



**HAL**  
open science

# Rôle de la SELENOT dans la régulation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique dans les neurones à POMC

Cedric Jehan

## ► To cite this version:

Cedric Jehan. Rôle de la SELENOT dans la régulation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique dans les neurones à POMC. Biochimie, Biologie Moléculaire. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR057 . tel-03945779

**HAL Id: tel-03945779**

**<https://theses.hal.science/tel-03945779>**

Submitted on 18 Jan 2023

**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

### Rôle de la SELENOT dans la régulation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique dans les neurones à POMC

Présentée et soutenue par  
**CEDRIC JEHAN**

Thèse soutenue le 17/11/2022  
devant le jury composé de

M. FRANÇOIS FOULQUIER	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIE	Rapporteur du jury
M. ALAIN LESCURE	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE STRASBOURG	Rapporteur du jury
M. YOUSSEF ANOUAR	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME CAROLE ROVERE	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS	Membre du jury
MME MURIEL BARDOR	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Président du jury
MME ISABELLE LIHRMANN	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par ISABELLE LIHRMANN (Neuroendocrine Endocrine and Germlinal Differentiation and Communication)



# Remerciements

*Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué dans le laboratoire de Communication et Différenciation Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Unité INSERM 1239, dirigé par le Dr Y. Anouar au sein de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB) à l'Université de Rouen, et a bénéficié de l'aide généreuse de plusieurs organismes : l'Université de Rouen ; l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) ; ainsi que la Région Normandie et la ComUE Normandie.*

*Je souhaite remercier Youssef Anouar pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de l'intérêt qu'il a porté à mes travaux en tant que chef d'équipe et de ses remarques scientifiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'opportunité qu'il m'a offerte.*

*La personne envers qui je me sens le plus redevable pour ces dernières années est évidemment Isabelle. Merci à elle pour avoir dirigé ce projet et m'avoir encadré durant toutes ces années. Elle a su tenir la barre et garder le cap malgré la pandémie mais aussi et surtout face à la perte, je ne pourrais que la respecter pour cela. Je la remercie aussi pour sa patience et sa pédagogie, son exigence, sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique et aussi ses propositions parfois un peu trop optimistes ! Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance à son égard.*

*Je suis extrêmement reconnaissant aux différents membres du jury, Muriel Bardor, Carole Rovère, Alain Lescure et François Foulquier, de prendre de leur temps et me faire l'honneur de juger ce travail, merci à eux.*

*Merci aux différents membres de mon comité de suivi individuel, le Dr Agnes Delaunay-Moisan, le Dr Laurent Poulain, le Dr Carole Rovere et le Dr Marion Dumanoir, pour avoir pris le temps, chaque année, de faire le point avec moi sur l'avancée et la bonne conduite de ce projet.*

*Je souhaite aussi remercier le professeur Pierrick Gandolfo, il s'est battu pour que j'obtienne la prolongation de mon contrat en raison de la pandémie de covid. Sans lui ce travail n'aurait pu voir le jour sous la forme que vous êtes en train de lire.*

*Je dois beaucoup à Dorthe et Christine. Merci à elles pour leur aide à la paillasse, leurs conseils et leurs temps. J'aimerais aussi nous féliciter pour notre organisation durant les confinements et déconfinements. Je les remercie profondément pour leur support et toute leur bienveillance durant toutes ces années. Merci Christine pour toutes tes implacables corrections et Dorthe pour les manip complémentaires que tu as réalisées.*

*Merci à l'ensemble de l'équipe 1, membres partis vers d'autres horizons ou restés après le renouvellement, pour ses conseils, sa rigueur et les nombreuses discussions scientifiques qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la conclusion de ce projet.*

*Merci aussi aux autres équipes pour leur aide et disponibilité dans le laboratoire lorsque je pouvais en avoir besoin, et d'avoir contribué à me préparer en fin de master 2 pour obtenir un financement de thèse.*

*Je tiens à remercier plus spécifiquement Céline pour son aide dans la réalisation et l'analyse du test Elisa. Merci aussi à tous les ingénieurs, techniciens et personnels d'entretien qui nous permettent à tous de travailler dans des conditions décentes.*

*Un grand merci à Christophe et Ines pour leur aide dans l'analyse de données de spectro de masse ainsi que leurs propositions d'études calciques et de sécrétion. Nos discussions ont toujours été très stimulantes et motrices dans ce projet.*

*Merci Maité, Lydie, Lina, Marine et Thomas pour votre gentillesse, votre intérêt et votre aide pour étudier nos modèles au niveau trans-golgien, membranaire et vésiculaire.*

*Je tiens à remercier nos collaborateurs, le professeur Muriel Bardor, le Dr Marie-Laure Walet-balieu et Carole Burel du laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) pour leur travail sur la N-glycosylation. Merci Aussi à la plateforme Pissaro et au Dr Philippe Chan tchi song pour toutes les analyses protéomiques. Sans ces différents acteurs ce travail aurait été extrêmement différent.*

*Merci à l'ensemble de ma famille, qui m'a toujours supporté dans mes études. Plus particulièrement, je remercie mes parents pour m'avoir donné les moyens de faire ces études et avoir développé ma curiosité, une qualité sans laquelle je ne me serais pas engagé dans cette voie. Merci d'avoir toujours accepté et respecté mes choix et de m'accorder votre confiance. Merci aussi à Nathalie et Claude pour votre aide et ces moments passés ensemble au cours de toutes ces années, pour le meilleur ou bien pour le pire, merci, pour votre vent de fraîcheur.*

*Je remercie aussi mes amis Nelson, Lhorane, Julien, Lucile, Pierre, Thomas, Clément, Aurèle, Pierre et Charlotte pour tous les moments passés ensemble durant ces nombreuses années. Rencontré à l'école, l'internat ou pendant les études, vous m'avez tous un peu changé et permis de relâcher la pression lorsque j'en avais besoin. Un grand merci à Lucile pour m'avoir aidé et accompagné dans la création de l'Agora des Sciences !*

*Je tiens aussi à remercier ma belle-famille, Ana, Pribislav et Hania pour m'avoir accueilli et intégré si naturellement et nous avoir aidé avec Marianka dans cette situation peu commune.*

*Merci enfin à toi Manka. Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir supporté lorsque je pouvais être pénible et d'avoir été si patiente. Après cinq années passées à 1700 km l'un de l'autre, une thèse, une pandémie mondiale et maintenant la menace d'une guerre nucléaire, on va pouvoir se retrouver ! Cette thèse marque surtout pour moi le début d'un nouveau chapitre que nous allons pouvoir pleinement partager et écrire ensemble.*

*Je dédie ce travail à la mémoire de mon grand-père, puisse-t-il honorer l'Homme qu'il était, sa droiture et sa ténacité dans l'adversité. Mon seul regret aujourd'hui est qu'il ne puisse voir l'aboutissement de ces nombreuses années d'études.*

# Table des matières

Liste des abréviations .....	8
Liste des figures .....	12
Résumé .....	14
Summary .....	17
Introduction.....	19
L'environnement unique du réticulum endoplasmique .....	19
I. La <i>N</i> -glycosylation.....	20
A. Le cycle du dolichol .....	23
B. Le complexe OST .....	25
II. Le repliement des protéines.....	27
A. Les <i>heat shock proteins</i> .....	27
B. Le repliement oxydatif des protéines.....	29
C. Le contrôle qualité des glycoprotéines : le cycle calnexine-calréticuline .....	33
III. Le stress du RE .....	35
A. La réponse UPR.....	36
B. Stress du RE et stress oxydant, un cercle vicieux .....	37
IV. Homéostasie calcique.....	39
A. Le RE : principal réservoir de Ca <sup>2+</sup> dans la cellule.....	39
B. Les pompes SERCA.....	39
C. Les canaux récepteurs de la ryanodine et à l'IP3 .....	41
D. Flux calciques au niveau des <i>mitochondria-associated ER membrane</i> .....	45
La famille des sélénoprotéines .....	47
I. Biosynthèse atypique des sélénoprotéine .....	47
A. Le Sélénium .....	47
B. Biosynthèse et insertion de la sélénocystéine .....	48
II. Les membres majeurs .....	51
III. Les sélénoprotéines dans le cerveau.....	53
IV. La SELENOT .....	57
A. Structure de la SELENOT.....	57
B. Histoire évolutive de la SELENOT .....	58
C. Profil d'expression spatiotemporelle .....	61
D. Localisation subcellulaire .....	63
E. Fonctions de la SELENOT .....	64
L'obésité .....	70



I. Généralités .....	70
II. Le contrôle central de la prise alimentaire.....	71
A. Le noyau arqué.....	71
B. Les neurones à POMC.....	74
C. Les neurones à NPY .....	76
III. Les causes d'un déséquilibre de la balance énergétique au niveau central .....	78
A. L'inflammation .....	78
B. Le stress du RE.....	80
Objectifs de la thèse .....	83
Résultats.....	84
I. L'expression de la SELENOT est stimulée par le stress oxydant et la leptine dans la lignée mhyoA-POMC.....	84
II. Invalidation du gène <i>selenot</i> dans la lignée mhyoA-POMC .....	85
III. Étude du phénotype des cellules mhyoA-POMC KO SELENOT .....	86
A. Taille du RE, production de POMC et d' $\alpha$ -MSH.....	86
B. Stress du RE, apoptose et sénescence .....	88
IV. Anomalies de la N-glycosylation des neurones SELENOT KO.....	93
V. Orientation du centre redox de la SELENOT .....	97
VI. Identification des partenaires redox de la SELENOT dans les cellules mhyoA-POMC .....	98
VII. Validation de l'interaction avec IP3R1 .....	103
Discussion.....	106
I. Les cellules mhyoA-POMC déplétées en SELENOT sont sénescents.....	106
II. Défauts de N-glycosylation à la membrane des cellules mhyoA-POMC SELENOT KO .....	108
III. Identification des partenaires redox potentiels de la SELENOT.....	111
IV. Comparaison de la SELENOT avec les autres sélénoprotéines résidentes du RE.....	115
Conclusions et perspectives .....	119
Références.....	123
Annexe I.....	149
Matériels et méthodes .....	149
Culture cellulaire et transfections.....	149
Plasmides et constructions.....	149
Invalidation de la SELENOT par l'approche CRISPR-Cas9 .....	150
Western blot.....	151
Immunopurification des complexes piégés avec la SELENOT-HA .....	151
Prélèvement et préparation protéomique.....	152
Analyse NanoLC-ESI-MS/MS.....	152

Analyse des données protéomiques .....	153
Immunohistochimie .....	153
Analyse des <i>N</i> -glycomes.....	154
Dosage de l' $\alpha$ -MSH .....	155
Annexe II.....	158
Annexe III.....	171
Annexe IV .....	190
Résumé de la thèse .....	203

# Liste des abréviations

5-HT	Sérotonine
5HT2CR	Récepteur à la sérotonine de type 2C
aa	Acide aminé
ACTH	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
ADP	<i>Adénosine diphosphate</i>
AgRP	<i>Agouti-related peptide</i>
AKT	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
Ampk	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>
A $\beta$	<i>Amyloid-<math>\beta</math></i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BiP, HSP70, GRP78	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
CART	<i>Cocaine and amphetamine-regulated transcript</i>
Cav1.1	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit</i>
CDG	<i>Congenital Disorder of Glycosylation</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CNX	Calnexine
ConA	Concanavaline A
CQ	Contrôle qualité
CRF	<i>Corticotropin-Releasing Factor</i>
CRT	Calréticuline
cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
Cys	Cystéine
DAD1	<i>Protein glycosyltransferase DAD1 subunit</i>
DC2	<i>Oligosaccharyltransferase complex subunit</i>
Derlin1	<i>Degradation in endoplasmic reticulum protein 1</i>
DHHC6	<i>Palmitoyltransferase gene</i>
Dio2 / D2	<i>Type 2 iodothyronine deiodinase</i>
DolPP	Dolichol pyrophosphate
DRH11	<i>ATP-dependent RNA helicase drs1</i>
EDEM1	<i>ER-degradation-enhancing mannosidase-like 1</i>
eEFSec	Facteur d'élongation eucaryote sélénocystéine-ARNt spécifique
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERGIC	<i>ER to Golgi intermediate compartment</i>

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERManI	<i>ER mannosidase I</i>
ERO1	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1</i>
ERp57	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>
EtNP	Ethanolamine phosphate
Fuc	Fucose
GABA	<i>Gamma Aminobutyric Acid</i>
Gal	Galactose
Gal-1	<i>Galectin-1</i>
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GDP	Guanosine diphosphate
GI	Glucosidase I
GII	Glucosidase II
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPI-AP	<i>GPI-anchored protein</i>
GPx4	<i>Glutathione peroxidase 4</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
IAP/MAGT1	<i>Magnesium transporter protein 1</i>
IKKB	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit</i>
IL	Interleukine
Ino	Inositol
IP3	Inositol trisphosphate
IP3R	<i>Inositol trisphosphate receptor</i>
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
KCP2	<i>Keratinocyte-associated protein 2</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LLO	<i>Lipid-linked oligosaccharide</i>
Mal	Malectine
MAM	<i>Mitochondria-associated membrane</i>
Man	Mannose
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MC3R, MC4R	récepteurs aux mélanocortines de types 3 et 4
MGAT1	<i>Alpha-1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase</i>
MPTP	<i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>
N, Asn	Asparagine

N33/TUSC3	<i>Tumor suppressor candidate 3</i>
NA, Arc	<i>Noyau arqué</i>
<i>Nes-Cre/SelTfl/fl</i>	<i>Brain conditional SELENOT-deficient mice</i>
NMDAR	<i>NMDA receptor</i>
NPY	<i>Neuropeptide Y</i>
OMS	<i>Organisation Mondial de la santé</i>
OST	<i>Oligosaccharytransferase</i>
OST4	<i>Protein glycosyltransferase subunit 4</i>
OST48	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein Glycosyltransferase 48 kDa subunit</i>
p97, VCP	<i>Valosin</i>
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
PC1	<i>Prohormone convertase 1</i>
PERK	<i>Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PGM1	<i>Phosphoglucomutase 1</i>
PMM2	<i>Phosphomannomutase 2</i>
Rdx	<i>Rédoxine</i>
RE	<i>Réticulum endoplasmique</i>
RMN	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
RNase 2	<i>Non-secretory ribonuclease</i>
Ros	<i>Reactive oxygen species</i>
Rpn	<i>Ribophorine</i>
RyR1	<i>Ryanodine receptor 1</i>
SBP2	<i>SECIS binding protein 2</i>
Se	<i>Sélénium</i>
SEC, U	<i>Sélocystéine</i>
SECIS	<i>Selenocysteine insertion sequence</i>
SELENOF, Sep15, 15-kDa selenoprotein	<i>Sélocoprotéine F</i>
SELENOH	<i>Sélocoprotéine H</i>
SELENOI	<i>Sélocoprotéine I</i>
SELENOK, SelK	<i>Sélocoprotéine K</i>
SELENOM, SelM	<i>Sélocoprotéine M</i>
SELENOP, SelP	<i>Sélocoprotéine P</i>
SELENOS, SelS, SEPS1	<i>Sélocoprotéine S</i>
SELENOV	<i>Sélocoprotéine V</i>
SELENOW, SelW	<i>Sélocoprotéine W</i>
SelT SELENOT	<i>Sélocoprotéine T</i>
SEPN1, SELENON, SelN	<i>Sélocoprotéine N</i>
SERCA	<i>ER-sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>

SNA/EBL	<i>Sambucus nigra agglutinine</i>
SNC	Système nerveux central
SPUR	<i>Selenoprotein S positive UGA Recoding</i>
STT3A	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein Glycosyltransferase STT3A subunit</i>
STT3B	<i>Diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase STT3B subunit</i>
T3	<i>3,5,3'-triiodothyronine</i>
T4	<i>3,5,3',5'-tetraiodothyronine</i>
TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TMEM258	<i>Transmembrane protein 258</i>
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor
TrxR1	<i>Thioredoxin reductase 1</i>
TXN	Thiorédoxine
UDP	Uridine diphosphate
UGGT	<i>UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase</i>
UMP	Uridine monophosphate
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VIMP	<i>Valosin interacting protein</i>
XBP1	<i>X-Box Binding Protein 1</i>
Xyl	Xylose
Y2R	Récepteur du NPY de type 2
$\alpha$ -MSH	<i><math>\alpha</math>-melanocyte stimulating hormone</i>
$\beta$ 1,4-N-GnT-III	Beta1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III

# Liste des figures

<i>Figure 1. Distribution du RE dans les neurones</i> .....	19
<i>Figure 2. Schéma montrant les différentes formes de CDG et les voies de biosynthèse des glycanes altérées</i> .....	22
<i>Figure 3. Cycle du dolichol</i> .....	23
<i>Figure 4. Organisation en sous-unités des complexes OST chez les mammifères et la levure</i> .....	25
<i>Figure 5. Régulation de l'activité de BiP par l'ATP</i> .....	28
<i>Figure 6. Illustration de la structure des PDI chez l'Homme</i> .....	30
<i>Figure 7. Rôles des PDI dans le repliement des protéines</i> .....	31
<i>Figure 8. Contrôle de l'homéostasie redox du RE par le glutathion</i> .....	32
<i>Figure 9. Le cycle calnexine/calréticuline</i> .....	34
<i>Figure 10. Représentation graphique de la topologie des protéines transmembranaires de la famille SERCA(1-3)</i> .....	40
<i>Figure 11. Comparaison des récepteurs RyR et IP3R</i> .....	42
<i>Figure 12. Mécanismes d'activation des canaux calciques du RE</i> .....	43
<i>Figure 13. Représentation graphique de la topologie des protéines transmembranaires de la famille IP3R(1-3)</i> .....	44
<i>Figure 14. Illustration des principales protéines aux contacts ER-mitochondrie</i> .....	46
<i>Figure 15. Structures et nombres d'oxydation des composés du soufre et du sélénium qui résultent de réactions d'oxydation à deux électrons</i> .....	48
<i>Figure 16. Biosynthèse de la Sec chez les eucaryotes</i> .....	49
<i>Figure 17. La machinerie moléculaire impliquée dans l'insertion du résidu Sec chez les eucaryotes</i> .....	50
<i>Figure 18. Modèle hypothétique du transport du Se à travers la barrière hémato-encéphalique et le plexus choroïde</i> .....	54
<i>Figure 19. Profil général du transcriptome lié au Se dans les cellules corticales</i> .....	56
<i>Figure 20. Structure secondaire et organisation spatiale de la SELENOT chez le rat</i> .....	58
<i>Figure 21. Histoire évolutive de la SELENOT</i> .....	59
<i>Figure 22. Arbre phylogénétique de la SELENOT basé sur la méthode du Maximum de Vraisemblance</i> .....	61
<i>Figure 23. Expression des transcrits SELENOT dans les tissus de rat pendant l'embryogenèse et chez l'adulte</i> .....	63
<i>Figure 24. Cascade de signalisation LKB1/AMPK/PGC-1<math>\alpha</math>/NRF-1 au cours de la différenciation neuroendocrine des cellules PC12 induite par le PACAP</i> .....	68
<i>Figure 25. Représentation schématique de la structure de la POMC</i> .....	69
<i>Figure 26. La délétion de la SELENOT altère la N-glycosylation de la POMC</i> .....	69
<i>Figure 27. Modèle conceptuel liant l'épidémie d'obésité et le changement climatique</i> .....	71
<i>Figure 28. Carte des connexions entre l'hypothalamus et d'autres régions du système nerveux central impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire</i> .....	72
<i>Figure 29. Schéma représentant la régulation de l'équilibre énergétique au niveau du noyau arqué</i> .....	73
<i>Figure 30. Schéma de la voie centrale des mélanocortines</i> .....	75

<i>Figure 31. Schéma des voies de signalisation par lesquelles les neurones à NPY/AgRP contrôlent l'homéostasie énergétique .....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 32. Les acides gras insaturés et la pratique d'une activité sportive atténuent l'inflammation hypothalamique.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 33. Illustration du rôle de l'inflammation hypothalamique et du stress du RE dans le développement de l'obésité .....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 34. Analyse par western blot de l'expression des protéines POMC et SELENOT dans les cellules mhyoA-POMC traitées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou à la leptine .....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 35. Guides utilisés pour invalider le gène selenot par l'approche CRISPR-Cas9....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 36. Analyse par western blot de l'expression de la SELENOT dans différents clones invalidés à l'aide des guides Sg3 ou Sg4 .....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 37. Morphologie des cellules mhyoA-POMC sauvages et de la lignée KOg3 observée en microscopie à lumière transmise .....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 38. Analyse par immunofluorescence de la morphologie du RE et de l'expression de la POMC dans les cellules mhyoA-POMC WT et SELENOT<sup>-/-</sup> .....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 39. La déplétion de la SELENOT n'altère pas la production d'α-MSH.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 40. Différents niveaux de BiP dans les cellules mhyoA-POMC stablement ou transitoirement déplétées en SELENOT .....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 41. Analyse par western blot du clivage de la caspase 7 dans les cellules KO .....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 42. Observation de l'activité β-galactosidase dans des cellules mhyoA-POMC et PC12 sauvages et SELENOT<sup>-/-</sup> par microscopie à lumière transmise .....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 43. Observation par microscopie confocale à balayage laser d'un processus d'endocytose dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup> .....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 44. Observation au microscope confocal à balayage laser des gangliosides GM1 dans les cellules sauvages et SELENOT<sup>-/-</sup>.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 45. Observation par microscopie confocale à balayage laser du cytosquelette d'actine dans les cellules mhyoA-POMC WT et SELENOT<sup>-/-</sup>.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 46. Analyse par spectrométrie MALDI-TOF du N-glycome des cellules WT et SELENOT<sup>-/-</sup> .....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 47. La déplétion de la SELENOT conduit à une diminution de protéines sialylées et à une perte de N-glycanes membranaires .....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 48. La SELENOT adopte une structure en épingle à cheveux avec le centre redox émergeant dans la lumière du RE .....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 49. Principe du thiol trapping appliqué à la SELENOT .....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 50. Identification des partenaires redox de la SELENOT.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 51. Caractérisation des partenaires de la SELENOT dont la liaison est indépendante du centre CVSC.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 52. Validation de l'interaction de la SELENOT avec IP3R1 .....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 53. Rôle du cytosquelette dans les premières étapes de la maturation de l'axone..</i>	<i>107</i>
<i>Figure 54. Motifs de liaison des lectines ConA et d'EBL.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 55. Le KO SELENOT modifie l'expression et la distribution cellulaire de deux GPI-AP impliquées dans l'adhésion et la plasticité neuronale .....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 56. Prédiction uniprot de la structure d'ERLIN2.....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 57. Résumé schématique des différentes fonctions réalisées par les sept sélénoprotéines résidentes du RE .....</i>	<i>117</i>



# Résumé

La sélénoprotéine T (SELENOT, SelT) est une protéine découverte *in silico* chez l'Homme en 1999. Elle est devenue un sujet d'étude pour notre laboratoire lorsqu'elle a été identifiée dans une étude transcriptomique comme un gène surexprimé au cours de la différenciation neuroendocrine. En lien avec le processus de différenciation, l'expression de la SELENOT atteint un pic lors du développement embryonnaire, notamment dans le cerveau, période à laquelle son invalidation est létale. À partir de la naissance et jusqu'au stade adulte, son expression décroît pour se limiter à un nombre restreint de tissus, et notamment les tissus endocrines. Dans certains cas, l'extinction de l'expression chez l'adulte est réversible, c'est le cas du foie lésé en cours de régénération et des neurones et astrocytes activés au cours de processus neurodégénératifs. La SELENOT est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Sa fonction biologique qui s'apparente par son domaine catalytique à la thiorédoxine repose en grande partie sur son activité antioxydante. Par l'intermédiaire de son site actif constitué de 4 acide aminé (aa) CVSU, U étant le 21<sup>e</sup> aa sélénocystéine (Sec), elle est capable d'échanger des électrons et des ponts disulfure avec d'autres protéines qui restent à identifier. Elle limite le stress oxydant et celui du RE dans les cellules neuroendocrines et les neurones. Son absence inhibe la sécrétion hormonale d'ACTH issue de la maturation post-traductionnelle de la proopiomélanocortine (POMC) dans les cellules hypophysaires.

