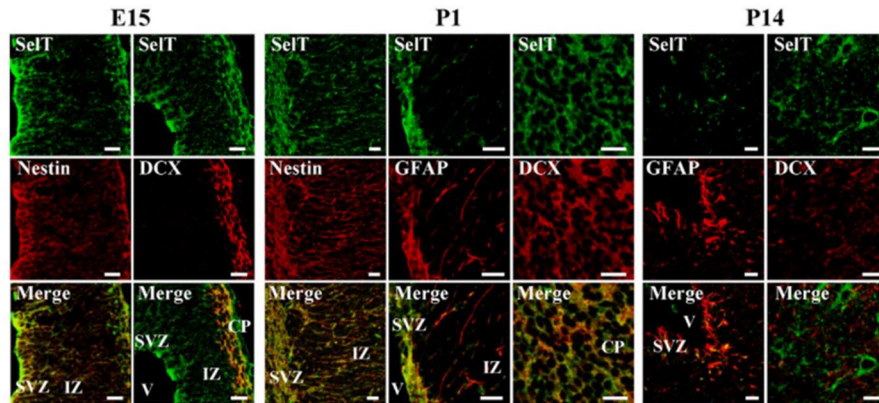


Figure 23 : Localisation de la SELENOT au sein du néocortex de rat. Au 15^{ème} jour embryonnaire, la SELENOT est localisée au niveau de la glie radiaire (marquée par la nestine) au sein de la zone sous-ventriculaire (SVZ), donnant les neuroblastes à ce stade. Elle est également présente au niveau de la zone intermédiaire (IZ), ainsi qu’au niveau des neuroblastes en différenciation (marqués par la doublecortine) localisés dans la plaque corticale (CP). Lors des deux premières semaines après la naissance, la SELENOT est toujours présente au sein de ces zones et colocalise également avec le marqueur de cellules gliales (GFAP). *D’après Tanguy et al., 2011b.*

Malgré cette faible expression observée dans certains tissus chez le rongeur adulte, la SELENOT semble être essentielle puisque la diminution de son expression est limitée lors d’une carence en Se. En effet, l’invalidation de la SELENOP, qui ne permet plus l’arrivée de Se au niveau des tissus, induit une perte de 60% de SELENOT au niveau testiculaire, alors que les niveaux sont maintenus au niveau cérébral (Hoffmann et al., 2007). La SELENOT est également requise au niveau cérébral, notamment par une réexpression lors de pathologies, comme nous allons le voir ci-dessous.

De plus, des études par immunohistofluorescence ont permis de localiser la SELENOT au niveau subcellulaire. En effet, cette dernière est exprimée, au niveau du RE (Dikiy et al., 2007; Grumolato et al., 2008; Prevost et al., 2013). Le domaine transmembranaire hydrophobe de la SELENOT décrit plus haut permettrait son intégration à la membrane du RE (Figure 24).

L’expression de la SELENOT, de l’embryogenèse à l’âge adulte, ainsi qu’au niveau de compartiments subcellulaires laisse présager d’un rôle important dans les processus essentiels au développement, notamment dans le SNC.

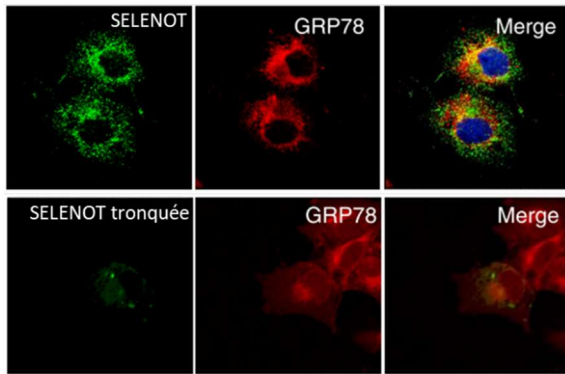


Figure 24 : Localisation subcellulaire de la SELENOT. La SELENOT (en vert, panel du haut) est localisée au niveau du RE, marqué par la protéine GRP78 (en rouge), au sein de cellules PC12. L'utilisation d'une SELENOT avec le domaine transmembranaire tronqué, ne permet plus son attachement au RE (panel du bas). D'après Grumolato et al., 2008.

2.4.3) La SELENOT et ses fonctions

a) Mécanismes cellulaires

C'est par une analyse fortuite dans des cellules de lignée tumorale, les cellules PC12 de phéochromocytome de rat, que notre équipe a découvert la SELENOT et s'est donc intéressée à celle-ci. En effet, le traitement avec le neuropeptide PACAP des cellules PC12 en différenciation induit l'augmentation de l'ARNm de plusieurs enzymes, dont la SELENOT. Le PACAP agit via la voie AMPc/PKA afin d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium, et l'invalidation de la SELENOT dans ces cellules empêche cette augmentation. Ainsi, l'expression de la SELENOT stimulée par le PACAP, régule la mobilisation calcique via son site actif redox, en libérant le calcium du RE (Grumolato et al., 2008). La régulation de l'homéostasie calcique par la SELENOT fut également démontrée dans des études réalisées chez le rat et le poisson rouge. La SELENOT est exprimée au niveau cardiaque chez ces animaux et augmente en situation d'hypoxie chez le poisson. Les auteurs ont alors analysé l'application d'un peptide dérivé de la SELENOT (le PSELT, comprenant le centre redox CVSU de la SELENOT) sur le cœur de rat *ex-vivo*. De manière intéressante, la concentration de 3-nitrotyrosine (marqueur d'un stress oxydatif nitrosatif) augmente en condition hypoxique, mais pas en présence du PSELT. Ce peptide a un effet inotropique positif sur le cœur, possiblement via la voie AMPc/PKA et un mécanisme dépendant de canaux calciques (Rocca et al., 2018; Mazza et al., 2019).

Un des compartiments cellulaires importants pour la mobilisation calcique intracellulaire est le RE. Nous avons vu que la SELENOT est localisée à son niveau et y est retenue grâce à son domaine transmembranaire. Ainsi, elle serait un acteur essentiel pour le recrutement de calcium dans les cellules. De plus, d'autres travaux de notre équipe ont montré

l'importance de la SELENOT pour l'homéostasie du RE, puisque la SELENOT augmente lors d'un stress du RE et joue un rôle dans la N-glycosylation des protéines (Hamieh et al., 2017).

Pour aparté, les protéines venant d'être synthétisées passent par le RE pour subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de ponts disulfures, afin de les stabiliser, l'ajout de lipides ou encore la glycosylation par l'ajout de glycanes afin d'être sécrétées ou intégrées aux membranes plasmiques. Ces modifications leur permettent d'acquérir leur conformation spatiale définitive. Au sein du RE, la N-glycosylation ajoute un oligosaccharide sur un résidu asparagine grâce au complexe protéique membranaire oligosaccharyltransférase (OST). La protéine passe ensuite par le système de contrôle qualité, le cycle calnexine/calréticuline afin d'établir si le repliement de la protéine est conforme ou non. Si tel est le cas, la protéine est transférée au niveau de l'appareil de Golgi, sinon après plusieurs cycles, la protéine est prise en charge par le système de dégradation des protéines associé au RE (ERAD) afin d'être éliminée par le protéasome (Figure 25) (Chevet et al., 2001).

Hamieh et *al.* ont alors inhibé l'expression de la SELENOT au sein de cellules AtT20 (cellules corticotropes de souris) par des siARN et ont observé une accumulation de protéines mal conformées au sein du RE, témoignant d'un dysfonctionnement du système ERAD. De plus, les auteurs ont mis en lumière l'association transitoire de la SELENOT avec les sous-unités STT3A, OST48 et KCP2, faisant partie du complexe OST de type A et ont montré que ces sous-unités voient leur expression diminuer lors de l'inhibition de la SELENOT. Ainsi, la SELENOT serait une sous-unité de ce complexe permettant de maintenir son intégrité. Ainsi, l'invalidation de la SELENOT par la technique de Crispr-Cas9 dans les cellules AtT20 induit une altération de la N-glycosylation de la proopiomélanocortine (POMC), précurseur de l'ACTH et de l' α -MSH (Hamieh et al., 2017). La SELENOT est donc un acteur important dans la N-glycosylation des protéines dans les cellules endocrines. Une autre étude a révélé que la SELENOT est nécessaire à la désacétylation des glycosylphosphatidylinositol (GPI) ancrés aux protéines, une autre modification post-traductionnelle s'effectuant dans le RE et permettant l'ancrage des protéines à la surface cellulaire (Liu et al., 2018).

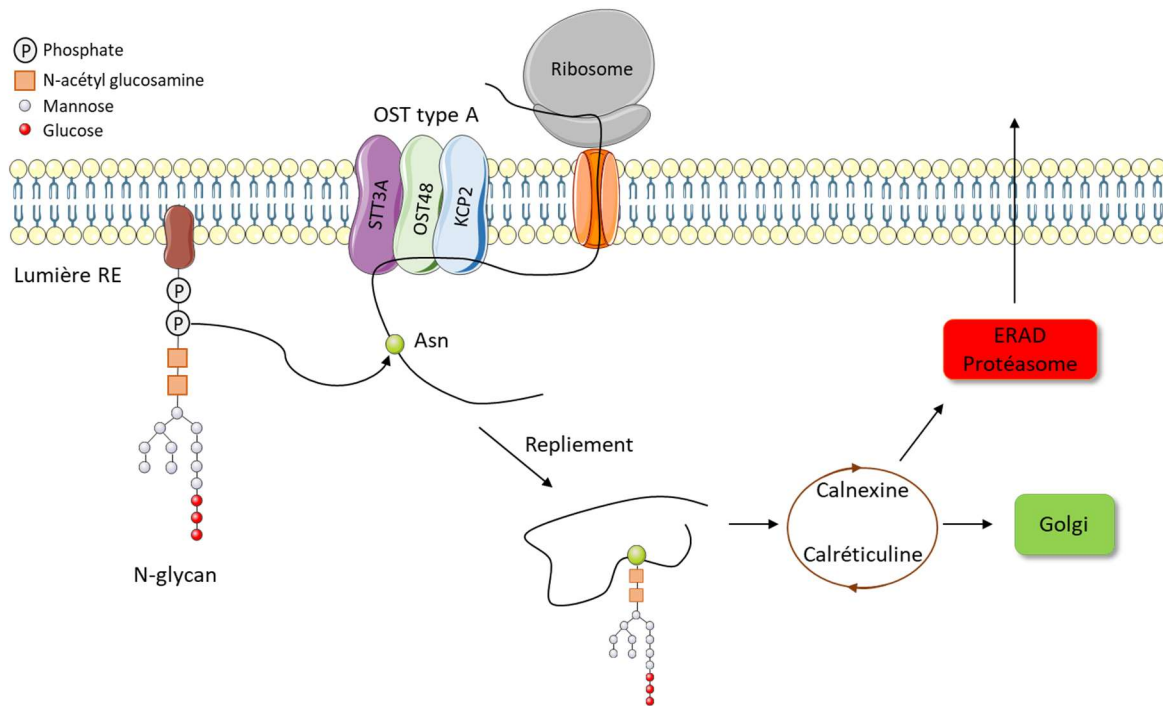


Figure 25 : Représentation de la N-glycosylation au sein du réticulum endoplasmique par l'oligosaccharyltransférase de type A (OST-A). Le N-glycane est synthétisé et ancré à la membrane du RE. En parallèle, la protéine formée lors de la traduction par le ribosome, est transloquée au sein du RE et s'associe au complexe OST-A, composé en partie des sous-unités STT3A, OST48 et KCP2. Par ce complexe, le N-glycane va se lier à une asparagine sur la protéine, permettant son repliement. La protéine repliée passe ensuite par le cycle de contrôle qualité calnexine/calréticuline. Si la protéine est correctement conformée, elle est dirigée vers l'appareil de Golgi. Si au contraire, la protéine présente des anomalies de conformation, elle est prise en charge par le système ERAD et éliminée par le protéasome. *Adapté de Mohanty et al., 2020 et Pothion et al., 2020. Réalisé grâce à la banque d'images smart.servier.com.*

b) Implications de la SELENOT dans des pathologies

Les fonctions décrites de la SELENOT en font un acteur essentiel pour le maintien de la physiologie cellulaire. Une récente étude portant sur les altérations induites après ischémie/reperfusion a démontré l'effet protecteur de celle-ci. En effet, l'expression de la SELENOT augmente après ischémie/reperfusion dans le cœur de rat. Afin de comprendre son rôle, les auteurs ont réalisé une ischémie/reperfusion sur des cœurs *ex vivo* et administré le peptide PSELT après ischémie. Ils ont remarqué une diminution des dommages fonctionnels causés par l'ischémie, ainsi qu'une diminution de la mort cellulaire par apoptose des cardiomyocytes et une baisse de la production de ROS intracardiaques (Rocca et al., 2018). Le PSELT améliore ainsi la récupération fonctionnelle en agissant en intracellulaire puisque celui-ci est capable de traverser les membranes biologiques (Alsharif et al., 2021).

L'effet protecteur de la SELENOT peut aussi s'opérer lors de maladies neurodégénératives. Les études réalisées par Boukhzar et al., sur des cellules de neuroblastome, montrent que l'application de MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, une neurotoxine dont la forme oxydée MPP⁺ est toxique pour les neurones dopaminergiques et induit les symptômes des patients Parkinsoniens *in vivo*), conduit à une augmentation de la SELENOT dans ces cellules. L'administration de MPTP chez la souris conduit également à une surexpression de la SELENOT au niveau du striatum, dans les neurones dopaminergiques, ainsi qu'une stimulation de son expression dans les astrocytes. De plus, la surexpression de cette enzyme s'est avérée bénéfique pour la survie des neurones dopaminergiques, en diminuant les niveaux de ROS induits par le MPP⁺. Les auteurs ont également étudié les effets du MPTP chez une lignée de souris développée au laboratoire et invalidée pour la SELENOT, spécifiquement au sein des cellules neurales. Leurs résultats confortent l'effet protecteur de cette protéine, puisque son absence conduit à une augmentation des niveaux de ROS dans les neurones dopaminergiques, accompagné d'une diminution de la quantité de dopamine dans le striatum, provoquant des altérations motrices (Boukhzar et al., 2016).

c) Implications lors du neurodéveloppement

Bien que les mécanismes d'action de la SELENOT ne soient pas pleinement compris au niveau central, elle apparaît comme une oxydoréductase essentielle pour la neuroprotection, que ce soit pour des accidents cérébraux ou encore des maladies neurodégénératives où son expression est stimulée. De plus, nous avons vu que son expression est importante lors du neurodéveloppement et qui plus est, vitale, puisque l'invalidation totale de la SELENOT est létale au moins à partir du 8^{ème} jour embryonnaire (Boukhzar et al., 2016).

Le rôle de la SELENOT lors du neurodéveloppement a alors été étudié au sein du laboratoire chez la lignée de souris invalidée pour la SELENOT spécifiquement dans le lignage neural, au moyen du système Cre-lox. Les souris floxées obtenues par l'insertion de site loxP de part et d'autre des exons 2 et 3 de la SELENOT (contenant le centre catalytique) ont ensuite été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous l'influence du promoteur nestine, permettant d'invalider la SELENOT par recombinaison génétique (Figure 26A). Castex et *al.* ont ainsi observé une diminution du volume cérébral total de 17% et 9%, respectivement 7 jours et 12 semaines après la naissance. Plus précisément, le volume du néocortex diminue de 16%, celui du cervelet de 21% et de 14% pour l'hippocampe 7 jours après

la naissance. Toutefois, ces variations ne sont plus présentes chez les souris KO adultes (Figure 26B).

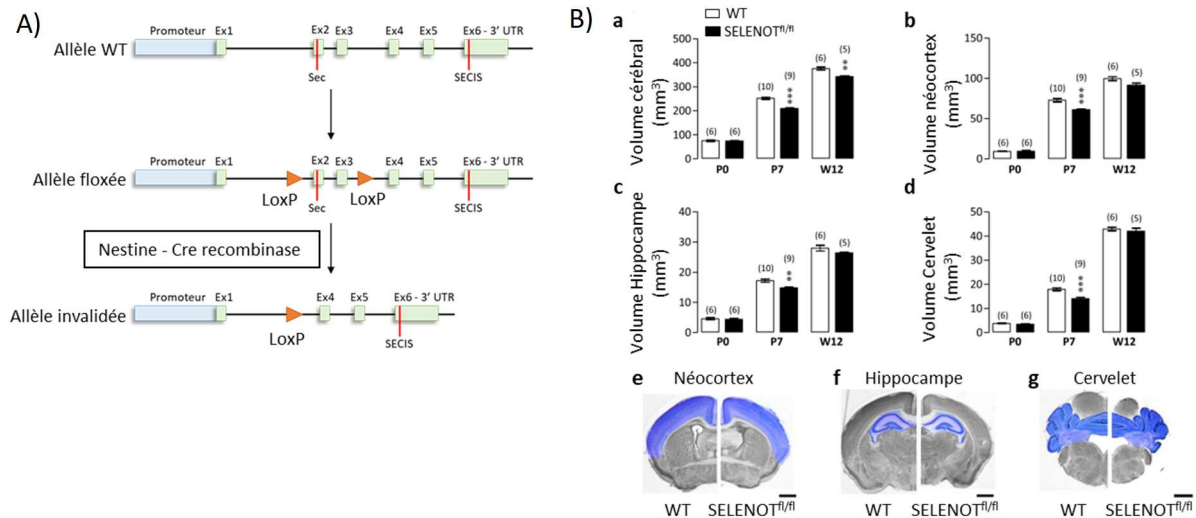


Figure 26 : Invalidation conditionnelle de la SELENOT et diminution transitoire du volume des aires cérébrales. **A)** Le gène de la SELENOT a été génétiquement modifié afin d’insérer des sites de recombinaison LoxP (triangles orange) avant et après les exons 2-3, contenant la Sec. L’apport de la Cre recombinase par croisement génétique permet de recombiner l’ADN en éliminant la séquence présente entre les sites LoxP et ainsi d’invalider l’allèle. L’expression de la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur nestine, donc restreinte aux cellules neurales. **B)** Le volume de différentes aires cérébrales a été mesuré par stéréologie non biaisée, le jour de la naissance (P0), 7 jours (P7) ou 12 semaines (W12) après la naissance, chez les souris WT (blanc) ou invalidées pour la SELENOT (noir). Le volume cérébral est diminué chez les souris KO conditionnelles à P7 (17%) et W12 (9%) (a). Le volume du néocortex, de l’hippocampe et du cervelet sont quant à eux diminués à P7, de 16%, 14% et 21% respectivement (b, c, d). Les images représentatives de ces diminutions sont présentées en e, f et g. D’après Castex et al., 2016.

Les auteurs se sont alors intéressés au cervelet, présentant la plus forte diminution transitoire et ont constaté une augmentation de la caspase-3 clivée (marqueur d’apoptose) ainsi qu’une élévation du niveau de ROS dans les couches corticales du cervelet. De plus, l’absence de SELENOT au sein de neuroblastes à E14,5 induit une élévation du niveau de ROS et une diminution de leur survie. Etant donné le rétablissement des volumes cérébraux chez les souris adultes KO, les auteurs ont regardé les mécanismes compensatoires possibles lors de l’ontogenèse du cervelet et ont ainsi remarqué une augmentation de la neurogenèse, 9 jours après la naissance chez ces souris (Figure 27A, B). Cependant, cette diminution transitoire puis

cette compensation cellulaire ne sont pas sans conséquences puisque ces souris invalidées présentent une hyperactivité locomotrice à l'âge adulte (Figure 27C) (Castex et al., 2016).

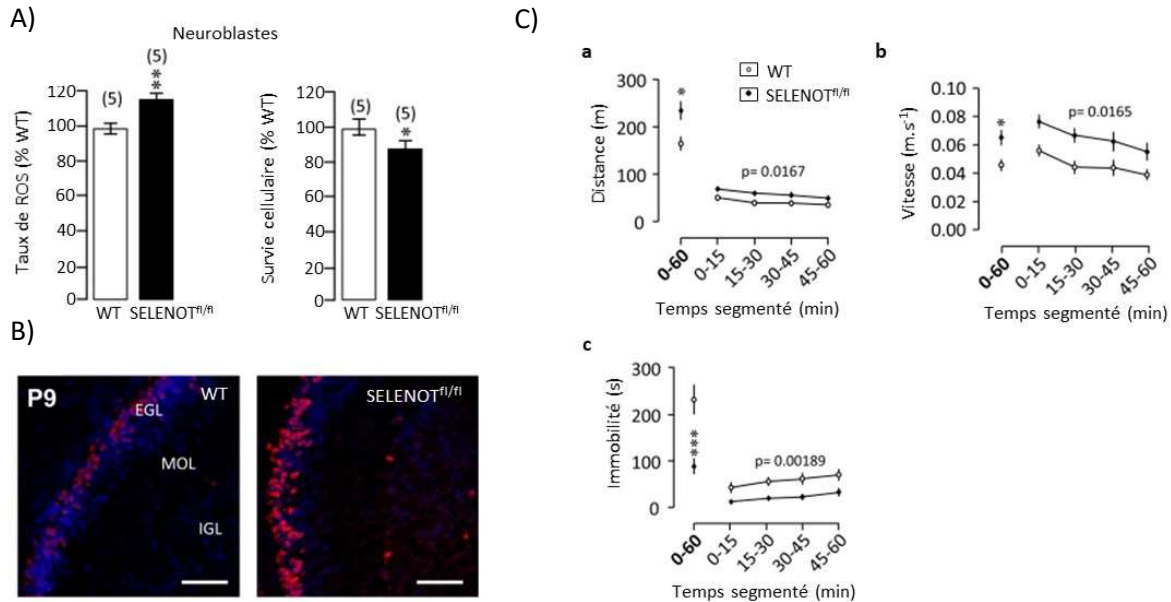


Figure 27 : Effet de l'invalidation de la SELENOT lors du neurodéveloppement. **A)** L'absence de SELENOT (SELENOT^{fl/fl}) au sein de neuroblastes à E14,5 conduit à une augmentation des taux de ROS, et à l'inverse à une diminution de leur survie cellulaire. **B)** Neuf jours après la naissance (P9), le cortex cérébelleux de souris invalidées pour la SELENOT au niveau des cellules neurales présente une neurogenèse (marqué par la BrdU, rouge) plus importante que les souris WT. **C)** Les souris adultes invalidées pour la SELENOT présentent une hyperactivité locomotrice, mesurée par le test d'open-field. Les souris SELENOT^{fl/fl} parcourent en effet une plus grande distance (a), plus rapidement (b) et restent moins longtemps immobiles (c) comparé aux souris WT. D'après Castex et al., 2016.

Une étude plus récente a également mis en lumière l'impact de la SELENOT sur la prolifération cellulaire, puisque la diminution de son expression dans des cellules dopaminergiques tumorales induit également une diminution de leur survie, de leur prolifération, avec une augmentation de la caspase-3 clivée au sein de ces cellules. Les anomalies de prolifération sont visibles 48 h après injection d'un ARN interférant contre la SELENOT, montrant une augmentation du nombre de cellules invalidées stagnant en phase G1 du cycle cellulaire et une diminution du nombre de cellules passées en phase S et G2/M. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en absence de SELENOT peut s'expliquer par une diminution de l'expression de protéines clés servant à valider la transition de la phase G1 à la phase S. En effet, les auteurs ont identifié une baisse de la proportion de protéines CDK4, Cyclin D et p27

au sein de ces cellules, ainsi qu'une augmentation de kinases inhibitrices des cyclines comme CDKN1B (Shao et al., 2019).

Différentes implications de la SELENOT ont donc été évoquées, modulant à la fois la mobilisation calcique, la N-glycosylation des protéines ou encore la prolifération et la survie cellulaire. Cependant, bien que son rôle d'oxydo-réduction et son importance lors de l'embryogenèse soient établis, les fonctions de la SELENOT lors de l'ontogenèse du SNC et notamment lors de la corticogenèse ne sont pas encore connues.

~ Objectifs de thèse ~

Les travaux de recherche évoqués dans l'introduction, indiquent l'importance de l'homéostasie redox dans la survie et les processus cellulaires, et donc des fonctions opérées par les sélénoprotéines. Ce n'est que récemment que les études sur la SELENOT ont mis en lumière son rôle crucial dans l'intégrité du RE. En effet, nous avons pu voir que la SELENOT est une partie intégrante du fonctionnement de la N-glycosylation, ainsi que pour la prévention du stress du RE (Hamieh et al., 2017). La SELENOT pourrait alors représenter un acteur essentiel dans les mécanismes régissant le neurodéveloppement. Des études ont notamment montré que l'absence de cette sélénoenzyme dans des modèles murins induit une létalité embryonnaire et que son invalidation au niveau central conduit à une baisse de la survie de certains neuroblastes ainsi qu'à une hyperactivité chez les souris KO adultes, sous-entendant des anomalies lors de la mise en place des connexions corticales (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016).