La POMC est aussi produite au niveau central par les neurones à POMC de l'hypothalamus. Ceux-ci jouent un rôle anorexigène dans la régulation de la prise alimentaire *via* la libération d' $\alpha$ -MSH, un autre peptide dérivé du clivage différentiel de la POMC, en réponse à divers signaux métaboliques tels que les lipides, les hormones et les glucides. Dans un modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisses, un stress du RE est observé dans ces neurones ainsi qu'une inflammation et une accumulation de POMC dans le RE, entraînant un défaut de sécrétion d' $\alpha$ -MSH. Étant donné le rôle essentiel de la SELENOT dans l'homéostasie du RE et son effet neuroprotecteur dans certains modèles de maladies neurodégénératives, nous avons étudié sa fonction dans les neurones à POMC.

Nous avons utilisé un modèle cellulaire murin de neurones à POMC, les neurones mhypoA-POMC obtenus à partir d'hypothalamus de souris et immortalisés par l'antigène T, dont on sait qu'ils répondent à la leptine et sécrètent de l' $\alpha$ -MSH. Nous avons généré par l'approche CRISPR-Cas9 deux lignées invalidées de manière stable pour la SELENOT, par

induction d'un codon stop prématuré. Nous avons étudié dans ce modèle l'homéostasie du RE et la différenciation neuronale. Nous avons constaté des défauts majeurs par rapport aux neurones sauvages : une augmentation de la surface cellulaire, un aplatissement de la cellule, un étalement du RE, une perte des contacts entre le RE et la membrane plasmique, une augmentation de l'endocytose, un défaut d'extension des neurites, et une expression de la  $\beta$ -galactosidase. Cet ensemble de modifications suggère que les cellules KO SELENOT sont sénescents. Le maintien de la production de POMC et d' $\alpha$ -MSH mesurés par immunofluorescence et par ELISA, respectivement, montre qu'elles demeurent métaboliquement actives, une caractéristique de la sénescence. Nous avons observé la perte spécifique de certains polysaccharides dans les cellules invalidées pour la SELENOT, en particulier les glycanes sialylés, confirmée par une diminution du marquage à la lectine *Sambucus nigra* aux niveaux intracellulaire et membranaire, en lien avec le rôle de la SELENOT dans la *N*-glycosylation et/ou la sénescence.

Nous avons étudié au niveau moléculaire le rôle de la SELENOT dans le RE. L'insertion de sites de *N*-glycosylation à différents endroits de la SELENOT a montré que cette protéine adopte une structure en épingle à cheveux, le site actif CVSU émergeant dans la lumière du RE. Nous avons adopté une approche de *thiol trapping* pour identifier par spectrométrie de masse les partenaires redox de la SELENOT dans le RE. Nous avons montré une interaction de la SELENOT avec le complexe OST (sous unités STT3A, STT3B, OST48, RPN1, RPN2, malectine) qui ne dépend pas de la présence des cystéines du centre redox. Nous avons par ailleurs identifié une dizaine de partenaires redox potentiels de la SELENOT, parmi lesquels le récepteur de l'inositol trisphosphate de type 1 (IP3R1), un canal du RE responsable de la mobilisation calcique lors d'une stimulation et ERLIN2, une protéine régulant l'expression de l'IP3R1. Nous avons confirmé par western blot l'interaction de la SELENOT avec l'IP3R et des résultats préliminaires montrent une tendance à la baisse des niveaux d'IP3R en absence de SELENOT.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que le centre redox de la SELENOT émerge dans la lumière du RE où elle est donc susceptible d'engager des interactions redox avec IP3R1 et / ou ERLIN2. Au contraire, l'interaction avec OST ne mettrait pas en jeu les cystéines du centre redox de la SELENOT, mais potentiellement des interactions avec d'autres cystéines ou des domaines transmembranaires. Le phénotype de sénescence observé résulte probablement d'une perturbation de l'homéostasie calcique liée à un défaut d'expression ou d'activité d'IP3R1. Le mécanisme de régulation de l'activité d'IP3R1 par la

SELENOT reste à identifier. Les résultats obtenus permettent d'avancer trois hypothèses : le contrôle de l'activité d'IP3R1 soit par l'état redox de ses cystéines régulatrices, soit par sa *N*-glycosylation puisqu'il présente la particularité de posséder une cystéine au sein d'un séquon qui se trouve à proximité d'un pont-disulfure, soit via son interaction avec ERLIN2.

# Summary

Selenoprotein T (SELENOT, SelT) is a protein discovered *in silico* in humans in 1999. It became a subject of study for our laboratory when it was identified in a transcriptomic study as a gene overexpressed during neuroendocrine differentiation. In connection with the differentiation process, SELENOT expression peaks during embryonic development, particularly in the brain, at which time its invalidation is lethal. From birth to adulthood, its expression decreases and is restricted to a limited number of tissues, particularly endocrine tissues. In some cases, the extinction of expression in adults is reversible, as in the case of damaged liver during regeneration and in neurons and astrocytes activated during neurodegenerative processes. SELENOT is located in the endoplasmic reticulum (ER). Its biological function, which is similar to that of thioredoxin in its catalytic domain, is largely based on its antioxidant activity. Through its active site CVSU, U being the 21st amino acid (aa) selenocysteine (Sec), it is capable of exchanging electrons and disulphide bridges with other proteins which have yet to be identified. It limits oxidative and ER stress in neuroendocrine cells and neurons. Its absence inhibits the hormonal secretion of ACTH from the post-translational maturation of proopiomelanocortin (POMC) in pituitary cells.

POMC is also produced centrally by POMC neurons in the hypothalamus. These play an anorectic role in the regulation of food intake via the release of  $\alpha$ -MSH, another peptide derived from differential cleavage of POMC, in response to various metabolic signals such as lipids, hormones and carbohydrates. In a mouse model of obesity induced by a high-fat diet, ER stress is observed in these neurons as well as inflammation and accumulation of POMC in the ER, leading to a defect in  $\alpha$ -MSH secretion. Given the essential role of SELENOT in ER homeostasis and its neuroprotective effect in some models of neurodegenerative diseases, we studied its function in POMC neurons.

We used a mouse cell model of POMC neurons, mhypoA-POMC neurons obtained from mouse hypothalamus and immortalised with T-antigen, which are known to respond to leptin and secrete  $\alpha$ -MSH. We generated two lines stably invalidated for SELENOT by induction of a premature stop codon using the CRISPR-Cas9 approach. We studied ER homeostasis and neuronal differentiation in this model. We found major defects compared to wild-type neurons: increased cell surface area, cell flattening, spreading of the ER, loss of contacts between the ER and the plasma membrane, increased endocytosis, defect in neurite extension, and expression

of  $\beta$ -galactosidase. This set of changes suggests that SELENOT KO cells are senescent. The maintenance of POMC and  $\alpha$ -MSH production measured by immunofluorescence and ELISA, respectively, shows that they remain metabolically active, a characteristic of senescence. We observed the specific loss of some polysaccharides in SELENOT-invalidated cells, in particular sialylated glycans, confirmed by a decrease in Sambucus nigra lectin labelling at the intracellular and membrane levels, in connection with the role of SELENOT in *N*-glycosylation and/or senescence.

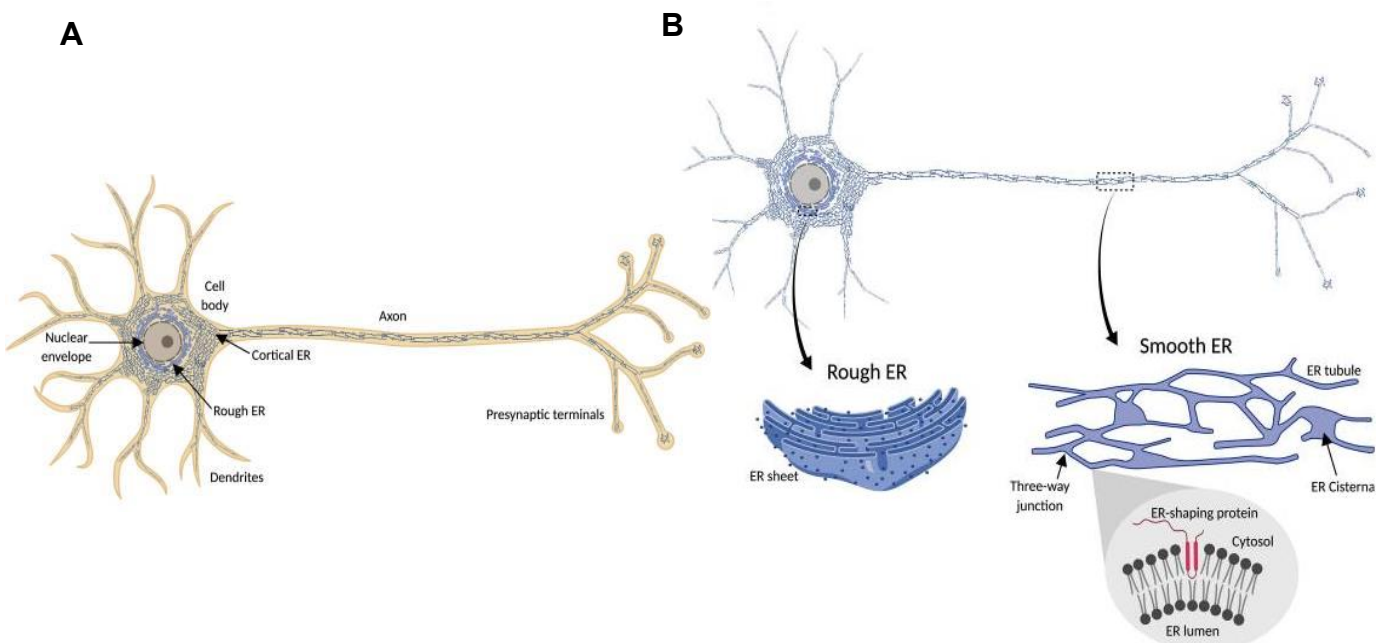
We studied the role of SELENOT in the ER at the molecular level. Insertion of *N*-glycosylation sites at different locations in SELENOT showed that this protein adopts a hairpin structure with the CVSU active site emerging in the ER lumen. We adopted a thiol trapping approach to identify the redox partners of SELENOT in the ER by mass spectrometry. We showed that SELENOT interacts with the OST complex (STT3A, STT3B, OST48, RPN1, RPN2, malectin) in a way that is not dependent on the presence of cysteines in the redox centre. We also identified about ten potential redox partners of SELENOT, including the inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1), an ER channel responsible for calcium mobilisation upon stimulation, and ERLIN2, a protein regulating IP3R1 expression. We confirmed by western blot the interaction of SELENOT with IP3R and preliminary results show a downward trend in IP3R levels in the absence of SELENOT.

In conclusion, we have shown for the first time that the redox centre of SELENOT emerges in the lumen of the ER where it is therefore likely to engage in redox interactions with IP3R1 and/or ERLIN2. In contrast, the interaction with OST would not involve the cysteines of the SELENOT redox centre, but potentially interactions with other cysteines or transmembrane domains. The observed senescence phenotype probably results from a disturbance of calcium homeostasis linked to a defect in IP3R1 expression or activity. The mechanism of regulation of IP3R1 activity by SELENOT remains to be identified. The results obtained allow us to put forward three hypotheses: the control of IP3R1 activity either by the redox state of its regulatory cysteines, or by its *N*-glycosylation since it has the particularity of possessing a cysteine within a sequon which is close to a disulphide bridge, or via its interaction with ERLIN2.

# Introduction

## L'environnement unique du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le plus grand réseau membranaire de la cellule, constitué de citernes et de tubules. C'est un site majeur de la synthèse, du repliement et du transport des protéines, de la synthèse des lipides et des stéroïdes et du stockage du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Sa taille peut varier selon l'activité et les besoins de la cellule. Il est structurellement divisé en deux parties : le RE lisse et le RE rugueux. La partie lisse est très abondante dans les hépatocytes du foie, dans les cellules productrices d'hormones stéroïdes, et dans les muscles, où il est également connu sous le nom de réticulum sarcoplasmique. Les enzymes du RE lisse sont principalement impliquées dans la synthèse des acides gras, du cholestérol et des phospholipides. Le RE est aussi le principal stock de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule (Chen *et al.* 2010). Le RE rugueux tient son nom de la présence de ribosomes au niveau de sa surface cytosolique, semblables à des bourgeonnements. Il est particulièrement développé dans les cellules spécialisées comme les plasmocytes producteurs d'anticorps ou les neurones (Figure 1).



**Figure 1. Distribution du RE dans les neurones**

A. Le RE (bleu) forme un réseau continu dans le cytosol (orange) des neurones, présent dans le corps cellulaire, l'axone, les terminaisons présynaptiques et la plupart des dendrites.

*B. Comme le RE forme une structure continue qui suit la forme de la cellule, il a été appelé "un neurone dans un neurone" (Berridge 1998). Dans le corps cellulaire, en continuité avec l'enveloppe nucléaire, se trouve le RE rugueux, caractérisé par sa morphologie en feuilletts et la présence de ribosomes (points bleu foncé) attachés à la membrane du RE (détail agrandi à gauche). Le RE lisse comprend le RE cortical dans le corps cellulaire et le RE dendritique et axonal. Il est principalement formé d'un réseau de tubules interconnectés, avec parfois des feuilles ou des citernes (détail agrandi à droite). La formation des tubules de la membrane du RE est favorisée physiquement par les protéines qui façonnent la forme du RE et partagent un domaine intramembranaire caractéristique inséré dans la face cytosolique de la membrane du RE (détail agrandi en bas à droite) (Ozturk, O'Kane, and Perez-Moreno 2020).*

Le RE constitue le premier compartiment de la voie sécrétoire par son implication dans la coordination de la synthèse des protéines membranaires et sécrétées (un tiers du protéome chez les eucaryotes), leur contrôle qualité (CQ), leur transport et leur dégradation (Carreras-Sureda, Pihan, and Hetz 2018). Dans cet organite, les protéines peuvent être repliées et subir des modifications co- et post-traductionnelles comme la *N*-glycosylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la création de ponts disulfures. La nature multifonctionnelle de cet organite nécessite une myriade de protéines, un environnement physicochimique unique et une coordination avec les changements de l'environnement intracellulaire que nous allons décrire dans ce chapitre.

## I. La *N*-glycosylation

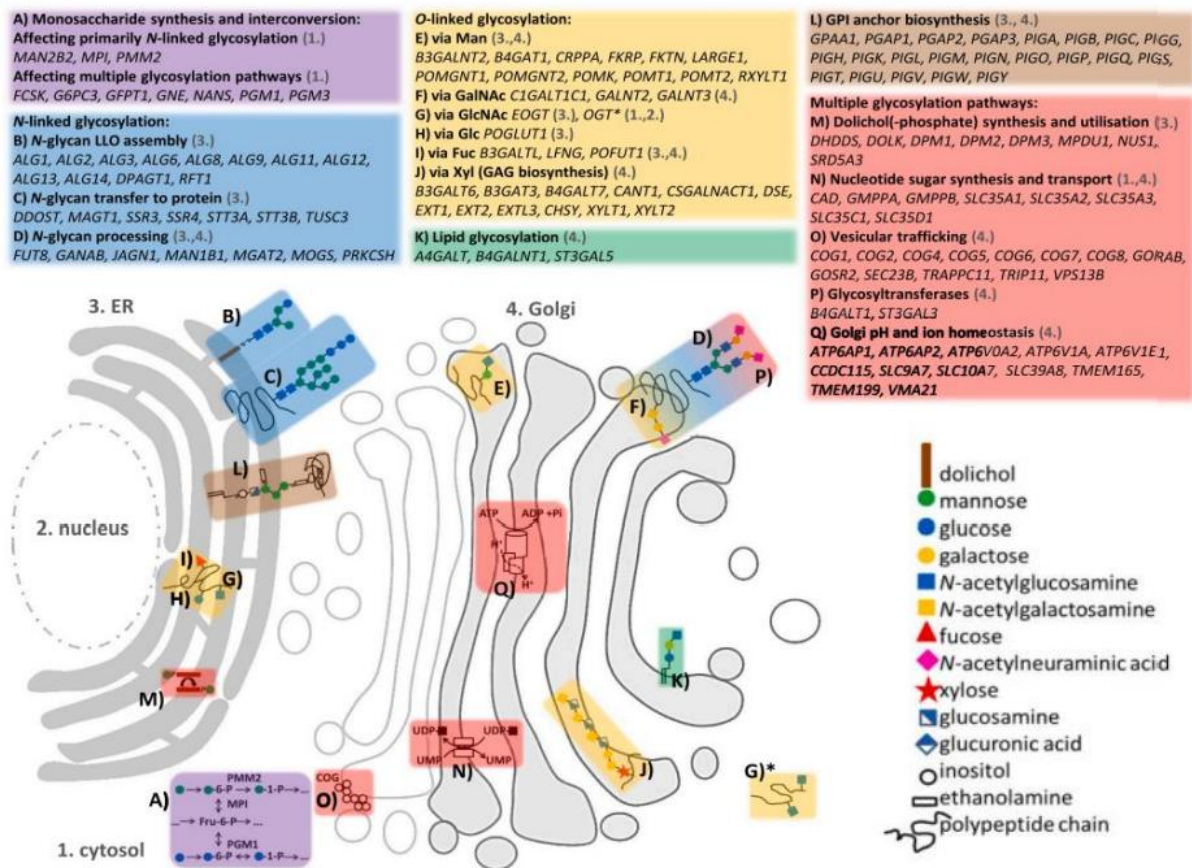
La *N*-glycosylation est une modification co- et post-traductionnelle essentielle chez les eucaryotes qui débute dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Elle amplifie fortement la diversité des protéines en produisant une multitude de protéines aux propriétés et fonctions différentes (Varki 2017, Breitling and Aebi 2013). La *N*-glycosylation consiste en l'établissement d'une liaison covalente entre un précurseur oligosaccharidique riche en mannose (Man) et une protéine, au niveau d'un résidu asparagine inclus dans le motif -asparagine-X-sérine / thréonine (séquon, où X n'est pas une proline) (Welply *et al.* 1983), catalysée par le complexe oligosaccharyltransférase (OST). Chez l'homme, elle concerne 50 à 70 % des protéines (Ford *et al.* 2015, An, Froehlich, and Lebrilla 2009) et plus de 85 % des protéines sécrétées et membranaires (Schjoldager *et al.* 2020). Le *N*-glycome est l'ensemble des *N*-glycanes retrouvés sur les glycoprotéines d'une cellule. Il est diversifié par les séquences

oligosaccharidiques rencontrées, par les liaisons reliant différents monosaccharides ou par les modifications de ces oligosaccharides (comme la phosphorylation, on trouve alors le Mannose-6-phosphate ou la sulfatation qui peut avoir lieu en position C6 des GlcNAc) (Muthana, Campbell, and Gildersleeve 2012).

Les mutations qui surviennent dans les protéines impliquées dans les voies de biosynthèse des différents types de glycanes (comme les glycosyltransférases, les transporteurs de sucres ou encore les glycosidases) donnent lieu à un ensemble de maladies héréditaires collectivement appelées troubles congénitaux de la glycosylation (CDG). Chez l'Homme ; les symptômes cliniques comprennent entre autres un retard mental, un retard de développement, un dysfonctionnement hépatique, des caractéristiques dysmorphiques, une anorexie et des troubles gastro-intestinaux. Cette famille de maladies métaboliques a été découverte en 1980 et elle continue de croître rapidement. Environ 17 % des 137 CDG ont été identifiés au cours des trois dernières années.

Conformément aux recommandations récentes, les maladies CDG sont divisés en deux groupes. Le groupe des CDG-I comprend des défauts d'assemblage de la chaîne *lipid-linked oligosaccharide* (LLO) et de son transfert à la protéine. Les protéines mutées sont situées dans le cytosol et le RE. Le groupe des CDG-II fait référence à des défauts de maturation des glycanes liés aux protéines, soit tardivement dans le RE, soit dans l'appareil de Golgi (Grunewald, Matthijs, and Jaeken 2002, Dulary *et al.* 2017). Outre des anomalies de *N*-glycosylation, les CDG peuvent être provoqués par l'altération d'autres processus incluant entre autres la *O*-glycosylation, la synthèse des monosaccharides, la glycosylation des lipides, la biosynthèse des *GPI-anchored proteins* (GPI-AP) et le transport vésiculaire (Ondruskova *et al.* 2021) (Figure 2). Les CDG liés à la *N*-glycosylation sont les plus répandus, avec en première position le PMM2-CDG provoqué par un déficit de l'enzyme impliquée dans la synthèse du GDP-mannose (phosphomannomutase 2, PMM2), pour laquelle on référence plus de 700 cas dans le monde (Chang, He, and Lam 2018, Houdou and Foulquier 2020).