De plus, l'absence de SELENOT impacte la prolifération cellulaire (Shao et al., 2019) et pourrait donc éventuellement affecter le développement et la mise en place des couches corticales. Un autre mécanisme important pour le positionnement des neuroblastes au sein du néocortex est leur migration. Les neuroblastes migrent le long du prolongement de la glie radiaire pour se positionner au sein de la plaque corticale. Afin de suivre ce prolongement, les neuroblastes adhèrent à l'axe de la glie radiaire. Cependant, Sengupta et al., ont remarqué que l'absence de SELENOT au sein de fibroblastes murins, induit une perte d'adhésion de ces cellules de près de 40% et une augmentation de l'expression d'autres oxydoréductases telles que la SELENOW, probablement comme mécanisme compensatoire. De plus, son absence provoque l'augmentation d'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la différenciation ou encore dans l'homéostasie redox, ou à l'inverse une diminution de gènes intervenant dans la régulation de la transcription (Sengupta et al., 2009).

L'ensemble de ces observations laisse présager un rôle de la SELENOT dans la corticogenèse. Les travaux de cette thèse ont été guidés par deux objectifs, qui sont : i) l'analyse du profil d'expression de la SELENOT, en utilisant comme modèle d'étude la souris, afin de corrélérer son expression avec les différentes étapes du développement cortical ; ii) et en second, l'invalidation de la SELENOT soit par électroporation *in utero* au sein des cellules souches

neurales chez l'embryon soit après invalidation conditionnelle dans le SNC chez la souris, de manière à déterminer son implication lors de la mise en place des couches corticales.

~ Résultats ~

Article : SELENOT deficiency alters projection neuron migration during corticogenesis in mice

Emmanuelle Carpentier, Anthony Falluel-Morel, Lisa Brunet, Magalie Bénard, David Godefroy, Loubna Boukhzar, Arnaud Arabo and Youssef Anouar

Le stress oxydatif est un facteur aggravant de maladies neurodéveloppementales. Cependant, les espèces réactives de l'oxygène agissent comme seconds messagers pour régir les processus cellulaires. Leur implication lors de la corticogenèse a été démontrée dans plusieurs études, modulant ainsi les différentes phases du développement du néocortex. Ce dernier est constitué de six couches, élaborées par la migration et le positionnement des neuroblastes, produits à partir des cellules de la glie radiaire. Afin de réguler l'homéostasie redox et la production de radicaux libres, les cellules possèdent des systèmes antioxydants, comprenant les sélénoprotéines. Parmi elles, la SELENOT apparaît essentielle au développement puisque son invalidation totale s'avère létale. Des études réalisées au laboratoire ont décrit sa présence au niveau des cellules neurales lors de l'embryogenèse, ainsi que son implication dans la mobilisation calcique, dans la N-glycosylation et dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. De plus, la SELENOT semble cruciale lors du neurodéveloppement, puisque son invalidation au sein des cellules neuronales induit une baisse de leur survie cellulaire, une augmentation des niveaux de radicaux libres, ainsi qu'une hyperactivité chez les souris adultes. Ainsi, les précédentes études évoquent un rôle de la SELENOT lors de la corticogenèse, étape clé de la mise en place des neurones de projection.

Les travaux de cette thèse ont alors porté sur l'implication de la SELENOT lors de la corticogenèse en :

- Etablissant son profil d'expression au niveau du néocortex
- Etudiant sa localisation au sein des différentes couches corticales lors de l'embryogenèse
- Analysant son implication lors de la migration des neuroblastes

SELENOT deficiency alters projection neuron migration during corticogenesis in mice

Emmanuelle Carpentier¹, Anthony Falluel-Morel¹, Lisa Brunet¹, Magalie Bénard², David Godefroy¹, Loubna Boukhzar¹, Arnaud Arabo³ and Youssef Anouar¹

¹ University of Rouen Normandie, INSERM U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication laboratory, IRIB, CURIB, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

² University of Rouen Normandie, INSERM, the Cell Imaging Platform of Normandy PRIMACEN, IRIB, CURIB, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

³ University of Rouen Normandie, Biological Resource Facility, CURIB, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Corresponding author: 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

Keywords: corticogenesis, neuronal migration, selenoprotein, antioxidant

Abstract

During corticogenesis, projection neurons migrate along the radial glial axis to form cortical layers, the alteration of which is associated with functional deficits in adulthood. As byproducts of cell metabolism, reactive oxygen species act as second messengers to contribute to neurodevelopment; however, free radical excess may impede this process. SELENOT is a thioredoxin-like enzyme of the endoplasmic reticulum abundantly expressed during embryogenesis whose gene disruption in the brain leads to neuroblast cell demise due to increased free radical levels. To determine the potential contribution of SELENOT to the establishment of cortical networks, we analyzed first its expression profile in the neocortex at different stages of development. These studies revealed the widespread expression of SELENOT in all cortical layers, and its continuous increase throughout mouse lifespan. In addition, we disrupted the SELENOT gene in the cortex using *in utero* electroporation and Nes-Cre/lox knockout. SELENOT deficiency altered neuroblast migration polarity, at the level of radial scaffolding, and projection neuron positioning. These results indicate that SELENOT plays a crucial role during neurodevelopment by sustaining projection neuron migration.

Abbreviations:

CP, cortical plate; En, embryonic day n; GE, ganglionic eminence; IUE, *in utero* electroporation; IZ, intermediate zone; PND, postnatal day; ROS, reactive oxygen species; SELENOT, selenoprotein T; SP, subplate; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone

Introduction

In mammals, the development of the cerebral neocortex is a particular histological process that leads to a laminar six-layered cytoarchitecture. This organization is of a main importance for intracortical and subcortical connectivity in order to ensure the cognitive functions involving this cerebral structure. During corticogenesis between embryonic day (E) 11 and E19 in mice, immature neurons (neuroblasts) are born in the ventricular and subventricular zones (VZ and SVZ) by asymmetric division of radial glial cells (Angevine and Sidman, 1961; Rakic, 1982; Takahashi et al., 1995; Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2004). After proliferation, neuroblasts migrate along the radial fibres of radial glial cells from the VZ to the cortical plate (CP) in an “inside-out” manner. Thus, newly generated neuroblasts terminate their migration above oldest neuroblasts to form a new cortical layer (Rakic, 1972; O'Rourke et al., 1992; Nadarajah et al., 2001). The major cell types found in the cerebral cortex are glutamatergic excitatory neurons and GABAergic inhibitory interneurons, that account for approximately 80% and 20% of total neurons, respectively, and this ratio is maintained from development to adulthood (Hendry et al., 1987; Sahara et al., 2012). In contrast to glutamatergic projection neurons which arise from radial glial cells, GABAergic neurons arise from the ganglionic eminence of the telencephalon and migrate tangentially to reach the cortex (Tan et al., 1998; Anderson et al., 1999; Marín et al., 2001). Glutamatergic neuron population is responsible for information treatment and storage through their specific connectivities, depending on the cortical layer where they reside (Kwan et al., 2012), and their activity is regulated by GABAergic neurons. Neuroblast migration abnormalities lead to neurodevelopmental deficits such as autism spectrum disorder (ASD) or schizophrenia (Wegiel et al., 2010; Stachowiak et al., 2017).

Extrinsic and intrinsic factors are involved in proper cell proliferation, migration and differentiation to allow the development of the neocortex. Among these, reactive oxygen species (ROS) which are byproducts of cell metabolism can also act as second messengers to stimulate, for instance, self-renewal of neural stem cell, in specific time-windows and localizations (Le Belle et al., 2011; Chui et al., 2020). However, uncontrolled ROS excess leads to oxidative stress, an aggravating factor of pathologies, which can provoke the loss of the axon initial segment, a decrease in adhesion molecule expression or cell death (Arai et al., 1998; Gogna et al., 2012; Clark et al., 2017).

In order to protect the brain against ROS and to maintain redox homeostasis, numerous antioxidant systems, including key enzymatic activities carried by selenoproteins, are recruited by nerve cells. Selenoproteins are a particular class of enzymes that contain selenium in the organic form of the amino acid selenocysteine (Sec). Selenoproteins are classified in different families, such as glutathione peroxidases (GPX), thioredoxin reductases (TXNRD), and iodothyronine deiodinases (DIO), according to their antioxidant activities mediated by the Sec residue present in their catalytic site. Sec-containing enzymes are crucial for development since their global disruption is lethal in mice (Bösl et al., 1997). Moreover, previous findings showed that selenoproteins are mainly expressed during embryogenesis and that cortical and hippocampal neurons are the favourite site of their expression (Jakupoglu et al., 2005; Zhang et al., 2008). It is now admitted that absence or reduction of selenoprotein expression could contribute to severe neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases such as ASD, seizure or Parkinson disease (Wirth et al., 2010; Raymond et al., 2014; Cardoso et al., 2015).

The precise functions of certain of these enzymes are not fully elucidated. This is the case of selenoprotein T (SELENOT), a selenoprotein highly conserved during evolution (Moustafa and Antar, 2012), which exerts oxidoreductase activity and whose gene disruption is lethal early during embryonic development in mice (Boukhzar et al., 2016). SELENOT is required for calcium mobilization (Grumolato et al., 2008; Mazza et al., 2019) and plays a role in protein N-glycosylation in neuroendocrine cells (Hamieh et al., 2017). In the brain, SELENOT has neuroprotective effects during development and after injury (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016; Alsharif et al., 2021). In the rat neocortex, SELENOT is localised in immature and differentiating neurons (Tanguy et al., 2011) and its conditional gene knockout in the brain causes neuroblast cell death, as well as a decrease in the volume of the neocortex structure. These observations strongly suggest that this selenoenzyme plays an important role during neurodevelopment, in particular for corticogenesis.

To elucidate the role of SELENOT in this developmental process, we sought first to establish its expression pattern in the neocortex to link this expression with cortical development. Then, we genetically disrupted SELENOT expression in radial glial cells and neuroblasts harboring a floxed gene through *in utero* electroporation (IUE) of a

Cre recombinase construct to evaluate the implication of this important selenoprotein during corticogenesis. The data obtained showed that SELENOT is widely expressed during the different stages of corticogenesis and that its deficiency alters neuroblast migration and projection neuron positioning.

RESULTS

SELENOT is expressed in neocortex throughout the mouse lifespan

In order to understand the contribution of SELENOT to neurodevelopment, we first analyzed its mRNA expression profile in the neocortex from embryonic (E) day 12 to 1-year-old, using laser capture microdissection which allowed isolating different cortical layers. SELENOT mRNA was present at low levels in all cortical layers during embryogenesis, with a higher expression level in the ventricular zone (VZ) at E12 where neuroblast are generated (Molyneaux et al., 2007). At postnatal stages, SELENOT levels seem to increase compared to embryonic stages although no statistical difference was observed between these stages. We also analyzed SELENOT mRNA levels in older animals, which were significantly higher in all cortical layers at 6 months of age. Indeed, SELENOT mRNA levels exhibited more than 17-fold increase in cortical layers C2-C5 ($*P<0.05$, $n=6-12$) and more than 27-fold increase in cortical layer C6 ($**P<0.01$, $n=6-12$) compared to early embryonic (E12 and E18) or postnatal stages (PND0) (Fig. 1A). Using the same samples obtained by laser microdissection, we could reproduce the profile of neuronal nuclei (NeuN or RBFOX3) mRNA abundance, which also displayed an increase during brain maturation (5-6-fold increase for PND90, 6-month-old and 1-year-old compared to younger mice ($*P<0.05$, $*P<0.05$ and $**P<0.01$ respectively, $n=3-12$) (Fig. 1B) as previously described (Sekine et al., 2011; Lin et al., 2016).

SELENOT protein levels were also analyzed to confirm the expression in the neocortex at the different stages. Due to the small size of tissue obtained after laser capture microdissection, we could not analyse the expression of SELENOT in each layer. Therefore, only the entire mouse neocortex could be analysed at different stages. Western blot analysis revealed that SELENOT protein is expressed during embryogenesis at E12 and E18, and increased significantly in adult and aged mice (>3-5 fold increase between PND60, PND90, 6 months and 1 year compared to early embryonic and PND stages ($*P<0.05$; $**P<0.01$ and $***P<0.001$; $n=3$) (Fig. 1C). It

should be noted that when SELENOT mRNA and protein expression data were segregated by sex, males and females exhibited similar profiles in all cortical layers and stages analysed (data not shown).

SELENOT is expressed in proliferating and immature layers within glutamatergic and GABAergic-positive neurons

To better define SELENOT expression profile at the histological level in the neocortex, we used an ultrasensitive *in situ* hybridization analysis. Fig. 2 shows representative SELENOT mRNA staining in all neocortical layers at embryonic stages E14.5 and E17.5, including proliferative (VZ and SVZ), migrating (IZ and SP) and differentiating zones (CP) (Fig. 2A-A', B-B'). SELENOT mRNA was also expressed in all cortical layers at birth (Fig. 2C-C'), PND 10 (Fig. 2D-D'), PND 20 (Fig. 2, E-E'), PND 60 (Fig. 2F-F'), 6 months (Fig. 2G-G') and 1 year (Fig. 2H-H'), confirming the PCR results. However, the intensity of SELENOT mRNA signal was similar in brain slices of adult and aged mice compared to embryonic and early postnatal stages (Fig. 2F-F', G-G', H-H' compared to Fig. 2A-A' to E-E'). In order to determine the neuronal cell types expressing SELENOT gene in the different embryonic cortical layers and to be able to link these data to the following functional studies, we analysed its co-expression with γ -aminobutyric acid (GABA)-ergic and glutamatergic neurons in embryos (E17.5) by *in situ* hybridization or immunohistochemistry.

Co-localization studies showed that SELENOT is present in GABA-positive neurons, labelled with vesicular GABA transporter (VGAT) probes, in the ganglionic eminence where GABAergic neurons are generated, and in the different embryonic cortical layers where GABAergic neuroblasts migrate during corticogenesis (Polleux et al., 2002) (Fig. 3a,b,d). Within cortical layers, SELENOT mRNA signal was present in the VZ where radial glial cells are present and generate neuroblasts (Molyneaux et al., 2007), but also in differentiating neurons labeled with an antibody against doublecortin (DCX), in the CP (Fig. 3a,c,d) (Molyneaux et al., 2007). In addition, SELENOT was present in glutamatergic-positive neurons, stained by type-2 vesicular glutamate transporter (VGLUT2) probes, in all cortical layers (*i.e.* proliferative, migration and differentiation layers) (Fig. 3e,f,g).

Impairment of SELENOT expression in neuronal progenitors through *in utero* electroporation (IUE) leads to neuroblast positioning defects

As SELENOT is expressed during embryogenesis in the neocortex including proliferative and immature layers, we sought to determine its contribution to corticogenesis and more particularly in neuroblast migration. To this intent, we performed IUE in SELENOT^{fl/fl} mice to deliver a plasmid containing a Cre recombinase into the lateral ventricle of embryos at E14.5, when neuroblasts are actively generated (Smart and McSherry, 1982; Takahashi et al., 1995). We electroporated the Cre-encoding plasmid in the border of the lateral ventricle in order to disrupt SELENOT gene in neuronal progenitors (Fig. 4A). Both control and pCAG-CRE plasmids carried a gene encoding an enhanced green fluorescent protein (eGFP) to visualize transfected cells (Fig. 4B). Fig. 4C shows the efficiency of the electroporation with green fluorescent cells visible in cortical layers, for the control (Fig. 4Ca,c) and pCAG-CRE (Fig. 4Cd,f) plasmids. The efficiency of SELENOT gene disruption was assayed first by PCR on mice tissue after IUE, and this analysis showed the presence of the SELENOT^{fl/fl} allele only in the neocortex transfected with the pCAG-CRE plasmid, thus showing the disruption of SELENOT gene (Fig. S1). We also performed immunostaining against SELENOT (Fig. 4Cb,c,e,f) which was detected only in a certain proportion of fluorescent cells (Fig. 4D). Indeed, IUE with the pCAG-CRE plasmid led to a 45% decrease (** $P < 0.01$; $n = 522$ cells for control and $n = 935$ cells for pCAG-CRE condition) in the number of SELENOT-positive fluorescent cells in the neocortex, thus confirming the SELENOT knockout in neuroblasts.

Seventy-two hours after IUE (E17.5), most fluorescent cells transfected with pCAG-CRE were observed in the IZ layer, while most fluorescent cells transfected with the control plasmid were located in the CP (Fig. 5A). Quantification of eGFP-positive cells showed a 148% increase (** $P < 0.01$; $n = 6-7$) in the proportion of cells located in the IZ following SELENOT disruption and, conversely, a 37% decrease (** $P < 0.01$, $n = 6-7$) in the percentage of fluorescent cells in the CP (Fig. 5B). Of note, certain neuroblasts expressing pCAG-CRE could reach the CP, probably due to residual expression of SELENOT in these cells.

Migrating neuroblast polarity is altered in absence of SELENOT

To better understand the neuroblast positioning defect observed after SELENOT disruption, *i.e.* accumulation of deficient cells in the IZ, we analysed the orientation of their leading process which drives their migration through the radial glia axis up to the neocortex (Nadarajah and Parnavelas, 2002) (Fig. 6A). Measuring the angle (degrees) between the neuroblast leading process and the main axis of radial glial cells (Fig. 6B) and representing the cumulative distribution of these angles in each cortical layer, we found that most SELENOT-deficient neuroblasts display a higher angle of migration in the VZ/SVZ ($*P<0.05$; $n=12-18$ cells per condition) and IZ ($***P<0.001$, $n=273-267$ cells per condition) compared to cells transfected with the control plasmid (Fig. 6C,D). Neuroblasts that successfully reach the CP have no migration angle alterations (Fig. 6E).

Absence of SELENOT leads to radial axis abnormalities

Since IUE was performed in the border of the lateral ventricle at E14.5, the plasmid is transfected in radial glial progenitors which serve as a scaffold for neuroblast migration (Rakic, 1972). We then hypothesized that alteration of neuroblast migration could be due to disruption of radial glial scaffolding after SELENOT gene knockout. To investigate this possibility, we first confirmed the localization of SELENOT in radial glia cells in both their soma and processes, using an antibody directed against nestin (Fig. 7A). Then, we used nestin labelling of radial glia cells to analyse the size of their processes in the cortical layers 24 h after IUE of Cre-expressing or control plasmids. Although the full length of each process could not be determined in the tissue sections analysed, we could quantify the apparent length of these processes within each layer of SELENOT-deficient compared to control animals (Fig. 7B). This analysis revealed a decrease of 46% in this parameter in VZ/SVZ ($***P<0.001$, $n=8-9$ processes), 20% in IZ ($*P<0.05$, $n=13$ processes) and 33% in CP ($**P<0.01$, $n=8-9$ processes) (Fig. 7C).

SELENOT is required for the proper positioning of deep neurons in adult neocortex

As SELENOT deficiency after IUE alters neuroblast polarity as well as radial glial scaffolding, we sought to determine the positioning of SELENOT-deficient neurons in the neocortex of Nes-Cre/SELENOT^{f/f} adult mice, where SELENOT was disrupted in neural cells. To do this, we immunostained the neocortex with an antibody directed

against BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit (BCL11B or CTIP2), a transcription factor primarily expressed in neurons of the deep layers (V and VI), and preferentially in layer V (Hevner, 2007; Chen et al., 2008). Indeed, CTIP2 immunolabelling was observed in layers V and VI of the adult neocortex in Nes-Cre/SELENOT^{+/+} mice, with a stronger labelling in layer V (Fig. 8Aa). In contrast, CTIP2-positive cells were more abundant in layer VI and less in layer V in adult SELENOT-deficient mice (Fig. 8Ab). Analysis of CTIP2 distribution in adult Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} neocortex showed a decrease of 5% and 23% in the C4 and C5 layers (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, $n = 3$), respectively, and an increase of 17% in the C6 layer (** $P < 0.001$, $n = 3$), compared to adult Nes-Cre/SELENOT^{+/+} mice (Fig. 8B). These data confirm the results obtained with IUE, thus demonstrating that SELENOT plays a physiological role in cortical lamination.

Discussion

SELENOT is expressed in the cerebral cortex during mouse lifespan

Previous studies have shown a role of SELENOT in the ontogenesis of the brain in mice (Castex et al., 2016), but its precise function in the different cerebral ontogenetic processes such as corticogenesis remains unknown. Here, we report the importance of this selenoenzyme for proper neuroblast migration during corticogenesis. To understand its contribution for the development of the different cortical layers, we first analysed SELENOT expression profile in mouse cerebral cortex, using biochemical (*i.e.* qPCR following laser capture microdissection, western blot) and histological (*i.e.* RNAscope *in situ* hybridization) methods. Our data indicate that SELENOT is expressed in the mouse brain early during embryogenesis, confirming our previous results obtained in the rat (Tanguy et al., 2011). However, this latter study showed that the global expression of SELENOT in the rat brain declines after birth and in adulthood. In the mouse cerebral cortex, our present data showed an inverse trend with increased expression of SELENOT in postnatal days and in adulthood. Moreover, quantitative PCR data showed that SELENOT mRNA expression is similar in cortical layers at each stage. RNAscope *in situ* hybridization confirmed the presence of SELENOT mRNA in all layers of the mouse neocortex from embryogenesis to 1 year-old.

In addition, SELENOT expression significantly increased in the neocortex of aged mice (6 months and 1-year old). Our previous data showed that SELENOT can protect

neuroblasts and neurons against oxidative stress (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016; Abid et al., 2019), suggesting that the rise in SELENOT expression observed in cortical layers of aged mice is associated to a defense mechanism against ROS. In fact, the aging brain is exposed to various insults, including ROS which can trigger cell senescence (Perez-Campo et al., 1998; Passos et al., 2010). Of note, this increase could not be visualized by RNAscope *in situ* hybridization. This apparent discrepancy could be due to the tissue architecture, the density of cells or the intracellular levels of SELENOT expression in each layer at different stages. Overall, these gene expression results strongly suggest that SELENOT could play a role in the neocortex during its ontogenesis but also later during brain aging.

SELENOT is present in proliferative and differentiating neuroblasts

RNAscope *in situ* hybridization analysis showed that SELENOT is present in the ventricular and cortical plate layers. This finding suggests that the selenoprotein could be an important actor in the ventricular zones where cell proliferation occurs during embryogenesis. It has been shown that SELENOT expression is crucial to maintain nerve cell division, by promoting cell cycle G1-S transition (Shao et al., 2019). Moreover, the presence of SELENOT in DCX-labeled immature neurones that reside in the cortical plate at E17.5, may also reflect the importance of this protein for neuroblast differentiation. In accordance, previous studies have shown that SELENOT is overexpressed in differentiating cells and participates to calcium mobilization, a process necessary for cell differentiation and specification (Grumolato et al., 2008; Tonelli et al., 2012).

We found that SELENOT mRNA is present in both glutamatergic and GABAergic neuroblasts. Glutamatergic cells expressed SELENOT in all cortical layers, comprising proliferative (VZ, SVZ), migrating (IZ) and differentiating (CP) layers, at E17.5. In fact, glutamate is essential for different developmental processes, depending on the cell localisation. Thus, glutamate stimulates neuroblast proliferation in the VZ, but not in the SVZ (LoTurco et al., 1995; Haydar et al., 2000; Luk and Sadikot, 2004), and neuroblast migration toward the CP, via a chemoattractant effect mediated by NMDA receptors and increased intracellular calcium (Behar et al., 1999; Simonian and Herbison, 2001). However, another study showed that the stimulation of NMDA receptors in the cortex acts as a stop signal for migration (Kihara et al., 2002). These

results indicate that glutamate exerts opposite effects during corticogenesis, depending on the time-window and neuroblast localisation. SELENOT ought to play a role in glutamatergic cells during corticogenesis probably to allow appropriate production of this essential neurotransmitter. SELENOT was also detected in GABAergic neurons, which are generated in ganglionic eminences in the ventral telencephalon and which reach the cortex by tangential migration (Polleux et al., 2002). SELENOT is detected in the site of origin of these cells and in generated and migrating GABAergic neuroblasts, at E17.5. These data support a role of SELENOT also in the generation and implementation of GABAergic neurons. Expression of SELENOT in neuronal cells in the developing cortical layers could be involved in the protection of different cortical cells against oxidative stress which is inevitably produced during the different processes, *i.e.* cell proliferation, migration and differentiation, of cortical lamination.

SELENOT is required for neuroblast migration

To elucidate the possible contribution of SELENOT during corticogenesis, we performed *in utero* electroporation of a Cre-expressing plasmid in mice to inactivate SELENOT gene in floxed neuroblast progenitors. We found that significantly less neuroblasts reach the CP after SELENOT inactivation compared to control, and numerous SELENOT-deficient cells remained in the IZ. Nevertheless, not all transfected cells were impacted since a certain number could be observed at the superficial layer. This could be ascribed to the level or timing of Cre recombinase expression in transfected cells, as attested by different eGFP staining levels among the cells.

During corticogenesis, radial glial cells give rise to neuroblasts and extend long processes known as the radial axis, which serve as a scaffolding for neuroblast migration until the CP (Rakic, 1972). Neuroblasts are guided by the radial axis, notably thanks to adhesive molecules (Anton et al., 1999; Sanada et al., 2004). Since SELENOT-deficient neuroblasts exhibited an altered positioning during corticogenesis, we investigated the angle of neuroblast migration with respect to the radial axis. We found that these neuroblasts located in the VZ/SVZ and IZ have a higher angle of migration compared to control. This means that neuroblasts do not migrate properly towards the CP, and can explain the increase in the number of cells accumulating in

the IZ. This abnormality could result from a loss of adhesion between neuroblasts and the radial axis or even from glial scaffolding alterations. In fact, SELENOT is expressed in radial glial cells and its disruption could affect scaffolding. Therefore, we analyzed glial process morphology using nestin as a marker, and found a decrease in their apparent length with a disorganised scaffold. It can thus be concluded that neuroblast migration is impaired due to a loss of neuroblast polarity, probably as a result of radial glial scaffolding impairment. Interestingly, a role of SELENOT in cell adhesion has been previously described in fibroblasts (Sengupta et al., 2009), and may also occur in neuroblasts and account for their altered positioning and migration after disruption of the selenoprotein gene. Besides, it was previously reported that SELENOT is required for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein synthesis (Liu et al., 2018). GPI anchoring of proteins is a post-translational modification that occurs in the endoplasmic reticulum (Ferguson et al., 1985) and concerns about 150 cell surface proteins in mammals, including neural adhesive molecules (Karagogeos, 2003). The role of SELENOT in this process could be related to its effect on protein glycosylation (Hamieh et al., 2017) since N-glycan moieties of GPI-anchored proteins play an important role in the proper inositol deacetylation necessary for their transport and their calnexin/calreticulin quality control cycle. It is thus tempting to speculate that the lack of SELENOT leads to N-glycosylation defaults in GPI-anchored proteins including adhesive proteins present in radial glial fibres and in neuroblasts, which in turn could lead to impairment of glial-cell adhesion and loss of polarity for neuroblasts.

These results obtained after disruption of SELENOT through IUE highlight its crucial role for the proper establishment of projection neuron positioning, through neuroblast polarity maintenance and radial glial scaffolding. Interestingly, analysis of the distribution of profound layer marker CTIP2 shows a mispositioning of deep cortical neurons in Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} adult mice. These data indicate that the absence of SELENOT impairs the migration of neuroblasts in the neocortex and alters their positioning in the different cortical layers. This finding adds to the list of genes whose expression is essential for the laminar organisation of the neocortex, such as the extracellular matrix protein reelin or the glutamate transporter whose disruption in mice provokes neuroblast stagnation in the ventricular layer, accompanied by a disorganisation of radial glial fibres (Caviness, 1982; Matsugami et al., 2006; Boyle et al., 2011). It is known that reelin binds the apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) in

neurons, which also serves as a receptor for SELENOP (a selenium transporter to the brain), thus indicating the possible implication of selenoproteins in important mechanisms involved in cortical lamination since deficiency of ApoER2 in mice leads to abnormal corticogenesis (Hiesberger et al., 1999; Scharpf et al., 2007; Hirota et al., 2018). Besides, absence of adhesion molecules, such as N-glycosylated integrins whose synthesis could be impacted by SELENOT deficiency (Pothion et al., 2020), also leads to cerebral laminar alteration in mice (Anton et al., 1999; Janik et al., 2010). The abnormalities observed in adult SELENOT KO mice on the one hand and after IUE in embryos on the other hand, *i.e* abnormal neuroblast polarity, and alterations of radial glial scaffolding and deep neuron positioning, strongly suggest the importance of SELENOT for the proper laminar organisation of the neocortex by modulating these processes. Since the localisation of neurons in cortical layers is correlated to their identity and connectivities with cortical and subcortical structures (Kwan et al., 2012), it is conceivable that the hyperactive phenotype observed in adult Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} mice (Castex et al., 2016) could be ascribed to neuron mispositioning induced by alteration of neuroblast migration, but also by exacerbated apoptosis of neuroblasts in the absence of SELENOT, as previously described (Castex et al., 2016).

To conclude, our present data show for the first time that SELENOT is an essential actor in the neocortex required during embryogenesis for cortical lamination, but probably also during the whole mouse lifespan to protect this cerebral structure. We demonstrated the importance of SELENOT during corticogenesis for proper neuroblast migration and positioning. SELENOT could exert its effects by regulating, via redox mechanisms, different cellular processes necessary for proliferation, migration and differentiation of neuroblasts, including folding of adhesive molecules and scaffolding of radial glial cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal experiments were approved by the Normandy Ethics Committee on Animal Experimentation (Authorization No. 25444, No. 6637 and No. 16178) and were performed in accordance to the European Committee Council Directives. C57Bl/6J mice were obtained from Janvier Labs (Saint Berthevin, France). SELENOT-floxed

(SELENOT^{fl/fl}) mice were obtained by intern colony breeding of genitors with a SELENOT^{fl} allele produced in collaboration with the Mouse Clinical Institute (Strasbourg, France). Transgenic SELENOT^{fl} mice were generated by homologous recombination of C57Bl/6J genome sequence encoding the active site of the protein, between exons 2 and 3. Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} KO mice were obtained by breeding of SELENOT^{fl/fl} mice with Tg (Nestin-Cre)¹ Kln +/- knock-in mice, acquired from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and lack of SELENOT in brain of KO mice was previously confirmed (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). Mice were housed under controlled conditions with a 12-h light/12-h dark cycle (light on at 07:00 am). Animals had access to food and water *ad libitum* and were maintained at 22 ± 2°C ambient temperature. Embryos were electroporated and/or surgically removed from SELENOT^{fl/fl} pregnant females, and embryonic stages were determined by the day of appearance of the vaginal plug, as E0.5. Genotypes were obtained by PCR of genomic DNA from tail clips with the following primers: forward, 5'-GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3'; and reverse, 5'-CGCCCCATTTTATAAACTTTGTATGTTTATGCCC-3', for WT (211 bp) and SELENOT^{fl} (261 bp) alleles; forward, 5'-GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3'; and reverse, 5'-GCCTAGGTTTTACCTGAGAA ACCAAAGG-3', for SELENOT^{fl/fl} alleles (409 bp).

Laser capture microdissection

Mice were anesthetized by 2% isoflurane inhalation and sacrificed by decapitation. Brains were immediately immersed in – 25°C isopentane and stored at – 80°C. For embryos, pregnant females were anesthetized by 2% isoflurane before sacrifice, and embryos head were cryopreserved in tissue freezing medium (Tissue-Tek, Leica) and stored at – 80°C. All steps were done in RNase-free conditions. Twenty-µm brain coronal sections cut in a cryostat were collected on PEN blades (ZEISS, Göttingen, Germany) and colored with 1% acetate cresyl violet (Sigma-Aldrich, C5042) to discriminate cortical layers, based on the “Atlas of the Developing Mouse brain” (Paxinos) for samples from E12 to post-natal day (PND) 3, and on “Allen Brain Atlas” for samples from PND 7 to 1-year-old. One mm² of each cortical layer was dissected out by the Leica laser capture microdissection apparatus (Leica Microsystems) and collected in a RLT lysis buffer containing 1% β-mercaptoethanol, 4 ng/µL RNA carrier as described by the supplier of the RNeasy® Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

Extraction of RNA was performed using the RNeasy® Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the concentration and integrity of RNA were evaluated by picochips (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Nine ng of total RNA were reverse-transcribed using the QuantiTect® kit (Qiagen, Hilden, Germany). Relative gene expression of SELENOT and NeuN was quantified by real-time PCR (qPCR) with specific primers and the Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). qPCR was carried out on QuantStudio™ Flex' system (Applied Biosystems), and gene expression was normalized to housekeeping genes (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, and phosphoglycerate Kinase 1, Pgk1) (Boda et al., 2009), by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Primers used were: mouse SELENOT forward, 5'-GGTATCCAGACATCCGCATTG-3', and reverse, 5'-GGAAAGATGCTATGTGTCTATAAATTGG-3'; mouse NeuN forward, 5'-CTGCCTGTGAGAACCTAGTGCTTT-3', and reverse, 5'-GGTCCTTCTGATGTCACACTGTTG-3'; mouse GAPDH forward, 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3', and reverse, 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'; mouse Pgk1 forward, 5'-GTTGCTCCTGAACTCAAATCTCT, and reverse, 5'-GCCACACAATCCTTCAAG-3'.

Western blot analysis

Proteins were extracted using a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 % Triton and protease inhibitors (Mini tablets Pierce™, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA). After centrifugation at 20.000 x g for 15 min, protein content was assayed by the Bio-Rad Protein Assay (München, Germany). Twenty µg of proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes in a Trans-Blot apparatus (Trans-Blot Turbo™, Bio-Rad, USA). Membranes were then saturated with a buffer containing 5% milk, 0.05% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBS) and incubated with the primary antibodies anti-SELENOT (1:1250, Grumolato et al., 2008) and anti-β-Actin (1:5000, ThermoFischer Scientific, MA5-15739) in 5% milk, 0.05% Tween 20 in TBS, overnight at 4°C. The membranes were then incubated with the secondary antibodies goat anti-rabbit peroxidase and goat anti-mouse peroxidase (1:5000, LI-COR, Lincoln, USA) 1 h at

room temperature (RT). Visualization of proteins was performed by chemiluminescence (ECL, Bio-Rad, USA) on ChemiDoc (Bio-Rad, XRS+ system).

RNAscope® *in situ* hybridization

Mice were anesthetized using a solution of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and perfused with sterile phosphate-buffered saline (PBS) followed by sterile paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were dissected and post-fixed in PFA 4% overnight at 4°C. A cryoprotection was performed through immersion in sterile sucrose 15% and 30%. Brains were frozen in isopentane in dry ice and stored at -80°C. Tissues were sectioned into 10-12-µm slices with a cryostat. Slices were washed 5 min in sterile PBS and heated at 60°C in a dedicated oven (ACD HybEZ™ II Hybridization System (220v) with ACD EZ-Batch Slide System, Biotechne, Rennes, France) under Bake mode during 30 min, and then post-fixed during 15 min with sterile PFA 4%. Slices were dehydrated in graded solutions of ethanol at 50%, 70% and twice 100% during 5 min for each bath. Slices were covered with H₂O₂ during 5 min and washed with distilled H₂O two times. Slices were submerged 10 sec in distilled water at 99°C and 5 min in RNAscope 1X Target Retrieval Reagent (ACD Biotechne) at 99°C. Slides were rinsed 15 sec in distilled water at RT, submerged 3 min in ethanol 100% and dried at RT. Slices were covered with protease RNAscope (ACD Biotechne) during 30 min at 40°C and washed with distilled water two times. Hybridization was performed with 50 µl/slice of probe mix during 2 h at 40°C in an oven. Probes used were supplied by ACD Biotechne and were as follows: SELENOT probe targeting the region 1428-3520 (NM_001040396.3), designed in C2; glutamate transporter targeting VGLUT2 (Slc17a6), designed in C3; GABA transporter targeting VGAT (Slc32a1), designed in C3. After hybridization, slices were covered with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 1 during 30 min at 40°C and washed with RNAscope wash buffer two times at RT, then covered with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 2 during 30 min at 40°C and washed with RNAscope wash buffer two times at RT, and finally with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 3 during 15 min at 40°C and washed with RNAscope wash buffer two times at RT (RNAscope Multiplex FL v2 Amp 1,2,3 : RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2; ACD Biotechne). After amplification, the staining steps were carried out sequentially. Slices were covered with RNAscope Multiplex FL v2 HRP-C1 (ACD Biotechne) during 15 min at 40°C and washed at RT with RNAscope wash buffer two times, then covered by 80 µL of Opal 520 at 1/1500 (Opal 520 reagent pack,

FP1487001KT, AKOYA Biosciences, Malborough, United States) during 30 min at 40°C and washed at RT with RNAscope wash buffer two times, followed by staining of C2 to block with HRP blocker (ACD Biotechne) during 15 min at 40°C and washed at RT with RNAscope wash buffer two times. Slices were covered by 80 µL of Opal 650 at 1/1000 (Opal 650 reagent pack, AKOYA Biosciences) during 30 min at 40°C and washed at RT with RNAscope wash buffer two times, and staining of C3 to block with HRP blocker (ACD Biotechne) during 15 min at 40°C and wash at RT with RNAscope wash buffer two times. Doublecortin was then labelled by immunostaining, as described in the immunohistofluorescence methods. Staining of the nuclei was done with RNAscope® 4-6-diamino-2-phenylindole (DAPI, ACD Biotechne), and the slides were mounted with fluoromount (Sigma-Aldrich). Images were acquired in the Leica Thunder 3D DCV microscope (Leica microsystems) and were processed in ImageJ/Fiji software.

***In utero* electroporation**

In utero electroporation was performed in female mice carrying a floxed SELENOT gene (SELENOT^{f/f}), at 14.5 gestational days which corresponds to the peak of neurogenesis (Takahashi et al., 1995). Females were anaesthetised with isoflurane inhalation during surgery. To prevent pain post-injury, buprenorphine at 0.1 mg/kg was injected subcutaneously 10 min before surgery and uterine horn exposition. One µg of control plasmid DNA (pCAG-IRES-eGFP, Megason and McMahon, 2002; Hand et al., 2005) or pCAG-CRE-IRES-eGFP (named pCAG-CRE), where the Cre enzyme was inserted after excision from pSK-Cre1 plasmid (provided by Clifford Tabin, Harvard Medical school, diluted in PBS containing 0.05% of Fast Green (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was injected into the lateral ventricle of embryos using a Hamilton needle (Dutsher, Issy-les-Moulineaux, France). Each embryo was placed between tweezers-type electrodes (CUY 650P1-5, Sonidel, Dublin, Ireland) linked to an electroporator (CUY21 EDIT, Sonidel, Dublin, Ireland) to apply 5 pulses at 50 V/50 ms, separated by 950 ms intervals. Uterine horns were placed back into the mice abdomen and the cavities were sutured-closed.

Immunohistofluorescence

Embryo heads were collected 24 or 72 h after *in utero* electroporation and fixed in 4% PFA, for 6 h at 4°C. Samples were then dehydrated by immersion in 15% sucrose/PBS

overnight at 4°C, and in 30% sucrose/PBS overnight at 4°C before being embedded in tissue-freezing medium (Tissue-Tek, Sigma) and stored at – 80°C. Immunohistofluorescence was performed on 12-µm coronal sections obtained by cryostat microtome (Leica). For SELENOT, nestin and CTIP2 protein staining, slides were post-fixed in 4% PFA for 30 min and blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, 1% donkey serum /for 2 h at RT. The antibodies anti-SELENOT (1:200, Grumolato et al., 2008), anti-nestin (1:250, Neuromics, Edina, USA), anti-DCX (1:250, Santa Cruz Biotechnology, Germany) and anti-CTIP2 (1:100, Invitrogen, Illkirch) were incubated overnight at 4°C. Visualization of immunostaining was performed by Alexa Fluor 650 or 594-conjugated secondary antibodies diluted at 1:500 (Invitrogen). Nuclei were visualized with DAPI (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml in PBS, and slides were mounted with PBS/glycerol 50/50 v/v for observation. Images were acquired with Leica Thunder 3D DCV microscope (Leica microsystems) and were processed using ImageJ/Fiji software.

Statistical analysis

Data comparisons were performed using the results of at least three independent experiments and were represented as means $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed on Graphpad Prism 5 software, using Kruskal-Wallis *U* test and Dunn's post-test, Mann-Whitney *U* test or Unpaired *t* test. Significance was set at **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Acknowledgments: Images were acquired in PRIMACEN, the cell imaging platform of Normandy.

Competing interests: The authors declare no competing or financial interests.

Funding: This work was supported by INSERM, the University of Rouen Normandy, the Regional Council of Normandy, DOIT, PHEDERCPG and 3R FEDER programs, and the French Ministry of Higher Education and Research. Europe gets involved in Normandy through the FEDER program.

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.
- Alsharif, I., Boukhzar, L., Lefranc, B., Godefroy, D., Aury-Landas, J., Rego, J. L., Rego, J. C., Naudet, F., Arabo, A., Chagraoui, A., et al. (2021).** Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol.* 40, 101839.
- Anderson, S., Mione, M., Yun, K. and Rubenstein, J. L. (1999).** Differential Origins of Neocortical Projection and Local Circuit Neurons: Role of Dlx Genes in Neocortical Interneuronogenesis. *Cereb. Cortex.* 9, 646–654.
- Angevine, J. B. Jr. and Sidman, R. L. (1961).** Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* 192, 766–768.
- Anton, E. S., Kreidberg, J. A. and Rakic, P. (1999).** Distinct functions of $\alpha 3$ and $\alpha(v)$ integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron.* 22, 277–289.
- Arai, T., Kelly, S. A., Brengman, M. L., Takano, M., Smith, E. H., Goldschmidt-Clermont, P. J. and Bulkley, G. B. (1998).** Ambient but not incremental oxidant generation effects intercellular adhesion molecule 1 induction by tumour necrosis factor α in endothelium. *Biochem. J.* 331, 853–861.
- Behar, T. N., Scott, C. A., Greene, C. L., Wen, X., Smith, S. V., Maric, D., Liu, Q.-Y., Colton, C. A. and Barker, J. L. (1999).** Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration. *J. Neurosci.* 19, 4449-4461.
- Boda, E., Pini, A., Hoxha, E., Parolisi, R. and Tempia, F. (2009).** Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *J. Mol. Neurosci.* 37, 238–253.
- Bösl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. and Taketo, M. M. (1997).** Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5531–5534.
- Boukhzar, L., Hamieh, A., Cartier, D., Tanguy, Y., Alsharif, I., Castex, M. T., 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.

Boyle, M. P., Bernard, A., Thompson, C. L., Ng, L., Boe, A., Mortrud, M., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Hevner, R. F. and Lein, E. S. (2011). Cell-type-specific consequences of reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 519, 2061-2089.

Cardoso, B. R., Roberts, B. R., Bush, A. I. and Hare, D. J. (2015). Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. *Metallomics.* 7, 1213-1228.

Castex, M. T., Arabo, A., Bénard, M., Roy, V., Le Joncour, V., Prévost, G., Bonnet, J. J., Anouar, Y. and Falluel-Morel, A. (2016). Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol. Neurobiol.* 53, 5818–5832.

Caviness, V. S. Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain Res.* 256, 293–302.

Chen, B., Wang, S. S., Hattox, A. M., Rayburn, H., Nelson, S. B. and McConnell, S. K. (2008). The Fezf2–Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11382-11387.

Chui, A., Zhang, Q., Dai, Q. and Shi, S. H. (2020). Oxidative stress regulates progenitor behavior and cortical neurogenesis. *Development.* 147, dev184150.

Clark, K. C., Sword, B. A. and Dupree, J. L. (2017). Oxidative stress induces disruption of the axon initial segment. *ASN Neuro.* 9, 1759091417745426.

Ferguson, M. A. J., Low, M. G. and Cross, G. A. M. (1985). Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260, 14547–14555.

Gogna, R., Madan, E., Kuppusamy, P. and Pati, U. (2012). Reactive oxygen species-mediated p53 core-domain modifications determine apoptotic or necrotic death in cancer cells. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 400–412.

Grumolato, L., Ghzili, H., Montero-Hadjadje, M., Gasman, S., Lesage, J., Tanguy, Y., Galas, L., Ait-Ali, D., Leprince, J., Guérineau, N. C., et al. (2008). Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J.* 22, 1756–1768.

- 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.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J. I. T., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005).** Phosphorylation of neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron.* 48, 45–62.
- Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L. and Rakic, P. (2000).** Differential Modulation of Proliferation in the Neocortical Ventricular and Subventricular Zones. *J. Neurosci.* 20, 5764.
- Hendry, S. H., Schwark, H. D., Jones, E. G. and Yan, J. (1987).** Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J. Neurosci.* 7, 1503–1519.
- Hevner, R. F. (2007).** Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 101–109.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. A. and Herz, J. (1999).** Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron.* 24, 481–489.
- Hirota, Y., Kubo, K. I., Fujino, T., Yamamoto, T. T. and Nakajima, K. (2018).** ApoER2 controls not only neuronal migration in the intermediate zone but also termination of migration in the developing cerebral cortex. *Cereb. Cortex.* 28, 223–235.
- Jakupoglu, C., Przemeck, G. K. H., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., de Angelis, M. H., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Brielmeier, M., et al. (2005).** Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1980–1988.
- Janik, M. E., Lityńska, A. and Vereecken, P. (2010).** Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 545–555.
- Karagogeos, D. (2003).** Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front. Biosci.* 8, 1304–1320.

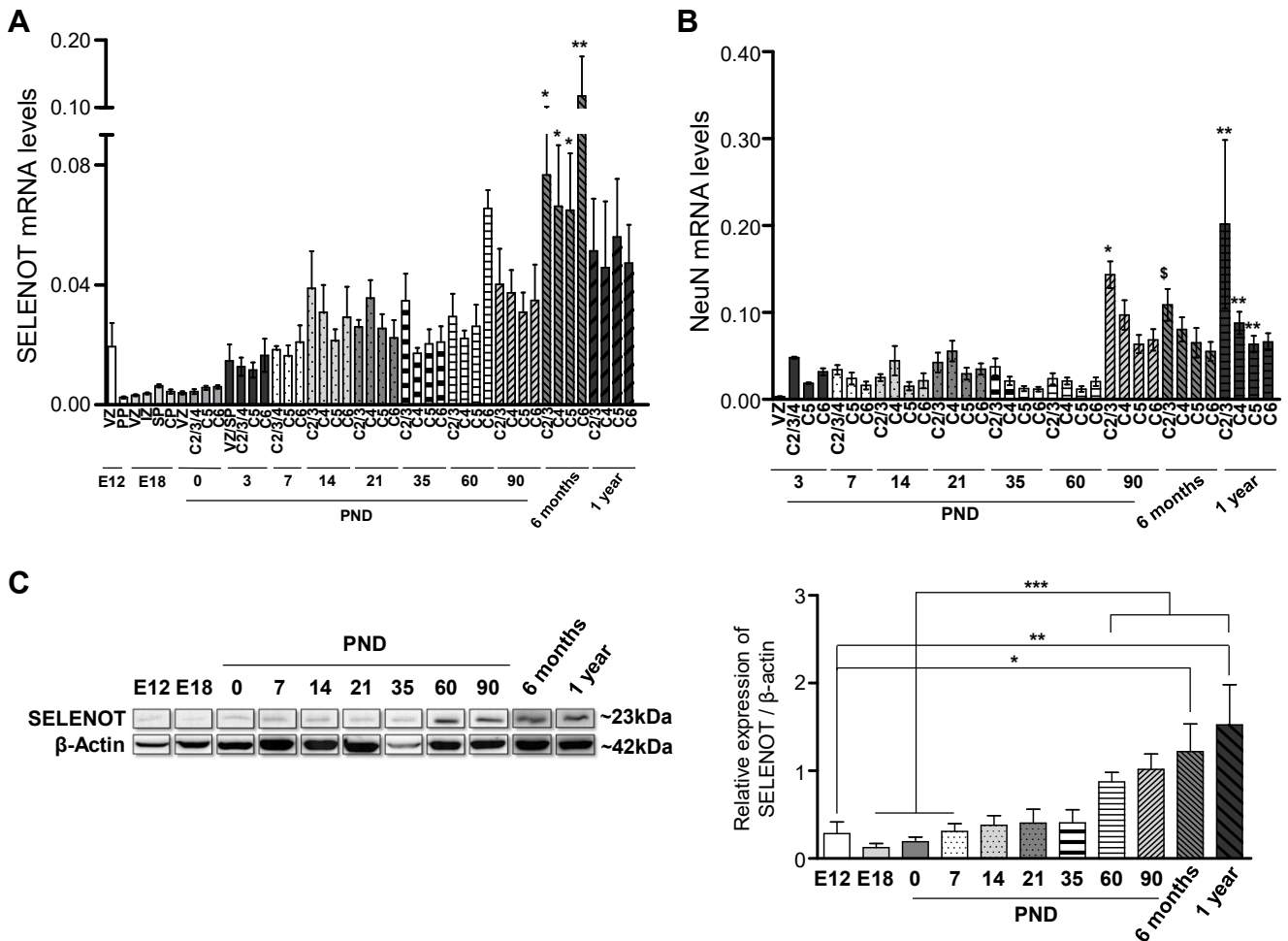
- Kihara, M., Yoshioka, H., Hirai, K., Hasegawa, K., Kizaki, Z. and Sawada, T.** (2002). Stimulation of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. *Dev. Brain Res.* 138, 195–198.
- Kwan, K. Y., Šestan, N. and Anton, E. S.** (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development.* 139, 1535–1546.
- Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H. and Kornblum, H. I.** (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell.* 8, 59–71.
- Lin, Y. S., Wang, H. Y., Huang, D. F., Hsieh, P. F., Lin, M. Y., Chou, C. H., Wu, I. J., Huang, G. J., Gau, S. S. F. and Huang, H. S.** (2016). Neuronal splicing regulator RBFOX3 (NeuN) regulates adult hippocampal neurogenesis and synaptogenesis. *PLoS One.* 11, e0164164.
- Liu, Y. S., Guo, X. Y., Hirata, T., Rong, Y., Motooka, D., Kitajima, T., Murakami, Y., Gao, X. D., Nakamura, S., Kinoshita, T., et al.** (2018). N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing. *J. Cell Biol.* 217, 585–599.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J. S., Davis, M. B. E. and Kriegstein, A. R.** (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron.* 15, 1287–1298.
- Luk, K. C. and Sadikot, A. F.** (2004). Glutamate and Regulation of Proliferation in the Developing Mammalian Telencephalon. *Dev. Neurosci.* 26, 218–228.
- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. and Rubenstein, J.L.** (2001). Sorting of Striatal and Cortical Interneurons Regulated by Semaphorin-Neuropilin Interactions. *Science.* 293, 872–875.
- Matsugami, T. R., Tanemura, K., Mieda, M., Nakatomi, R., Yamada, K., Kondo, T., Ogawa, M., Obata, K., Watanabe, M., et al.** (2006). Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12161–12166.
- Mazza, R., Gattuso, A., Imbrogno, S., Boukhzar, L., Leo, S., Mallouki, B. Y., Filice, M., Rocca, C., Angelone, T., Anouar, Y., et al.** (2019). Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* 222, jeb201202.