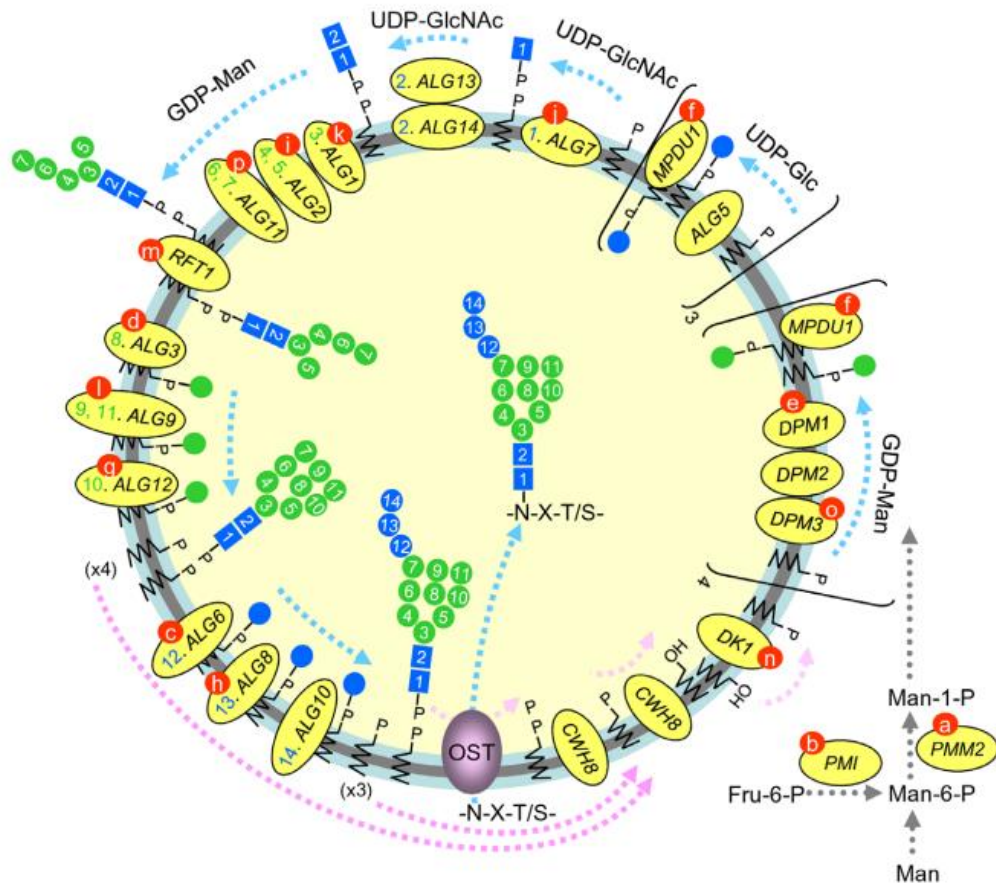


**Figure 2. Schéma montrant les différentes formes de CDG et les voies de biosynthèse des glycanes altérés**

Les CDG sont désignés par le symbole du gène muté et sont classés en fonction de l'étape affectée dans les divers processus de glycosylation (N- et O-glycosylation, glycosylation des lipides, synthèse de l'ancre glycosylphosphatidylinositol GPI). Les nucléotides-oses, substrats des mannosyltransférases, sont synthétisés principalement dans le cytosol, et parce qu'ils sont utilisés dans plusieurs réactions de glycosylation, leur déficience impacte la structure de divers glycoconjugués. De nombreux défauts impactant plusieurs voies de glycosylation ont été décrits mais il arrive souvent que d'autres processus cellulaires soient perturbés (par exemple, un CDG induit en raison d'une homéostasie ionique altérée dans l'appareil de Golgi, telles que TP6AP2). Abréviations : ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate; COG, conserved oligomeric Golgi complex; RE, réticulum endoplasmique ; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; Fuc, fucose; GalNAc, N-acétylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, N-acétylglucosamine; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LLO, oligosaccharides liés aux lipides ; MPI, mannose phosphate isomérase; PGM1, phosphoglucomutase 1; PMM2, phosphomannomutase 2; UDP, uridine diphosphate; UMP, uridine monophosphate; Xyl, xylose (Ondruskova et al. 2021).

## A. Le cycle du dolichol

La *N*-glycosylation comporte deux étapes : une étape de construction du précurseur oligosaccharidique (cycle du dolichol) puis son transfert co- ou post-traductionnelle sur l'asparagine d'une protéine (Figure 3).



**Figure 3. Cycle du dolichol**

Le cycle du dolichol consiste en une série de réactions (lignes bleues en pointillés) impliquées dans l'assemblage du précurseur oligosaccharidique ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) sur un résidu de dolichol phosphate (Dol-P). Le cycle est complété par des réactions (lignes roses en pointillés lourds) impliquées dans le recyclage du dol-P. Le LLO mature est généré par le transfert de deux résidus de *N*-acétylglucosamine (carrés bleus), 9 résidus de Man (cercles verts) et 3 résidus de Glc (cercles bleus) sur le support lipidique dolichol-P (ligne en zigzag). Les monosaccharides sont ajoutés séquentiellement, dans l'ordre indiqué par leur numéro, par des glycosyltransférases dont les noms de gènes sont indiqués dans les ovals jaunes et dont l'ordre d'action est également indiqué. Les sept premiers sucres sont ajoutés par des glycosyltransférases à orientation cytoplasmique qui requièrent de l'UDP-GlcNAc et des

glycosyltransférases nécessitant du GDP-Man. Le LLO en croissance est ensuite basculé dans la lumière du RE par le biais d'une flippase codée par le gène RFT1. Des glycosyltransférases nécessitant la dolichol-P-Man (DPM) et la dolichol-P-Glc (DPG) complètent ensuite la biosynthèse du LLO. L'ajout du dernier résidu de Glc au LLO en croissance permet un transfert efficace, par l'intermédiaire d'OST, de l'oligosaccharide depuis le lipide sur le séquon du polypeptide naissant (-N-X-T/S-) dans le RE. Comme l'indiquent les lignes roses en pointillés, une série de réactions effectuées par les produits des gènes indiqués dans les ovals jaunes, assure que les molécules dol-P et dol-PP orientées dans la lumière du RE soit réorientées vers le cytosol. Les différents sous-types de CDG de type I (indiqués par des lettres dans des cercles rouges associées aux nom de gènes) sont causés par des mutations dans les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la construction du LLO mature ou dans le recyclage du dolichol (Peric et al. 2010).

Le précurseur oligosaccharidique est constitué de 14 monosaccharides, dont trois résidus de Glc, neuf de Man et deux de GlcNAc : (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). La première étape du cycle du dolichol est catalysée par l'UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate N-acétylglucosamine phosphotransférase (DPAGT1). Celle-ci transfère la GlcNAc-1-P à partir de l'UDP-GlcNAc sur un terpène enchâssé dans la membrane du RE, le dolichol phosphate (Dol-P) pour générer le LLO. Cette étape est inhibée par la tunicamycine, un antibiotique identifié chez *Streptomyces lysosuperificus*. Deux glycosyltransférases, l'UDP-GlcNAc-glycosyltransférase et la GDP-Man-glycosyltransférases, ajoutent séquentiellement une autre molécule de GlcNAc et cinq de Man, respectivement. Une flippase, RFT1, permet alors le changement de feuillet du GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>-LLO au sein de la membrane, basculant le précurseur oligosaccharidique dans la lumière du RE. Des monosaccharides supplémentaires (quatre molécules de Man et trois de Glc) sont ajoutés successivement dans la lumière du RE par les Dol-P-Man et Dol-P-Glc glycosyltransférases pour former le LLO mature (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). Le précurseur oligosaccharidique mature est transféré en bloc par le complexe oligosaccharyltransférase (OST) sur certaines asparagines au sein de séquons accessibles (Mohanty, Chaudhary, and Zoetewey 2020). Les Dol-P et Dol-PP sont ensuite déphosphorylés et réorientés vers le feuillet cytosolique de la membrane.

## B. Le complexe OST

L'OST est un complexe hétéro-oligomérique, très conservé entre l'Homme et la levure, qui est inséré dans la membrane du RE et qui catalyse la réaction de *N*-glycosylation. Chez la levure il existe sous une forme composée de la sous-unité catalytique Stt3, de 6 protéines essentielles (Ost1, 2, 4, 5, Swp1 et Wbp1) et d'une sous-unité non essentielle mutuellement exclusive Ost3 ou Ost6 (Figure 4) permettant d'optimiser l'efficacité de la *N*-glycosylation *via* sa fonction d'oxydoréductase permettant de réduire les ponts disulfure et rendre l'asparagine accessible au complexe. Chez les mammifères il existe deux isoformes de la sous-unité catalytique, STT3A ou STT3B, et donc également deux complexes différents respectivement appelés OST-A et OST-B. Six sous-unités essentielles, les mêmes que chez la levure, sont aussi systématiquement présentes dans les deux types de complexes, à savoir ribophorine I et II, OST48, DAD1, OST4 et TMEM258. Des sous-unités plus spécifiques peuvent s'ajouter à OST-A, telles que DC2 et KCP2 (Kelleher and Gilmore 2006). OST-B possède lui aussi des sous-unités spécifiques qui sont MAGT1 ou TUSC3, homologues de Ost3 et Ost6 respectivement chez la levure. Ces quatre protéines partagent la même topologie, c'est-à-dire une organisation à quatre domaines transmembranaires avec une partie N-terminale orientée vers la lumière du RE portant une activité oxydoréductase (Kelleher *et al.* 2003).

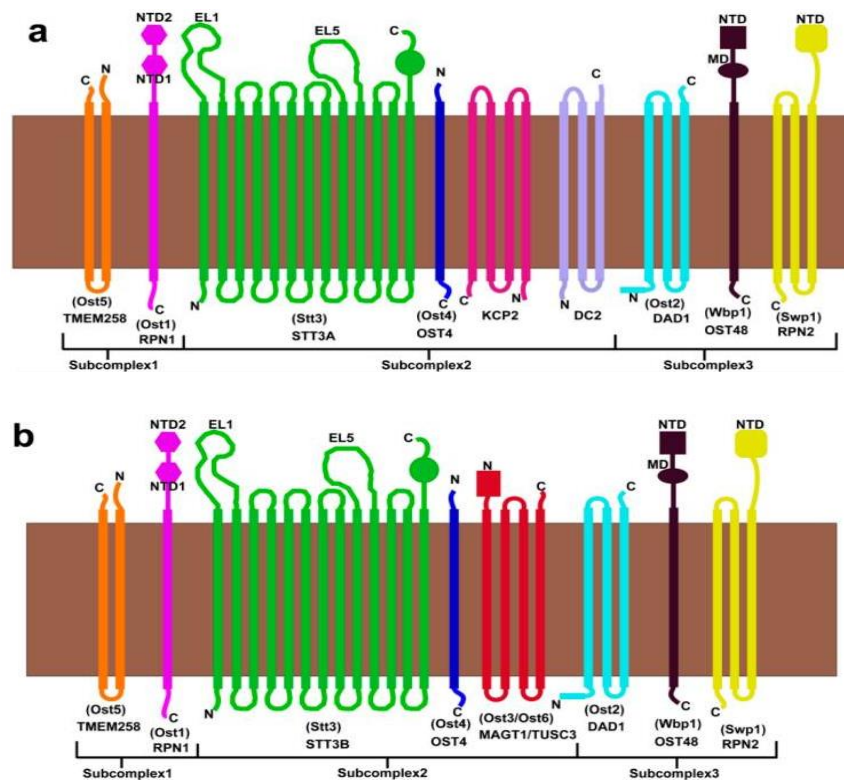


Figure 4. Organisation en sous-unités des complexes OST chez les mammifères et la levure

A. Complexe OST-A. B. Complexe OST-B. Les sous-unités sont désignées par leur nom chez les mammifères et leur nom chez la levure est mentionné entre parenthèses. Le complexe OST-B est dépourvu des sous-unités KCP2 et DC2, trouvées exclusivement dans le complexe OST-A. À l'inverse, les oxydoréductases MAGT1 et TUSC3 ne sont présentes que dans le complexe OST- B de façon mutuellement exclusive. Le complexe OST de levure est constitué des sous-unités sst3 et ost1-6. ost3 et ost6 sont des homologues mutuellement exclusifs du complexe et aussi les équivalents de Tusc3 et MagT1 (Mohanty, Chaudhary, and Zoetewey 2020).

Les progrès récents de l'étude structurale des assemblages macromoléculaires à l'échelle atomique par cryo-microscopie électronique (cryo-EM), spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et cristallographie ont mis en lumière la topologie des sous-unités individuelles dans le complexe OST (Gayen and Kang 2011, Huang, Bhaskaran, and Mohanty 2012, Wild *et al.* 2018, Bai *et al.* 2018). Ces études ont permis notamment de démontrer que l'interaction entre le complexe OST-A et le translocon Sec61 nécessite la présence de DC2 et KCP2 (Shrimal, Cherepanova, and Gilmore 2017) et que la chaîne d'acides aminés en cours de biosynthèse doit atteindre entre 65 et 75 acides aminés pour être accessible au complexe à la sortie du translocon (Deprez, Gautschi, and Helenius 2005, Whitley, Nilsson, and von Heijne 1996). La structure à haute résolution la plus récente de OST-A, obtenue par cryo-EM, n'a pas pu confirmer qu'il contient la sous-unité KCP2, particulièrement difficile à faire précipiter, mais qu'il peut lier partiellement, *via* une interaction avec RPN1, une protéine supplémentaire appelée malectine (Ramirez, Kowal, and Locher 2019). Le rôle de cette lectine, qui reconnaît plus spécifiquement les glycanes riches en Man, dans le processus de *N*-glycosylation, n'est pas connu (Takeda *et al.* 2014). RPN1, à l'aide de DC2, est aussi impliquée dans la liaison d'OST-A au complexe ribosome-translocon. Par ailleurs, il a été montré que RPN1, TMEM258 et STT3A forment un faisceau de quatre hélices se liant à un ribosome en cours de traduction. En revanche, plusieurs éléments empêcheraient la liaison de l'OST-B au ribosome, tels que l'organisation spatiale du domaine cytosolique de 47 acides aminés, spécifique de STT3B. On peut aussi remarquer l'absence de DC2 et la position inclinée des domaines transmembranaires TM1 de STT3B et TM2 de TMEM258, par rapport à leur position dans OST-A. Autre différence, le complexe OST-B présente une affinité plus importante pour la malectine que le complexe OST-A, sans qu'on en connaisse la signification (Ramirez, Kowal, and Locher 2019). Compte-tenu de leur différence d'association avec le ribosome en cours de traduction, OST-A et OST-B exercent des rôles différents mais complémentaires. OST-A est responsable de la glycosylation co-traductionnelle de la plupart des sites accepteurs (Shrimal, Cherepanova, and Gilmore 2015, Braunger *et al.* 2018, Bai and Li 2019), alors qu'OST-B est plutôt dédié à la *N*-

glycosylation post-traductionnelle des cibles ayant échappé à OST-A. OST-A est plus largement exprimé qu'OST-B, dans les tissus sécréteurs comme le pancréas alors que ce dernier est plus exprimé dans le cerveau qu'OST-A (Kelleher *et al.* 2003) (<https://www.proteinatlas.org/>).

L'aspartate 49 et le glutamate 351 de STT3A d'une part, et l'aspartate 103 et l'asparagine 623 de STT3B d'autre part sont les deux sites accepteurs de liaisons hydrogène pouvant réagir avec l'asparagine du peptide en cours de synthèse (Ramirez, Kowal, and Locher 2019). Il a été proposé que la formation de ces liaisons hydrogène conduise à la rotation de la liaison N-C du groupe amide du peptide, de façon à libérer l'atome d'azote du groupe carbonyle. Il deviendrait alors plus réactif pour une attaque nucléophile par le LLO qui libère le DolPP tout en créant une liaison *N*-glycosidique sur l'asparagine. Pour que cette réaction puisse avoir lieu, le séquen -N-X-T/S- doit adopter une conformation relâchée, sans ponts disulfures, de façon à être accessible au complexe enzymatique. Tout encombrement stérique provoqué par le repliement de la protéine peut inhiber la réaction. Le complexe OST-B, grâce à la présence des oxydoréductases MagT1 ou Tusc3, est capable d'ouvrir les protéines repliées pour faciliter leur accès à la *N*-glycosylation par l'établissement d'un pont disulfure transitoire entre ses sous-unités et le substrat (Mohorko *et al.* 2014, Cherepanova, Shrimal, and Gilmore 2014). L'idée qui prévaut est que contrairement à OST-B, OST-A ne requiert pas d'activité oxydoréductase associée, puisqu'il catalyse la *N*-glycosylation en cours de traduction, donc avant la formation de la plupart des ponts disulfure.

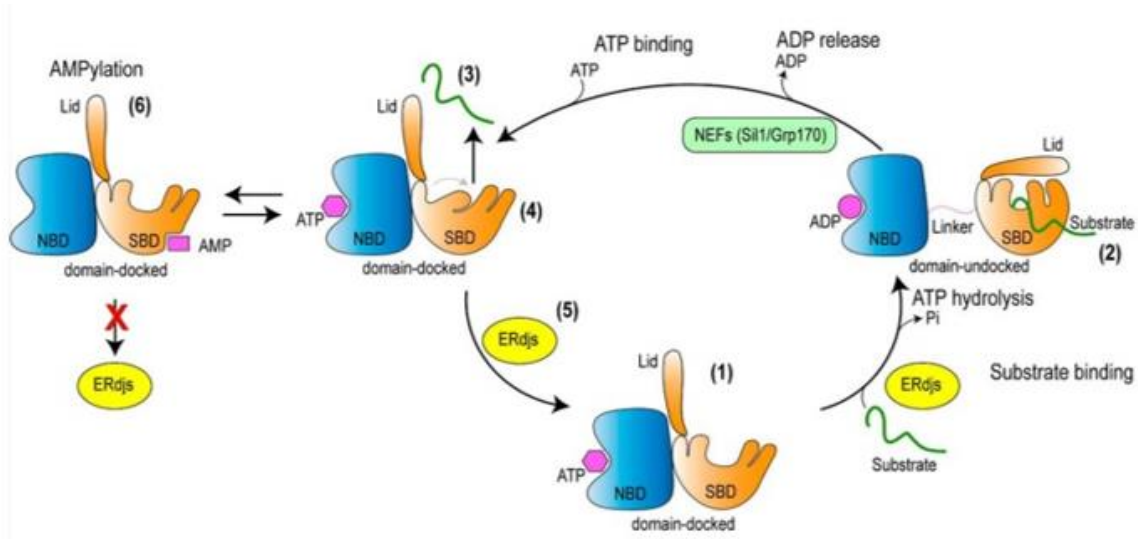
## II. Le repliement des protéines

Le RE contient une grande quantité de protéines dont la concentration peut atteindre  $\approx 100$  g/L (soit environ 2 mM) ce qui lui confère une forte viscosité (Stevens and Argon 1999). Afin de prévenir l'agrégation des protéines mal repliées qui exposent à leur surface des domaines hydrophobes, cet organite contient une grande quantité de protéines chaperonnes, des protéines qui facilitent le repliement d'autres protéines pour leur permettre d'atteindre leur forme native (Cai, Wang, and Tsou 1994). Il existe plusieurs types de protéine chaperonnes comme les protéines sensibles à la température (*heat shock protein*, *Hsp*), les protéines disulfide isoméras (PDI) et les lectines chaperonnes.

### A. Les *heat shock proteins*

Les Hsp sont classées en plusieurs familles (Hsp 40, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 et Hsp 100), selon leur masse moléculaire. L'expression de ces protéines est généralement induite suite à un stress thermique, puisque la température modifie la conformation des protéines, mais certaines d'entre elles, comme Hsp70/GRP78/BiP, ERdj1-5, BAP/Sil1, GRP170, GRP94 et la Torsine A sont surexprimées lors d'une accumulation de protéines dans le RE, une privation en glucose et/ou une dérégulation de l'homéostasie calcique et redox dans le RE (Hebert and Molinari 2007).

GRP78/BiP est la chaperonne majeure du RE et la principale consommatrice d'ATP (Hendershot 2004). Elle joue un rôle de premier plan dans le repliement des protéines, la protection vis-à-vis de l'agrégation des protéines mal repliées (Haas and Wabl 1983, Puig and Gilbert 1994) et le maintien de l'homéostasie calcique dans le RE (Lievremont *et al.* 1997). BiP possède un site de liaison nucléotidique (NBD) et un site de liaison au substrat (SBD). Sous sa forme liée à l'ATP le NBD est arrimé au SBD. L'hydrolyse de l'ATP permet de libérer les deux domaines et créer une poche afin de lier avec une haute affinité le substrat à replier apporté par ERdj. Le relargage de l'ADP permet à la fois de relarguer le substrat replié et libérer le site de liaison pour l'ATP (Figure 5) (Pobre, Poet, and Hendershot 2019, Wieteska, Shahidi, and Zhuravleva 2017). BiP peut aussi être AMPylé (Preissler, Rato, *et al.* 2017), une modification post-traductionnelle qui lie de façon covalente l'AMP à une protéine. Cette modification inactive BiP en la figeant dans une conformation arrimée similaire à sa forme liée à l'ATP qui bloque l'interaction avec ERdj (Preissler, Rohland, *et al.* 2017).



**Figure 5. Régulation de l'activité de BiP par l'ATP**

Étape 1, dans la forme liée à l'ATP, le domaine de liaison au nucléotide (NBD) (bleu) et le domaine de liaison au substrat (SBD) (orange), avec son couvercle (lid) ouvert, sont arrimés l'un à l'autre, ce qui donne une forme à faible affinité pour le substrat. Étape 2 : lors de

*l'hydrolyse de l'ATP, le NBD et le SBD se dissocient et le couvercle du SBD se ferme, ce qui donne une forme à forte affinité pour le substrat. Ce cycle est régulé par des cofacteurs DnaJ localisés dans le RE (ERdjs) qui interagissent avec les protéines dépliées et les transfèrent à la forme liée à l'ATP de BiP, tout en déclenchant simultanément l'hydrolyse de l'ATP. Étapes 3, 4 des facteurs d'échange de nucléotides (NEF) stimulent la libération d'ADP. La liaison de l'ATP entraîne un changement de conformation du SBD, ce qui donne lieu à une conformation plus compacte, censée "expulser" le substrat. Étape 5, l'interaction avec ERdjs réorganise la poche de liaison polypeptidique du SBD BiP-ATP, le préparant à interagir avec un autre substrat. Étape 6, BiP peut être modifiée de manière post-traductionnelle par AMPylation, ce qui rend la protéine inactive. La forme BiP AMPylée adopte une structure "à domaine fixe" similaire à celle de l'état lié à l'ATP et est incapable d'interagir de manière productive avec ERdjs (Pobre, Poet, and Hendershot 2019).*

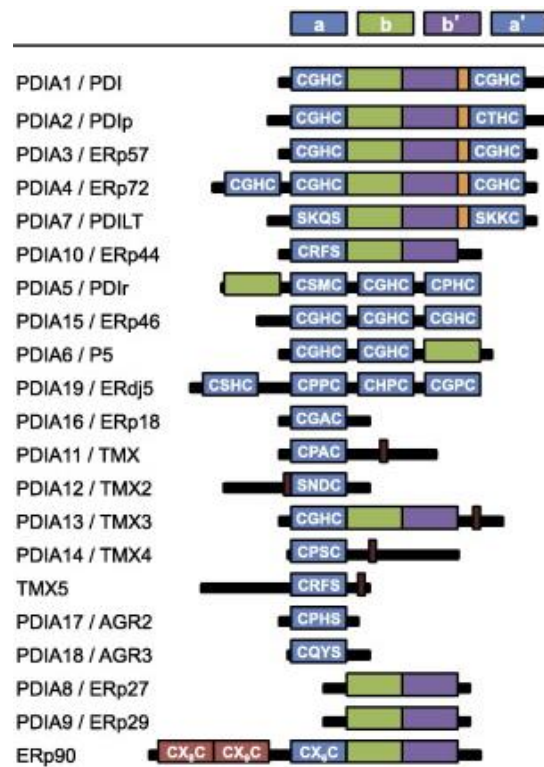
BiP facilite aussi, avec des membres de la famille ERdj et Sil1, la translocation des chaînes polypeptidiques naissantes vers le RE (Matlack *et al.* 1999) et contrôle la perméabilité du RE en obstruant les canaux de translocation Sec61 (Alder *et al.* 2005). Par ailleurs, elle joue aussi un rôle fondamental dans l'activation de l'UPR (Hebert and Molinari 2007, Schroder and Kaufman 2005).