- Megason, S. G. and McMahon, A. P.** (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*. 129, 2087-2098.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M.** (2001). Asymmetric Inheritance of Radial Glial Fibers by Cortical Neurons. *Neuron*. 31, 727–741.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. and Macklis, J. D.** (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427-437.
- Moustafa, M. E. and Antar, H. A.** (2012). A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem. Genet.* 50, 736–747.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L. and Pearlman, A. L.** (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 143–150.
- Nadarajah, B. and Parnavelas, J. G.** (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 423-432.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R.** (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 409, 714–720.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeño, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R.** (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144.
- O'Rourke, N. A., Dailey, M. E., Smith, S. J. and McConnell, S. K.** (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science*. 258, 299–302.
- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al.** (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* 6, 347.
- Perez-Campo, R., Loâ Pez-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C. and Barja, G.** (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.* 163, 149–158.
- Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T. and Ghosh, A.** (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*. 129, 3147–60.
- Pothion, H., Jehan, C., Tostivint, H., Cartier, D., Bucharles, C., Falluel-Morel, A., Boukhzar, L., Anouar, Y. and Lihrmann, I.** (2020). Selenoprotein T: An Essential Oxidoreductase Serving as a Guardian of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 33, 1257-1275.

- Rakic, P.** (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61–83.
- Rakic, P.** (1982). Early developmental events: cell lineages, acquisition of neuronal positions, and areal and laminar development. *Neurosci. Res. Program Bull.* 20, 439-451.
- Raymond, L. J., Deth, R. C. and Ralston, N. V. C.** (2014). Potential role of selenoenzymes and antioxidant metabolism in relation to autism etiology and pathology. *Autism Res. Treat.* 2014, 164938.
- Sahara, S., Yanagawa, Y., O’Leary, D. D. M. and Stevens, C. F.** (2012). The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J. Neurosci.* 32, 4755–4761.
- Sanada, K., Gupta, A. and Tsai, L. H.** (2004). Disabled-1-Regulated Adhesion of Migrating Neurons to Radial Glial Fiber Contributes to Neuronal Positioning during Early Corticogenesis. *Neuron.* 42, 197–211.
- Scharpf, M., Schweizer, U., Arzberger, T., Roggendorf, W., Schomburg, L. and Köhrle, J.** (2007). Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J. Neural. Transm. (Vienna).* 114, 877-884.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. and Nakajima, K.** (2011). The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the dab1-dependent “inside-out” lamination in the neocortex. *J. Neurosci.* 31, 9426–9439.
- Sengupta, A., Carlson, B. A., Labunskyy, V. M., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L.** (2009). Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem. Cell. Biol.* 87, 953–961.
- Shao, Z. Q., Zhang, X., Fan, H. H., Wang, X. S., Wu, H. M., Zhang, L., Cheng, W. H. and Zhu, J. H.** (2019). Selenoprotein T Promotes Proliferation and G1-to-S Transition in SK-N-SH Cells: Implications in Parkinson’s Disease. *J. Nutr.* 149, 2110-2119.
- Simonian, S. X. and Herbison, A. E.** (2001). Differing, Spatially Restricted Roles of Ionotropic Glutamate Receptors in Regulating the Migration of GnRH Neurons during Embryogenesis. *J. Neurosci.* 21, 934-943.
- Smart, I. H. and McSherry, G. M.** (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J. Anat.* 134, 415–42.

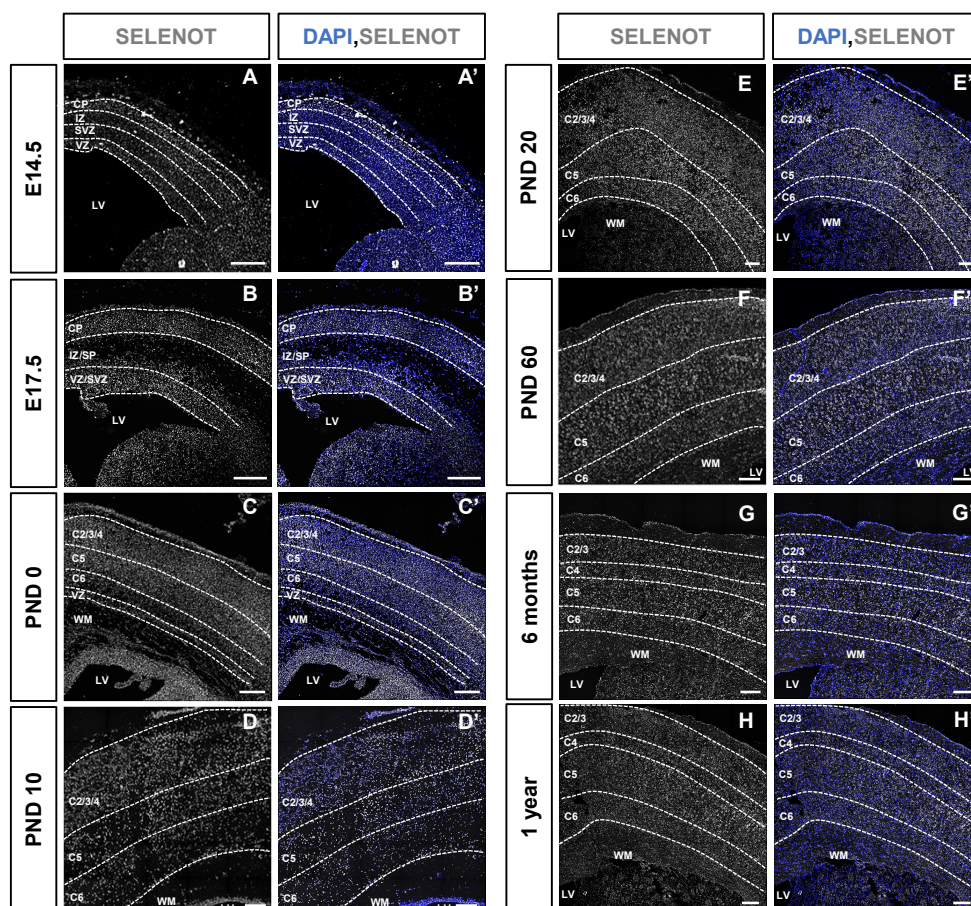
- Stachowiak, E. K., Benson, C. A., Narla, S. T., Dimitri, A., Chuye, L. E. B., Dhiman, S., Harikrishnan, K., Elahi, S., Freedman, D., Brennand, K.J., et al.** (2017). Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Transl. Psychiatry*. 7, 6.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. and Caviness, V. S. Jr.** (1995). Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15, 6058-6068.
- Tan, S. S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P. P., Reese, B. E. and Faulkner-Jones, B.** (1998). Separate Progenitors for Radial and Tangential Cell Dispersion during Development of the Cerebral Neocortex. *Neuron*. 21, 295–304.
- 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.
- Tonelli, F. M. P., Santos, A. K., Gomes, D. A., da Silva, S. L., Gomes, K. N., Ladeira, L. O. and Resende, R. R.** (2012). Stem Cells and Calcium Signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 891-916.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., Ma, S. Y., Chauhan, A., Chauhan, V., Bobrowicz, T. W., et al.** (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta. Neuropathol.* 119, 755–770.
- Wirth, E. K., Conrad, M., Winterer, J., Wozny, C., Carlson, B. A., Roth, S., Schmitz, D., Bornkamm, G. W., Coppola, V., Tessarollo, L., et al.** (2010). Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J.* 24, 844–852.
- Zhang, Y., Zhou, Y., Schweizer, U., Savaskan, N. E., Hua, D., Kipnis, J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N.** (2008). Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. *J. Biol. Chem.* 283, 2427–2438.

Fig. 1.



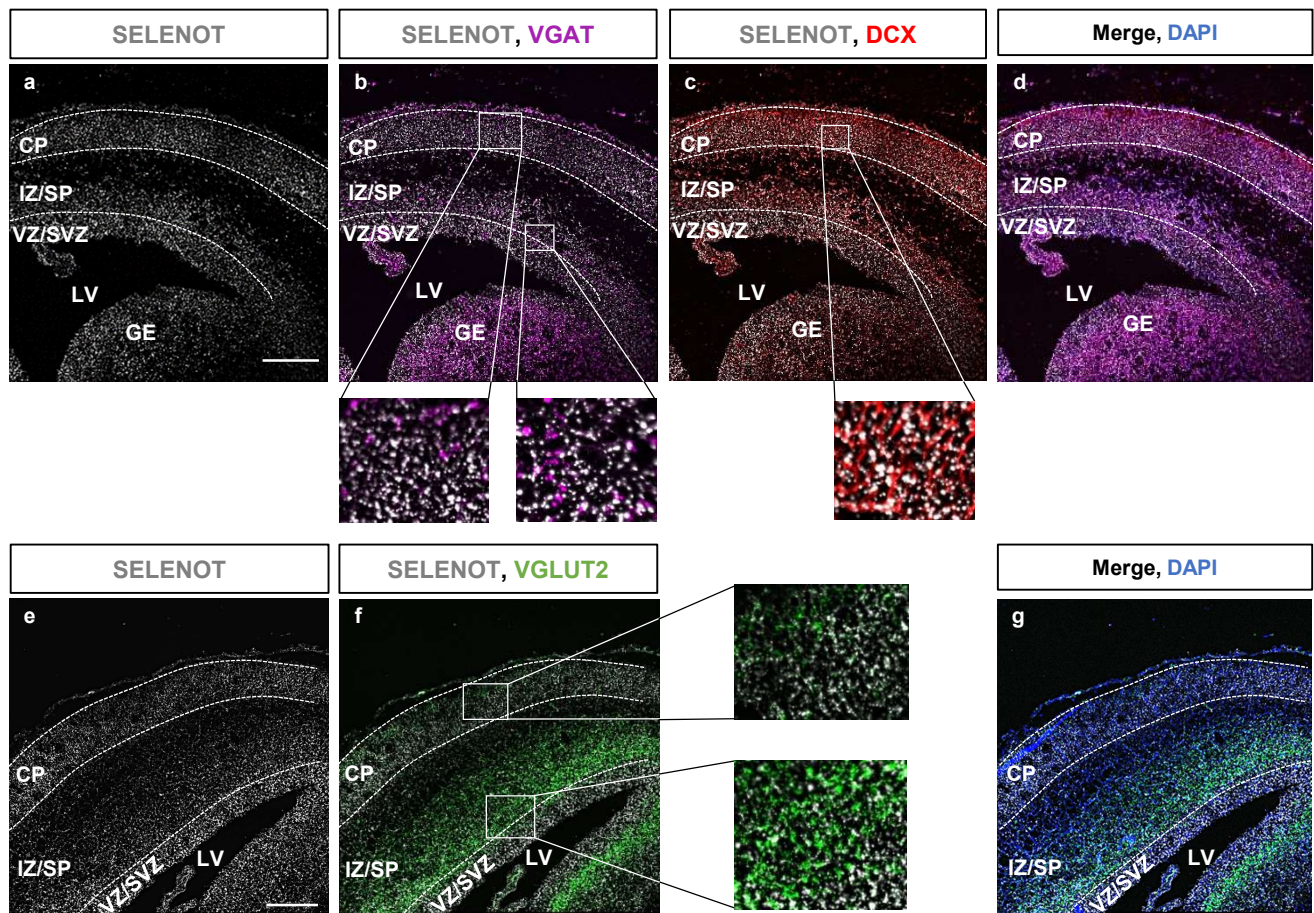
SELENOT is expressed in the neocortex during embryogenesis and throughout the mouse lifespan. (A) SELENOT mRNA levels were analysed in each cortical layer of mice, using laser capture microdissection followed by RT-qPCR, from E12 to 1-year-old. SELENOT mRNA expression was detected in the neocortex during embryogenesis and maturation, with a higher levels in the VZ at E12, becoming significantly higher in aged mice. Relative expression of SELENOT was normalized to GAPDH and represents mean $\pm$ sem, $n=6-12$ for E12-1 year. An Increase of >17-fold, $*P<0.05$ for 6 months in C2/3/C4/C5 versus E12 PP, E18 VZ/IZ/SP/CP, PND0 VZ and C2/3/4; >27-fold, $**P<0.01$ for 6 months in C6 versus E12 PP, E18 VZ/IZ/SP/CP, PND0 VZ and C2/3/4, using Kruskal-Wallis U test and Dunn's post-test. (B) NeuN relative expression was also analysed in the same samples of microdissected layers, which confirmed previously reported data. Relative expression of NeuN mRNA was normalized to GAPDH mRNA and data were presented as mean $\pm$ sem. $n=3-12$ for PND3-1 year. A >6-fold increase, $*P<0.05$ for PND90 C2/3 versus PND3 VZ, PND7 C5, PND14 C2/3/C5/C6 and PND35 C2/3/C4/C5; >5-fold increase, $\$P<0.05$ for 6 months C2/3 versus PND14 C5/C6; >5-fold increase, $**P<0.01$ for 1-year C2/3/C4/C5 versus PND14 C5/C6 and PND60 C2/3/C4/C5; using Kruskal-Wallis U test and Dunn's post-test. (C) SELENOT protein levels were determined by western blot in the entire mouse cortex, showing its increase in adult and aged mice compared to embryonic and PND stages. SELENOT was normalized to β -Actin and the data represent means $\pm$ sem. $n=3$. >3-fold increase, $*P<0.05$ for E12 versus 6 months; >5-fold increase, $**P<0.01$ E12 versus 1 year and $***P<0.001$ for E18/PND0/PND7 versus PND60/PND90/6 months/1 year; using Kruskal-Wallis U test and Dunn's post-test.

Fig. 2.



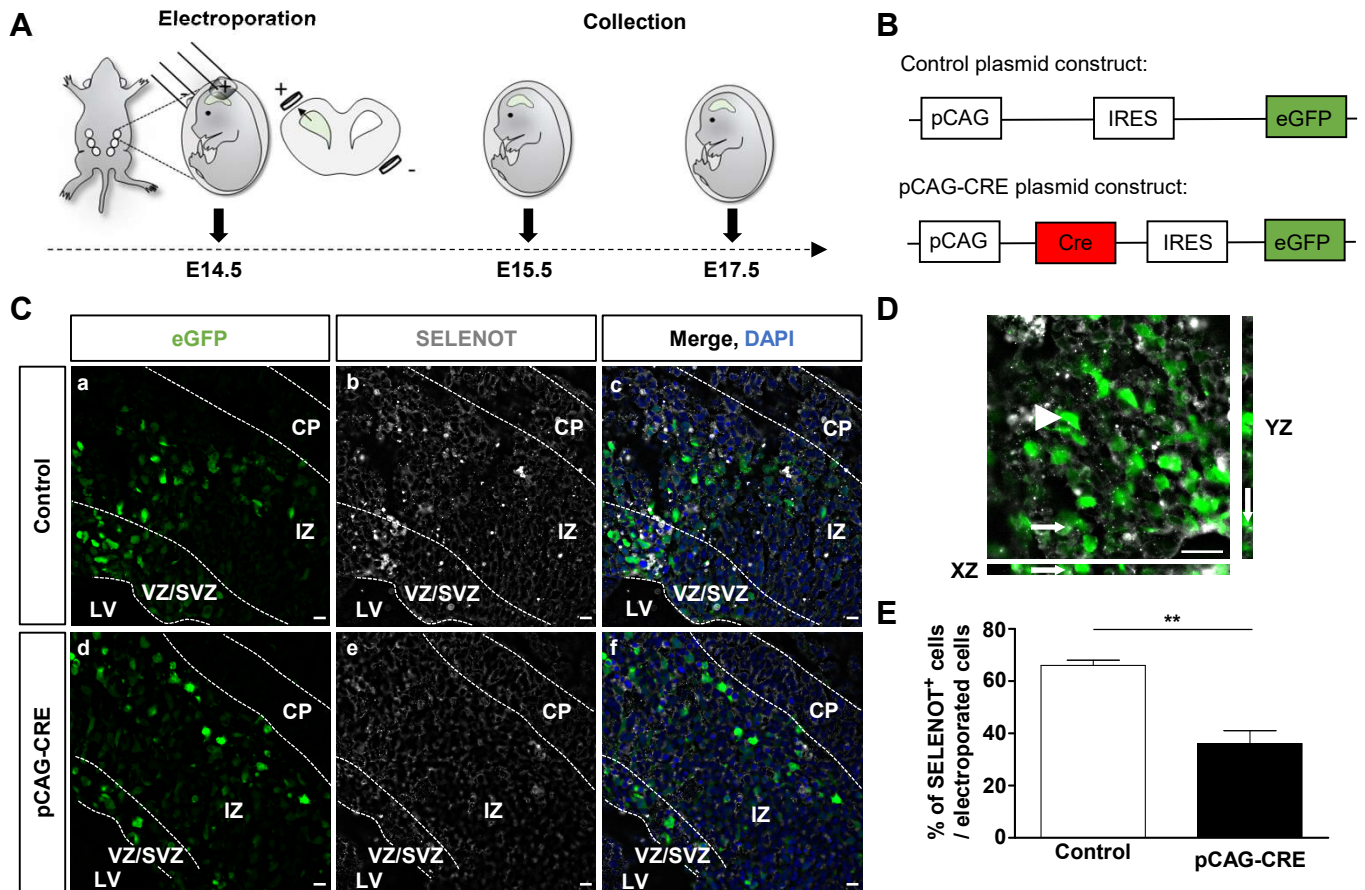
SELENOT mRNA expression in cortical layers throughout mouse development using *in situ* hybridization. Representative images showing SELENOT mRNA from E14.5 to 1-year are presented. SELENOT (grey) is expressed at similar levels in all cortical layers and between embryonic, PND, adult and aged mice (A-H). Staining with DAPI (blue) was used to evaluate cell density (A'-H'). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate; GE, ganglionic eminence; LV, lateral ventricle; WM, white matter. Scale bar 150 μ m.

Fig. 3.



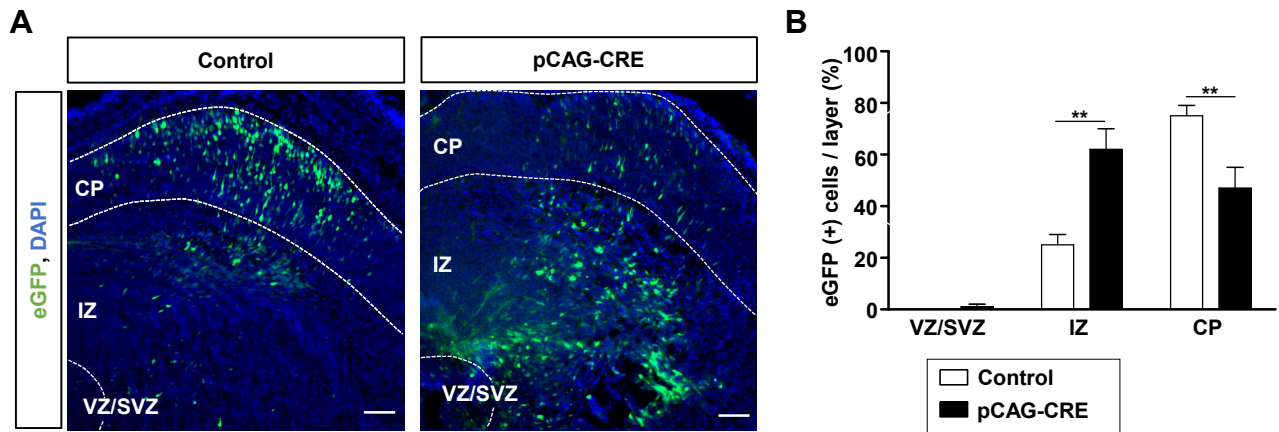
Expression of SELENOT in glutamatergic and GABAergic cells during embryogenesis. Representative images showing the localisation of SELENOT (grey) at E17.5 in the proliferative (VZ/SVZ), the migrating (IZ) and in the CP layers of the mouse neocortex, delimited by dashed lines after DAPI staining (blue) (a,d). SELENOT was detected in GABAergic neurons (VGAT; magenta) in the GE where these neurons are generated and in all cortical layers, where GABAergic neurons migrate (a,b,d). In the cortical plate, SELENOT was found in DCX-positive immature neurons (red), which are differentiating (a,c,d). At E17.5, SELENOT was detected in glutamatergic neurons (VGLUT2, green) in all cortical layers (delimited by DAPI staining, blue) where they proliferate (VZ/SVZ), migrate (IZ) and differentiate (CP) (e,f,g). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate; GE, ganglionic eminence; LV, lateral ventricle. Scale bars 150 μ m.

Fig. 4.



Efficacy of SELENOT disruption by *in utero* electroporation (IUE). (A) IUE was performed in E14.5 embryos where SELENOT gene was floxed (SELENOT^{fl/fl}). Plasmids were injected in the border of the lateral ventricle of embryo and transfected in neuroblast progenitors by electric pulses. Embryos were collected 24 h (E15.5) or 72 h (E17.5) IUE. (B) The control plasmid contained a pCAG plasmid backbone with an eGFP sequence to visualise the transfected cells, while the plasmid that disrupts SELENOT gene (pCAG-CRE) contained, in addition, a Cre recombinase sequence which deletes the floxed part of the SELENOT gene in SELENOT^{fl/fl} embryos. (C) Representative images of transfected cells (green) in E17.5 embryos showing the expression of SELENOT (grey) in all cortical layers (a,b,c) and lower SELENOT labelling in pCAG-CRE-electroporated neocortex (d,e,f). Nuclei were labelled with DAPI. Images in (D) show the colocalization of SELENOT with green-positive cells transfected with the control (arrow) but also its absence in certain transfected green-positive cells (arrow heads) in control condition. Acquisitions were obtained by Z-stack imaging. (E) Quantification of the signal showed 1.8-fold decrease of SELENOT-positive fluorescent cells when electroporation was performed with the pCAG-CRE plasmid compared to control. Data are represented as mean $\pm$ sem. $n=522$ cells for control and 935 cells for pCAG-CRE conditions, $**P<0.01$ using Unpaired t test. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate; LV, lateral ventricle. Scale bars = 10 μ m.

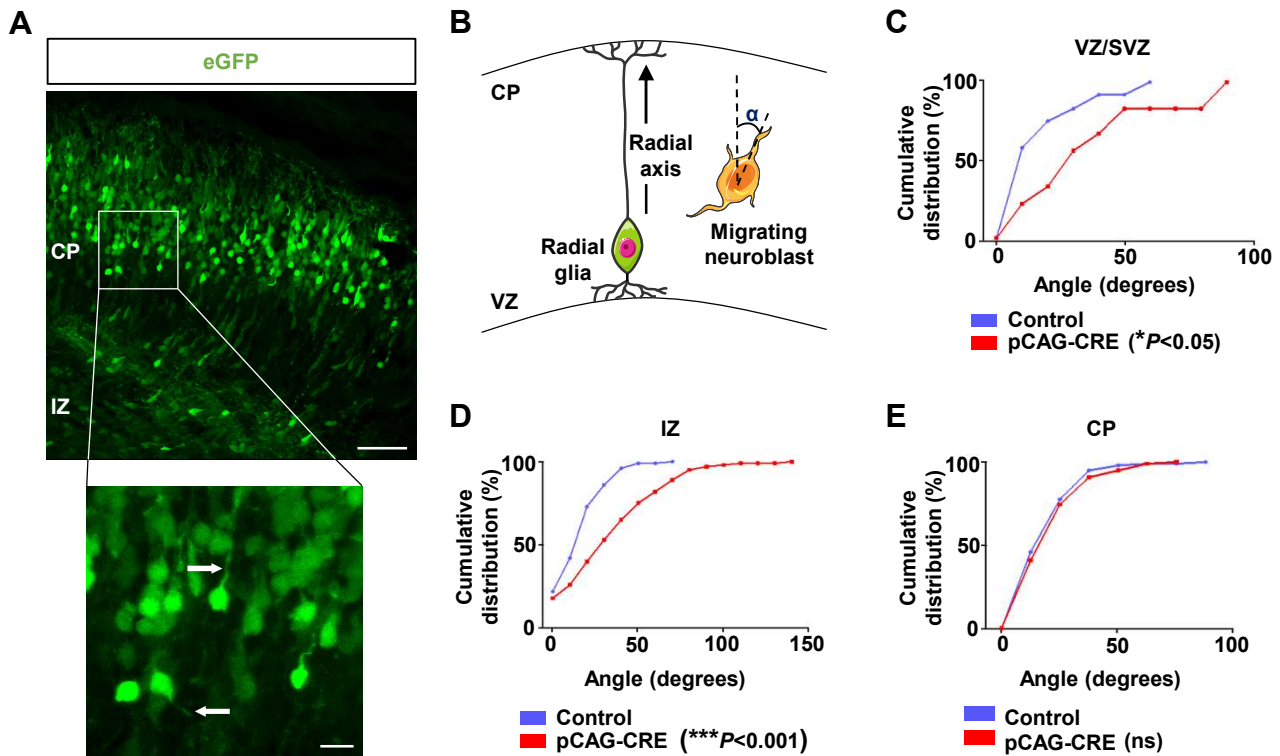
Fig. 5.



Disruption of SELENOT expression by IUE leads to neuroblast positioning defect.

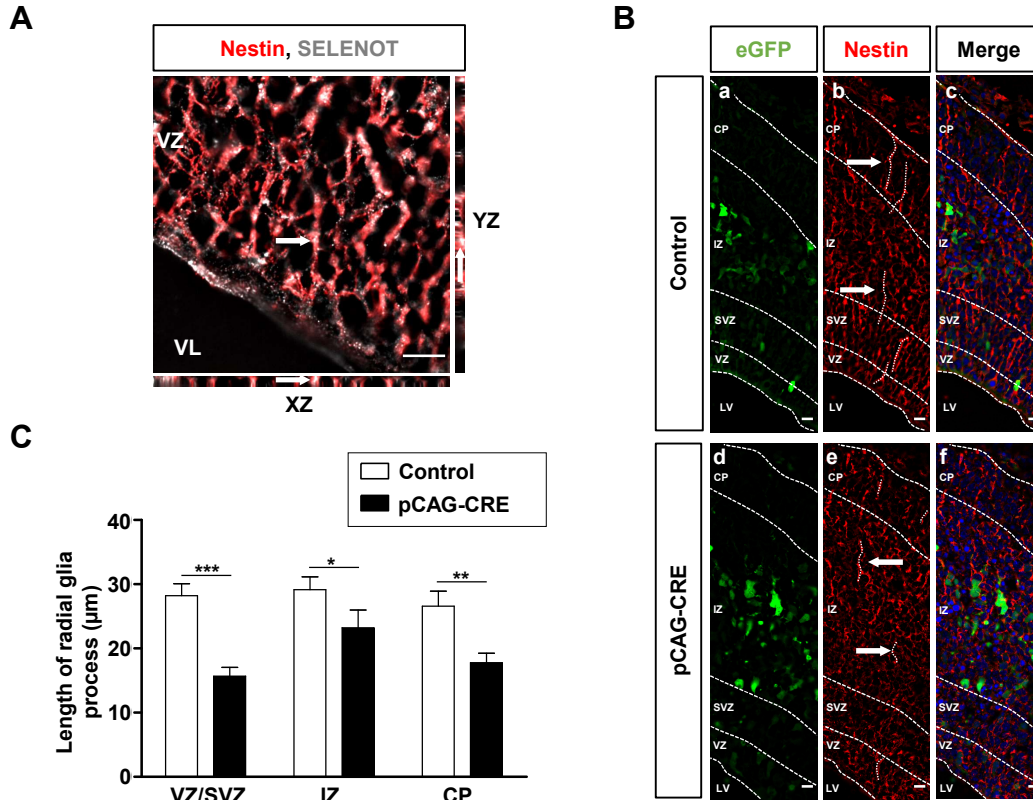
(A) Representative images obtained 72 h after IUE (E17.5) with the control or pCAG-CRE plasmid. In control condition, most eGFP-positive electroporated cells were visible in the CP, while higher eGFP-positive cells electroporated with the pCAG-CRE plasmid remained in the IZ. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). (B) Quantification of eGFP-positive neuroblasts in each cortical layer. Data are represented as mean $\pm$ sem. $n=6$ for control and $n=7$ for pCAG-CRE, ** $P<0.01$ using Mann Whitney U test. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate. Scale bars = 50 μ m.

Fig. 6.



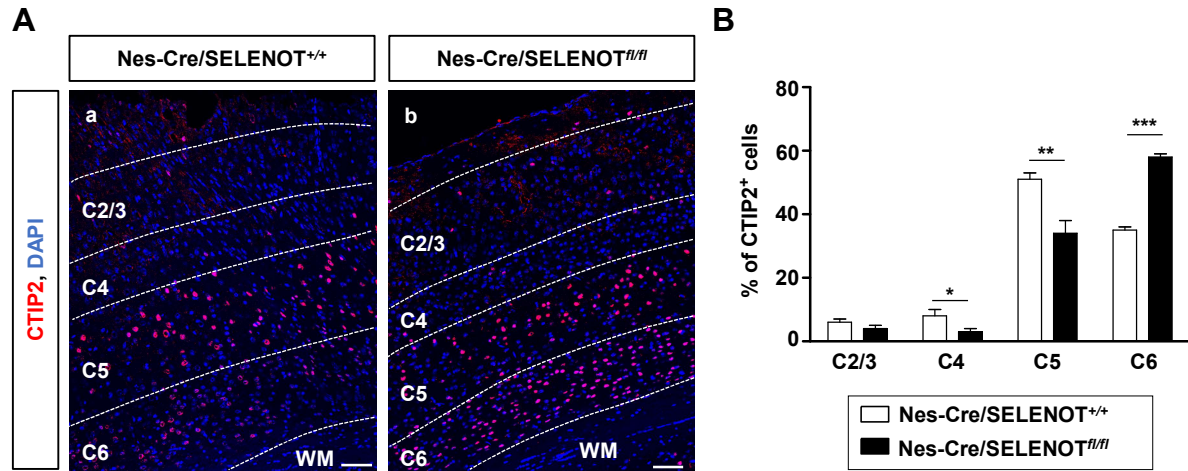
SELENOT deficiency in neuroblasts leads to migration polarity abnormalities. (A) Transfected neuroblasts (green) migrate along the radial glial axis from the VZ to the CP. The inset shows leading processes of neuroblasts (white arrow), which drive their migration. (B) The migration polarity of neuroblasts was determined by calculating the angle (in degrees) between the radial glial axis and the leading process of neuroblasts. The graphs represent the cumulative distribution of the angles measured for cells transfected by the control (blue) or pCAG-CRE (red) plasmids. Seventy-two hours after electroporation, pCAG-CRE cells have a significantly higher angle of migration in VZ/SVZ (C) ($n=12-18$ cells per condition) and IZ (D), ($n=267-273$ cells per condition), compared to control cells. (E) Cells that reach the CP display no difference between the two groups ($n=117-292$ cells per condition). Only cells with a distinguishable leading process were included in this analysis. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, not significant versus the respective control using Mann-Whitney U test. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate. Scale bars = $50\mu\text{m}$ and zoom = $10\mu\text{m}$.

Fig. 7.



SELENOT disruption in radial glial progenitors leads to alteration of radial glial scaffolding. (A) Immunostaining for nestin (red) was performed in control condition to confirm the expression of SELENOT (grey) in radial glial soma and processes. Z-stack imaging shows the colocalization of SELENOT with nestin (white arrow). (B) Radial glial scaffolds in neocortical slices of E17.5 mice were compared between cells transfected (green) with control (upper panel; a,b,c) or pCAG-CRE (lower panel; d,e,f) plasmids. Radial glial processes have a polarized organization toward the pial surface in the normally developing neocortex (b), but are more discontinuous and shorter in pCAG-CRE-treated neocortex (e). The images c and f show the merge of transfected cell fluorescence, nestin labelling and DAPI staining. (C) Quantification of radial glial processes length indicates a decrease of radial glial processes throughout the different cortical layers after transfection with pCAG-CRE plasmid, with 46% decrease in VZ/SVZ ($n=8-9$ processes), 20% decrease in IZ ($n=13$ processes) and 33% decrease in CP ($n=8-9$ processes). Quantification was realized on Z-stack projection and represent means $\pm$ sem. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ using Mann-Whitney U test. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate; LV, lateral ventricle. Scale bars = 10μm.

Fig. 8.



Neurons of deep cortical layers have positioning defects in adult brain SELENOT-deficient mice. (A) Representative images of the neocortex of Cre recombinase-expressing WT (Nes-Cre/SELENOT^{+/+}) (a) or Nes-CRE/SELENOT^{fl/fl} (b) adult mice, labelled for CTIP2, a marker of deep cortical neurons, showing more CTIP2-positive neurons in C6 layer of Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} mice compared to Nes-Cre/SELENOT^{+/+}, and in contrast, less CTIP2-positive neurons in C5 and C4 layers. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). (B) Quantification of CTIP2-positive neurons in each cortical layer indicates a 17% increase in C6 and a 5% and 23% decrease in C4 and C5, respectively, in Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} compared to Nes-Cre/SELENOT^{+/+} neocortex. Data are presented as mean $\pm$ sem ($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ using Unpaired t test. C2/3/4/5/6, cortical layer 2/3/4/5/6; WM, white matter. Scale bars = 50 μ m.

~ Discussion ~

Les ROS sont des sous-produits métaboliques considérées comme essentielles au neurodéveloppement, en agissant comme seconds messagers (Le Belle et al., 2011). Pour autant, leur excès est néfaste, pouvant conduire à la mort cellulaire. Afin de réguler les niveaux de ROS, les cellules mettent en place des défenses antioxydantes.

Parmi elles, nous retrouvons les sélénoprotéines. Celles-ci incorporent l'oligoélément sélénium, découvert par le chimiste et physicien suédois Jöns Jacob Berzelius, qu'il nomma ainsi d'après le nom grec de la lune « selène ». Le Se est un micro-nutriment non renouvelable et a longtemps été considéré comme toxique. Ce n'est que 80 ans après la découverte de sa toxicité, que le Se a été reconnu comme essentiel à la physiologie animale, puisque sa déficience induit des pathologies (Pillai et al., 2014). Le Se est incorporé à l'acide aminé Sec et confère une activité d'oxydo-réduction aux sélénoprotéines (Castellano et al., 2009). Les mécanismes d'action des sélénoprotéines ont fait l'objet de bon nombre de recherches, mais le rôle de certaines d'entre-elles reste encore peu compris à ce jour.

La SELENOT est l'une de ces enzymes qui a été découverte il y a maintenant 22 ans, grâce à des recherches bioinformatiques (Kryukov et al., 1999). Notre laboratoire fût le premier à identifier son implication lors de la différenciation cellulaire, puisque son expression se voit augmentée suite au traitement des cellules de phéochromocytomes par le PACAP, en modulant la mobilisation calcique (Grumolato et al., 2008). Par la suite, notre laboratoire a également démontré que celle-ci est localisée au niveau des cellules de la glie radiaire qui donne naissance aux neuroblastes lors de l'embryogenèse, ainsi qu'au sein des zones de migration et de différenciation du néocortex (Tanguy et al., 2011b). Pour comprendre son rôle lors du neurodéveloppement, notre équipe a développé un modèle de souris invalidé pour la SELENOT, mais cette invalidation s'est avérée être létale (Boukhzar et al., 2016). La mise au point d'un second modèle, invalidé spécifiquement dans le lignage neural a alors mis en évidence l'importance de la SELENOT pour la survie neuronale et pour la mise en place des connexions fonctionnelles, puisque ces souris sont hyperactives à l'âge adulte (Castex et al., 2016).

Ces travaux témoignent ainsi d'un rôle crucial de la SELENOT lors du neurodéveloppement et c'est sur ce sujet que les recherches de cette thèse ont porté.

I] Profil d'expression de la SELENOT chez la souris C57Bl6/J

1.1) L'expression de la SELENOT augmente tout au long de la vie de la souris

Une étude antérieure réalisée au sein du laboratoire a montré que l'inactivation de la SELENOT au niveau central induit une réduction du volume cérébral 7 jours après la naissance, dont une diminution du volume du néocortex de 16 % (Castex et al., 2016). Afin de faire le lien entre le neurodéveloppement et le rôle de la SELENOT, nous avons voulu étudier son profil d'expression au niveau du néocortex. Lors du développement, les couches corticales se forment les unes après les autres par la migration des neuroblastes, allant des couches profondes vers les couches superficielles (dit *inside-out*) (Caviness, 1982). Une fois matures, les différentes couches corticales assurent des fonctions distinctes selon les types cellulaires les constituant (réception, traitement et envoi de l'information au niveau des aires intra-corticales ou sous-corticales) (Kwan et al., 2012). De ce fait, nous avons analysé la présence de l'ARNm de la SELENOT par microdissection laser, afin de pouvoir isoler les couches corticales et ce à différents stades du développement. Notre analyse, chez la souris C57Bl6/J, indique la présence de la SELENOT dès les stades embryonnaires et ce au niveau des différentes couches jusqu'à développées, comme démontré lors de précédentes études réalisées au laboratoire (Tanguy et al., 2011b). Cependant, contrairement aux résultats obtenus lors de cette étude, nous avons observé que l'expression de la SELENOT ne décline pas dans le cortex après la naissance et est présente au sein de toutes les couches corticales lors de la maturation cérébrale. Nous avons donc poussé notre analyse jusqu'à 1 an de vie de l'animal, révélant une présence plus importante de la SELENOT entre la souris âgée (de 6 mois) et les stades embryonnaires et postnataux précoces.

La technique de microdissection laser demandant énormément de matériel biologique pour étudier l'expression de la SELENOT au niveau protéique, et n'ayant pas de différences significatives entre les couches corticales d'un même stade, nous avons analysé son expression par western blot au sein du cortex entier. Les résultats obtenus confirment ceux observés pour l'ARNm de la SELENOT, témoignant d'une augmentation de son expression entre les souris adultes et âgées avec les stades embryonnaires et postnataux précoces. L'augmentation d'expression de la SELENOT à des stades avancés indique un possible rôle de la SELENOT lors du vieillissement. En effet, c'est en 1956 que fût émise par Harman la première hypothèse

soulignant un lien entre le vieillissement et la production de ROS (Harman, 1956). Les ROS régulent différents processus, comme la senescence cellulaire ou encore l'expression de certains gènes via des remaniements épigénétiques. Lors du vieillissement, le stress oxydatif est exacerbé au niveau mitochondrial, en raison de dysfonctionnements liés à l'âge, induisant l'hypo- ou l'hyper-méthylation de certains gènes, notamment responsables de la senescence des cellules (Ashapkin et al., 2019; Passos et al., 2010; Sanchez-Roman et al., 2011). De plus, une étude a mis en avant la corrélation négative entre les niveaux de ROS et le vieillissement, montrant leur augmentation avec l'âge (Perez-Campo et al., 1998). Ces données sont ainsi en faveur d'une augmentation d'expression de la SELENOT avec l'âge, afin de protéger les cellules vieillissantes contre le stress oxydatif.

Les techniques décrites ci-dessus ont permis une identification qualitative et quantitative de l'expression de notre protéine d'intérêt, mais ne permettent pas de la localiser histologiquement. Pour cela, nous avons exploré la localisation tissulaire de la SELENOT au niveau néocortical par le biais du RNAscope, une technique d'hybridation *in situ*. Cette analyse confirme une fois de plus la présence de la SELENOT au niveau de toutes les couches corticales dans le modèle murin, et ce jusqu'à au moins 1 an de vie. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par les méthodes quantitatives précédentes, nous n'avons pas observé d'augmentation d'intensité d'expression de l'ARNm de la SELENOT entre les souris âgées et celles aux stades précoces du développement.

Cette opposition peut s'expliquer par des différences architecturales des tissus entre l'embryogenèse et l'adulte, induisant un biais de comptage après imagerie, par manque de discrimination cellulaire (les cellules sont bien éparées et distinctes dans le tissu adulte, alors que la forte prolifération lors de l'embryogenèse ne permet pas de discriminer les neuroblastes). Nous avons également réalisé un comptage du nombre de spots d'ARNm de la SELENOT au sein des aires corticales, mais là encore, aucune différence n'est observée entre les stades précoces et tardifs du développement (données non présentées). Ainsi, la SELENOT semble être plus abondante visuellement lors des stades embryonnaires, ce qui pourrait être dû à une accumulation de neuroblastes. Mais la rationalisation de son expression avec des gènes de ménage (GAPDH, Pgk1 et β -actine) témoigne bien d'une augmentation liée à l'âge.

1.2) Localisation de la SELENOT lors de l'embryogenèse

Afin de mieux comprendre l'implication de la SELENOT lors de la corticogenèse, nous avons étudié plus précisément sa localisation, par hybridation *in situ*, au sein des différentes couches corticales et en fonction des deux types neuronaux principaux peuplant le néocortex. Les résultats obtenus lors de l'embryogenèse (E17,5) démontrent la présence de la SELENOT au niveau des zones prolifératives (VZ/SVZ), de migration (IZ) et également au niveau de la CP. Au sein de la zone formant les futures couches corticales, la SELENOT est colocalisée avec la doublecortine (DCX), présente au niveau des neurones immatures. A ce stade et au niveau de la CP, les neuroblastes commencent leur différenciation en neurones matures, mécanisme dépendant de la mobilisation calcique. La SELENOT a été précédemment décrite comme nécessaire à la mobilisation calcique lors de la différenciation des cellules PC12 en réponse au PACAP (Grumolato et al., 2008; Tonelli et al., 2012). Il est donc concevable de retrouver la SELENOT au niveau des neuroblastes DCX positifs, afin de promouvoir leur différenciation en neurones.

Au niveau du néocortex à E17,5, la SELENOT est également présente au niveau des neurones exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT2). Les cellules glutamatergiques sont les principaux neurones peuplant le néocortex adulte et constituent les neurones de projection (Sahara et al., 2012; Xu et al., 2016). Par hybridation *in situ*, nous avons remarqué que la SELENOT est présente au sein des neurones glutamatergiques au niveau des différentes couches corticales à E17,5. Ainsi, cette sélénocoenzyme serait nécessaire lors des différentes phases de la corticogenèse, puisque le glutamate régit différents mécanismes en fonction du positionnement du neuroblaste. En effet, le glutamate stimule la prolifération des neuroblastes au niveau de la VZ, agit comme chimioattractant pour la migration des neuroblastes jusqu'à la CP et servirait également de signal d'arrêt lorsque les neuroblastes ont atteint leur destination (Behar et al., 1999; Haydar et al., 2000; Kihara et al., 2002; Luk and Sadikot, 2004). La SELENOT jouerait alors un rôle métabolique différent en fonction de l'emplacement du neuroblaste. Par exemple, Behar et al., (1999) ont démontré que le glutamate agit comme chimioattractant lors de la migration des neuroblastes, en se fixant aux récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), provoquant une augmentation de calcium intracellulaire. Des études ont pu montrer l'implication de la SELENOT pour la mobilisation calcique, grâce à son domaine transmembranaire lui permettant d'être ancrée à la membrane du RE (Grumolato et al., 2008; Mazza et al., 2019), et par conséquent son possible rôle lors de la migration des

cellules glutamatergiques positives. Ainsi, la SELENOT pourrait réguler à la fois la mobilisation calcique au sein du RE et les niveaux de ROS par son action oxydoréductase, déjà démontrés comme servant de seconds messagers dans les voies de signalisation lors du neurodéveloppement (Le Belle et al., 2011).

Les 20% de neurones restant peuplant majoritairement le néocortex sont les neurones GABAergiques, générés au niveau des éminences ganglionnaires. Ces futurs neurones inhibiteurs gagnent le néocortex par migration tangentielle, en empruntant trois routes de migration (au niveau de la MZ, la SP et de l'IZ/SVZ) (Anderson et al., 2001; Ang et al., 2003; Sahara et al., 2012). Tout comme les neurones glutamatergiques, la SELENOT est présente au niveau des cellules GABAergiques localisées au sein des éminences ganglionnaires, mais également au niveau des neurones GABAergiques en migration, au sein des différentes couches corticales. Il a été démontré que le contrôle de l'homéostasie redox au niveau des interneurones GABAergiques est essentiel, puisque l'invalidation de la GPX4 inhibe leur prolifération, leur différenciation et conduit à l'apparition d'une activité épileptique (Wirth et al., 2010). Ces données suggèrent ainsi un rôle de la SELENOT pour la genèse et la mise en place des neurones GABAergiques.

L'expression de la SELENOT au sein des cellules neuronales lors de l'embryogenèse suggère alors son importance pour le développement des couches corticales et la mise en place de ces neurones.

II] SELENOT et migration des neuroblastes

La SELENOT est exprimée au niveau des différentes couches corticales lors de l'embryogenèse, ainsi qu'au niveau des neurones glutamatergiques et GABAergiques. Afin de comprendre son rôle lors de l'histogenèse du néocortex, nous nous sommes focalisés sur les altérations possibles dues à l'absence de SELENOT, lors de la mise en place des neurones de projection.

De manière à étudier spécifiquement les neuroblastes lors de la corticogenèse, nous avons électroporé *in utero* un plasmide, contenant une Cre recombinase, au niveau du ventricule latéral d'embryons à E14,5, dont le gène de la SELENOT est floxé. Ainsi, la Cre recombinase

peut exciser une partie du gène au niveau de la zone floxée et invalider la SELENOT. Le plasmide a donc été électroporé au niveau de la bordure du ventricule latéral, afin d'être exprimé dans les cellules de la glie radiaire et les neuroblastes générés par ces cellules à ce stade de développement (Takahashi et al., 1995).