## B. Le repliement oxydatif des protéines

Les protéines acquièrent une structure tridimensionnelle dans le RE qui est déterminée par leur séquence primaire et repliées par différents types d'interactions telles que les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et électrostatiques. Les ponts disulfure servent à stabiliser la structure tertiaire. Environ 7000 protéines (1/3 du protéome) présentent des ponts disulfure, une réaction catalysée par la familles des *protein disulfide isomerase* (PDI) (Hatahet and Ruddock 2009). L'environnement oxydant du RE par rapport à celui du cytosol (-170 à -185 mV à pH 7.0 dans le RE contre -290 mV dans le cytosol) (Dixon *et al.* 2008, Ostergaard, Tachibana, and Winther 2004), favorise leur formation (Hebert and Molinari 2007, Hatahet and Ruddock 2009, Molinari and Helenius 1999). Dans cet environnement, les groupements sulfhydryles, (SH), très réactifs des cystéines peuvent être oxydés de manière réversible. L'oxydation de deux groupements SH voisins permet la formation d'une liaison covalente stable (S-S). Si le groupement SH se trouve au



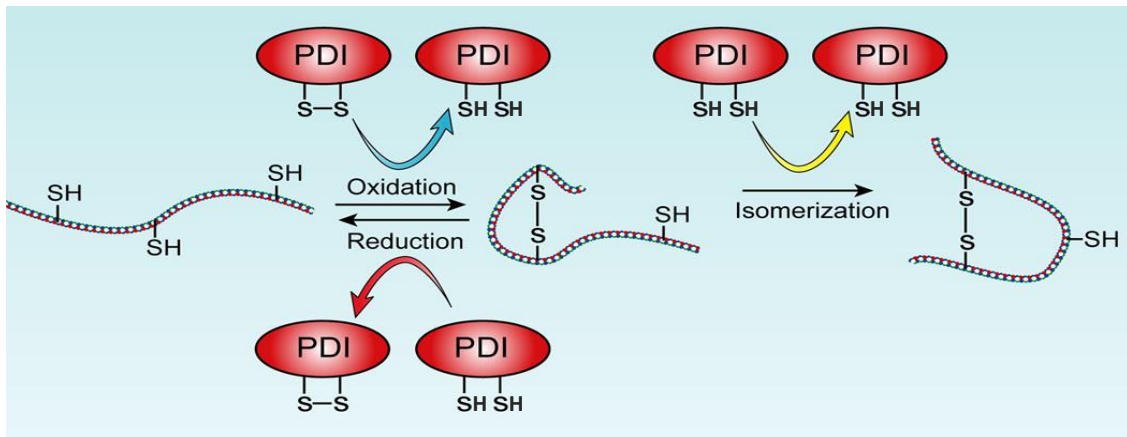
voisinage d'un groupement SeH (sélénium, Se), l'oxydation de ces deux groupements aboutit à la formation d'un pont sélénosulfure (Se-S) (voir le chapitre sur les Sélénoprotéines).



**Figure 6. Illustration de la structure des PDIA chez l'Homme**

Différents domaines des PDIA1, PDIA2, PDIA3, PDIA4 et PDIA7 : a, b, b' et a', motifs thio-redoxin-like ; En bleu, les domaines catalytiques a et a', en vert et violet, les domaines non catalytiques b et b', respectivement. Le x-linker entre b' et a' est représenté en orange et le domaine transmembranaire en rouge foncé. Modifié d'après (Andreu et al. 2012).

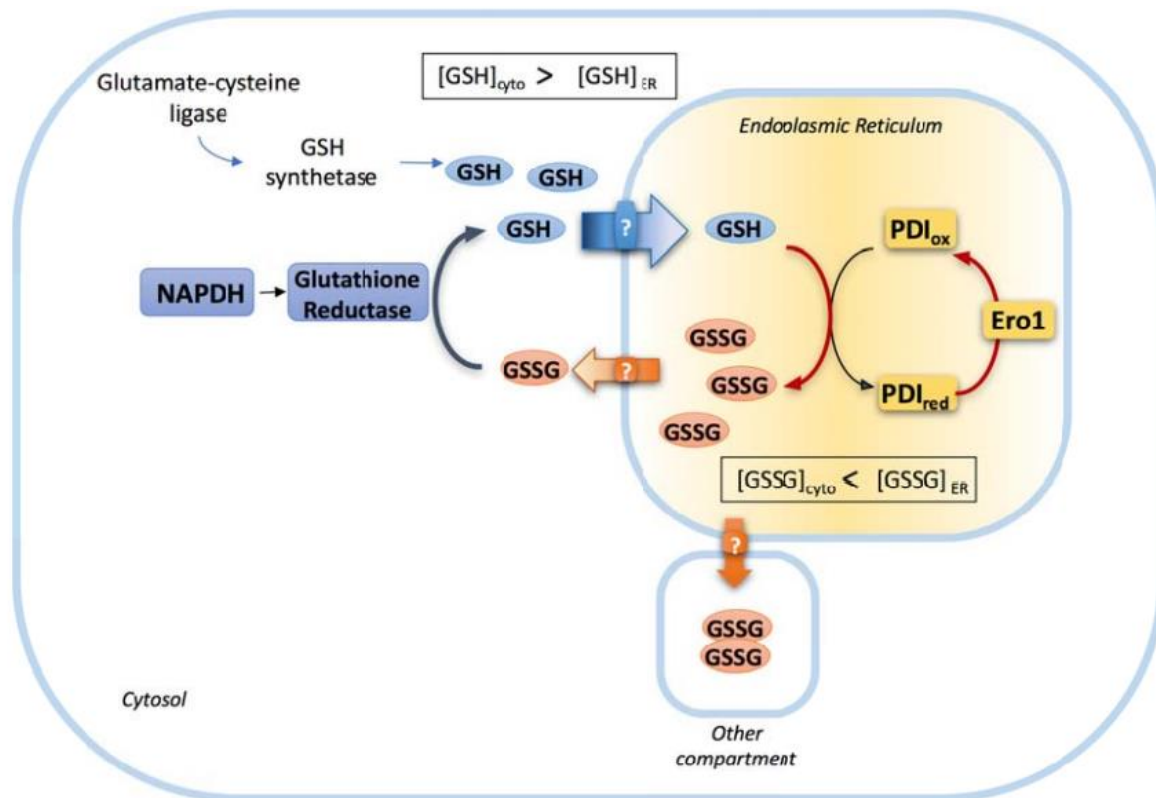
Chez l'Homme, une vingtaine de protéines composent la famille des PDI, incluant des oxydoréductases et des protéines chaperonnes, (Kanemura et al. 2020). Elles possèdent un ou plusieurs motifs *thio-redoxin-like* (un feuillet  $\beta$  central entouré d'hélices  $\alpha$ ) et jusqu'à 4 sites actifs CXXC au niveau de leurs domaines catalytique (Figure 6). Grâce aux Cys présentes dans leurs sites actifs (motif CXXC), les PDI permettent le repliement des protéines par des échanges d' $e^-$  ou par isomérisation et permettent aussi l'élimination des ponts disulfure inadaptés. Ces protéines se comportent soit comme des accepteurs d'électrons ( $e^-$ ) provenant du substrat à oxyder, soit en tant que donneur d' $e^-$  au substrat à réduire lors du repliement oxydatif des protéines (Hebert and Molinari 2007, Tavender and Bulleid 2010, Zito et al. 2010, Nguyen et al. 2011, Margittai et al. 2012) (Figure 7).



**Figure 7. Rôles des PDI dans le repliement des protéines**

Les PDI permettent la formation de ponts disulfure dans les protéines par le biais de leurs sites redox CXXC. Elles permettent aussi l'isomérisation des protéines et l'élimination des ponts disulfure inadaptés par l'intermédiaire de ponts disulfure mixtes (protéine-PDI), modifié d'après (Hebert et Molinari, 2007).

Afin de garder une dynamique d'échange de pont disulfure, les PDI doivent être ré-oxydées. Ceci est réalisé par l'enzyme *ER oxidoreductin-1 $\alpha$  et  $\beta$*  (Ero1), une flavoprotéine qui transfère deux électrons de la PDI<sub>red</sub> au dioxygène *via* le FAD. Cette réaction génère de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tavender *et al.*, 2010), la principale source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le RE. Les PDI peuvent aussi être réduites par le glutathion sous sa forme réduite (GSH). Il est aussi capable de réduire les protéines mal repliées et Ero1 en générant par la même le glutathion sous forme oxydée (GSSG) (Kumar *et al.* 2011) (Figure 8). Le glutathion est souvent considéré comme l'un des principaux composants qui maintienne l'environnement redox du RE chez les procaryotes et eucaryotes, bien que son rôle dans le repliement oxydatif des protéines et la sécrétion reste débattu puisque, sous sa forme réduite, il entre en compétition avec les substrats des PDI (Cuozzo and Kaiser 1999, Delaunay-Moisan, Ponsero, and Toledano 2017). Sa concentration dans le RE atteint 15 mM (Montero *et al.* 2013) et les formes réduites et oxydées sont à l'équilibre (avec un ratio allant de 1:1 à 3:1) contrairement au cytosol où la GSH est majoritaire (de 30:1 à 100:1) (Hwang, Sinskey, and Lodish 1992). De fait, le GSH n'est synthétisé que dans le cytosol (Delaunay-Moisan, Ponsero, and Toledano 2017) et il a été démontré *in vitro* que les récepteurs à la ryanodine (RyR) et le translocon Sec61 transportent passivement le GSH vers le RE (Banhegyi *et al.* 2003, Ponsero *et al.* 2017). La forme oxydée pourrait être renvoyée vers le cytosol par le biais d'un canal qui n'est pas identifié à l'heure actuelle (Delaunay-Moisan, Ponsero, and Toledano 2017).



**Figure 8. Contrôle de l'homéostasie redox du RE par le glutathion**

*Le glutathion est synthétisé et réduit dans le cytosol puis transporté et oxydé dans le RE durant le repliement oxydatif des protéines par les PDI. Ero1 oxyde ces dernières de façon à garder un pool de PDI oxydées (Delaunay-Moisans 2017).*

Des travaux ont montré que les PDI pouvaient participer au repliement des protéines dépourvues de ponts disulfures, comme la GAPDH, indépendamment de leurs fonctions d'oxydoréductase (Cai, Wang, and Tsou 1994). Chez l'homme, cette activité de chaperonne est régulée par l'état redox des cystéines situées au niveau du site catalytique du domaine a' (Wang *et al.* 2012, Quan, Fan, and Wang 1995). Récemment, une localisation extracellulaire des PDI, notamment PDIA1, a été observée. Celles-ci sont impliquées dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines. Le mécanisme d'adressage serait indépendant de la translocation *via* l'appareil de Golgi (Soares Moretti and Martins Laurindo 2017, Rosenberg *et al.* 2019).

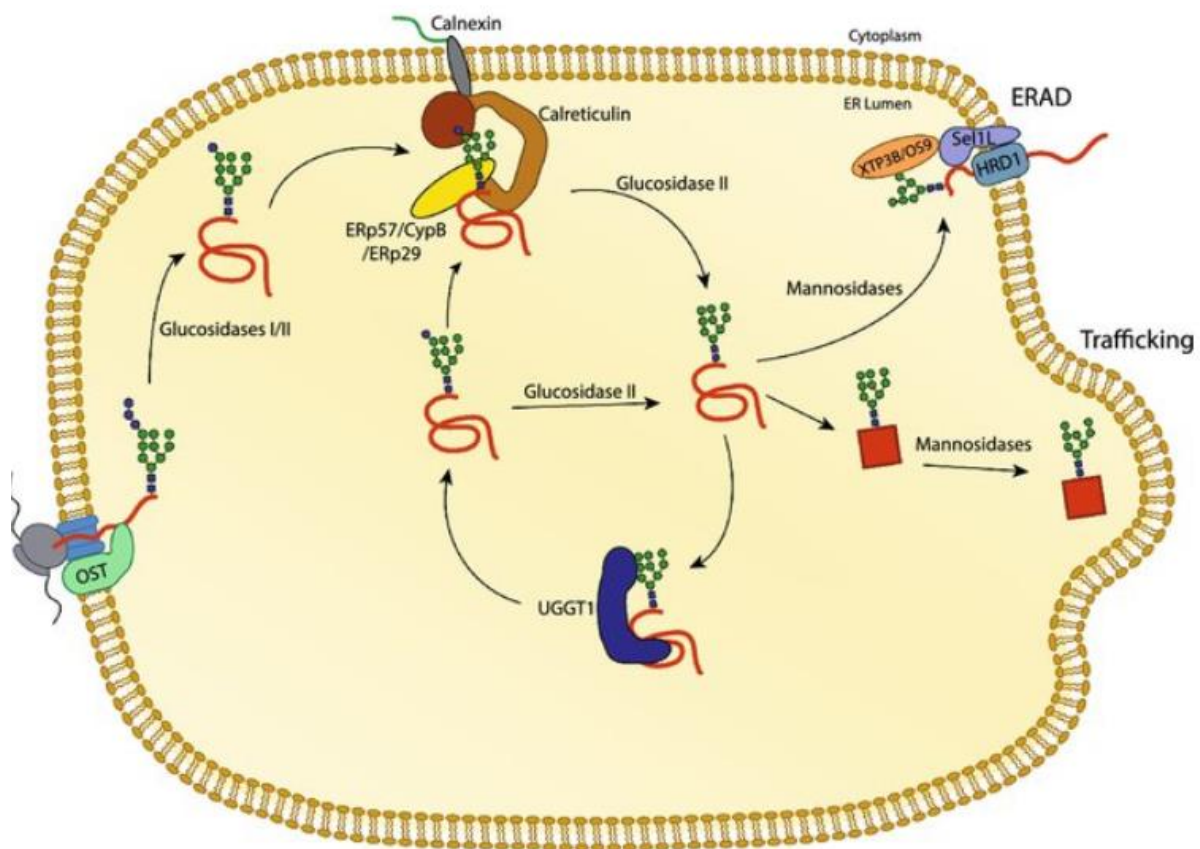
Enfin, il faut préciser que le repliement des protéines ne se limite pas à la formation des ponts disulfure. D'autres acteurs de ce processus, les *isomerases peptidyl-prolyl cis/trans*, participent au repliement de la chaîne peptidique en catalysant l'isomérisation cis-trans des liaisons peptidiques impliquant un résidu proline (Hebert and Molinari 2007).

### C. Le contrôle qualité des glycoprotéines : le cycle calnexine-calréticuline

Le repliement des glycoprotéines dans le cycle calnexine (CNX)/calréticuline (CRT) commence en même temps que la traduction lorsque les protéines nouvellement synthétisées émergent dans le RE et sont *N*-glycosylées. Le CQ débute par l'élimination des deux résidus Glc les plus externes du précurseur oligosaccharidique Glc3Man9GlcNAc2, sous l'action des glucosidases I (GI) et II (GII). La chaîne de glycane devenue monoglucosylée lie alors spécifiquement deux lectines chaperonnes dont la séquence de liaison aux glycanes est hautement conservée : la CNX, membranaire, et la CRT, soluble dans la lumière du RE (Zapun *et al.* 1997) (Figure 9). Elles possèdent toutes deux un domaine riche en proline, ou domaine P, qui lie spécifiquement d'autres protéines chaperonnes favorisant la maturation et le repliement des glycoprotéines. Trois chaperonnes spécifiques sont connues pour se lier à la CNX et à la CRT. La PDI ERp57, la première des trois chaperonnes découverte, qui catalyse l'oxydation et l'isomérisation des liaisons disulfure des glycoprotéines (Patel *et al.* 2020) et deux autres chaperonnes, la cyclophiline B (Kozlov *et al.* 2010, Sakono *et al.* 2014) et ERp29, qui réalisent respectivement l'isomérisation des liaisons peptidiques et la fonction générale de protéine chaperonne.

La GII élimine ensuite le dernier résidu glucose de l'oligosaccharide, ce qui empêche la liaison à la CNX et à la CRT. Si à ce stade la protéine n'a pas encore adopté sa conformation native, l'UDP-Glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT), un senseur du repliement des protéines qui opère en association avec la sélénoprotéine F (SELENOF) (Yim *et al.* 2018), rajoute le dernier résidu de glucose qui vient d'être éliminé pour permettre à la glycoprotéine de se lier à nouveau à la CNX et à la CRT. De cette façon, l'UGGT constitue un *checkpoint* du CQ des protéines en reconnaissant spécifiquement les glycoprotéines Man9GlcNAc2 mal repliées et en les renvoyant à la CNX/CRT pour un nouveau cycle de repliement (Kozlov and Gehring 2020).

Le cycle se poursuit autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que la glycoprotéine atteigne la conformation native qui n'expose alors plus de domaines hydrophobes à sa surface et n'est donc plus reconnue par l'UGGT ou alors est envoyé vers la voie de dégradation. Elle est ensuite déglucosylée et partiellement démannosylée par la GII et l'*ER mannosidase I* (ERManI), respectivement, puis quitte le RE en direction de l'appareil de Golgi. Au cours de ce transit, les protéines sont prises en charge par d'autres lectines se liant aux glycanes riches en mannose comme ERGIC53, ERGL ou VIP36, au niveau de l'*ER to Golgi intermediate compartment* (ERGIC).



**Figure 9. Le cycle calnexine/calréticuline**

Les protéines ciblées vers le RE sont pour la plupart N-glycosylées par le complexe OST à la sortie du translocon. Les deux premiers glucoses sont éliminés par les glucosidases I et II, laissant un glycan monoglucosylé. Dans cet état, le glycan est reconnu par la calnexine et la calréticuline qui, avec d'autres chaperonnes, assurent le repliement oxydatif des glycoprotéines. Leur dissociation de la calnexine ou de la calréticuline est suivie de l'élimination du dernier glucose par la glucosidase II. Le repliement et l'adoption d'une conformation native permettent la sortie de la glycoprotéine du RE. Les glycoprotéines qui n'adoptent pas une conformation native sont reconnues par l'UGGT qui reglucosyle les substrats, et rétablit leur liaison à la calnexine et à la calréticuline ou de les éliminer par la glucosidase II. Les glycoprotéines qui n'atteignent pas la conformation native sont retirées du cycle calnexine/calréticuline par l'intermédiaire de mannosidases et rétrotransloquées vers le cytosol par le biais de la machinerie ERAD (Adams, Oster, and Hebert 2019).

Si après plusieurs cycles de repliement une glycoprotéine n'atteint pas sa conformation native, un processus de dégradation est initié dans le RE. Un tiers des protéines qui transitent par le RE sont dégradées avant qu'elles n'atteignent leur conformation native (Schubert *et al.* 2000). L'élimination de trois ou quatre résidus de mannose liés en 1,2 est un signal d'entrée dans la voie *ER-associated degradation* (ERAD) qui assure la rétrotranslocation de la protéine à travers la membrane du RE, son ubiquitination, puis sa dégradation par le protéasome. L'enzyme impliquée dans l'élimination des molécules de mannose est ERMAnI, une protéine résidente de vésicules spécialisées dans le CQ, les *quality control vesicles* (Benyair *et al.* 2015), où elle est assistée par *l'ER-degradation-enhancing mannosidase-like 1* (EDEM1) dont l'activité mannosidase augmente sur les glycoprotéines dénaturées (Shenkman *et al.* 2018). La rétro-translocation de la chaîne peptidique nécessite un mécanisme de transport. La famille des Derlin (Der) qui sont des composantes essentielles du complexe ERAD, sont de bons candidats pour cette tâche même si leur absence ne bloque pas complètement la rétro-translocation des glycoprotéines (Mehnert, Sommer, and Jarosch 2014, Wahlman *et al.* 2007). D'autres protéines comme l'E3 ligase Hdr1 (Carvalho, Stanley, and Rapoport 2010, Horn *et al.* 2009) et la protéine Cdc48/P79 (Lipson *et al.* 2008) sont aussi évoquées pour ce rôle.

### III. Le stress du RE

La traduction de l'ARN messager (ARNm) et la synthèse et la sécrétion des protéines sont des processus qui répondent immédiatement et de manière réversible aux changements de l'homéostasie intracellulaire et aux stimuli externes. Leurs taux sont très variables selon le type cellulaire. Les cellules sécrétrices spécialisées telles que les cellules  $\beta$  acineuses, les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les plasmocytes ainsi que les cellules cancéreuses qui présentent des taux élevés de prolifération et de synthèse protéique, ont besoin d'un environnement qui facilite un repliement et un CQ efficaces dans le RE. L'altération de l'homéostasie du RE peut provenir de facteurs multiples comme l'augmentation des niveaux de synthèse des protéines et l'accumulation de protéines mal repliées, l'altération de la *N*-glycosylation ou de l'ubiquitination et de la dégradation des protéines, un défaut d'autophagie, un déficit énergétique, un excès ou une carence en nutriments, la dérégulation des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de l'homéostasie redox, un contexte inflammatoire et hypoxique (Zhang *et al.* 1997, Xu, Bailly-Maitre, and Reed 2005). Ceci engendre un état qui peut être physiologique ou physiopathologique connue sous le nom de stress du RE (Wang and Kaufman 2016, Hetz 2012, Benyair, Ron, and Lederkremer 2011,

Ghemrawi and Khair 2020, Hwang and Qi 2018). Cet état induit l'activation d'une réponse visant à rétablir l'homéostasie du RE désigné sous le nom *unfolded protein response* (UPR) (Walter and Ron 2011). Si cette réponse ne permet pas de rétablir l'équilibre, elle engendre un processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose (Urrea *et al.* 2013).

### A. La réponse UPR

L'UPR est une réponse cellulaire visant à augmenter la capacité de repliement des protéines, stimuler la dégradation des protéines mal repliées *via* ERAD, diminuer la biosynthèse des protéines, augmenter la réponse antioxydante et la biosynthèse des lipides qui composent la membrane du RE afin de rétablir l'homéostasie (Schroder and Kaufman 2005, Read and Schroder 2021). Des travaux ont montré que la quantité de BiP augmente lors d'un stress prolongé du RE (Bakunts *et al.* 2017). Le rôle de BiP est actuellement débattu. En absence de stress BiP pourrait être présente sous la forme inactive d'oligomères dans la lumière du RE capable de lier trois protéines membranaires senseurs de l'UPR : *inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease* (IRE1), *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3* (eIF2AK3/PERK) et *activating transcription factor 6* (ATF6) (Ron and Walter 2007). En condition de stress, les protéines substrats de BiP exposant leurs domaines hydrophobes entreraient en compétition avec ces senseurs pour la liaison à BiP, sa dissociation aux senseurs entraînant leur activation (Read and Schroder 2021). Cependant, une seconde hypothèse développée par Ron et collaborateurs propose que les protéines mal repliées agiraient directement avec les senseurs. Dans ce scénario, BiP constituerait la première ligne de réponse aux fluctuations des niveaux de protéines mal repliées, précédant ainsi l'activation directe des senseurs par ces protéines (Preissler and Ron 2019).