2.1) Perte de la polarité des neuroblastes en absence de SELENOT

Soixante-douze heures après IUE, nous avons pu observer des altérations de positionnement des neuroblastes, au sein des différentes couches corticales en absence de SELENOT. Les résultats indiquent une diminution du nombre de neuroblastes ayant atteint la CP, et à l'inverse davantage de neuroblastes positionnés au niveau de la zone de migration (IZ). La migration des neuroblastes semble alors avoir été perturbée après invalidation de la SELENOT, les empêchant de se diriger correctement jusqu'à leur destination. Cependant, certaines cellules eGFP-positives sont observables au niveau de la CP, après électroporation avec le plasmide invalidant la SELENOT. Ces cellules ayant probablement migré jusqu'à leur destination finale en raison d'un niveau d'expression faible ou tardif de la Cre recombinase dans ces cellules. Pour atteindre la CP, les neuroblastes migrent le long de la glie radiaire, grâce à leurs prolongements (*leading process*) qu'ils émettent et rétractent afin d'avancer (Nishimura et al., 2014; Schaar and McConnell, 2005). Ces prolongements constituent donc un guide pour les neuroblastes, leur indiquant la direction à suivre. Nous nous sommes alors intéressés à l'orientation de ce prolongement pour les neuroblastes invalidés et avons remarqué une altération de leur polarité au niveau des zones prolifératives et de migration. En effet, ces derniers présentent un angle de migration plus important comparé aux neuroblastes non invalidés, indiquant qu'ils ne migrent pas de manière laminaire en direction de la CP et expliquant également l'augmentation du nombre de neuroblastes présents au sein de l'IZ.

De plus, nous avons pu voir dans l'introduction, que l'absence de DCX perturbe l'organisation laminaire des couches corticales, suite à une altération de la polarité migratoire des neuroblastes (Verhage et al., 2000). Nos résultats obtenus par hybridation *in situ* indiquent la présence de la SELENOT au sein des cellules DCX positives. Il est donc possible que l'absence de SELENOT altère l'organisation du cytosquelette, par un excès de ROS qui impacterait la formation des microtubules (Westermann and Weber, 2003). En effet, plusieurs études rapportent l'implication des ROS dans la régulation de la polymérisation du cytosquelette d'actine. En tant que seconds messagers, les ROS peuvent réguler les voies de

signalisation activées par les facteurs de croissance et les chimiokines (impliquées entre autres dans la migration cellulaire). Ainsi, en cas d'excès de ROS, l'oxydation de protéines telles que les phosphatases, diminue l'activité de protéines liant l'actine, affaiblissant alors la polymérisation des filaments d'actine. A l'inverse, de faibles taux de ROS se voient bénéfiques pour la polymérisation de l'actine, élément du cytosquelette essentiel pour la migration cellulaire (Balta et al., 2020). Il a été démontré que l'absence de SELENOT au sein des neuroblastes induit une augmentation des taux de ROS (Castex et al., 2016). La perte de cette sélénoenzyme pourrait alors altérer la dynamique de polymérisation des microtubules et de l'actine, en raison d'une perte de l'homéostasie redox.

De plus, il a été démontré qu'un excès de ROS intracellulaire induit une entrée de calcium, par des canaux calciques voltage-dépendants, aboutissant à la perte du complexe protéique du segment initial de l'axone, entre autres nécessaire au maintien de la polarité neuronale (Clark et al., 2017). Il est donc tentant de penser que l'absence de SELENOT ne permette plus de réguler les taux calciques entrants, conduisant à la perte de polarité du neuroblaste. De plus, lors de leur migration, les neuroblastes établissent une pause de 24 h au niveau de l'IZ et adoptent une morphologie multipolaire. Pendant cette pause, les neuroblastes sont très dynamiques en établissant et rétractant leurs prolongements, puis adoptent de nouveau une morphologie bipolaire pour continuer leur migration jusqu'à la CP (Tabata and Nakajima, 2003). L'absence de SELENOT, induisant une perte de polarité, pourrait ainsi expliquer l'augmentation du nombre de cellules stagnant au niveau de l'IZ et le manque de neuroblastes rejoignant la CP, en ne retrouvant pas une polarité bipolaire adéquate.

Des anomalies de migration cellulaire ont également été identifiées lors de l'invalidation de la SELENOK. Cette sélénoprotéine, tout comme la SELENOT, est localisée au niveau du RE et permet la régulation calcique lors de l'activation des cellules immunitaires. La diminution de SELENOK dans les cellules microgliales altère alors leur capacité de migration, dû à une baisse de la mobilisation calcique (Meng et al., 2019). Ces données suggèrent que l'activité redox de la SELENOT peut également moduler la migration des neuroblastes selon des mécanismes dépendant de la régulation calcique, comme pour l'effet chimioattractant du glutamate et la stabilisation de la polarité axonale.

La migration neuronale fait également intervenir des molécules sécrétées comme les sémaphorines, protéines impliquées dans la prolifération ou encore la guidance axonale. Les

sémaphorines de classe 3 et 7 sont retrouvées chez les vertébrés et contiennent des sites de N-glycosylation. L'invalidation du récepteur Nrp1 également N-glycosylé et dont la sémaphorine 3A est un agoniste (Huang et al., 2019), induit des perturbations de la migration radiaire, puisque les neuroblastes n'atteignent pas les couches superficielles de la plaque corticale et sont donc mal positionnés au niveau du néocortex. De plus, ces neuroblastes invalidés pour ce récepteur présentent des anomalies de l'angle de migration de leur prolongement (Chen et al., 2007), comme retrouvé dans notre modèle d'étude. La présence de protéines N-glycosylées est donc essentielle à divers processus cellulaires, dont ceux régissant la migration des neuroblastes et pourrait alors être impactée en absence de SELENOT, puisque celle-ci intervient dans la N-glycosylation des protéines (Hamieh et al., 2017).

Comme pour les neuroblastes, les sémaphorines 3A et 3F sont toutes aussi importantes pour la migration tangentielle des interneurons GABAergiques, en agissant comme chimiorépulsifs au niveau du striatum, afin de les diriger vers le néocortex (Marín et al., 2001). En effet, des perturbations de signalisation GABAergique sont décrites dans diverses maladies neurodéveloppementales, comme les troubles du spectre autistique et l'épilepsie. L'absence de la sémaphorine 3F induit une diminution du nombre de neurones GABAergiques au niveau cortical, ainsi que des anomalies de positionnement de ces interneurons au sein des différentes couches corticales. Ces altérations sont accompagnées d'une augmentation du stress oxydatif dans les interneurons et *in fine* des anomalies de la transmission GABAergique (Ito et al., 2008; Li et al., 2019).

La mise en place des neurones corticaux est donc dépendante de la SELENOT dont l'absence impacte leur migration, très probablement via des processus impliquant la régulation calcique, l'orientation de leur prolongement, l'altération de protéines N-glycosylées et la régulation de l'homéostasie redox.

2.2) L'invalidation de la SELENOT induit des altérations de la glie radiaire

Les anomalies de migration des neuroblastes invalidés pour la SELENOT peuvent s'expliquer par une perte de polarité de migration des neuroblastes, mais pourraient également provenir d'altérations de la glie radiaire elle-même. En effet, l'IUE induit la perte de SELENOT dans les cellules de la glie radiaire en premier lieu, puis dans les neuroblastes qui sont générés

à partir de ces cellules. Lors de la corticogenèse, les neuroblastes migrent selon deux modes distincts : la translocation, où les neuroblastes émettent eux-mêmes leurs prolongements jusqu'à la surface piaie lors des premiers stades de développement et la locomotion à des stades plus tardifs, où les neuroblastes migrent le long du prolongement de la glie radiaire, émis jusqu'à la CP (Nadarajah et al., 2001). La glie radiaire est alors indispensable à la migration des neuroblastes lors des stades étudiés et qui plus est, exprime physiologiquement la SELENOT. Ainsi, nous avons marqué la glie radiaire au moyen du marqueur nestine et avons observé que l'invalidation de la SELENOT au sein de ces cellules perturbe l'échafaudage de leurs prolongements. Ces derniers sont alors plus petits et désorganisés au niveau du néocortex, ce qui contribuerait aux anomalies de migration des neuroblastes.

Le phénotype que nous observons, en absence de SELENOT, peut donc s'expliquer par une perte de polarité des neuroblastes et une altération des prolongements des cellules de la glie radiaire, les empêchant de migrer correctement jusqu'à la CP. Lors de la locomotion, le neuroblaste adhère au prolongement de la glie radiaire au moyen de molécules d'adhésion. Une étude portant sur la SELENOT dans des fibroblastes murins, a démontré que son absence perturbe l'adhésion cellulaire, en modifiant l'expression de gènes impliqués dans la structure cellulaire et des gènes d'oxydoréductases comme la SELENOW, dont l'expression se voit augmentée (Sengupta et al., 2009). L'implication de la SELENOT dans l'adhésion cellulaire peut ainsi expliquer l'augmentation du nombre de neuroblastes présents au sein de l'IZ dans notre modèle, puisque ces derniers perdraient leur adhésion au niveau des prolongements de la glie radiaire, modifiant ainsi leur migration.

La SELENOT serait alors un acteur majeur de la migration des neuroblastes, en permettant l'acquisition de leur polarité, ainsi que leur adhésion au niveau des prolongements de la glie radiaire. Au niveau du RE, la SELENOT ne régule pas seulement la mobilisation calcique mais est également une partie intégrante du complexe oligosaccharyltransférase de type A, responsable de l'ajout de N-glycanes aux protéines lors de leurs modifications post-traductionnelles. Il a ainsi été montré que la SELENOT intervient dans la N-glycosylation de la POMC (Hamieh et al., 2017). Des molécules d'adhésion, nécessaires à la migration des neuroblastes, comme la fibronectine, sont N-glycosylées dans le RE (Gu et al., 2012; Hsiao et al., 2017) et la perte de SELENOT pourrait altérer leur conformation et donc leur expression. En effet, si les protéines sont mal conformées, le système de contrôle qualité (le cycle calnexine/calréticuline) les dirige vers le protéasome pour dégradation (Chevet et al., 2001).

Une seconde étude a également démontré qu'un stress du RE conduit à l'expression de protéines liées à des GPI acétylées au niveau de la membrane plasmique. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, l'ancrage de GPI aux protéines est une autre forme de modification post-traductionnelle, dont la présence de la SELENOT semble être un prérequis pour la désacétylation des GPI, nécessaire à la conformation et à la fonction des protéines (Liu et al., 2018). Certaines molécules d'adhésion neurale, comme la protéine TAG-1 (*Transient Axonal Glycoprotein 1*) indispensable à la migration neuronale, ou encore les intégrines essentielles à la lamination corticale, sont concernées par cette seconde modification post-traductionnelle (Anton et al., 1999; Karagogeos, 2003; Denaxa et al., 2005; Sittaramane et al., 2009; Janik et al., 2010), qui pourrait être altérée en absence de SELENOT et induire des anomalies de migration des neuroblastes au sein du néocortex.

2.3) Le positionnement des neurones de projection au sein du néocortex est dépendant de l'expression de la SELENOT

Les résultats obtenus après IUE suggèrent fortement l'implication de la SELENOT lors de la migration des neuroblastes et donc de leur positionnement au sein des couches corticales. Ainsi, nous avons regardé l'emplacement des neurones des couches profondes, marqués par le facteur de transcription CTIP2, au niveau du néocortex de souris adultes dont le gène de la SELENOT a été invalidé dans le lignage neural, et nous avons observé des anomalies de positionnement de ces neurones. CTIP2 marque préférentiellement les neurones de la couche V et dans une moindre mesure, ceux de la couche VI (Hevner, 2007; Chen et al. 2008). Cependant, chez la souris adulte SELENOT KO, les neurones CTIP2-positifs sont davantage positionnés dans la couche VI que dans la couche V. Ces données témoignent alors d'un défaut de positionnement des neurones en absence de SELENOT, qui n'ont pas atteint la couche V et sont donc cohérentes avec les anomalies de migration que nous observons après IUE. L'organisation laminaire des couches corticales est primordiale pour l'établissement des connexions fonctionnelles, et des altérations de cette architecture conduisent à des pathologies. Plusieurs études ont rapporté des anomalies de cette organisation en l'absence de certains facteurs, comme la mutation du gène *reeler* chez la souris *Reeler* où une inversion des couches corticales est observable, ou encore l'invalidation de transporteurs du glutamate montrant une désorganisation des prolongements des cellules de la glie radiaire accompagnée d'une augmentation de neuroblastes accumulés dans la VZ (Caviness, 1982 ; Matsugami et al., 2006 ; Boyle et al., 2011). De plus, la *reeline*, ainsi que la SELENOP se fixent sur le récepteur ApoER2

au niveau neuronal pour induire leurs effets. De manière intéressante, les souris KO pour ApoER2 présentent une lamination corticale perturbée, suggérant que l'action des sélénoprotéines peut faire intervenir des mécanismes moléculaires clés lors des processus de corticogenèse.

Les altérations de la polarité des neuroblastes et des prolongements des cellules de la glie radiaire observées après électroporation, ainsi que les anomalies de positionnement des neurones au niveau du néocortex, démontrent l'importance de la SELENOT dans les processus de migration neuronale, de mise en place des couches corticales et par conséquent des connexions fonctionnelles.

2.4) Altérations de la migration des neuroblastes et déficiences fonctionnelles

Si nous reprenons le modèle murin d'invalidation conditionnelle de la SELENOT au niveau central, il a été démontré que ces souris présentent une diminution du volume du néocortex, peu après la naissance. Ce phénotype pourrait être expliqué par la perte de prolifération cellulaire engendrée par l'absence de SELENOT, et selon nos résultats, cette variation du volume néocortical pourrait être liée à la diminution du nombre de neuroblastes atteignant la CP. En effet, Shao et *al.* ont précédemment démontré l'implication de la SELENOT dans le cycle cellulaire, puisque son inhibition dans des cellules de neuroblastome provoque une diminution du nombre de cellules prolifératives associée à une augmentation de cellules bloquées en phase G1 du cycle de réplication. Cette invalidation a également pour conséquence une baisse d'expression de protéines clés nécessaires au point de contrôle du passage de la phase G1 à S, ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire (Shao et al., 2019). La survie neuronale soutenue par la SELENOT a également été démontrée au sein de notre équipe (Boukhzar et al., 2016 ; Castex et al., 2016).

La prolifération cellulaire est primordiale pour le développement cérébral et son dérèglement peut conduire à de sévères troubles neurodéveloppementaux. Le syndrome d'atrophie cérébelleux-cérébrale progressive (PCCA) est caractérisé par une microcéphalie, due à une altération de la prolifération des progéniteurs neuraux (Ben-Zeev et al., 2003). De plus, cette équipe a montré que la mutation du gène de la SecS (responsable de la synthèse des sélénoprotéines) est retrouvée chez de nombreux patients atteints de PCCA ayant une

microcéphalie (Agamy et al., 2010), suggérant un rôle des sélénoprotéines dans l'étiologie de cette pathologie. Récemment, la réémergence du virus Zika au sein de la population brésilienne, a conduit à de nombreux cas de microcéphalie chez les nouveau-nés. Les patients infectés par ce pathogène présentent ainsi une diminution de l'épaisseur des couches neuronales (prolifératives et corticales), ainsi qu'une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux, marquée par l'arrêt du cycle cellulaire. L'infection de cultures de cellules embryonnaires (HEK293T) par ce virus induit également la baisse d'expression protéique de la SELENOP et des TXNRD (Wen et al., 2017; Dailey et al., 2021). Ainsi, les sélénoprotéines sont des acteurs essentiels lors du développement cérébral, notamment pour promouvoir la prolifération des cellules neurales. L'absence de SELENOT a permis de montrer son implication dans la progression du cycle cellulaire, ainsi que dans la migration et la survie des neuroblastes, processus clés lors du neurodéveloppement qui doivent être régulés afin d'éviter la survenue de certaines pathologies.

De plus, il a été montré que la position des neuroblastes au sein du néocortex dépend de leur date de naissance et régit leur spécification (Kwan et al., 2012). Si un retard ou des anomalies de prolifération et/ou migration surviennent en absence de SELENOT, les neuroblastes ne se positionnent pas à une place appropriée, donc n'établiraient pas les bonnes connexions corticales/sous-corticales, ce qui engendrerait des déficits moteurs, comme l'hyperactivité observée chez les souris Nes-CRE/SELENOT^{fl/fl} (Castex et al., 2016). En effet, les six couches composant le néocortex comprennent des neurones de projection ayant des connexions spécifiques. Ainsi, la couche VI contient des neurones projetant leurs axones au niveau du thalamus, tandis que la couche IV reçoit les informations provenant du thalamus. Les couches II et III ont respectivement des afférences ou des efférences cortico-corticales. Enfin, les couches II à VI sont capables d'avoir des connexions intratélencéphaliques (connexions avec le striatum, l'amygdale...) dont certains neurones projettent leurs connexions dans plusieurs structures par un seul axone. Le cervelet est également capable de communiquer avec le cortex, en passant par le thalamus (O'Leary and Koester, 1993; Watson et al., 2014; Badura et al., 2018; Winnubst et al., 2019). Des anomalies de positionnement des neuroblastes peuvent alors perturber les connexions émises par les neurones de projection et donc perturber l'activité cérébrale, bien que leur spécification soit en partie définie par leur période de naissance (Caviness and Frost, 1983; Colombo et al., 2007).

De plus, des premiers résultats obtenus au laboratoire témoignent d'une perturbation de la neurotransmission, avec une augmentation des taux de GABA présent au sein du cortex préfrontal de souris adultes invalidées pour la SELENOT au niveau central (données non publiées). Ces résultats attestent de l'importance de cette sélénoenzyme pour parfaire l'activité neuronale. L'implication de sélénoprotéines dans la transmission du message nerveux a également été démontrée pour la SELENOP, dont l'absence chez la souris conduit à une libération excessive de neurotransmetteurs par les neurones présynaptiques, au niveau de l'hippocampe. Ce phénomène a pour conséquence une altération de la transmission synaptique, avec un déficit de la potentialisation à long terme (Peters et al., 2006). La GPX4 est une autre sélénoprotéine également essentielle pour la régulation de l'activité nerveuse, puisque son invalidation affecte le développement des interneurones parvalbuminergiques conduisant à une activité épileptique (Wirth et al., 2010).

La SELENOT, par son activité d'oxydo-réduction, permettrait ainsi la bonne mise en place des neurones de projection lors du neurodéveloppement, et par conséquent de leurs connexions fonctionnelles.

2.5) Anomalies neurodéveloppementales en absence de SELENOT et TDAH

De nombreuses maladies neurodégénératives et neurodéveloppementales ont comme facteur aggravant le stress oxydatif, comme pour la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, ou encore les troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité (TDAH). Le TDAH est une maladie touchant 6 à 7 % des enfants en âge scolaire, dont la moitié reste atteints lorsqu'ils sont adultes. Cette maladie est due à des facteurs génétiques et environnementaux, et ne connaît pas de traitement curatif à l'heure actuelle, bien que les symptômes de ces patients puissent être atténués par la prise de psychostimulants (méthylphénidate, amphétamine) ou d'antioxydants (N-acétylcystéine).

Le TDAH est caractérisé par des anomalies de la balance oxydants/antioxydants. Toutes les études rapportent une augmentation du stress oxydatif chez les patients, mais se contredisent sur la diminution ou non du taux d'antioxydants. En effet, bien que des études ne relatent pas de changement quant aux taux d'antioxydants présents chez les patients atteints de TDAH, d'autres indiquent une diminution de leur taux et de leur activité, comme les GPX (Joseph et al., 2015; Corona, 2020). De plus, plusieurs anomalies présentes chez les patients atteints de

TDAH sont retrouvées chez les souris invalidées pour la SELENOT. Par exemple, les enfants ayant un TDAH présentent une réduction du volume cortical de 8 % pour chaque hémisphère, retrouvé dans le néocortex des souris SELENOT KO. Bien que toutes les études neuroanatomiques attestent de cette diminution, certaines révèlent une diminution de l'épaisseur corticale de différentes aires, dont le cortex préfrontal, d'autres seulement chez les sujets féminins et d'autres encore ne montrent aucune différence (Narr et al., 2009; Wolosin et al., 2009). D'autre part, les patients atteints de TDAH ont un retard de maturation corticale. En effet, alors que des personnes non malades atteignent 50 % de leur pic d'épaisseur corticale vers 7,5 ans, les enfants ayant un TDAH ne l'obtiennent qu'à 10,5 ans, dont l'épaisseur du cortex préfrontal médian, atteint 2 ans après les enfants sains (Shaw et al., 2007) !

Le délai de maturation peut expliquer les anomalies de neurotransmission, également présentes chez ces patients, avec des perturbations de la balance excitation/inhibition. Bauer et al., ont ainsi reportés une augmentation des taux de glutamate au niveau du cortex cingulaire des patients, ainsi qu'au niveau des connexions fronto-striatales chez un modèle d'étude du TDAH, le rongeur SHR (*spontaneous hyperactive rat*, ayant les symptômes majeurs retrouvés chez les patients TDAH) (Bauer et al., 2016). De plus, la transmission mettant en jeu les récepteurs AMPA du glutamate est également diminuée au sein du cortex préfrontal des rats SHR (Cheng et al., 2017). La neurotransmission des enfants ayant un TDAH présente également une diminution de l'activité dopaminergique, altérant les connexions fronto-striatales, et sérotoninergiques (Swanson et al., 2007; Oades, 2008).

Tout comme les patients atteints de TDAH, les souris invalidées pour la SELENOT présentent une diminution du volume cortical, des anomalies de la balance oxydants/antioxydants et des altérations de la neurotransmission (libération de GABA excessive au niveau cortical et perte des neurones dopaminergiques en absence de SELENOT). De plus, le modèle d'étude utilisé lors de cette thèse a démontré des anomalies de migration des neuroblastes. Le retard de maturation corticale chez les patients ayant un TDAH induit des anomalies de connexions corticales, qui peuvent également être retrouvées chez les souris invalidées pour la SELENOT, puisque les anomalies de migration peuvent induire des problèmes de fonctionnement des réseaux neuronaux. La neurotransmission altérée du glutamate par les récepteurs AMPA chez les patients TDAH pourrait être étudiée en fonction de l'état du stress oxydatif du RE et de la fonction de la SELENOT, puisque ces récepteurs doivent être N-glycosylés pour être fonctionnels (Kandel et al., 2018).

Notre modèle d'étude, ayant permis de mettre en avant les anomalies de migration des neuroblastes, pourrait expliquer les altérations observées chez les souris SELENOT KO central, et notamment leur hyperactivité, et donc d'établir un parallèle avec les personnes présentant un TDAH. De ce fait, le modèle d'inactivation KO conditionnel de la SELENOT au niveau des cellules neurales pourrait être utilisé comme modèle d'étude du TDAH, afin de tester les effets bénéfiques du PSELT sur les mécanismes décrits ci-dessus, étant donné son rôle déjà démontré pour la neuroprotection.

~ Conclusions et Perspectives ~

Les travaux de cette thèse ont pu mettre en avant l'importance de la SELENOT pour la migration des neuroblastes et leur mise en place au sein du néocortex.

Dans un premier temps, l'analyse du profil d'expression de la SELENOT chez la souris a révélé sa présence au niveau de toutes les couches corticales du néocortex lors des stades embryonnaires et postnataux, comme précédemment démontré chez le rat (Tanguy et al., 2011b), puis une augmentation lors du vieillissement. La SELENOT, chez la souris comme chez le rat, pourrait donc jouer un rôle lors du développement et de la maturation corticale. De plus, la SELENOT pourrait être impliquée dans la régulation de l'homéostasie redox lors du vieillissement cérébral, puisque son expression s'accroît chez la souris, alors que le cortex est de plus en plus confronté au stress oxydatif (Harman, 1956; Perez-Campo et al., 1998). Compte tenu du profil d'expression de la SELENOT lors de la corticogenèse, ainsi que des troubles locomoteurs décrits chez les souris adultes invalidées pour la SELENOT, nous avons axé nos travaux sur les stades embryonnaires, lors de la migration et de la différenciation des neuroblastes.

Ainsi, la suite de l'analyse du profil d'expression de la SELENOT a pu montrer sa présence dans les neurones glutamatergiques et GABAergiques, représentant les principaux neurones peuplant le néocortex. De plus, la SELENOT est exprimée au sein de ces populations neuronales pendant les différentes phases de leur mise en place, qui sont, la prolifération, la migration et la différenciation. La SELENOT jouerait alors des rôles multiples en fonction de l'état de la cellule, permettant de réguler ces processus. En effet, la SELENOT a pu être décrite comme régulant la mobilisation calcique, processus nécessaire à la migration des neuroblastes, ainsi qu'à la différenciation cellulaire ou encore nécessaire au cycle cellulaire (Grumolato et al., 2008; Shao et al., 2019). Il serait alors intéressant d'étudier les variations d'expression de la SELENOT au sein des neurones glutamatergiques et GABAergiques, en fonction de leur état cellulaire (*i.e.* en prolifération, en migration et en différenciation) et ce à différents stades embryonnaires et postnataux. En effet, en fonction du stade sélectionné, les neurones sont plutôt en genèse (stades E10-E15), en migration (E14-E19) ou en différenciation établissant leurs axones et synapses au niveau des couches intra- et inter-corticales (stades embryonnaires et postnataux) et présentent donc des besoins métaboliques variés. L'étude du profil d'expression

de la SELENOT lors des différentes étapes de la corticogenèse pourrait également être réalisée au sein d'autres populations neurales, comme les astrocytes ou les oligodendrocytes, essentiels à la mise en place des réseaux neuronaux.