Qu'elle soit directe ou indirecte, l'activation, suite à un stress du RE, de chacun des trois senseurs de l'UPR, IRE1 $\alpha$ , eIF2AK3/PERK et ATF6, entraîne trois réponses indépendantes. La plus ancienne sur le plan évolutif est consécutive à l'activation d'IRE1 $\alpha$  suite à sa dimérisation et son autophosphorylation. IRE1 $\alpha$  porte les deux activités serine/thréonine kinase et endoribonucléase. Cette dernière entraîne l'épissage de l'ARNm de XBP1, un facteur de transcription régulant les gènes impliqués dans le repliement des protéines et ERAD. La fonction endoribonucléase est aussi impliquée dans *IRE1 dependant decay* (RIDD) qui réduit le *pool* d'ARNm en cours de traduction. IRE1 $\alpha$  peut aussi, en cas de stress insurmontable, activer l'apoptose par le biais de la voie JNK.

La dimérisation et l'auto phosphorylation de PERK entraîne quant à elle une réduction générale de la production de protéines suite à la phosphorylation d'EiF2 $\alpha$ . La traduction de certains ARNm est au contraire stimulée, notamment l'ARNm d'ATF4, un facteur de transcription initialement caractérisé comme le *cAMP-response element binding protein 2* (CREB2). ATF4 régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante, la synthèse et le transport d'aa et l'autophagie. Les protéines mal repliées forment des agrégats toxiques qui doivent être dégradés (Bucciantini *et al.* 2002, Kopito 2000, Stefani and Dobson 2003), lorsque la quantité d'agrégats dépasse la capacité du protéasome, l'activation de l'autophagie est nécessaire (Ogata *et al.* 2006, Pena-Blanco and Garcia-Saez 2018, Lamark, Svenning, and Johansen 2017). L'autophagie est un processus qui consiste en la formation d'une vésicule intracellulaire appelée phagophore qui emprisonne les composés à dégrader (molécules ou organites (Gump and Thorburn 2011)) suite à sa fusion à un lysosome (Houck *et al.* 2014).

Enfin l'activation d'ATF6 entraîne sa translocation dans l'appareil de Golgi où il est clivé par deux protéases (*site-1 protease et site-2 protease*) (Adachi *et al.* 2008). Le fragment cytosolique ainsi généré est un facteur de transcription qui entre dans le noyau pour enclencher la transcription de gènes cibles similaires à ceux d'XBP1. Ainsi, la voie UPR est une réponse principalement transcriptionnelle.

## B. Stress du RE et stress oxydant, un cercle vicieux

Lors d'une demande accrue de synthèse protéique, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente, ce qui stimule la réponse UPR, augmente l'activité des PDI et celle d'ERO1 (Santos *et al.* 2009) et engendre une augmentation encore plus forte du taux de ROS, majoritairement d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Appenzeller-Herzog 2011). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fait partie des *reactive oxygen species* (ROS) au même titre que l'anion superoxide O<sub>2</sub><sup>-</sup>, les radicaux alkoxy RO<sup>•</sup>, les radicaux peroxy ROO<sup>•</sup>, et les radicaux hydroxyl <sup>•</sup>OH. Ses niveaux doivent être maintenus à un seuil acceptable car son accumulation peut inhiber la formation correcte des liaisons disulfure, conduisant à un mauvais repliement des protéines et donc à un stress du RE. Il existe dans le RE des enzymes capables de dégrader l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxyredoxine 4 (Prx4) et les glutathion peroxydase 7 et 8 (GPx7/8) qui réduisent l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène. Elles oxydent aussi les PDI, favorisant ainsi le repliement oxydatif.

Si le stress n'est pas compensé, la réponse UPR devient *maladaptative* et enclenche la mort cellulaire par apoptose suite à l'activation par le facteur de transcription Chop de Gadd34,



une protéine recrutant des phosphatases pour déphosphoryler le facteur d'initiation de la traduction Eif2a (Cao and Kaufman 2014, Wang and Kaufman 2016). L'apoptose se caractérise par une rupture de la membrane mitochondriale. La perméabilité de celle-ci dépend principalement des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille *B-cell lymphoma 2*, Bak/Bax et Bcl-2 respectivement (Conus *et al.* 2000). Lors d'un signal apoptotique, les effecteurs Bak/Bax s'oligomérisent dans la membrane externe pour former des pores (Pena-Blanco and Garcia-Saez 2018), libérant dans le cytosol le cytochrome c et l'*apoptosis inducing factor* (AIF) (Hetz and Papa 2018, Kim *et al.* 2006). Le cytochrome c recrute la protéine adaptatrice, Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) qui active la caspase 9. Cette dernière est la caspase initiateur puisqu'elle active à son tour d'autres caspases effectrices telles que les caspases 3, caspase 6, et caspase 7, ce qui mène à la fragmentation de l'ADN et à la destruction du cytosquelette (Cullen and Martin 2009, Kitazumi and Tsukahara 2011, Adams 2003, Viswanath *et al.* 2001). L'AIF provoque lui aussi la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN mais de façon caspase-indépendante (Artus *et al.* 2010).

L'excès de ROS entraîne aussi une libération de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol à partir du complexe Bak/Bax au niveau du RE, conduisant au clivage de la procaspase 12 située dans la membrane du RE par la calpaïne cytosolique et à l'activation de la voie ASK1/JNK *via* IRE1 $\alpha$  (Pena-Blanco and Garcia-Saez 2018). De même, l'excès de  $Ca^{2+}$  et de radicaux libres peut activer ERO1 qui conduit à l'activation de CaMKII/JNK (Li *et al.* 2009). Le  $Ca^{2+}$  libéré en excès pénètre dans la mitochondrie, où il induit une dépolarisation de la membrane externe et l'ouverture de canaux anioniques entraînent la perméabilisation et la lyse des mitochondries. Ce processus inhibe également le complexe III de la chaîne respiratoire et augmente la production des ROS. L'augmentation de la concentration du  $Ca^{2+}$  intracellulaire altère également l'élimination des protéines oxydées par le protéasome, ce qui entraîne une accumulation des protéines anormales et alimente le stress oxydatif (Cecarini, Ding, and Keller 2007, Ding, Dimayuga, and Keller 2006, Halliwell 2006). Ainsi, l'accumulation des protéines mal repliées et la production des ROS génère un cercle vicieux menant à la mort cellulaire (Cao and Kaufman 2014).

Les ROS sont souvent considérées comme des produits toxiques issus du métabolisme cellulaire. Cependant, ils peuvent aussi être des régulateurs de processus physiologiques (Santolini *et al.* 2019) et servir de signal de prolifération (Bindoli, Fukuto, and Forman 2008, Goffart *et al.* 2021). De même, l' $H_2O_2$  est connu pour potentialiser les effets de l'insuline (Lennicke and Cocheme 2021). On parle donc de stress oxydant lorsque les défenses antioxydantes (enzymes, vitamines, protéines, oligoéléments) sont dépassées par l'excès de

ROS (Brigelius-Flohe 2009). Le défi de la recherche actuelle est de déterminer le seuil entre des concentrations physiologiques et pathologiques de ROS (Santolini *et al.* 2019).

## IV. Homéostasie calcique

### A. Le RE : principal réservoir de $\text{Ca}^{2+}$ dans la cellule

Une fonction majeure du RE est de coordonner le transport et le stockage des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le RE représente la plus grande réserve cellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , sa concentration pouvant atteindre jusqu'à 1 mM, comparativement au cytosol dont la moyenne est de 100 nM (Raffaello *et al.* 2016). Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue une fonction clé en tant que second messenger cytosolique qui contrôle la contraction musculaire, la sécrétion de protéines, le métabolisme mitochondrial et la mort cellulaire. Plusieurs mécanismes génèrent et maintiennent le gradient de concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytosol et le RE. À savoir, la fraction de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le RE varie entre 100-800  $\mu\text{M}$  car la majorité des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont liés à la surface de protéines résidentes du RE (Carreras-Sureda, Pihan, and Hetz 2018). Certaines sont des chaperonnes dont la fonction est de permettre aux protéines en cours de synthèse de suivre un repliement tridimensionnel adéquat. Les chaperonnes du RE telles que GRP78/BiP, GRP94 (endoplasmine), la CNX, CRT, GRP170/ORP150 ou ERp57 contiennent de multiples sites de liaison pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . La liaison à faible affinité du  $\text{Ca}^{2+}$  de ces chaperonnes est nécessaire pour leur activité mais permet aussi de garder un fort niveau d'ions dans la lumière du RE. Le  $\text{Ca}^{2+}$  régule aussi l'activité de certaines mannosidases (Brostrom and Brostrom 2003).

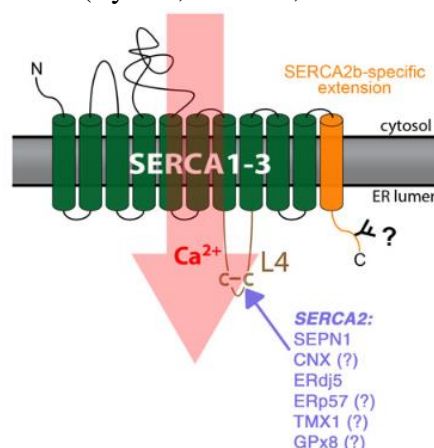
En plus du pouvoir tampon des chaperonnes, quatre types de système de transport différents résident dans la membrane du RE qui contrôlent l'homéostasie calcique, chez les eucaryotes supérieurs : les pompes SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases*), les récepteurs IP3 (IP3Rs), les récepteurs de la ryanodine (RYRs) et les protéines STIM, qui peuvent engager les canaux ORAI dans la membrane plasmique. Aucune de ces protéines n'a d'homologue conservé chez la levure, le RE jouant un rôle moins critique dans la régulation de l'homéostasie calcique (Fenech, Ben-Dor, and Schuldiner 2020).

### B. Les pompes SERCA

Les pompes SERCA importent le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE contre son gradient électrochimique par un mécanisme couplé à l'hydrolyse de l'ATP. Elles contribuent ainsi à maintenir une plus forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE par rapport au cytosol. Chez les vertébrés il existe 3 sous

types de SERCA (SERCA1-3) codés par trois gènes paralogues *ATPA1-3*, chacun d'entre eux générant d'autres isoformes par épissage alternatif (Guerrero-Hernandez, Dagnino-Acosta, and Verkhratsky 2010, Carreras-Sureda, Pihan, and Hetz 2018). Au total, il existe 10 isoformes de SERCA qui présentent des différences fonctionnelles et des profils d'expression distincts dans les différents tissus et au cours du développement (Samtleben *et al.* 2013, Altshuler *et al.* 2012). À titre d'exemple, la forme SERCA1a est majoritaire dans les muscles à contraction rapide alors que la forme SERCA2a est principalement exprimée dans le muscle cardiaque et les muscles à contraction lente. La forme 3 présente une distribution plus large, exprimée dans les lymphocytes, les cellules épithéliales et endothéliales, les mastocytes et les cellules de Purkinje.

La protéine SERCA comporte dix domaines transmembranaires. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP entraîne le passage de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le RE grâce à ses sites de liaison situés au niveau de ses hélices transmembranaires. Elle est régulée (négativement) par des protéines résidentes du RE, notamment des protéines chaperonnes, des thiorédoxine réductases et des glutathion peroxydases (John, Lechleiter, and Camacho 1998, Ushioda *et al.* 2016). En effet, la quatrième boucle luminale (L4) possède une paire de cystéines conservées au cours de l'évolution qui permettent le recrutement de protéines comme la SELENON, ERp57 ou CNX (Figure 10). Il est notamment suggéré que la SELENON forme une interaction thiol/séléniol-disulfure avec SERCA2 pour augmenter son activité de pompe calcique (Marino *et al.* 2015), de la même façon que SERCA1a requiert un pont disulfure dans le boucle L3V pour être totalement actif (Daiho *et al.* 2001). La lactone thapsigargine, une protéine extraite de la *Thapsia garganica* (une plante du bassin méditerranéen) inhibe les différentes pompes SERCA avec la même efficacité (Lytton, Westlin, and Hanley 1991).



**Figure 10. Représentation graphique de la topologie des protéines transmembranaires de la famille SERCA(1-3)**

Les dix domaines transmembranaires sont représentés en vert, à l'exception de l'extension C-terminale spécifique de SERCA2b en orange. Bien que cette extension C-terminale comprenne

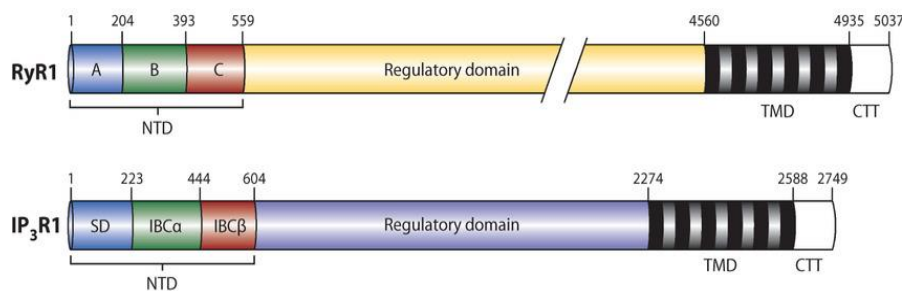
également un site consensus de N-glycosylation, cette modification n'a jamais été démontrée pour SERCA2b (indiqué par un point d'interrogation). La boucle L4 avec son pont disulfure conservé est représenté en marron clair. Les modulateurs redox agissant à ce niveau sont énumérés. GPx8 pourrait ne pas influencer directement le pont disulfure, car cette enzyme n'est pas une oxydoréductase mais une peroxydase (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016).

### C. Les canaux récepteurs de la ryanodine et à l'IP3

Dans le sens inverse, il existe deux types de canaux ioniques permettant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE vers le cytosol, les récepteurs de la ryanodine (RYR), principalement exprimés dans les tissus excitables comme les muscles et les neurones, et les récepteurs de l'inositol-1,4,5-trisphosphate IP3 (IP3R), exprimés dans tous les tissus de mammifères. Ces deux types de canaux sont de larges assemblages homo- ou hétéro-tétramériques présentant de fortes homologies de structure (Figure 11).

Outre la ryanodine, un alcaloïde issu de la plante *Ryania speciosa*, les effecteurs de RYR1 comprennent des ions et de petites molécules ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , adénine-nucléotides) et des polypeptides (calmoduline, FKBP12) (Lacampagne, Fauconnier, and Richard 2008). Toutefois une exposition prolongée à une forte concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe l'ouverture du canal RyR2 (Dulhunty *et al.* 2000).

L'IP3R existe sous trois formes (IP3R1-3) codées par des gènes différents et exprimées différemment selon les tissus. L'IP3R1 est le plus répandu et il est fortement exprimé dans les neurones (Fujino *et al.* 1995) alors que l'expression d'IP3R2 est faible dans l'ensemble des tissus, l'expression la plus importante se situant dans des cellules sécrétrices au niveau du canal urinaire, des glandes sous mandibulaires ainsi que dans les veines et artères des reins. L'expression des messagers IP3R3 est aussi plus importante dans les cellules sécrétrices comme l'épithélium du petit intestin et dans les cellules acineuses salivaires et pancréatiques (Fujino *et al.* 1995). Les RyR existent aussi sous trois formes issues de gènes différents (RyR1-3). La première est exprimée dans le muscle squelettique, la seconde dans le muscle cardiaque et les cellules  $\beta$ -pancréatiques. La troisième a été découverte dans le cerveau et elle est exprimée dans de nombreux tissus, mais elle reste peu connue (Santulli *et al.* 2018).



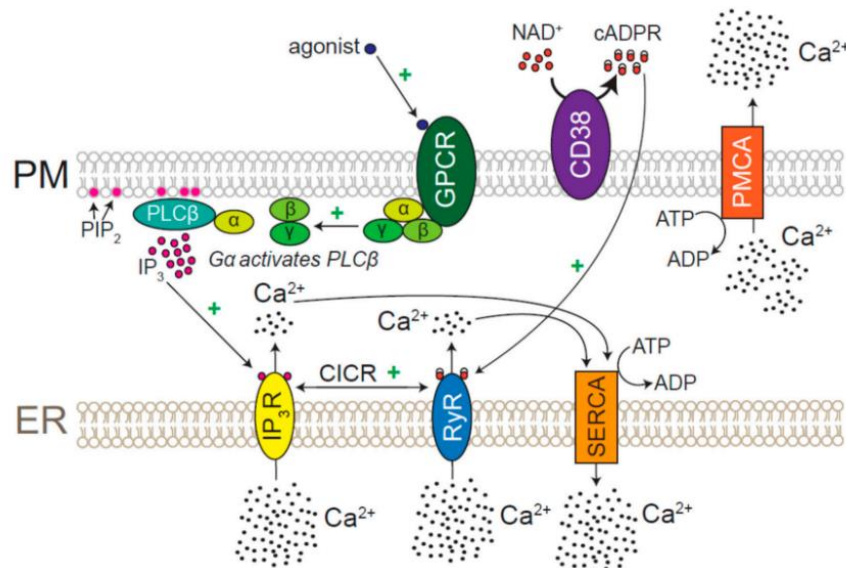
**Figure 11. Comparaison des récepteurs RyR et IP3R**

La numérotation utilisée est celle du RyR1 de lapin et du IP3R1 de rat. NTD, domaine N-terminal ; SD, domaine suppresseur ; IBC, site de liaison IP3 ; TMD, domaine transmembranaire ; CTT, site C-terminal de liaison à la calmoduline (Amador *et al.* 2013).

Les IP3R quant à eux s'ouvrent suite à l'activation à la membrane plasmique des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs tyrosine kinases, et à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en l'IP3 et diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C. La liaison conjointe de l'IP3 et du  $Ca^{2+}$  active l'IP3R et la sortie de  $Ca^{2+}$  du RE vers le cytosol. Comme pour le RYR, le  $Ca^{2+}$  à lui seul peut activer l'IP3R, un processus connu sous le nom de libération de  $Ca^{2+}$  induite par le  $Ca^{2+}$  (Figure 12) (Berridge 2002). Ces vagues calciques ont notamment été observées dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (régions CA1 et CA3), du cortex (couches 2/3 (L2/3) et L5) et des neurones principaux de l'amygdale des rongeurs (Ross 2012) afin de maintenir une signalisation sur de longues distances. Elles ont également été observés dans les neurones pyramidaux du cortex de la tortue (Larkum *et al.* 2008), Étant donné que les tortues ont divergé des mammifères il y a plus de 300 millions d'années et occupent une niche écologique différente, cette découverte suggère que les vagues calciques ont évolué tôt et sont une propriété robuste et conservée des neurones pyramidaux.

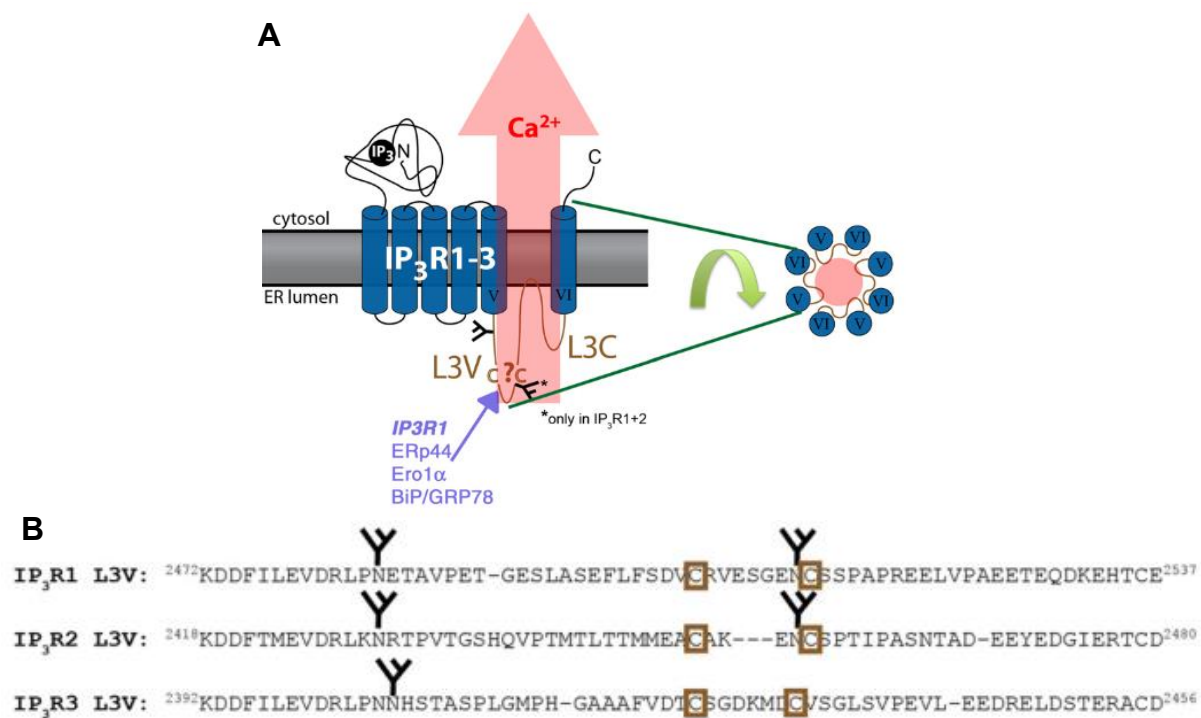
L'état redox du RE tient une place centrale dans la régulation de l'ouverture de ces canaux (Joseph *et al.* 2018, Nikolaienko, Bovo, and Zima 2018). Chaque sous-unité RYR compte entre 38 et 48 thiols à l'état libre, modifiables par oxydation, S-nitrosylation ou alkylation. Son état d'activation répond de manière biphasique à l'administration de doses croissantes d'oxydants, le maximum d'activation se situant pour un état impliquant 23 cystéines réduites (Sun *et al.* 2001). L'IP3R possède aussi un pont disulfure régulateur, au niveau de la boucle L3 qui émerge dans la lumière de RE entre les domaines membranaires V et VI, dont l'état redox conditionne la liaison avec un certain nombre d'oxydoréductases et de protéines chaperonnes comme ERp44 (Figure 13) (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016). L'IP3R possède plusieurs sites de phosphorylation (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016) ainsi que

des sites d'arrimage pour les phosphatases et protéines kinases. La phosphorylation permet d'augmenter la sensibilité pour l'IP<sub>3</sub> sans changer celle pour le Ca<sup>2+</sup> (Vanderheyden *et al.* 2009). Il est aussi glycosylé au niveau de la boucle intracellulaire L3V sur un séquen présentant une cystéine.



**Figure 12. Mécanismes d'activation des canaux calciques du RE**

L'activation des IP<sub>3</sub>R commence au niveau de la membrane plasmique (PM), où l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) entraîne la dissociation de la protéine hétérotrimérique Gq. Gq active la PLC, qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> sert de second messenger et active l'IP<sub>3</sub>R, provoquant la libération de Ca<sup>2+</sup> dans le RE. Alternativement, RyR est activé par la cADPR, qui est synthétisé dans l'espace extracellulaire à partir du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) par l'ectoenzyme CD38. IP<sub>3</sub>R et RyR sont eux-mêmes activés par le Ca<sup>2+</sup> et peuvent se stimuler l'un l'autre (CICR). L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique qui en résulte est normalisée par l'ATPase de la membrane plasmique (PMCA), ou par SERCA, qui rejettent le Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire ou le RE, respectivement (Karagas and Venkatachalam 2019).



**Figure 13. Représentation graphique de la topologie des protéines transmembranaires de la famille IP3R(1–3)**

A. Les six domaines TM sont représentés en bleu, parmi lesquels les deux derniers domaines sont étiquetés V et VI. La boucle luminaire L3 est constituée de deux parties hydrophiles nommées L3V et L3C, séparées par une petite séquence hydrophobe qui plonge dans la membrane. L3V, avec sa paire de cystéines conservées, et L3C sont représentées en brun clair. Les statuts redox des paires de cystéines présentes dans IP3R1–3 n'ont pas encore été résolus (comme indiqué par un point d'interrogation). Les positions des oligosaccharides N-liés dans L3V sont indiquées en noir. Le pore du canal calcique fermé (rouge clair) est composé par les domaines TM V et VI et par les boucles L3 des sous-unités constituant le tétramère. Les interacteurs redox démontrés avec IP3R1 sont répertoriés. On peut noter que la partie cytosolique N-terminale est beaucoup plus grande que celle représentée sur la figure. B. Alignement des séquences d'acides aminés de la boucle L3V dans les IP3R humains. Les N-glycanes sont indiqués en noir. Les paires de cystéines conservées sont encadrées en brun clair. La position des acides aminés terminaux par rapport aux protéines entières est indiquée en exposant (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016).

Dans les neurones, la morphologie entraîne des contraintes sur l'architecture du RE mais la libération de Ca<sup>2+</sup> par le RE influence aussi la structure de ces cellules (Ozturk, O'Kane, and

Perez-Moreno 2020). En effet, l'homéostasie calcique du RE joue un rôle central dans la physiologie des neurones en régulant la morphologie et la croissance axonale, l'exocytose, la plasticité, l'expression de gènes et la régulation de l'activité mitochondriale (Karagas and Venkatachalam 2019). Ainsi, chez la drosophile l'inhibition des canaux IP3R ou RyR dans les motoneurones, se traduit par une diminution du nombre de boutons synaptiques et une augmentation de leur taille (Wong *et al.* 2014), révélant un lien fonctionnel entre le flux calcique et le développement des synapses. A l'inverse, une surexpression des canaux RyR entraîne un relargage des vésicules synaptiques (Galante and Marty 2003).

#### D. Flux calciques au niveau des *mitochondria-associated ER membrane*

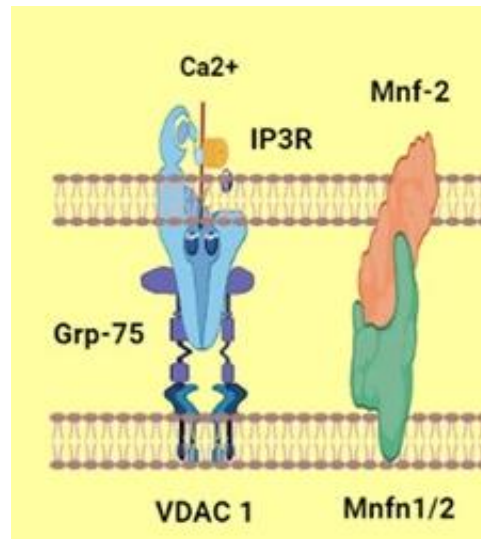
En condition normale, le  $\text{Ca}^{2+}$  est majoritairement présent dans la lumière du RE. Lors d'une stimulation, de petites quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  sont périodiquement libérées dans le cytoplasme puis reséquestrées, avec une partie recapturée par la mitochondrie (Berridge 2002, Raffaello *et al.* 2016). Dans le contexte d'un stress, un dialogue croisé s'instaure entre le RE et la mitochondrie afin d'augmenter la production d'ATP (Bravo *et al.* 2011). On pense que celle-ci est médiée par la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RE et son entrée dans la mitochondrie par le biais de structures spécialisées, les MAM.

Les MAM sont des zones de contact entre le RE et la mitochondrie riche en *lipid raft* résistant aux détergents dont la distance entre les membranes des deux organites varie de 10 à 30 nm (Giacomello and Pellegrini 2016). Environ 12 % de la membrane externe mitochondriale est associée au RE (Csordas *et al.* 2006). Elles ont suscité un grand intérêt car elles fonctionnent comme un nœud de signalisation, contrôlant différents aspects de la biologie cellulaire tels que la biosynthèse des lipides, le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et les mitochondries, l'apoptose et la macroautophagie (Phillips and Voeltz 2016). Leur dysfonctionnement est associé à différentes pathologies, en particulier dans le système nerveux central, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique ou encore la maladie d'Alzheimer (Pham *et al.* 2012, Parakh and Atkin 2021, Area-Gomez *et al.* 2018).

Des protéines caractéristiques de ces structures sont les mitofusines 1 et 2, présentes au niveau des mitochondries et du RE et impliquées dans leur rapprochement (Figure 14) (Bartok *et al.* 2019). L'IP3R est aussi enrichi dans ces structures, en particulier IP3R2 et IP3R3, où il est en contact avec les *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) par l'intermédiaire de la chaperonne GRP75 qui recrute aussi d'autres protéines telles que Park-7 et FUNDC (Szabadkai *et al.* 2006). Cette interaction facilite le passage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers la mitochondrie. Outre



leur rôle dans le rapprochement des membranes du RE et de la mitochondrie, les mitofusines facilitent le rapprochement de l'IP3R avec les VDAC de même que la protéine TOM70 (Filadi *et al.* 2018). L'interaction de VDAC avec le *mitochondrial calcium uniporter* (MCU) assure le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  au travers de la membrane interne.



**Figure 14. Illustration des principales protéines aux contacts ER-mitochondrie**

*Association de l'IP3R avec VDAC1 par l'intermédiaire de Grp-75. Les mitofusines permettent le rapprochement du RE et de la mitochondrie (Degechisa, Dabi, and Gizaw 2022).*

# La famille des sélénoprotéines

## I. Biosynthèse atypique des sélénoprotéine

### A. Le Sélénium

En 1817, le chimiste Jöns Jacob Berzelius découvrit un nouvel élément qu'il décida de nommer « sélénium » (Se), dérivé du nom donné à la déesse grecque de la Lune "Séléné" (Duntas et Benvenga, 2015), par analogie avec le "tellurium" dont le nom vient de la déesse de la terre romaine "Tellus". L'importance de cet élément a été montrée 140 ans après sa découverte (Schwarz et Foltz, 1957), à la suite d'études montrant qu'il s'agit d'un oligo-élément à action antioxydante indispensable pour les êtres vivants (pour revue, Papp *et al.*, 2007).

Le sélénium est apporté principalement par l'alimentation, notamment par les poissons, les viandes, les produits laitiers et certains fruits et légumes (Kieliszek 2019). Il joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, immunitaire, endocrine et métabolique (Rayman, 2009). Il est important dans la maturation de l'hormone thyroïdienne et le développement de la fonction musculaire (Hatfield *et al.*, 2014; Lescure *et al.*, 2009). Une baisse de Se dans l'organisme peut être provoquée par divers facteurs, comme le vieillissement, la consommation d'alcool, le tabagisme et l'utilisation de contraceptifs oraux (Lloyd *et al.*, 1983). La déficience en Se (moins de 12 µg/jour) est associée à de nombreux problèmes de santé comme la maladie de Keshan (hypertrophie et dysfonctionnement du muscle cardiaque), la maladie de Kashin-Beck (maladie des "gros os", une maladie invalidante de l'os et du cartilage), des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux (Duntas et Benvenga, 2015). En revanche, l'excès de sélénium (plus de 400 µg/jour) est toxique et conduit à l'apparition d'une variété de symptômes comme la chute des phanères (cheveux, ongles...), un érythème cutané, une grande fatigabilité, des états dépressifs, une irritabilité et des dommages neurologiques dans les cas d'intoxication les plus graves (Duntas et Benvenga, 2015; Hatfield *et al.*, 2014). La plage optimale de consommation serait comprise entre 80 et 120 µg/L de sérum (Duntas et Benvenga, 2015).

Le Se est principalement incorporé dans des protéines, nommées sélénoprotéines, sous la forme du résidu sélénocystéine (Sec/U). Ce 21<sup>ème</sup> aa protéinogène est un homologue structural de la cystéine (Cys) dans lequel l'atome de soufre est substitué par un atome de Se. La Sec est plus réactive que la Cys envers les ROS, grâce à son atome de Se lui conférant à la fois un pouvoir nucléophile plus élevé et un pKa (pH de demi-dissociation) plus faible (Reich and Hondal 2016, Arner 2010). Le Se serait plus résistant à la suroxydation en sélénone que le S en

sulfone et il aurait une capacité à être réduit en sélényde plus rapidement que le S (Figure 15) (Reich and Hondal 2016). Ces propriétés physico-chimiques procurent un rôle antioxydant plus ou moins établi à toutes les sélénoprotéines. Certaines d'entre elles, les thiorédoxine réductases notamment, sont essentielles pour la régulation de l'homéostasie redox (Barrett, Short, and Williams 2017). Il est à noter que le Se peut aussi être introduit dans les protéines sous la forme de sélénométhionine, notamment chez certaines plantes et bactéries (Schrauzer 2000).



**Figure 15. Structures et nombres d'oxydation des composés du soufre et du sélénium qui résultent de réactions d'oxydation à deux électrons**

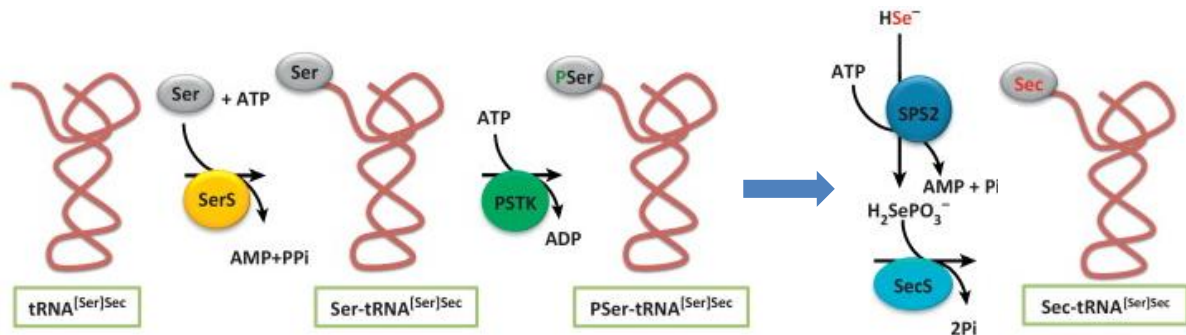
Les flèches montrent les voies de conversion entre les états d'oxydation. Le cercle ouvert représente le carbone, et le nombre à l'intérieur du cercle représente le nombre d'oxydation du soufre ou du sélénium auquel il est attaché. Le X magenta indique une réaction lente. Le symbole [O] représente un oxydant à deux électrons (Reich and Hondal 2016).

## B. Biosynthèse et insertion de la séléno-cystéine

Chez les archéobactéries et les eucaryotes, la Sec n'existe pas à l'état libre dans les cellules. Elle est synthétisée directement sur son ARNt spécifique (ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>) à partir de la sérine. Cet ARNt est codé par le gène *Trsp*. L'inactivation de ce gène chez la souris est liée à une absence de production des sélénoprotéines, à un développement anormal du squelette et du cartilage et à une mort précoce des embryons (Downey *et al.* 2009). Chez les eucaryotes, la biosynthèse de la Sec commence tout d'abord par l'association d'une sérine à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, catalysée par la séryl-ARNt synthétase (SerS), puis par sa modification en phosphosérine grâce à la phosphoséryl-ARNt kinase (PSTK). En parallèle, le Se, transformé en sélénophosphate à l'aide de la sélénophosphate synthase 2 (SPS2), est transféré au PSer-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> grâce à la Sec synthétase (SecS, codée par le gène *SelA*), aboutissant à la formation du Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Figure 16) (Xu *et al.* 2007, Yuan *et al.* 2006).

Contrairement aux autres aa qui disposent d'un ou plusieurs codons, la Sec ne possède aucun codon dédié. Le mécanisme d'incorporation de la Sec demeura énigmatique jusqu'au jour où fut découverte la présence d'un codon stop UGA à la position correspondant au résidu Sec (Chambers *et al.* 1986, Zinoni, Heider, and Bock 1990). Ce phénomène de recodage du

codon stop n'est pas unique : le 22<sup>ème</sup> aa appelé pyrrolysine est incorporé chez certaines archéobactéries méthanogènes au niveau d'un codon UAG normalement reconnu comme codon stop (Osawa *et al.* 1992).

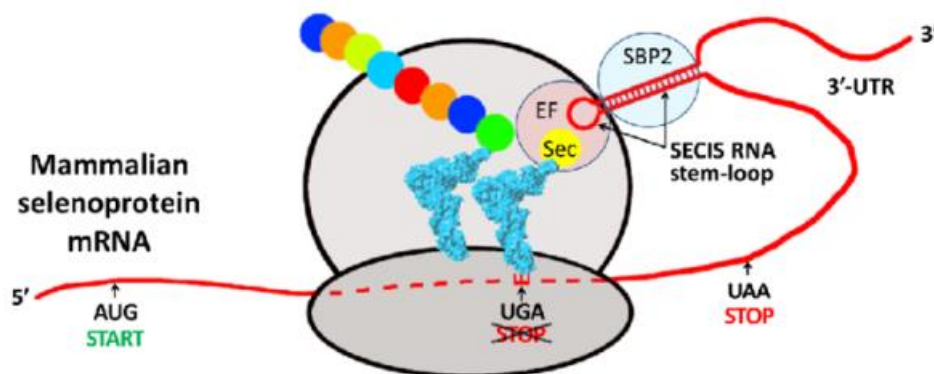


**Figure 16. Biosynthèse de la Sec chez les eucaryotes**

La séryl-ARNt synthétase (*SerS*), en présence d'ATP, catalyse la liaison de la sérine avec l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> pour donner la Ser-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Le résidu sérine est ensuite phosphorylé par une *o*-phosphoséryl-ARNt kinase (*PSTK*) pour donner la P<sup>S</sup>er-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. La Sec synthase (*SecS*) prend en charge le résidu sérine phosphorylé (P<sup>S</sup>er-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>) et le convertit, en présence de sélénophosphate produit par la sélénophosphate synthétase (*SPS2*), en Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (modifié d'après Hatfield *et al.*, 2014).

La translecture du codon stop UAG et l'insertion concomitante du résidu Sec nécessite une machinerie spécialisée. Ainsi, Les ARNm des sélénoprotéines comprennent dans leur région 3' non traduite une séquence de 60 nucléotides qui adopte une structure tige-boucle désignée sous le nom de *selenocysteine insertion sequence* (SECIS), située entre 300 et plusieurs milliers de nucléotides du codon stop UGA qu'elle va permettre de recoder en codon Sec (Berry *et al.* 1993). Pour cela, la structure SECIS lie un complexe protéique de 500 kDa comprenant SBP2 (*SECIS binding protein 2*). Ce complexe agit comme une plateforme de recrutement pour d'autres facteurs comme eEFSec (facteur d'élongation eucaryote sélénocystéine-ARNt spécifique) et la protéine ribosomique L30, qui va permettre d'amener l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> en face d'un codon UGA spécifique au cours de l'étape d'élongation de la traduction (Figure 17) (Serrao *et al.* 2018, Copeland *et al.* 2000, Lescure *et al.* 2002). D'autres composants du complexe ont été identifiés qui régulent négativement (eIF4A3) ou positivement (Nucléoline) l'expression des sélénoprotéines (Miniard *et al.* 2010, Budiman *et al.* 2009). Leur expression dépend

principalement de l'abondance des ARNm et de l'efficacité de leur traduction (Krol 2002, Hatfield *et al.* 2006).



**Figure 17. La machinerie moléculaire impliquée dans l'insertion du résidu Sec chez les eucaryotes**

Sur cette figure apparaissent les deux facteurs *eEFSec* et *SPB2*, nécessaires pour décoder le codon *UGA* en *Sec*. Ces protéines appartiennent à un complexe plus important qui se lie sur une séquence particulière de l'ARNm des sélénoprotéines, la *Selenocystein Insertion Sequence (SECIS)*, repliée en épingle à cheveux. D'autres facteurs moins bien connus, appartenant au même complexe, semblent aussi impliqués, tels que la protéine ribosomique *L30*, la nucléoline et un facteur eucaryote d'initiation de la traduction *eIF4a3* (Taylor *et al.* 2016).

Lorsque les ARNm de sélénoprotéines sont surexprimés dans les cellules, l'incorporation de la *Sec* est limitée par la disponibilité de certains facteurs intervenant dans la biosynthèse des sélénoprotéines, comme *SBP2* (Peng *et al.* 2021). La disponibilité en *SBP2* elle-même est contrôlée par l'état redox de la cellule (Allmang, Wurth, and Krol 2009). L'oxydation de *SBP2* lors des conditions de stress oxydatif conduit à son accumulation dans le noyau, ce qui bloque l'incorporation de la *Sec* et entraîne un arrêt prématuré de la traduction des sélénoprotéines (Papp *et al.* 2006). Plusieurs facteurs de transcription comme *Nrf2*, *Keap1* et *NF-κB*, impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des sélénoprotéines sont aussi sensibles à l'homéostasie redox (Banning *et al.* 2005, Sakurai *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2011). Des mutations du gène *sbp2* chez l'homme provoquent de nombreuses manifestations cliniques associées à une déficience en sélénoprotéines telles que l'azoospermie, la dystrophie musculaire, une déficience immunitaire et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline (Schoenmakers *et al.* 2010).

La traduction des sélénoprotéines dépend aussi de la disponibilité en *Se* (Sunde and Raines 2011, Hill, Lyons, and Burk 1992, Lei *et al.* 1995, Schomburg and Schweizer 2009). Certaines

sélénoprotéines, essentielles, comme les thiorédoxine réductases 1 et 2 (TrxR1 et TrxR2) et la GPx4 sont moins affectées par une déficience en Se que d'autres sélénoprotéines (Sunde and Raines 2011, Hadley and Sunde 2001, Lei *et al.* 1995). Cette régulation "hiérarchique" de l'expression des sélénoprotéines se produit à la fois au niveau des ARNm et au niveau de la traduction (Labunskyy, Hatfield, and Gladyshev 2014). Il existe deux isoformes de l'ARNt<sup>[SerSec]</sup><sub>mm</sub><sup>5</sup><sub>U</sub> et l'ARNt<sup>[SerSec]</sup><sub>mm</sub><sup>5</sup><sub>Um</sub> qui diffèrent par la méthylation d'un ribose en position 34, une étape influencée par les niveaux de Se et qui conditionne la structure tertiaire de l'ARNt<sup>[SerSec]</sup> (Carlson *et al.* 2005, Kim *et al.* 2000). La méthylation est une modification spécifique des sélénoprotéines sensibles au stress. L'expression de ces protéines est aussi influencée par les niveaux du facteur d'élongation eIF4a3, lui-même surexprimé en carence de Se. Ce facteur se lie dans la partie 3' non traduite des ARNm de ces protéines au même niveau que SBP2, bloquant ainsi leur traduction. Les ARNm de ces dernières sont généralement dégradés par la voie RIDD qui permet d'éliminer les transcrits présentant un codon stop prématuré (Labunskyy, Hatfield, and Gladyshev 2014, Low *et al.* 2000).

La recherche systématique par bio-informatique de l'élément SECIS dans la région 3' non traduite des ARNm a permis l'identification de vingt-cinq sélénoprotéines humaines (24 chez la souris du fait de la substitution de la Sec par une Cys dans GPx6) (Kryukov, Kryukov, and Gladyshev 1999, Santesmasses, Mariotti, and Gladyshev 2020a). Toutes ont dans leur séquence un seul résidu Sec, à l'exception de la sélénoprotéine P (SeIP, SELENOP) qui en contient jusqu'à dix chez l'homme. Elle est produite dans le foie et sécrétée dans le plasma pour alimenter en Se les différents tissus de l'organisme. De façon surprenante, une approche basée sur la détection de résidus Sec par spectrométrie de masse a permis d'identifier récemment cinq sélénoprotéines candidates dépourvues de séquence SECIS. Le mode d'incorporation de la Sec dans ces protéines pourrait résulter d'un mécanisme de biosynthèse totalement différent impliquant, ou non, une séquence de type SECIS inconnue jusqu'à présent. Il se pourrait donc que d'autres sélénoprotéines de ce type soient découvertes à l'avenir (Guo *et al.* 2018).

## II. Les membres majeurs

La première sélénoprotéine identifiée est la glutathion peroxydase (GPx1) (Chambers *et al.* 1986, Flohe, Gunzler, and Schock 1973, Forstrom, Zakowski, and Tappel 1978). Chez l'Homme, la famille des GPx comprend huit isoformes codées par des gènes différents dont cinq seulement (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx6) sont des sélénoprotéines. La Sec est localisée dans leur partie N-terminale au sein d'un motif *thioredoxin fold* (Kryukov *et al.* 2003,

Margis *et al.* 2008). Les GPx1-4 sont des acteurs principaux de la défense antioxydante capable de réduire les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène en oxydant le glutathion (Arthur 2000, Fu *et al.* 1999). Chez l'Homme la mutation de GPx1 est associée à la maladie de Keshan. La GPx4 est la seule parmi les quatre à pouvoir réduire les hydroperoxydes lipidiques. Si l'invalidation de GPx4 est létale *in utero* chez la souris, elle est délétère à un stade plus avancé chez l'Homme (Santesmasses, Mariotti, and Gladyshev 2020b).