L'expression néocorticale embryonnaire de la SELENOT et les déficits locomoteurs observés chez les souris invalidées pour la SELENOT au niveau central, nous ont amené à étudier son rôle lors de la corticogenèse, en l'invalidant par électroporation *in utero* au sein des cellules de la glie radiaire. Les résultats obtenus ont permis de montrer son importance lors de la migration des neuroblastes, puisque l'absence de SELENOT induit une perte de leur polarité ainsi que des anomalies d'échafaudage des prolongements de la glie radiaire, ne permettant pas aux neuroblastes d'être positionnés au niveau de la plaque corticale 72 h après IUE. L'expression de la SELENOT dans les neuroblastes est alors nécessaire pour enclencher les mécanismes de migration, possiblement par la régulation de l'homéostasie calcique et redox. Il serait ainsi intéressant d'évaluer les variations calciques au sein des neuroblastes invalidés pour la SELENOT, puisque les flux calciques sont essentiels à la différenciation cellulaire ou bien encore à la migration par l'effet chimioattractant du glutamate lors de sa fixation à son récepteur NMDA (Behar et al., 1999; Grumolato et al., 2008). De plus, l'homéostasie redox régulée par les sélénoprotéines, dont la SELENOT par son activité oxydoréductase, est essentielle pour diverses fonctions, dont la polarité neuronale (Clark et al., 2017). Enfin, la SELENOT joue un rôle dans la modification post-traductionnelle des protéines, lors de la N-glycosylation et l'ajout de GPI. Ainsi, l'analyse de ces modifications au niveau des molécules et structures d'adhésion impliquées dans la corticogenèse, comme la protéine TAG-1, la fibronectine ou les microtubules, permettrait d'élucider l'implication de la SELENOT dans ces mécanismes.

Les souris invalidées pour la SELENOT au niveau des cellules neurales présentent une hyperactivité à l'âge adulte, tandis que nos études démontrent des anomalies de migration des neuroblastes, ainsi qu'une altération du positionnement des neurones des couches profondes chez ses souris. Pour comprendre ce phénotype, bien que des mécanismes de compensation soient mis en place chez ces souris KO (*i.e.* neurogenèse tardive), il serait pertinent de suivre les prolongements émis par les neurones de projection, par imagerie 3D par exemple. En effet, les neurones élaborent leurs connexions axonales selon la couche corticale où ils sont positionnés. Etant donné les anomalies de positionnement des neurones des couches profondes, il est possible que leurs connexions axonales aient des défauts de liaison avec les aires sous-corticales, comme le thalamus ou le striatum, structures impliquées dans la locomotion.

L'analyse de marqueurs des couches profondes et superficielles, à différents temps lors de l'embryogenèse mais également chez l'adulte en absence de SELENOT, nous renseignerait également sur le déplacement effectué par ses neurones et le temps mis pour atteindre leur position, facteurs cruciaux pour l'établissement des bonnes connexions corticales.

Les anomalies de mise en place des réseaux fonctionnels conduisent à des défauts de neurotransmission (augmentation du GABA au niveau du cortex préfrontal), qui pourraient expliquer l'hyperactivité décrite chez les souris KO adultes. L'étude du profil d'expression de la SELENOT témoigne de sa présence au sein des neurones glutamatergiques, et également des interneurons GABAergiques. Ces derniers ont une action inhibitrice dans le cerveau mature et leur dérèglement pourrait participer à l'hyperactivité retrouvée chez ces KO. De la même manière que nous l'avons fait pour les neurones glutamatergiques, l'invalidation ciblée de la SELENOT dans les neurones GABAergiques nous indiquerait si ces neurones sont impactés par son absence lors de la corticogenèse, et donc dans le modèle d'invalidation nerveux central.

Les travaux réalisés lors de cette thèse, indiquent que la SELENOT est une enzyme essentielle lors de la corticogenèse et plus particulièrement pour la migration et le positionnement des neurones. Enfin, nous pourrions tester l'effet neuroprotecteur du PSELT lors de la corticogenèse afin d'évaluer son action thérapeutique dans le dérèglement de l'homéostasie redox, facteur aggravant de maladies neurodégénératives et neurodéveloppementales, comme le TDAH.

~ Références ~

~ A ~

- Aachmann FL, Fomenko DE, Soragni A, Gladyshev VN and Dikiy A. (2007). Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 37036–37044.
- Agamy O, Ben Zeev B, Lev D, Marcus B, Fine D, Su D, Narkis G, Ofir R, Hoffmann C, Leshinsky-Silver E et al. (2010). Mutations disrupting selenocysteine formation cause progressive cerebello-cerebral atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **87**: 538-544.
- Allen NJ and Eroglu C. (2017). Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron*. **96**: 697-708.
- Allmang C, Wurth L and Krol A. (2009). The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**: 1415-23.
- Alsharif I, Boukhzar L, Lefranc B, Godefroy D, Aury-Landas J, do Rego JL, do Rego JC, Naudet F, Arabo A, Chagraoui A, et al. (2021). Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol.* **40**: 101839.
- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K and Rubenstein JL. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development.* **128**: 353–363.
- Ang ESBC, Haydar TF, Gluncic V and Rakic P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.* **23**: 5805–5815.
- Angevine JB Jr and Sidman RL (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* **192**: 766–768.
- Anouar Y, Lihrmann I, Falluel-Morel A and Boukhzar L. (2018). Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic. Biol. Med.* **127**: 145-152.
- Anton ES, Kreidberg JA and Rakic P. (1999). Distinct functions of $\alpha 3$ and $\alpha(v)$ integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron.* **22**: 277-289.
- Aon MA, Stanley BA, Sivakumaran V, Kembro JM, O'Rourke B, Paolocci N and Cortassa S. (2012). Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. *J. Gen. Physiol.* **139**: 479–491.
- Arai T, Kelly SA, Brengman ML, Takano M, Smith EH, Goldschmidt-Clermont PJ and Bulkley GB. (1998). Ambient but not incremental oxidant generation effects intercellular adhesion molecule 1 induction by tumour necrosis factor α in endothelium. *Biochem J.* **331**: 853–861.
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F and Huttner WB. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun.* **2**: 154.
- Arnér ESJ. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**: 495-526.
- Arnér ESJ. (2010). Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.* **316**: 1296-303.

- Ashapkin VV, Kutueva LI and Vanyushin BF. (2019). Epigenetic Clock: Just a Convenient Marker or an Active Driver of Aging? *Adv Exp Med Biol.* **1178**: 175–206.
- Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabanian R, Yekaninejad MS, Chegini N, Khodadad A and Safaralizadeh R. (2007). A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.* **48**: 1750–1755.
- Avila A, Vidal PM, Tielens S, Morelli G, Laguesse S, Harvey RJ, Rigo JM and Nguyen L. (2014). Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cell Death Differ.* **21**: 1696–1708.
- Azevedo MF, Barra GB, Naves LA, Ribeiro Velasco LF, Godoy Garcia Castro P, De Castro LCG, Amato AA, Miniard A, Driscoll D, Schomburg L, et al. (2010). Selenoprotein-related disease in a young girl caused by nonsense mutations in the SBP2 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**: 4066–4071.

~ B ~

- Badura A, Verpeut JL, Metzger JW, Pereira TD, Pisano TJ, Deverett B, Bakshinskaya DE and Wang SSH. (2018). Normal cognitive and social development require posterior cerebellar activity. *ELife.* **7**: e36401.
- Balta E, Kramer J and Samstag Y. (2020). Redox regulation of the actin cytoskeleton in cell migration and adhesion: on the way to a spatiotemporal view. *Front. Cell. Dev. Biol.* **8**: 618261.
- Bandeira F, Lent R and Herculano-Houzel S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**: 14108–14113.
- Bass AH and Baker R. (1997). Phenotypic specification of hindbrain rhombomeres and the origins of rhythmic circuits in vertebrates. *Brain. Behav. Evol.* **50**: 3–16.
- Bauer J, Werner A, Kohl W, Kugel H, Shushakova A, Pedersen A and Ohrmann P. (2016). Hyperactivity and impulsivity in adult attention-deficit/hyperactivity disorder is related to glutamatergic dysfunction in the anterior cingulate cortex. *World J Biol Psychiatry.* **19**: 538–546.
- Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O’Connell C and Barker JLL. (1998). Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J. Neurosci.* **18**: 6378–6387.
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA and Barker JL. (1999). Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J. Neurosci.* **19**: 4449–4461.
- Ben-Ari Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* **3**: 728–739.

- Ben-Zeev B, Hoffman C, Lev D, Watemberg N, Malinger G, Brand N and Lerman-Sagie T. (2003). Progressive cerebellocerebral atrophy: a new syndrome with microcephaly, mental retardation, and spastic quadriplegia. *J. Med. Genet.* **40**: e96.
- Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Peña-Contreras Z and Palacios-Prü E. (2003). Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci.* **25**: 366–374.
- Berlett BS and Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 20313–20316.
- Berry MJ, Banu L, Harney JW and Larsen PR. (1993). Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* **12**: 3315–3322.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ and Larsen PR. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* **23**: 38–89.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J and Kuhn HG. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* **291**: 17–20.
- Blaschke AJ, Staley K and Chun J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development.* **122**: 1165–1174.
- Bondareva AA, Capecchi MR, Iverson SV, Li Y, Lopez NI, Lucas O, Merrill GF, Prigge JR, Siders AM, Wakamiya M, et al. (2007). Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 911–923.
- Bony G, Szczurkowska J, Tamagno I, Shelly M, Contestabile A and Cancedda L. (2013). Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat. Commun.* **4**: 1800.
- Borchert A, Wang CC, Ufer C, Schiebel H, Savaskan NE and Kuhn H. (2006). The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**: 19655–19664.
- Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S and Taketo MM. (1997). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 5531–5534.
- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet JJ, 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.
- Boyle MP, Bernard A, Thompson CL, Ng L, Boe A, Mortrud M, Hawrylycz MJ, Jones AR, Hevner RF and Lein ES. (2011). Cell-type-specific consequences of reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. *J. Comp. Neurol.* **519**: 2061–2089.
- Brigelius-Flohé R and Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**: 3289–303.

- Broca P. (1865). Sur le siège de la faculté du langage articulé. *Bull. la Société d'anthropologie Paris*. **6**: 377–393.
- Brustein E, Côté S, Ghislain J and Drapeau P. (2013). Spontaneous glycine-induced calcium transients in spinal cord progenitors promote neurogenesis. *Dev Neurobiol*. **73**: 168–175.
- Budiman ME, Bubenik JL, Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A and Driscoll DM. (2009). Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol Cell*. **35**: 479–489.
- Burk RF, Hill KE, Read R and Bellew T. (1991). Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. **261**: E26-E30.
- Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF and Chittum HS. (1997). Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem. Cell Biol*. **108**: 11–15.
- Burk RF and Hill KE. (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Rev. Nutr*. **25**: 215–235.
- Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP and Austin LM. (2007). Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J. Neurosci*. **27**: 6207–6211.
- Burk RF, Hill KE, Motley AK, Winfrey VP, Kurokawa S, Mitchell SL and Zhang W. (2014). Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J*. **28**: 3579–3588.
- Buss RR, Sun W and Oppenheim RW. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci*. **29**: 1-35.

~ C ~

- Callebaut I, Curcio-Morelli C, Mornon JP, Gereben B, Buettner C, Huang S, Castro B, Fonseca TL, Harney JW, Larsen PR, et al. (2003). The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J. Biol. Chem*. **278**: 36887–36896.
- Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2004). Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J. Biol. Chem*. **279**: 8011–8017.
- Carlson BA, Yoo MH, Tsuji PA, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2009). Mouse models targeting selenocysteine tRNA expression for elucidating the role of selenoproteins in health and development. *Molecules*. **14**: 3509-3527.
- Castaño A, Ayala A, Rodríguez-Gómez JA, Herrera AJ, Cano J and Machado A. (1997). Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. *Neurochem. Int*. **30**: 549–555.

- Castellano S, Andrés AM, Bosch E, Bayes M, Guigó R and Clark AG. (2009). Low exchangeability of selenocysteine, the 21st amino acid, in vertebrate proteins. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2031–2040.
- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet JJ, Anouar Y and Falluel-Morel A. (2016). Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol. Neurobiol.* **53**: 5818–5832.
- Caviness VS Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain Res.* **4**: 293–302.
- Caviness VS Jr and Frost DO. (1983). Thalamocortical projections in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol.* **219**: 182–202.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA and Gruss P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell.* **94**: 727–737.
- Chavatte L, Brown Ba and Driscoll DM. (2005). Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 408–16
- Chen B, Schaevitz LR and McConnell SK. (2005). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 17184–17189.
- Chen B, Wang SS, Hattox AM, Rayburn H, Nelson SB and McConnell SK. (2008). The Fezf2–Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11382–11387.
- Chen G, Sima J, Jin M, Wang K, Xue X, Zheng W, Ding Y and Yuan X. (2007). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nature Neuroscience.* **11**: 36–44.
- Chen LL, Huang JQ, Wu YY, Chen LB, Li SP, Zhang X, Wu S, Ren FZ and Lei XG. (2021). Loss of Selenov predisposes mice to extra fat accumulation and attenuated energy expenditure. *Redox Biol.* **45**: 102048.
- Chen K, Thomas SR, Albano A, Murphy MP and Keaney JF. (2004). Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *J. Biol. Chem.* **279**: 35079–35086.
- Cheng J, Liu A, Shi MY and Yan Z. (2017). Disrupted glutamatergic transmission in prefrontal cortex contributes to behavioral abnormality in an animal model of ADHD. *Neuropsychopharmacology.* **42**: 2096–2104.
- Chernorudskiy A, Varone E, Colombo SF, Fumagalli S, Cagnotto A, Cattaneo A, Briens M, Baltzinger M, Kuhn L, Bachi A, et al. (2020). Selenoprotein N is an endoplasmic reticulum calcium sensor that links luminal calcium levels to a redox activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**: 21288–21298.
- Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY and Bergeron JJM. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 120–124.

- Chui A, Zhang Q, Dai Q and Shi SH. (2020). Oxidative stress regulates progenitor behavior and cortical neurogenesis. *Development*. **147**: dev184150.
- Chung YW, Jeong D, Noh OJ, Park YH, Kang SI, Lee MG, Lee TH, Yim MB and Kim IY. (2009). Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. *Mol. Cells*. **27**: 609–613.
- Clark KC, Sword BA and Dupree JL. (2017). Oxidative stress induces disruption of the axon initial segment. *ASN Neuro*. **9**: 1759091417745426.
- Clatworthy AE, Stockinger W, Christie RH, Schneider WJ, Nimpf J, Hyman BT and Rebeck GW. (1999). Expression and alternate splicing of apolipoprotein E receptor 2 in brain. *Neuroscience*. **90**: 903–911.
- Colombo E, Collombat P, Colasante G, Bianchi M, Long J, Mansouri A, Rubenstein JLR and Broccoli V. (2007). Inactivation of Arx, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. *J. Neurosci*. **27**: 4786–4798.
- Cone JE, Del Rio RM, Davis JN and Stadtman TC. (1976). Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**: 2659–2663.
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, et al. (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 9414–9423.
- Corona JC. (2020). Role of oxidative stress and neuroinflammation in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Antioxidants*. **9**: 1039.
- Crain B, Cotman C, Taylor D and Lynch G. (1973). A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res*. **63**: 195–204.

~ D ~

- Dailey GP, Premadasa LS, Ruzicka JA and Taylor EW. (2021). Inhibition of selenoprotein synthesis by Zika virus may contribute to congenital Zika syndrome and microcephaly by mimicking SELENOP knockout and the genetic disease PCCA. *BBA Adv.* **1**: 10023.
- Dammerman RS, Flint AC, Noctor S and Kriegstein AR. (2000). An excitatory GABAergic plexus in developing neocortical layer 1. *J. Neurophysiol.* **84**: 428–434.
- D'Autréaux B and Toledano MB. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 813–824.
- De Lahunta A, Glass EN and Kent M. (2016). Embryonic development of the central nervous system. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* **46**: 193–216.
- Denaxa M, Kyriakopoulou K, Theodorakis K, Trichas G, Vidaki M, Takeda Y, Watanabe K and Karagogeos D. (2005). The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev. Biol.* **288**: 87–99.

- Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, Guardiola O, Sibilio A, Paik JH, Minchiotti G, DePinho RA, Fenzi G, Larsen PR, et al. (2010). The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J. Clin. Invest.* **120**: 4021–4030.
- De Zio D, Giunta L, Corvaro M, Ferraro E and Cecconi F. (2005). Expanding roles of programmed cell death in mammalian neurodevelopment. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**: 281-294.
- Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2007). SelT, SelW, SelH, and Rdx 12: Genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry.* **46**: 6871–6882.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* **149**: 1060–1072.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE and Refetoff S. (2005). Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat. Genet.* **37**: 1247–1252.
- Duntas LH and Benvenga S. (2015). Selenium: an element for life. *Endocrine.* **48**: 756–775.

~ E ~

- Edwards LJ, Kirilina E, Mohammadi S and Weiskopf N. (2018). Microstructural imaging of human neocortex in vivo. *Neuroimage.* **182**: 184-206.
- Emmink BL, Laoukili J, Kipp AP, Koster J, Govaert KM, Fatrai S, Verheem A, Steller EJA, Brigelius-Flohé R, Jimenez CR, et al. (2014). GPx2 suppression of H₂O₂ stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res.* **74**: 6717–6730.
- Ermak G and Davies KJ. (2001). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.* **38**: 713-721.

~ F ~

- Fagel DM, Ganat Y, Silbereis J, Ebbitt T, Stewart W, Zhang H, Ment LR and Vaccarino FM. (2006). Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia. *Exp. Neurol.* **199**: 77–91.
- Fairweather-Tait SJ, Collings R and Hurst R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**: 1484S-1491S.
- Fernández V, Llinares-Benadero C and Borrell V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J.* **35**: 1021–1044.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JLR and Marín O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron.* **44**: 251–261.

- Fotos J, Olson R and Kanekar S. (2011). Embryology of the brain and molecular genetics of central nervous system malformation. *Semin. Ultrasound, CT MRI*. **32**: 159–166.
- Frantz GD and McConnell SK. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*. **17**: 55–61.
- Furukawa T, Yamada J, Akita T, Matsushima Y, Yanagawa Y and Fukuda A. (2014). Roles of taurine-mediated tonic GABAA receptor activation in the radial migration of neurons in the fetal mouse cerebral cortex. *Front. Cell. Neurosci.* **8**:88.

~ G ~

- Gandhi S and Abramov AY. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**: 428010.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A and Bianco AC. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* **29**: 898-938.
- Gladyshev VN and Kryukov GV. (2001). Evolution of selenocysteine-containing proteins: Significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *BioFactors*. **14**: 87–92.
- Gobler CJ, Lobanov AV, Tang YZ, Turanov AA, Zhang Y, Doblin M, Taylor GT, Sañudo-Wilhelmy SA, Grigoriev IV and Gladyshev VN. (2013). The central role of selenium in the biochemistry and ecology of the harmful pelagophyte, *Aureococcus anophagefferens*. *ISME J.* **7**: 1333–1343.
- Gogna R, Madan E, Kuppusamy P and Pati U. (2012). Reactive oxygen species-mediated p53 core-domain modifications determine apoptotic or necrotic death in cancer cells. *Antioxid. Redox Signal.* **16**: 400–412.
- Gonzalez-Flores JN, Shetty SP, Dubey A and Copeland PR. (2013). The molecular biology of selenocysteine. *Biomol. Concepts*. **4**: 349-365.
- Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**: 494–501.
- 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.* **22**: 1756–1768.
- Gu J, Isaji T, Xu Q, Kariya Y, Gu W, Fukuda T and Du Y. (2012). Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj. J.* **29**: 599–607.

~ H ~

- 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.

- Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. **92**: 3007-3017.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298–300.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F and Kageyama R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*. **131**: 5539–5550.
- Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA and Gladyshev VN. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem. Sci.* **39**: 112-120.
- Hawkes WC, Lyons DE and Tappel AL. (1982). Identification of a selenocysteine-specific aminoacyl transfer RNA from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*. **699**: 183–191.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML and Rakic P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J. Neurosci.* **20**: 5764–5774.
- Heck N, Golbs A, Riedemann T, Sun JJ, Lessmann V and Luhmann HJ. (2008). Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex*. **18**: 1335–1349.
- Herculano-Houzel S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* **3**: 31.
- Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT and Ramos-Mandujano G. (2009). Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* **88**: 1673-1681.
- Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J and Borlongan CV. (2013). Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurol.* **4**: 30.
- Hevner RF. (2007). Layer-Specific Markers as Probes for Neuron Type Identity in Human Neocortex and Malformations of Cortical Development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**: 101-109.
- Hoffmann PR, Höge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC and Berry MJ. (2007). The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res.* **35**: 3963–3973.
- Hoppe B, Bräuer AU, Kühbacher M, Savaskan NE, Behne D and Kyriakopoulos A. (2008). Biochemical analysis of selenoprotein expression in brain cell lines and in distinct brain regions. *Cell Tissue Res.* **332**: 403–414.
- Horikoshi T, Asanuma A, Yanagisawa K, Anzai K and Goto S. (1988). Taurine and β -alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA. *Mol. Brain Res.* **464**: 97–105.
- Hsiao CT, Cheng HW, Huang CM, Li HR, Ou MH, Huang JR, Khoo KH, Yu HW, Chen YQ, Wang YK, et al. (2017). Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation. *Oncotarget*. **8**: 70653-70668.

- Huang X, Ye Q, Chen M, Li A, Mi W, Fang Y, Zaytseva YY, O'Connor KL, Vander Kooi CW, Liu S, et al. (2019). N-glycosylation-defective splice variants of neuropilin-1 promote metastasis by activating endosomal signals. *Nat. Comm.* **10**: 3708.
- Hug N, Longman D and Cáceres JF. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **44**: 1483–1495.
- Huttenlocher PR. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res.* **163**: 195–205.

~ I ~

- Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara T, Ishidate F and Kageyama R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science.* **342**: 1203–1208.
- Ina A, Sugiyama M, Konno J, Yoshida S, Ohmomo H, Nogami H, Shutoh F and Hisano S. (2007). Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex. *Eur. J. Neurosci.* **26**: 615–623.
- Ito K, Kawasaki T, Takashima S, Matsuda I, Aiba A and Hirata T. (2008). Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J. Neurosci.* **28**: 4414-4422.

~ J ~

- Jakupoglu C, Przemeck GKH, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, De Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, et al. (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 1980–1988.
- Janik ME, Lityńska A and Vereecken P. (2010). Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1800**: 545-555.
- Ji F, Kanbara N and Obata K. (1999). GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Neurosci. Res.* **33**: 187–194.
- Jiang L, Ni J and Liu Q. (2012). Evolution of selenoproteins in the metazoan. *BMC Genomics.* **13**:446.
- Joseph N, Zhang-James Y, Perl A and Faraone SV. (2015). Oxidative stress and ADHD: a meta-analysis. *J. Atten. Disord.* **19**: 915-924.
- Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT and Grunwald DJ. (2008). 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.

~ K ~

- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M and Voipio J. (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**: 637-654.
- Kandel MB, Yamamoto S, Midorikawa R, Morise J, Wakazono Y, Oka S and Takamiya K. (2018). N-glycosylation of the AMPA-type glutamate receptor regulates cell surface expression and tetramer formation affecting channel function. *J. Neurochem.* **147**: 730–747.
- Karagogeos D. (2003). Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front Biosci.* **8**: 1304–1320.
- Kawaguchi Y and Kubota Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex.* **7**: 476–86.
- Ke FFS, Vanyai HK, Cowan AD, Delbridge ARD, Whitehead L, Grabow S, Czabotar PE, Voss AK and Strasser A. (2018). Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell.* **173**: 1217-1230
- Kelsom C and Lu W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci.* **3**: 19.
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M and Richardson WD. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* **9**: 173–179.
- Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z and Sawada T. (2002). Stimulation of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. *Dev. Brain. Res.* **138**: 195–198.
- Kipp AP, Müller MF, Göken EM, Deubel S and Brigelius-Flohé R. (2012). The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta.* **1820**: 1588–1596.
- Köhrle J. (2000). The deiodinase family: Selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 1853-1863
- König N, Roch G and Marty R. (1975). The onset of synaptogenesis in rat temporal cortex. *Anat. Embryol. (Berl).* **148**: 73–87.
- Korotkov KV, Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2001). Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 15330–15336.
- Kraus RJ, Prohaska JR and Ganther HE. (1980). Oxidized forms of ovine erythrocyte glutathione peroxidase. Cyanide inhibition of a 4-glutathione:4-selenoenzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **615**: 19–26.
- Kriegstein A and Alvarez-Buylla A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci.* **32**: 149-84.
- Kriegstein AR and Noctor SC. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends. Neurosci.* **27**: 392-399.