La thiorédoxine réductase (TrxR), ainsi que le thiorédoxine (TRX) et le NADPH font partie du système thiorédoxine (Arner 2010). La TrxR est un dimère capable de réduire la TRX en utilisant le NADPH (Tamura and Stadtman 1996). La grande réactivité du site actif permet une interaction avec une large gamme de substrats comme les sélénites, les hydroperoxydes, les TRX, la GPx et les PDI (Ren *et al.* 2018, Papp *et al.* 2007). La Sec se situe à l'extrémité C-terminale. Elle a un site de liaison pour le FAD et le NADPH. Il existe trois isoformes de TrxR chez l'Homme, toutes des sélénoprotéines : TrxR1, cytosolique, TrxR2, mitochondriale et TrxR3 de distribution plus large (Ren *et al.* 2018). TrxR3 possède en plus un domaine glutarédoxine (Grx) dans son extrémité N-terminale (Lu and Holmgren 2014), similaire à la glutathion réductase (Sandalova *et al.* 2001). TrxR1 régule le statut redox de la cellule (Anestal and Arner 2003, Sun and Gladyshev 2002) et tient un rôle anti-apoptotique en réduisant la TRX qui peut se lier à la kinase ASK1. TrxR2 joue un rôle similaire mais durant l'embryogénèse (Conrad *et al.* 2004). TrxR3 est surtout exprimée dans les testicules où elle est impliquée dans la maturation des spermatozoïdes en participant à l'isomérisation des ponts disulfures de protéines régulant la spermatogénèse (Su *et al.* 2005). L'invalidation de TrxR1 ou TrxR2 chez la souris est létale *in utero*. La perte de fonction de TrxR1 est également létale chez l'Homme contrairement à celle de TrxR2 qui est tolérée (Jakupoglu *et al.* 2005, Li, Bandyopadhyay, *et al.* 2012).

Les iodothyronines déiodinases comportent trois enzymes transmembranaires chez les mammifères (DIO1, DIO2 et DIO3) qui éliminent un résidu d'iode des hormones thyroïdiennes (Behne *et al.* 1990, Berry, Banu, and Larsen 1991). DIO1 et DIO2 convertissent la prohormone sécrétée thyroxine (T<sub>4</sub>) en tri-iodothyronine (T<sub>3</sub>), la forme hormonale circulante et active dans les tissus (Bianco *et al.* 2002). DIO3, elle, est l'enzyme permettant de désactiver la T<sub>3</sub> et la T<sub>4</sub> en 3,3'-diiodothyronine T<sub>2</sub> et rT<sub>3</sub> (T<sub>3</sub> reverse), des formes non reconnues par les récepteurs nucléaires. De façon surprenante, si la perte de fonction des déiodinases est létale chez l'Homme, elle est tolérée chez la souris (Santesmasses, Mariotti, and Gladyshev 2019).

La méthionine-R-Sulfoxyde Réductase 1 (MSRB1) est une sélénoprotéine contenant, en plus de l'atome de Se, un atome de zinc. Elle a initialement été identifiée à l'aide d'outils

bioinformatiques (Kryukov, Kryukov, and Gladyshev 1999, Lescure *et al.* 1999). MSRB1 peut protéger les protéines contre les dommages oxydatifs en catalysant la réduction de méthionines sulfoxyde en méthionines (Tsuji *et al.* 2021).

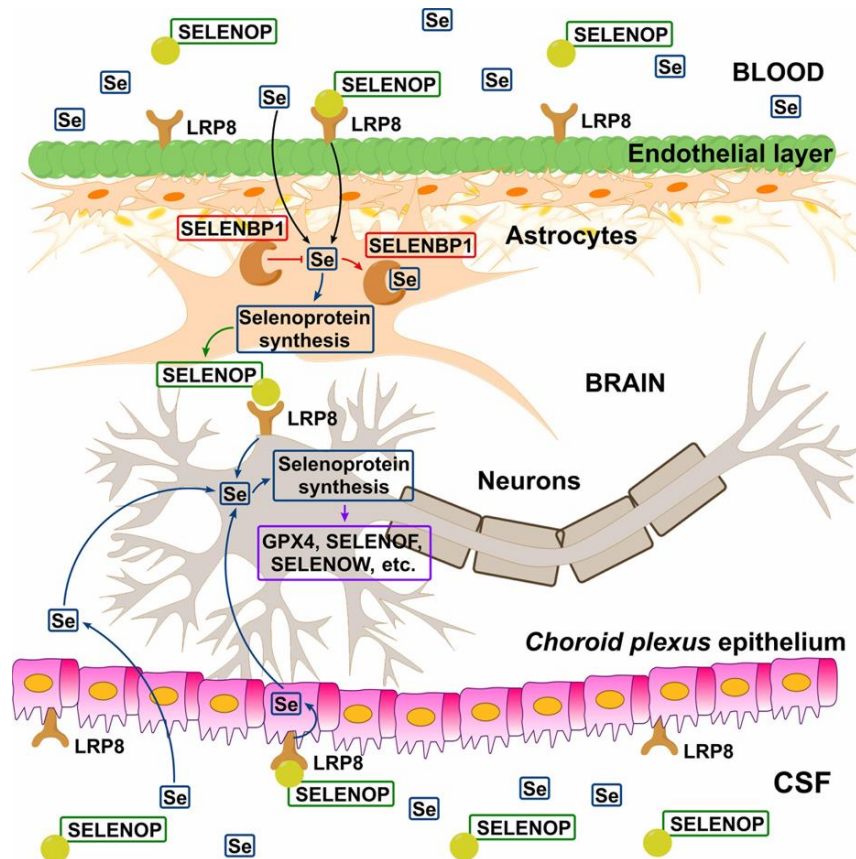
La Sélénophosphate Synthétase 2 (SEPHS2) synthétise le monosélénophosphate requis pour la synthèse de la Sec à partir de sélényde ( $\text{Se}^{2-}$ ) et d'ATP (Veres *et al.* 1994). SEPHS2 est une sélénoprotéine cytosolique que l'on retrouve chez tous les procaryotes et eucaryotes.

La sélénoprotéine P (SELENOP) est la seule sélénoprotéine à contenir plusieurs Sec. Elle est présente chez tous les métazoaires, mais sa teneur en Sec est très variable. Chez les vertébrés, le nombre de résidus varie de cinq chez le rat-taupe jusqu'à 37 chez le poisson sériole. La SELENOP humaine et murine contient 10 résidus Sec. C'est une protéine plasmatique synthétisée dans le foie (Carlson *et al.* 2004) qui assure le transport et la livraison du Se dans les tissus (Saito and Takahashi 2002). L'invalidation de la SELENOP entraîne une baisse du niveau de Se dans le cerveau, les testicules et le rein ainsi que des pathologies sévères (Kasaikina, Hatfield, and Gladyshev 2012).

### III. Les sélénoprotéines dans le cerveau

Le Se est principalement distribué dans le cerveau sous la forme de SELENOP. La SELENOP circulante présente dans le sang et le liquide céphalo rachidien est absorbée par les cellules LRP8-positives (Burk and Hill 2015, Solovyev *et al.* 2021) au niveau de la barrière hémato encéphalique et du plexus choroïde, puis resynthétisée dans les astrocytes voisins et libérée pour alimenter les neurones LRP8-positifs en Se (Figure 18) (Sasuclark, Khadka, and Pitts 2019). Il est aussi possible que le Se pénètre dans le cerveau sous forme de sucre sélénié (Burk and Hill 2015) ou sous forme de sel de sélényte (en utilisant des transporteurs d'anions présents dans la barrière hémato-encéphalique (Campos-Bedolla *et al.* 2014), auquel cas il peut être neurotoxique (Vinceti *et al.* 2017). Les souris invalidées pour la SELENOP présentent de graves dysfonctionnements neurologiques lors du sevrage qui sont en grande partie évités avec un régime enrichi en Se (Hill *et al.* 2004). Le Se peut aussi être séquestré par la *selenium Binding Protein 1* dans les astrocytes, ce qui régule négativement la production de la SELENOP.





**Figure 18. Modèle hypothétique du transport du Se à travers la barrière hémato-encéphalique et le plexus choroïde**

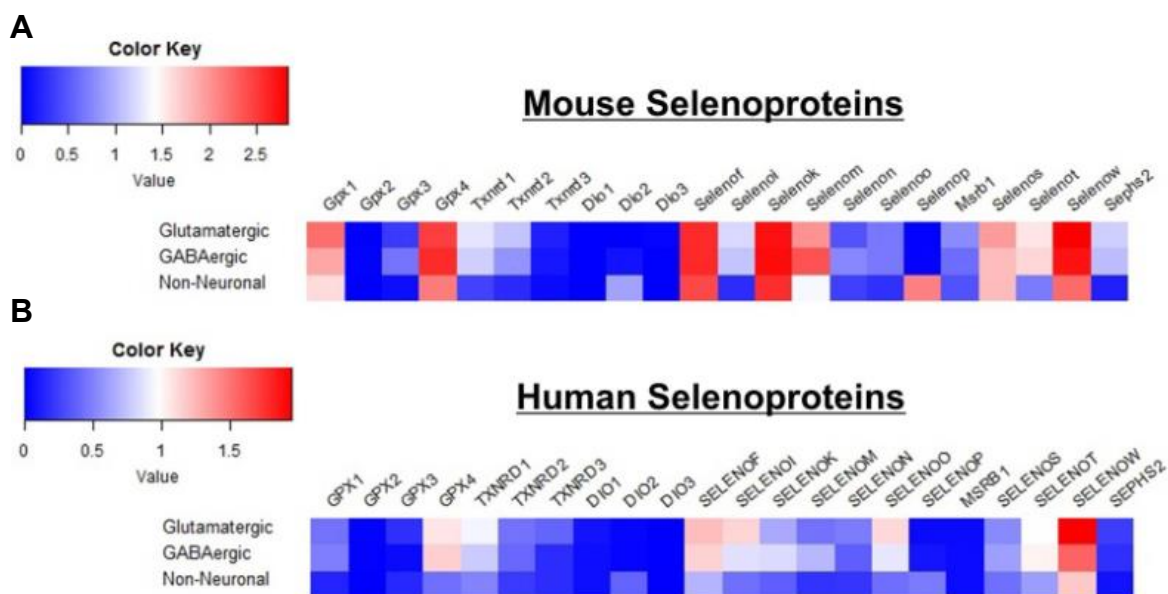
La SELENOP circulante présente dans le sang et le liquide céphalorachidien entre dans les cellules LRP8-positives au niveau des couches épithéliales et épendymaires, respectivement. Elle est resynthétisée dans les astrocytes voisins, et libérée pour alimenter en Se les neurones LRP8-positifs. Dans les astrocytes, la selenium binding protein 1 (SELENBP1) séquestre le Se et régule ainsi négativement la production de SELENOP. L'absorption du Se est aussi possible de façon SELENOP-indépendante (Solovyev *et al.* 2021).

Dans le cerveau de rat, les niveaux de Se les plus élevés ont été détectés dans les régions anatomiques contenant le plus de matière grise, dans l'ordre décroissant suivant: cervelet > cortex > bulbe rachidien (Prohaska and Ganther 1976). L'hippocampe, certaines couches du cervelet, le tronc cérébral et les ventricules sont les sites préférentiels d'approvisionnement en Se dans le cerveau de rats déficients en Se (Kuhbacher *et al.* 2009).

Le cerveau est particulièrement dépendant du Se en raison de son taux élevé de consommation d'oxygène et de sa sensibilité accrue au stress oxydant (Steinbrenner and Sies 2013). C'est pourquoi il est le dernier organe à subir la perte de Se en cas de déficience (Zhang *et al.* 2008, Pitts *et al.* 2014). Chez le rat, il a été montré que les niveaux de Se ne diminuent

que de 29 % dans l'ensemble des régions cérébrales analysées lors d'une déficience en Se contre plus de 98 % dans le foie et de 92 % dans les reins (Kuhbacher *et al.* 2009), un résultat en partie corroboré chez le poulet (Li, Li, *et al.* 2012). Dans le cerveau, le Se protège contre le stress oxydatif, le stress du RE et l'inflammation. Il est également prouvé que cet oligoélément favorise la neurotransmission en maintenant l'équilibre redox (Solovyev 2015). Un apport insuffisant en Se et une dérégulation des sélénoprotéines ont été associés à de multiples troubles cérébraux, notamment des maladies neurodégénératives (Pillai, Uyehara-Lock, and Bellinger 2014, Solovyev 2015), ainsi qu'à des troubles du neurodéveloppement (Ajmone-Cat *et al.* 2022). Le Se a été utilisé comme agent thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer avec des résultats non concluants (Solovyev *et al.* 2018). Il a été utilisé en complément de thérapie chez la souris modèle de sclérose en plaque où il diminuerait l'inflammation (de Toledo *et al.* 2020). Une autre stratégie thérapeutique est de faciliter le transport du Se en utilisant un peptide cargo pour améliorer la synthèse de Gpx4 lors d'un processus de neurodégénérescence par ferroptose (Conrad and Proneth 2020) et d'accidents vasculaires cérébraux (Alim *et al.* 2019) chez la souris.

Une fraction importante du Se (20 %) est incorporée dans le cerveau sous forme de Gpx (Prohaska and Ganther 1976). Mais la majorité des sélénoprotéines y sont exprimées (Figure 19). Six membres de la famille des sélénoprotéines sont hautement enrichis dans le cerveau de souris, en particulier la SelP/SELENOP, GPx4, la sélénoprotéine K (SelK, SELENOK), la sélénoprotéine M (SelM, SELENOM), la sélénoprotéine W (SelW, SELENOW) et la sélénoprotéine F (Sep15/SELENOF) (Zhang *et al.* 2008). Chez l'Homme, les plus représentées sont la SELENOF, la SELENOW, Gpx4, la sélénoprotéine I (SELENOI), la SELENOO et la SELENOT. Certaines d'entre elles sont essentielles pour l'organisme comme GPx4, TrxR1, SELENOI et SELENOT (Schweizer *et al.* 2021).



**Figure 19. Profil général du transcriptome lié au Se dans les cellules corticales**

A,B. heatmap détaillant l'expression des gènes des sélénoprotéines de la souris (A) et de l'homme (B) dans les cellules glutamatergiques, GABAergiques et non neuronales (Sasuclark, Khadka, and Pitts 2019).

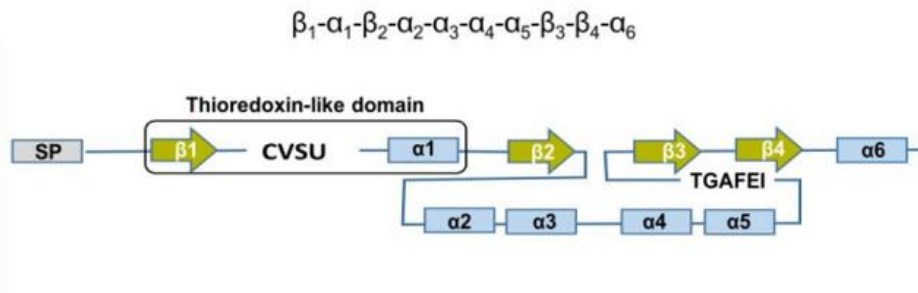
GPx4 a probablement été la plus étudiée de ces sélénoprotéines essentielles dans le cerveau. Cette enzyme antioxydante mitochondriale joue un rôle protecteur face au stress oxydant, ce qui a pour effet de limiter la neurodégénérescence et la ferroptose (Friedmann Angeli, Krysko, and Conrad 2019, Stockwell *et al.* 2017). Si l'inactivation du gène est létale chez la souris, l'inactivation conditionnelle de Gpx4 dans les neurones du cerveau antérieur après le développement entraîne un déclin cognitif et une neurodégénérescence de l'hippocampe (Hambricht *et al.* 2017). Chez l'Homme, des nouveau-nés atteints de dysplasie spondylométaphysaire de type sédaghatien présentant des mutations non-sens inactivatrices du gène GPX4 ont été observés (Smith *et al.* 2014). Ils présentent une atrophie massive du cerveau et meurent généralement peu après la naissance en absence de GPX4, les fœtus humains progressent donc plus loin dans leur développement que les embryons de souris. L'ablation conditionnelle de TrxR1, dans les précurseurs neuronaux, entraîne une hypoplasie du cervelet, une ataxie et des tremblements chez la souris (Soerensen *et al.* 2008), tandis que son ablation spécifique dans les neurones entraîne une neurodégénérescence et un vieillissement (Schweizer *et al.* 2021), ce qui suggère un rôle vital dans les processus de migration *via* la glie de Bergmann ou de génération des cellules en grain (Soerensen *et al.* 2008). La SELENOI, dont l'inactivation est aussi létale au stade embryonnaire, est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des

phospholipides importante pour la myélinisation (Horibata *et al.* 2018) (Gladyshev *et al.* 2016). C'est sans doute par le biais de la SELENOI que la carence en Se provoquée par l'absence de SELENOP, pourrait altérer la formation de la gaine de myéline dans le tronc cérébral (Valentine *et al.* 2005). La dernière sélénoprotéine dont il a été démontré qu'elle joue un rôle essentiel dans le cerveau est la SELENOT (Castex *et al.* 2016, Boukhzar *et al.* 2016).

## IV. La SELENOT

### A. Structure de la SELENOT

La séquence de la SELENOT est composée de 195 aa chez l'homme et les rongeurs. Elle contient un peptide signal en position 1-19 et possède 6 hélices  $\alpha$  et 4 brins  $\beta$ , avec un arrangement typique  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4-\alpha 5-\beta 3-\beta 4-\alpha 6$  (Dikiy *et al.* 2007, Moustafa and Antar 2012, Anouar *et al.* 2018). Chez la plupart des espèces, le motif redox *N*-terminal CYSU/C est situé dans une boucle localisée entre le brin  $\beta 1$  et l'hélice  $\alpha 1$ , formant ainsi un domaine caractéristique des « *thioredoxin fold proteins* » (Figure 20). Comme pour d'autres protéines de ce groupe telles que les thiorédoxines, les glutarédoxines et les PDI, le centre redox confère à la SELENOT une activité sélénosulfure/disulfure oxydoréductase qui a été démontrée expérimentalement dans un système acellulaire utilisant une SELENOT recombinante présentant une mutation Sec/Cys (Boukhzar *et al.* 2016). La SELENOT contient également deux domaines hydrophobes en position 87-102 et 125-143 qui recouvrent 4 hélices  $\alpha$  et qui suggèrent une localisation transmembranaire (Grumolato *et al.* 2008, Dikiy *et al.* 2007, Shchedrina *et al.* 2010). La SELENOT présente aussi une séquence conservée tGxFEI (résidus conservés en majuscules) à son extrémité C-terminale, également présente dans la Rdx12, la SELENOW, la sélénoprotéine V (SELENOV) (toutes trois cytosoliques) et la sélénoprotéine H (SELENOH) (nucléaire), chez les mammifères (Dikiy *et al.* 2007). Ce motif, ainsi que le domaine *thioredoxin fold* et la présence d'un site oxydoréductase ont permis d'établir la signature génétique d'une sous-famille de sélénoprotéines apparentées aux thiorédoxines, désignées par le terme de rédoxines (Rdx). Dans cette famille, la SELENOT est le seul membre localisé au niveau du RE ce qui pose la question de rôle de ces motifs dans les différents compartiments cellulaires.



**Figure 20. Structure secondaire et organisation spatiale de la SELENOT chez le rat**

Les hélices  $\alpha$  et brins  $\beta$  sont indiqués, ainsi que le centre redox CVSU et la signature TGAFEI conservée parmi les membres de la famille des rédoxines. SP, peptide signal (Pothion et al. 2020b).

## B. Histoire évolutive de la SELENOT

La SELENOT est la sélénoprotéine la plus conservée des 25 protéines composant cette famille chez l'Homme. Des protéines orthologues contenant un résidu Cys ou Sec ont été identifiées chez de nombreux eucaryotes y compris les plantes, les métazoaires, certains protistes (comme les ciliés) mais pas chez la levure ni les bactéries chez qui il n'y a apparemment pas d'homologues. La substitution de la Sec par la Cys dans la SELENOT est présente chez *C. elegans* (dans les deux isoformes) et chez plusieurs insectes et plantes terrestres (Pothion et al. 2020a, Lobanov et al. 2006, Moustafa and Antar 2012).

L'analyse phylogénétique montre que chez des espèces éloignées (comme les arthropodes ou les archaéplastides), le variant Sec de la SELENOT est retrouvé plutôt que la variante Cys, qui lui est présente chez des espèces plus proches (comme *Arabidopsis* et *Drosophila*). L'introduction de la Sec dans les sélénoprotéines ne serait donc pas une acquisition récente liée à l'évolution.

La famille des gènes codant la SELENOT a été fortement façonnée au cours de l'évolution (Figure 21). La majorité des espèces ne possède qu'un seul gène *selenot*, à quelques exceptions près, par exemple les nématodes (deux gènes chez *C. elegans*, trois chez *C. brenneri*) et les téléostéens (trois gènes chez le poisson rouge et le poisson zèbre). Tous ces gènes appartiennent à un même paralogon, c'est-à-dire à un ensemble de régions chromosomiques paralogues générées à partir d'une région ancestrale commune, au cours des deux événements de duplication du génome entier (2R) au début de l'histoire des vertébrés. Les approches phylogénétiques montrent que trois gènes *selenot* générés par la duplication 2R étaient présents chez l'ancêtre vertébré commun. Deux d'entre eux (*selt1* et *selt2*) seraient toujours présents

chez les poissons osseux, un seul (*selt1/selenot*) chez les tétrapodes. Chez l'Homme, le gène *selenot* est situé sur le chromosome 3, et deux pseudogènes, *selenotp1* et *selenotp2*, sont aussi présents respectivement sur les chromosomes 9 et 5 (Moustafa and Antar 2012). Les deux copies de *selt1*, *selt1a* et *selt1b*, présentes chez le poisson zèbre et le poisson rouge, seraient quant à elles apparues au cours d'un troisième événement de duplication du génome (3R) propre aux poissons téléostéens (Pothion et al. 2020b).