- Kryukov GV, Kryukov VM and Gladyshev VN. (1999). New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.* **274**: 33888–33897.
- Kryukov GV and Gladyshev VN. (2000). Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells.* **5**: 1049–1060.
- Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z and Gladyshev VN. (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4245–4250.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R and Gladyshev VN. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* **300**: 1439–1443.
- Kryukov GV and Gladyshev VN. (2004). The prokaryotic selenoproteome. *EMBO Rep.* **5**: 538–43.
- Kühbacher M, Bartel J, Hoppe B, Alber D, Bukalis G, Bräuer AU, Behne D and Kyriakopoulos A. (2009). The brain selenoproteome: priorities in the hierarchy and different levels of selenium homeostasis in the brain of selenium-deficient rats. *J. Neurochem.* **110**: 133–142.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H and Gage FH. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**: 2027–2033.
- Kuroda H, Wessely O and De Robertis EM. (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol.* **2**: E92.
- Kurokawa S, Takehashi M, Tanaka H, Mihara H, Kurihara T, Tanaka S, Hill K, Burk R and Esaki N. (2011). Mammalian selenocysteine lyase is involved in selenoprotein biosynthesis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* **57**: 298–305.
- Kurosaki T, Popp MW and Maquat LE. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**: 406–420.
- Kwan KY, Šestan N and Anton ES. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development.* **139**: 1535–1546.
- Kwon YT, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M and Tsai LH. (2000). Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35–Cdk5 kinase. *Curr. Biol.* **10**: 363–372.

~ L ~

- Labunskyy VM, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2014). Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* **94**: 739–777.
- Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H and Kornblum HI. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell.* **8**: 59–71.

- Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC and Hatfield DL. (1989). Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J. Biol. Chem.* **264**: 9724–9727.
- Lee S, Kim SM and Lee RT. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* **18**: 1165–207.
- Lee J, Kim Y, Lim S and Jo K. (2016). Single-molecule visualization of ROS-induced DNA damage in large DNA molecules. *Analyst.* **141**: 847–852.
- Le Magueresse C, Alfonso J, Bark C, Eliava M, Khrulev S and Monyer H. (2012). Subventricular zone-derived neuroblasts use vasculature as a scaffold to migrate radially to the cortex in neonatal mice. *Cereb. Cortex.* **22**: 2285–2296.
- Lent R, Azevedo FAC, Andrade-Moraes CH and Pinto AVO. (2012). How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur. J. Neurosci.* **35**: 1–9.
- Levers TE, Edgar JM and Price DJ. (2001). The fates of cells generated at the end of neurogenesis in developing mouse cortex. *J. Neurobiol.* **48**: 265–277.
- Li M, Cui Z, Niu Y, Liu B, Fan W, Yu D and Deng J. (2010). Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Res. Bull.* **81**: 107–113.
- Li Z, Jagadapillai R, Gozal E and Barnes G. (2019). Deletion of semaphorin 3F in interneurons is associated with decreased GABAergic Neurons, autism-like behavior, and increased oxidative stress cascades. *Mol. Neurobiol.* **56**: 5520–5538.
- Lin J and Wang L. (2020). Oxidative stress in oocytes and embryo development: implications for *in vitro* systems. *Antioxid. & Redox Signal.* **ars.2020.8209**.
- Liu J, Wang X, Liu Y, Yang N, Xu J and Ren X. (2013). Antenatal taurine reduces cerebral cell apoptosis in fetal rats with intrauterine growth restriction. *Neural Regen. Res.* **8**: 2190–2197.
- Liu YS, Guo XY, Hirata T, Rong Y, Motooka D, Kitajima T, Murakami Y, Gao XD, Nakamura S, Kinoshita T, et al. (2018). N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing. *J. Cell Biol.* **217**: 585–599.
- Lobanov AV, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2007). Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol.* **8**: R198.
- Lobanov AV, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2008). Reduced reliance on the trace element selenium during evolution of mammals. *Genome Biol.* **9**: R62.
- Lobanov AV, Hatfield DL and Gladyshev NM. (2009). Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**: 1424–8.
- Lodato S and Arlotta P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**: 699–720.
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK and Arlotta P. (2011). Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron.* **69**: 763–779.

- Loflin J, Lopez N, Whanger PD and Kioussi C. (2006). Selenoprotein W during development and oxidative stress. *J. Inorg. Biochem.* **100**: 1679–1684.
- Lois C and Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 2074–2077.
- Lubos E, Loscalzo J and Handy DE. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **15**: 1957–1997.
- Luk KC and Sadikot AF. (2004). Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. *Dev. Neurosci.* **26**: 218–228.
- Lyck L, Krøigård T and Finsen B. (2007). Unbiased cell quantification reveals a continued increase in the number of neocortical neurones during early post-natal development in mice. *Eur. J. Neurosci.* **26**: 1749–1764.

~ M ~

- Maia AL, Goemann IM, Meyer EL and Wajner SM. (2011). Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol.* **209**: 283–97.
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L and Represa A. (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J. Neurosci.* **25**: 4755–4765.
- Marín O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M and Rubenstein JL. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science.* **293**: 872–875.
- Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2012). Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One.* **7**: e33066.
- Martin JL. (1995). Thioredoxin -a fold for all reasons. *Structure.* **3**: 245–250.
- Massa V, Savery D, Ybot-Gonzalez P, Ferraro E, Rongvaux A, Cecconi F, Flavell R and Greene NDE, Copp AJ. (2009). Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 8233–8238.
- Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, et al. (2006). Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 12161–12166.
- Mazza R, Gattuso A, Imbrogno S, Boukhzar L, Leo S, Mallouki BY, Filice M, Rocca C, Angelone T, Anouar Y, et al. (2019). Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* **222**: jeb201202
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F and Lei XG. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8852–8857.

- McConnell SK and Kaznowski CE. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*. **254**: 282–285.
- Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L and Dufrasne I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. **18**: 3292–3311.
- Meng XL, Chen CL, Liu YY, Su SJ, Gou JM, Huan FN, Wang D, Liu HS, Ben SB and Lu J. (2019). Selenoprotein SELENOK enhances the migration and phagocytosis of microglial cells by increasing the cytosolic free Ca²⁺ level resulted from the up-regulation of IP3R. *Neurosci*. **406**: 38–49.
- Metanis N, Keinan E and Dawson PE. (2006). Synthetic seleno-glutaredoxin 3 analogues are highly reducing oxidoreductases with enhanced catalytic efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 16684–16691.
- Migdal C and Serres M. (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Med. Sci.* **27**: 405–12.
- Mihara H, Kurihara T, Watanabe T, Yoshimura T and Esaki N. (2000). cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 6195–6200.
- Miniard AC, Middleton LM, Budiman ME, Gerber CA and Driscoll DM. (2010). Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res.* **38**: 4807–4820.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. **3**: 265–278.
- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, et al. (2010). A Liver-Derived Secretory Protein, Selenoprotein P, Causes Insulin Resistance. *Cell Metab.* **12**: 483–495.
- Misu H, Takayama H, Saito Y, Mita Y, Kikuchi A, Ishii K, Chikamoto K, Kanamori T, Tajima N, Lan F, et al. (2017). Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat. Med.* **23**: 508–516.
- Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Quijano Roy S, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D, et al. (2001). Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat. Genet.* **29**: 17–18.
- Mohanty S, Chaudhary BP and Zoetewey D. (2020). Structural Insight into the Mechanism of N-Linked Glycosylation by Oligosaccharyltransferase. *Biomolecules*. **10**: 624.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR and Macklis JD. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 427–237.
- Morris JS and Crane SB. (2013). Selenium toxicity from a misformulated dietary supplement, adverse health effects, and the temporal response in the nail biologic monitor. *Nutrients*. **5**: 1024–1057.

- Moustafa ME and Antar HA. (2012). A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem. Genet.* **50**: 736–747.
- Murphy RC. (1996). Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. *Adv. Exp. Med. Biol.* **416**: 51-58.
- Mustacich D and Powis G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem J.* **346**: 1-8.

~ N ~

- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL and Pearlman AL. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **4**: 143–150.
- Nadarajah B and Parnavelas JG. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 423-432.
- Napolitano S, Reber RJ, Rubini M and Glockshuber R. (2019). Functional analyses of ancestral thioredoxins provide insights into their evolutionary history. *J. Biol. Chem.* **294**: 14105–14118.
- Narr KL, Woods RP, Lin J, Kim J, Phillips OR, Del’Homme M, Caplan R, Toga AW, McCracken JT and Levitt JG. (2009). Widespread cortical thinning is a robust anatomical marker for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* **48**: 1014-1022.
- Nickel A, Kottra G, Schmidt G, Danier J, Hofmann T and Daniel H. (2009). Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem. Biol. Interact.* **177**: 234–241.
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M and Walsh CA. (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **479**: 168–180.
- Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K and Kawauchi T. (2014). Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development.* **141**: 3540–3550.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, Ivic L and Kriegstein AR. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* **7**: 136–144.
- Nonomura K, Yamaguchi Y, Hamachi M, Koike M, Uchiyama Y, Nakazato K, Mochizuki A, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yoshida H, et al. (2013). Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Dev. Cell.* **27**: 621–634.
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2007). Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J. Biol. Chem.* **282**: 11960–11968.

~ O ~

- Oades RD. (2008). Dopamine–serotonin interactions in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Prog. Brain. Res.* **172**: 543–565.
- Ohta Y and Suzuki KT. (2008). Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**: 169–177.
- O’Leary DD. (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci.* **12**: 400–406.
- O’Leary DD and Koester SE. (1993). Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex. *Neuron.* **10**: 991–1006.
- Olson GE, Winfrey VP, Hill KE and Burk RF. (2008). Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 6854–6860.

~ P ~

- Palackal T, Moretz R, Wisniewski H and Sturman J. (1986). Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J. Neurosci. Res.* **15**: 223–239.
- Paridaen JT and Huttner WB. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* **15**: 351–364.
- Park JK, Williams BP, Alberta JA and Stiles CD. (1999). Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J. Neurosci.* **19**: 10383–10389.
- Park YH, Jeon YH and Kim IY. (2012). Selenoprotein W promotes cell cycle recovery from G2 arrest through the activation of CDC25B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**: 2217–2226.
- Parnavelas JG. (1999). Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* **156**: 418–429.
- Pasquini JM and Adamo AM. (1994). Thyroid Hormones and the Central Nervous System. *Dev. Neurosci.* **16**: 1–8.
- Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 347.
- Penaloza C, Lin L, Lockshin RA and Zakeri Z. (2006). Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem. Cell. Biol.* **126**: 149–158.
- Peters MM, Hill KE, Burk RF and Weeber EJ. (2006). Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice. *Molecular Neurodegeneration* **1**, 12.
- Pekny M, Wilhelmsson U and Pekna M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* **565**: 30–8.
- Pera EM, Acosta H, Gougnard N, Climent M and Arregi I. (2014). Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction. *Exp. Cell Res.* **321**: 25–31.

- Perez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C and Barja G. (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.* **168**: 149–158.
- Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW and Behne D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* **15**: 1236–1238.
- Phatarphekar A, Buss JM and Rokita SE. (2014). Iodotyrosine deiodinase: A unique flavoprotein present in organisms of diverse phyla. *Mol. Biosyst.* **10**: 86–92.
- Pillai R, Uyehara-Lock JH and Bellinger FP. (2014). Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life.* **66**: 229–239.
- Pitts MW, Raman AV, Hashimoto AC, Todorovic C, Nichols RA and Berry MJ. (2012). Deletion of selenoprotein P results in impaired function of parvalbumin interneurons and alterations in fear learning and sensorimotor gating. *Neuroscience.* **208**: 58–68.
- Pla R, Borrell V, Flames N and Marín O. (2006). Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of reelin signaling. *J. Neurosci.* **26**: 6924–6934.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T and Ghosh A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development.* **129**: 3147–3160.
- Pothion H, Jehan C, Tostivint H, Cartier D, Bucharles C, Falluel-Morel A, Boukhzar L, Anouar Y and Lihrmann I. (2020). Selenoprotein T: An Essential Oxidoreductase Serving as a Guardian of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* **33**: 1257–1275.
- Prevost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihrmann I, et al. (2013). The PACAP-Regulated Gene Selenoprotein T Is Abundantly Expressed in Mouse and Human β -Cells and Its Targeted Inactivation Impairs Glucose Tolerance. *Endocrinology.* **154**: 3796–3806.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS and White LE. (2015). *Neurosciences*. 5ème édition.

~ R ~

- Rakic P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**: 61–83.
- Rakic P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science.* **241**: 170–176.
- Raman AV, Pitts MW, Seyedali A, Hashimoto AC, Bellinger FP and Berry MJ. (2013). Selenoprotein W expression and regulation in mouse brain and neurons. *Brain Behav.* **3**: 562–574.
- Rayman MP. (2008). Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *Br. J. Nutr.* **100**: 254–268.

- Rice DS and Curran T. (2001). Role of the Reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 1005-1039.
- 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)*. **223**: e13067.
- Roman M, Jitaru P and Barbante C. (2014). Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. **6**: 25-54.
- Rother M and Quitzke V. (2018). Selenoprotein synthesis and regulation in Archaea. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* **1862**: 2451-2462.
- ~ S ~
- Sahara S, Yanagawa Y, O’Leary DD and Stevens CF. (2012). The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J. Neurosci.* **32**: 4755–4761.
- Sanchez-Roman I, Gomez A, Gomez J, Suarez H, Sanchez C, Naudi A, Ayala V, Portero-Otin M, Lopez-Torres M, Pamplona R, et al. (2011). Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**: 699–708.
- Sauvageot CM and Stiles CD. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 244-249.
- Savaskan NE, Borchert A, Bräuer AU and Kuhn H. (2007). Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: Specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 191–201.
- Schaar BT and McConnell SK. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 13652-13657.
- Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M and Köhrle J. (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* **370**: 397–402.
- Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R and Savaskan NE. (2004). Selenium and brain function: A poorly recognized liaison. *Brain Res. Rev.* **45**: 164-178.
- Sengupta A, Carlson BA, Labunsky VM, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2009). Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem. Cell Biol.* **87**: 953–961.
- Seyedali A and Berry MJ. (2014). Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA*. **20**: 1248–1256.
- Shao ZQ, Zhang X, Fan HH, Wang XS, Wu HM, Zhang L, Cheng WH and Zhu JH. (2019). Selenoprotein T promotes proliferation and G1-to-S transition in SK-N-SH cells: implications in Parkinson’s disease. *J. Nutr.* **149**: 2110-2119.

- Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Giedd J and Rapoport JL. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19649-19654.
- Shchedrina VA, Everley RA, Zhang Y, Gygi SP, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2011). Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *J. Biol. Chem.* **286**: 42937–42948.
- Shim SY and Kim HS. (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean J. Pediatr.* **56**: 107-111.
- Shrimali RK, Weaver JA, Miller GF, Starost MF, Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2007). Selenoprotein expression is essential in endothelial cell development and cardiac muscle function. *Neuromuscul. Disord.* **17**: 135–142.
- Sittaramane V, Sawant A, Wolman MA, Maves L, Halloran MC and Chandrasekhar A. (2009). The cell adhesion molecule Tag1, transmembrane protein Stbm/Vangl2, and Laminin α 1 exhibit genetic interactions during migration of facial branchiomotor neurons in zebrafish. *Dev. Biol.* **325**: 363-373.
- Smart IH and McSherry GM. (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J. Anat.* **134**: 415–42.
- Soerensen J, Jakupoglu C, Beck H, Förster H, Schmidt J, Schmahl W, Schweizer U, Conrad M and Brielmeier M. (2008). The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS One.* **3**: e1813.
- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, et al. (2012). Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature.* **491**: 109–113.
- Spemann H. (1903). Entwicklungsphysiologische Studien am Triton-Ei. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen.* **16**: 551–631.
- Squires JE, Stoytchev I, Forry EP and Berry MJ. (2007). SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 7848–7855.
- Stachowiak EK, Benson CA, Narla ST, Dimitri A, Chuye LEB, Dhiman S, Harikrishnan K, Elahi S, Freedman D, Brennand KJ, et al. (2017). Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Transl. Psychiatry.* **7**: 6.
- Steinhart Z and Angers S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development.* **145**: dev146589.
- Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase: roles in bisulfide bond formation and sperm maturation. *J. Biol. Chem.* **280**: 26491–26498.

- Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL and Gladyshev VN. (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* **274**: 24522–24530.
- Sun Z, Su Q and Rokita SE. (2017). The distribution and mechanism of iodotyrosine deiodinase defied expectations. *Arch. Biochem. Biophys.* **632**: 77-87.
- Sunde RA, Raines AM, Barnes KM and Evenson JK. (2009). Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci. Rep.* **29**: 329–338.
- Sunde RA and Raines AM. (2011). Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. *Adv. Nutr.* **2**: 138–150.
- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX and Wadhwa PD. (2007). Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol. Rev.* **17**: 39–59.

~ T ~

- Tabata H and Nakajima K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **23**: 9996–10001.
- Takahashi T, Nowakowski R and Caviness VS Jr. (1995). Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* **15**: 6058-6068.
- Tanguy S, Rakotovo A, Jouan MG, Ghezzi C, de Leiris J and Boucher F. (2011a). Dietary selenium intake influences Cx43 dephosphorylation, TNF- α expression and cardiac remodeling after reperfused infarction. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**: 522–529.
- Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka DL, 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**: 4322–4335.
- Tonelli FM, Santos AK, Gomes DA, Da Silva SL, Gomes KN, Ladeira LO and Resende RR. (2012). Stem cells and calcium signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**: 891-916.

~ U-V ~

- Ufer C and Wang CC. (2011). The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 12.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, et al. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science.* **287**: 864–869.

- Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS and Caviness VS Jr. (2000). Independent Controls for Neocortical Neuron Production and Histogenetic Cell Death. *Dev. Neurosci.* **22**: 125–138.
 - Voss AK and Strasser A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res.* **9**: F1000.
- ~ W ~
- Watson TC, Becker N, Apps R and Jones MW. (2014). Back to front: cerebellar connections and interactions with the prefrontal cortex. *Front. Syst. Neurosci.* **8**:4.
 - Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, et al. (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta. Neuropathol.* **119**: 755–770.
 - Weiss SS and Sunde RA. (2001). Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem. J.* **357**: 851–858.
 - Wen Z, Song H and Ming GL. (2017). How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev.* **31**: 849-861.
 - Wessjohann LA, Schneider A, Abbas M and Brandt W. (2007). Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biol. Chem.* **388**: 997-1006.
 - Westermann S and Weber K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 938–947.
 - Wigle J and Eisenstat DD. (2008). Homeobox genes in vertebrate forebrain development and disease. *Clin. Genet.* **73**: 212–226.
 - Wilson C, Núñez MT and González-Billault C. (2015). Contribution of NADPH oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J. Cell Sci.* **128**: 2989–2995.
 - Winnubst J, Bas E, Ferreira TA, Wu Z, Economo MN, Edson P, Arthur BJ, Bruns C, Rokicki K, Schauder D, et al. (2019). Reconstruction of 1,000 projection neurons reveals new cell types and organization of long-range connectivity in the mouse brain. *Cell.* **179**: 268–281.
 - Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, et al. (2010). Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J.* **24**: 844–852.
 - Wittko-Schneider IM, Schneider FT and Plate KH. (2014). Cerebral angiogenesis during development: Who is conducting the orchestra? *Methods Mol. Biol.* **1135**: 3–20.
 - Wolosin SM, Richardson ME, Hennessey JG, Denckla MB and Mostofsky SH. (2009). Abnormal cerebral cortex structure in children with ADHD. *Hum. Brain. Mapp.* **30**: 175-184.
 - Wonders CP and Anderson SA. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci.* **7**:687-96.

~ X-Y ~

- Xu JC, Fan J, Wang X, Eacker SM, Kam TI, Chen L, Yin X, Zhu J, Chi Z, Jiang H, et al. (2016). Cultured networks of excitatory projection neurons and inhibitory interneurons for studying human cortical neurotoxicity. *Sci. Transl. Med.* **8**: 333ra48.
- Xu XM, Zhou X, Carlson BA, Kim LK, Huh TL, Lee BJ and Hatfield DL. (1999). The zebrafish genome contains two distinct selenocysteine tRNA([Ser]Sec) genes. *FEBS Lett.* **454**: 16–20.
- Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN and Hatfield DL. (2007). Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem. J.* **404**: 115–120.
- Yamaguchi Y and Miura M. (2015). Programmed cell death in neurodevelopment. *Dev. Cell.* **32**: 478–490.
- Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, et al. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell.* **156**: 317–331.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, Motta L, Richardson A and Prolla TA. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 496–502.
- Young JJ, Patel A and Rai P. (2010). Suppression of thioredoxin-1 induces premature senescence in normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**: 363–368.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM and Mak TW. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell.* **94**: 739–750.

~ Z ~

- Zhang Y and Gladyshev VN. (2005). An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. *Bioinformatics.* **21**:2580-9
- Zhang Y, Romero H, Salinas G and Gladyshev VN. (2006). Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: A balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. *Genome Biol.* **7**: R94.
- Zhang Y, Zhou Y, Schweizer U, Savaskan NE, Hua D, Kipnis J, Hatfield DL and Gladyshev VN. (2008). Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. *J. Biol. Chem.* **283**: 2427–2438.
- Zhong L, Arnér ES and Holmgren A. (2000). Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 5854–5859.
- Zhong L and Holmgren A. (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.* **275**: 18121–18128.

Zilles K. (2018). Brodmann: a pioneer of human brain mapping—his impact on concepts of cortical organization. *Brain*. **141**: 3262–3278.

Résumé

Le cortex cérébral des mammifères est une structure particulière organisée en six couches. Sa maturation débute dès l'embryogenèse par la mise en place des neurones de projection et se perpétue lors des stades postnatals. Afin d'établir leurs connexions fonctionnelles, les neuroblastes, générés par les cellules de la glie radiaire, migrent au sein du néocortex et se différencient une fois leur destination atteinte. Ces processus sont régis par divers facteurs, dont les espèces réactives de l'oxygène, servant de seconds messagers dans les voies de signalisation. L'homéostasie redox se doit d'être finement régulée, puisqu'un excès des taux de radicaux libres est néfaste pour la cellule. Ainsi, des systèmes antioxydants interviennent afin de maintenir cette homéostasie, comprenant des enzymes contenant du sélénium, les sélénoprotéines. Parmi elles, la sélénoprotéine T (SELENOT), une mystérieuse oxydoréductase essentielle au neurodéveloppement, puisque son absence accroît la mort neuronale et induit une hyperactivité locomotrice.

Nos recherches ont permis de montrer que la SELENOT est exprimée dès l'embryogenèse au sein de toutes les couches corticales du néocortex et augmente au cours de la vie de la souris. Cette sélénoenzyme est également présente au sein des neuroblastes glutamatergiques et GABAergiques au niveau des couches prolifératives, de migration et de différenciation. Ces données suggèrent ainsi un rôle de la SELENOT lors de ces différents processus, et également lors du vieillissement physiologique. L'utilisation de modèles d'inactivation conditionnel dans les cellules neurales, et plus spécifiquement dans les neuroblastes par électroporation *in utero*, ont permis de montrer l'importance de la SELENOT pour la migration des neuroblastes. En effet, nos résultats indiquent des perturbations de leur polarité de migration, ainsi que des irrégularités du prolongement des cellules de la glie radiaire, servant d'échafaudage pour la migration des neuroblastes. Ces anomalies altèrent *in fine* le positionnement des neurones invalidés au sein des couches corticales profondes.

La SELENOT régulerait alors la mise en place des neurones de projection au sein du néocortex en favorisant leur migration et leur survie. Les recherches complémentaires sur son rôle permettront d'identifier ses partenaires moléculaires dont elle régirait l'activité, via différents mécanismes et notamment par leur modification post-traductionnelle, afin d'assurer la néocortico-genèse au cours des stades embryonnaires.

Mots-clés : corticogenèse, migration neuronale, sélénoprotéines, oxydoréductase