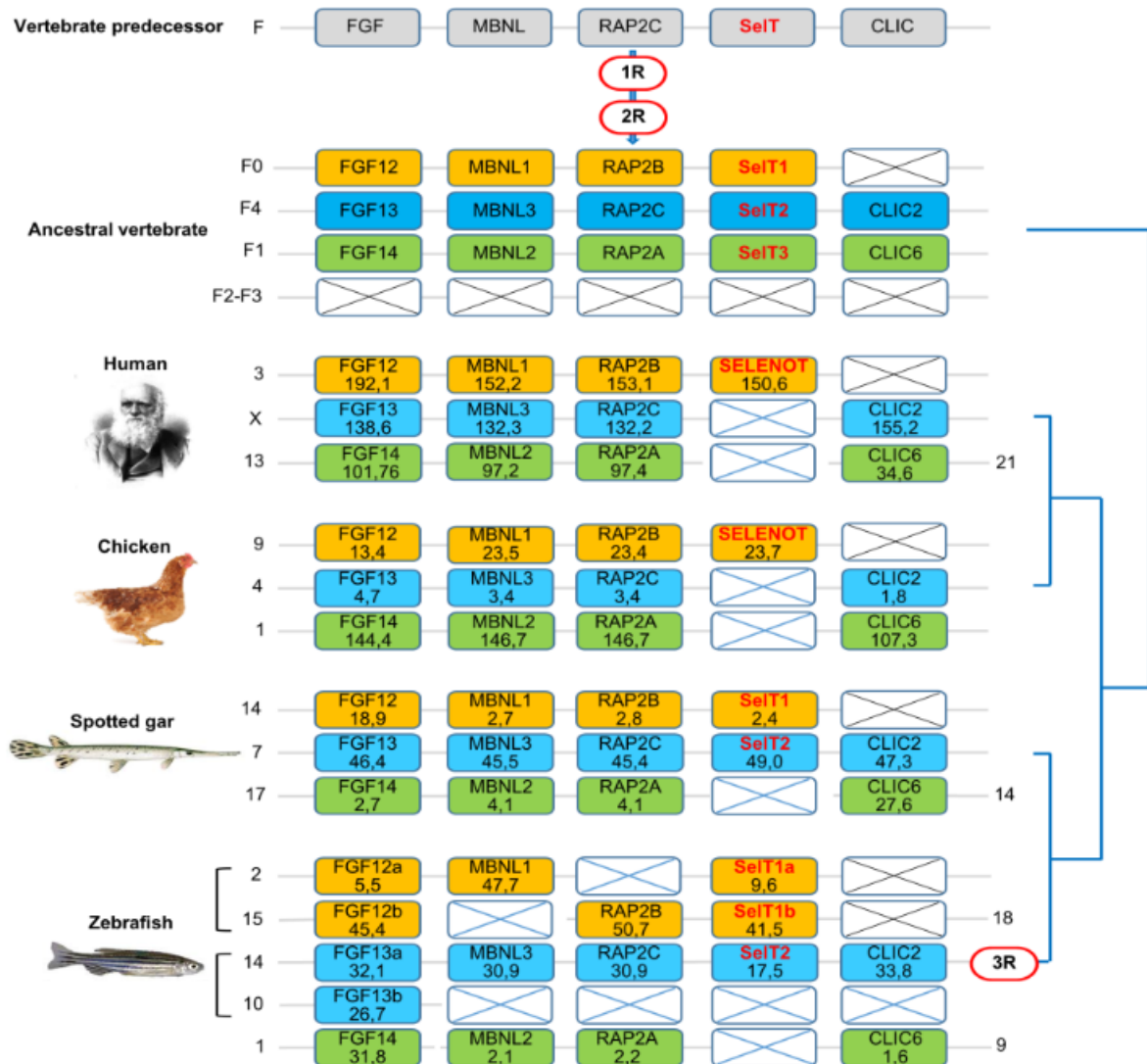
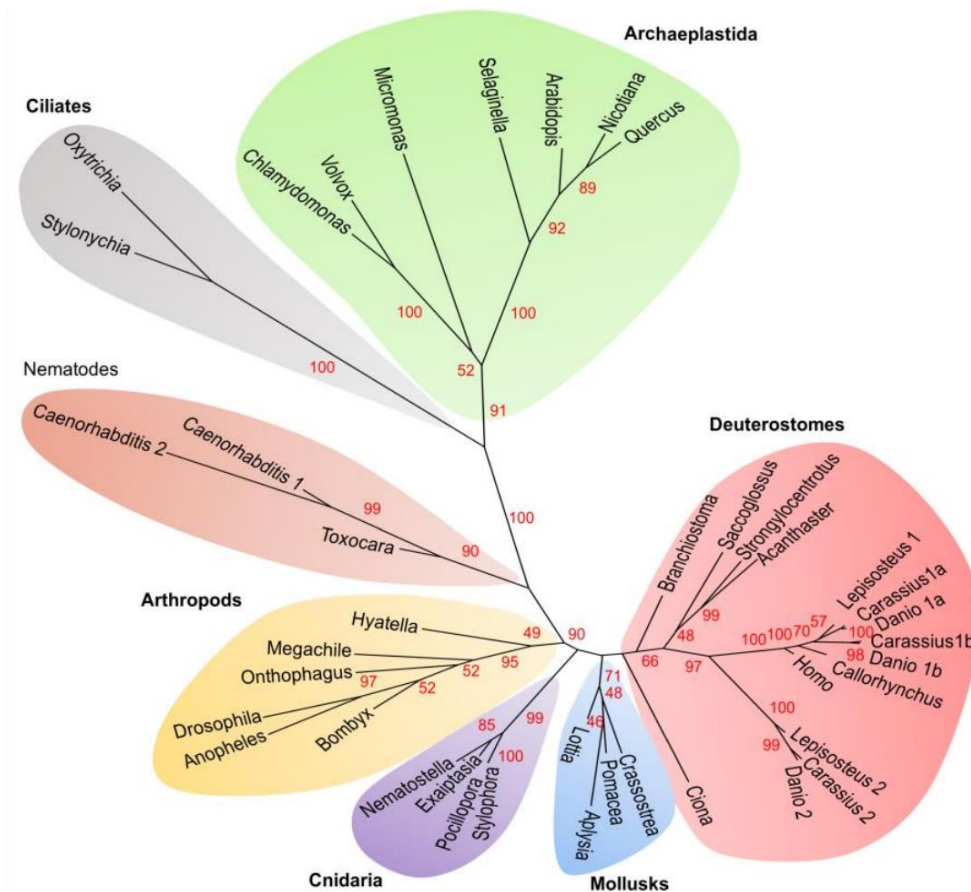


Figure 21. Histoire évolutive de la SELENOT

Le répertoire de gènes présents chez le prédécesseur des vertébrés est présenté dans le panneau supérieur. Le schéma indique ensuite quels orthologues ont été conservés chez l'ancêtre des vertébrés, après deux cycles de doublement global du génome des vertébrés (1R et 2R). Les quatre derniers panneaux montrent le répertoire génétique présent chez l'Homme, le poulet, le lépisosté tacheté et le poisson zèbre. Les croix indiquent une perte de gène ou un gène non identifié. Chaque paralogon est présenté dans une couleur distincte. F désigne l'un des

chromosomes du prédécesseur des vertébrés avant 1R et 2R. F0-F4 correspondent aux différents chromosomes fils de F suivant 1R et 2R. 3R, doublement du génome spécifique des poissons téléostéens. La synthèse a été réalisée en utilisant le logiciel Genomicus ; Selt, SELENOT, sélénoprotéine T (Pothion et al. 2020b). On observe une perte de selt2 et 3 chez l'Homme et le poulet ainsi que la perte de selt3 chez le poisson zèbre et le lépisostée tacheté.

Les méthodes de reconstruction phylogénétique ont également montré que la SELENOT, variants Sec et Cys confondus, est la sélénoprotéine la plus conservée chez les vertébrés (Figure 22). Par exemple, l'identité en acides aminés entre deux espèces aussi éloignées que l'Homme et le poulet est de 95 %. Certains ont également souligné une identité exceptionnellement forte au niveau nucléotidique (Moustafa and Antar 2012, Dikiy et al. 2007, Mariotti et al. 2012). Un tel niveau de conservation traduit l'existence de fortes contraintes fonctionnelles ayant exercé une pression très sélective sur les séquences. L'importance fonctionnelle de la SELENOT a été établie par ailleurs lors d'études d'inactivation génique montrant que des souris transgéniques totalement dépourvues de SELENOT ne sont pas viables *in utero* (Castex et al. 2016, Boukhzar et al. 2016). De plus, des travaux comparant la tolérance à la perte de fonction entre l'Homme et la souris montrent que la SELENOT et TrxR1 seraient les deux seules sélénoprotéines à être indispensables chez l'Homme et la souris (Santesmasses, Mariotti, and Gladyshev 2020b). En revanche, la délétion des deux gènes *selenot* chez *C. elegans* est viable (Romanelli-Cedrez et al. 2017). La disponibilité en Se affecte modérément l'expression de la SELENOT, ce qui suggère qu'elle tient un rôle important pour l'organisme (Sunde and Raines 2011). De plus, une déplétion en SELENOP, qui distribue le Se dans l'organisme, a un impact modéré sur l'expression de la SELENOT, excepté dans les testicules (Touat-Hamici et al. 2014). Ces données montrent que dans la hiérarchie de la production des sélénoprotéines, la SELENOT figure parmi les sélénoprotéines à priorité la plus élevée, dont l'expression ne peut pas descendre en dessous d'un seuil critique.



**Figure 22. Arbre phylogénétique de la SELENOT basé sur la méthode du Maximum de Vraisemblance**

Les séquences protéiques de 41 espèces représentatives d'eucaryotes ont été alignées avec MUSCLE et l'arbre phylogénétique a été produit avec Seaview en utilisant l'algorithme PhyML. Les nombres indiquent l'homologie de séquence entre les deux embranchements et la longueur des branches est proportionnelle à la divergence (Pothion et al. 2020b).

### C. Profil d'expression spatiotemporelle

#### 1. Au cours du développement

L'expression de la SELENOT a été étudiée chez le rat, le poisson rouge, le poulet et *C. elegans*. Elle est élevée au cours du développement dans l'ensemble de l'organisme, que ce soit chez le rat ou le nématode (isoforme SelT-1.1). Chez ce dernier, ainsi que chez le poulet, elle persiste jusqu'à l'âge adulte contrairement au rat chez qui l'expression commence à décliner à partir de la naissance (Romanelli-Cedrez *et al.* 2017, Grumolato *et al.* 2008, Tanguy *et al.* 2011). Chez le rat au jour embryonnaire 14, elle est exprimée (protéines et transcrits) dans le cerveau, le thymus, le foie, le rein, le testicule et à moindre échelle dans le tractus gastro



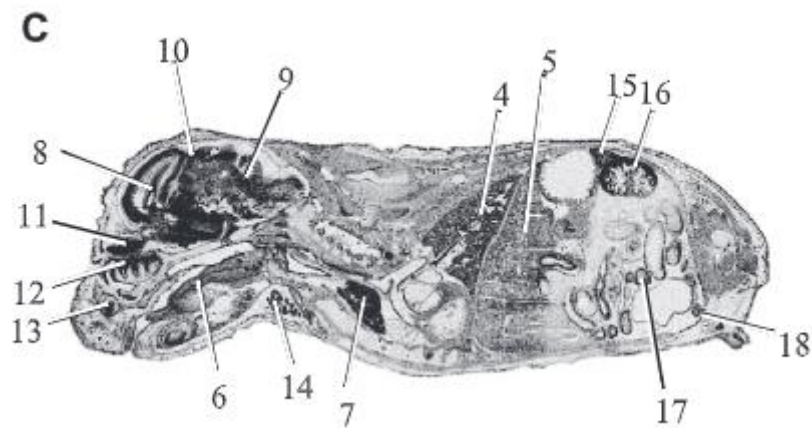
intestinal (Tanguy *et al.* 2011, Grumolato *et al.* 2008). Son expression est aussi élevée dans le cœur pendant le développement. Le marquage avec les cardiomyocytes devient ensuite résiduel chez le nouveau-né pour finalement disparaître chez l'adulte (Rocca *et al.* 2018).

Au cours de l'ontogenèse du système nerveux central, son expression est abondante dans les progéniteurs neuraux des zones sous-ventriculaire et intermédiaire de la plaque corticale, et dans les neurones de la couche germinative externe du cortex cérébelleux (Tanguy *et al.* 2011). Dans le néocortex de rat, son expression décline après la naissance, elle est résiduelle 14 jours après la naissance et disparaît chez l'adulte. Chez *C. elegans* l'isoforme SelT-1.1 est exprimée au niveau du RE dans le système nerveux, ainsi que dans les cellules épithéliales hypodermiques, de l'arcade, pharyngées, vulvaires et rectales de l'épithélium et les cellules musculaires somatiques de la tête, du cou, de la paroi corporelle et des muscles pharyngés non striés. L'isoforme Selt-1.2 est exprimée de façon plus restreinte dans le cytoplasme, le corps cellulaire, les dendrites et les axones des neurones AWB impliqués dans l'olfaction. Chez le poisson rouge, trois paralogues de la SELENOT ont été découverts, nommés gfSelT1a, gfSelT1b et gfSelT2. Les transcrits SELENOT ont pu être détectés dans tous les tissus et organes testés, comprenant, la moelle épinière, le diencéphale, le cervelet, le télencéphale, le bulbe rachidien, l'hypothalamus, la graisse, les muscles, la peau, les branchies, le foie, les reins, le cœur, la rate, l'intestin antérieur, moyen et postérieur, et le testicule, avec une plus grande abondance d'ARNm de gfSelT1a et gfSelT2, par rapport à gfSelT1b (Chen *et al.* 2017).

## 2. Stade adulte

Chez les rongeurs, l'expression de la SELENOT (protéines et transcrits) persiste chez l'adulte dans des organes comme l'hypophyse, le pancréas, le testicule, la thyroïde, le cerveau, le thymus et le rein alors qu'elle disparaît dans le foie, le cœur, le muscle, la surrénale et le tractus gastro intestinal (Tanguy *et al.* 2011, Prevost *et al.* 2013, Dikiy *et al.* 2007). Dans le cerveau, les transcrits SELENOT sont détectés par hybridation *in situ* dans de nombreuses régions comprenant la couche glomérulaire du bulbe olfactif, le cortex piriforme, le noyau supraoptique, l'hippocampe (couche CA3), le gyrus denté, l'habenula, le cervelet, au sein des couches des cellules granulaires et de Purkinje, et autour du quatrième ventricule. De même, l'ARNm de la SELENOT est abondant dans l'hypothalamus au sein du noyau paraventriculaire, dans la zone ventrale du pons et dans la médulla. Une colocalisation des ARNm de la SELENOT et de la tyrosine hydroxylase a été mise en évidence dans plusieurs noyaux catécholaminergiques (Godefroy *et al.* 2022). Dans l'hypophyse de rat, la SELENOT est

présente dans les populations cellulaires du lobe antérieur où elle colocalise avec l'hormone de croissance, la prolactine, la thyrotrophine, la corticotrophine et l'hormone folliculo-stimulante (Hamieh *et al.* 2017), tandis que dans les testicules, elle est retrouvée uniquement dans les cellules germinales et les cellules de Leydig. Dans le pancréas endocrine de souris, la SELENOT est majoritairement produite dans les cellules qui produisent l'insuline (cellules  $\beta$ ) et la somatostatine (cellules  $\delta$ ) tandis qu'elle est indétectable dans les cellules qui produisent le glucagon (cellules  $\alpha$ ) et dans le pancréas exocrine (Prevost *et al.* 2013). La SELENOT est aussi exprimée dans un certain nombre de lignées cellulaires d'origine endocrine telles que les cellules corticotropes AtT20 et les cellules neuroendocrines catécholaminergiques PC12 et SY5Y dérivées d'un phéochromocytome et d'un neuroblastome, respectivement. En résumé, la SELENOT est bien exprimée dans les tissus endocrines et neuroendocrines (Figure 23) (Abid *et al.* 2019, Grumolato *et al.* 2008, Tanguy *et al.* 2011, Prevost *et al.* 2013).



**Figure 23. Expression des transcrits SELENOT dans les tissus de rat pendant l'embryogenèse et chez l'adulte**

A. Section parasagittale d'un embryon E21 hybridé avec une sonde antisens SELENOT. 1, neuroépithélium cortical ; 2, télencéphale basal ; 3, ectoturbine ; 4, poumon ; 5, foie ; 6, langue ; 7, thymus ; 8, hippocampe ; 9, cervelet ; 10, mésencéphale ; 11, neuroépithélium du bulbe olfactif ; 12, endoturbine ; 13, organe voméronasal ; 14, glande salivaire ; 15, glande surrénale ; 16, rein ; 17, boucles intestinales ; et 18, testicule (Grumolato *et al.* 2008).

#### D. Localisation subcellulaire

Des études de microscopie électronique, d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire menées chez des plantes (*Arabidopsis thaliana*) (Nikolovski *et al.* 2012), des invertébrés (*C. elegans*) (Romanelli-Cedrez *et al.* 2017) ou des vertébrés (rat, souris, poisson rouge) (Mazza *et al.* 2019, Grumolato *et al.* 2008, Hamieh *et al.* 2017) montrent que la

SELENOT est localisée dans le RE. Toutefois, cette localisation n'est exacte que pour une des deux formes de la SELENOT chez *C. elegans* puisque *SelT1.2* est présente dans le cytoplasme. Chez les mammifères, la SELENOT colocalise avec plusieurs protéines du RE comme la protéine BiP et KCP2 (Hamieh *et al.* 2017, Grumolato *et al.* 2008, Prevost *et al.* 2013, Roboti and High 2012b, Tanguy *et al.* 2011). Le peptide signal à l'extrémité N-terminale n'est pas nécessaire à l'adressage de la SELENOT dans le RE (Grumolato *et al.* 2008, Dikiy *et al.* 2007), ce qui suggère que d'autres séquences sont nécessaires pour le ciblage de la SELENOT vers le RE. Certaines protéines membranaires peuvent être adressées au RE par leurs domaines transmembranaires (Blobel 1980, Allen *et al.* 2019). La SELENOT possède deux régions riches en acides aminés hydrophobes aux positions 87-102 et 125-144, qui pourraient permettre son adressage à la membrane du RE (Grumolato *et al.* 2008, Dikiy *et al.* 2007, Moustafa and Antar 2012). Des études de modélisation et de mutagenèse dirigée suggèrent que le premier segment hydrophobe contient une hélice amphipathique qui pourrait former des contacts étendus avec la bicouche lipidique et permettrait l'insertion monotopique de la SELENOT à la membrane du RE (Grumolato *et al.* 2008, Liu and Rozovsky 2015). Enfin, la SELENOT ne présente pas le térapeptide KDEL nécessaire à sa rétention dans le RE. Toutefois elle n'a été décrite qu'une seule fois dans l'appareil de Golgi (Dikiy *et al.* 2007) et n'a jamais été identifiée dans les granules de sécrétion par microscopie électronique (Hamieh *et al.* 2017).

L'ensemble de ces observations indique que la SELENOT est un membre atypique de la famille des Rdx, le seul à être localisé à la membrane du RE. D'autres localisations de la SELENOT ont également été suggérées mais restent à caractériser plus précisément, notamment dans l'appareil de Golgi ou le cytoplasme.

## E. Fonctions de la SELENOT

### 1. Étude *in vivo*

Divers modèles d'animaux transgéniques ont été produits pour étudier le rôle de la SELENOT. L'inactivation des deux gènes *SelT1.1* et *SelT1.2* chez *C. elegans* est viable bien que la viabilité du mutant *SelT1.1* soit compromise face à un stress oxydant (Romanelli-Cedrez *et al.* 2017). Ce gène serait impliqué dans les interactions hôtes-pathogènes. Chez la souris, deux modèles d'inactivation globale du gène *selenot* ont été produits. Le premier consiste en la délétion des exons deux et trois du gène *selenot* par la méthode Cre-LoxP qui élimine le centre redox (entre autres). Ce modèle n'est pas viable *in utero* (Boukhzar *et al.* 2016). Plus récemment, un modèle de souris KO pour la SELENOT viable a été produit en utilisant la

méthode CRISPR-Cas9 pour déléter 41 paires de bases dans l'exon 2 du gène *selenot*. Contrairement au premier modèle, cette délétion conserve le centre redox (Li *et al.* 2021). Ces souris<sup>SELENOT<sup>-/-</sup></sup> présentent une taille réduite, une infertilité, une baisse de la glycémie (à jeun ou non) et des taux d'insuline sérique, en accord avec les travaux de Prevost et collaborateurs (Prevost *et al.* 2013), ainsi qu'une amélioration du profil lipidique sanguin.

Des modèles murins d'inactivation conditionnelle de la SELENOT ont également été produits pour étudier plus spécifiquement le rôle de la SELENOT dans le cerveau et le pancréas. Dans le modèle Nes-Cre/SELENOT<sup>flox/flox</sup> la SELENOT a été spécifiquement invalidée dans les progéniteurs neuraux exprimant la nestine (une protéine de filament intermédiaire) à l'origine des lignées neuronales et astrocytaires. Au septième jour postnatal, ces souris présentent un volume réduit de différentes structures cérébrales, dont l'hippocampe, le cervelet et le cortex cérébral. Ce phénotype est associé à une perte de neurones immatures par apoptose et de niveaux élevés de ROS dans les neuroblastes. Il n'y a pas d'impact notable au niveau des cellules gliales. À la deuxième semaine postnatale, une augmentation de la neurogenèse est observée dans le cervelet suggérant l'apparition de mécanismes compensatoires. Néanmoins, ces souris mutantes présentent un comportement hyperactif. Ainsi, malgré une apparente compensation morphologique, la déficience en SELENOT entraîne un dysfonctionnement cérébral à l'âge adulte (Castex *et al.* 2016).

L'expression de la SELENOT est stimulée dans les neurones et les astrocytes activés dans le modèle murin de la maladie de Parkinson induit par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Boukhar *et al.* 2016, Hamieh *et al.* 2017). Le MPTP comme la roténone provoquent des déficiences motrices plus rapides et sévères chez les souris Nes-Cre/SELENOT<sup>flox/flox</sup> comparées aux souris sauvages. On constate la mort des souris Nes-Cre/SELENOT<sup>flox/flox</sup> dès 2 h après l'injection de MPTP contre 20 % seulement des souris sauvages. La déficience motrice est associée à un stress oxydatif, une neurodégénérescence accrue des neurones dopaminergiques de la substance noire, ainsi qu'à une diminution de la tyrosine hydroxylase, un marqueur des neurones catécholaminergiques (CA). (Boukhar *et al.* 2016). Une étude récente rapportant la cartographie 3D par la méthode iDISCO+ des neurones CA montre la réduction globale de leur nombre dans *l'area postrema* (AP-A2), les cellules A11, la *zona incerta* (ZI-A13) et dans l'hypothalamus de souris mutantes femelles (Godefroy *et al.* 2022). L'expression de la SELENOT est aussi induite dans certaines situations physiopathologiques comme l'hypoxie cérébrale (Ikematsu *et al.* 2007), ou encore pendant la régénération hépatique, après une hépatectomie partielle chez le rat (Tanguy *et al.* 2011), et au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion dans le myocarde (Rocca *et al.* 2018).

Un second modèle d'inactivation conditionnelle de la SELENOT dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Ins-Cre/SELENOT<sup>fllox/fllox</sup>) a été généré en croisant des souris SELENOT<sup>fllox/fllox</sup> avec des souris exprimant la recombinaise sous contrôle du promoteur de l'insuline (Prevost *et al.* 2013). Les souris Ins-Cre/SELENOT<sup>fllox/fllox</sup> présentent une tolérance au glucose altérée. Bien que la sensibilité à l'insuline ne soit pas modifiée chez les souris mutantes, le rapport entre le glucose et l'insuline est significativement plus élevé chez les souris Ins-Cre/SELENOT<sup>fllox/fllox</sup> par rapport à leurs homologues sauvages, suggérant un déficit de production/sécrétion d'insuline. L'analyse morphométrique a montré que les îlots des souris Ins-Cre/SELENOT<sup>fllox/fllox</sup> sont plus petits et que leur nombre est significativement plus élevé par rapport aux îlots de souris sauvages (Prevost *et al.* 2013).

Une étude menée chez le poisson rouge a mis en évidence une corrélation entre l'expression des trois gènes *selenot* et la prise alimentaire, le stress oxydant, le choc thermique et l'exposition au cadmium (Chen *et al.* 2017). L'activité de la SELENOT est donc susceptible d'être requise pour diverses fonctions physiologiques.

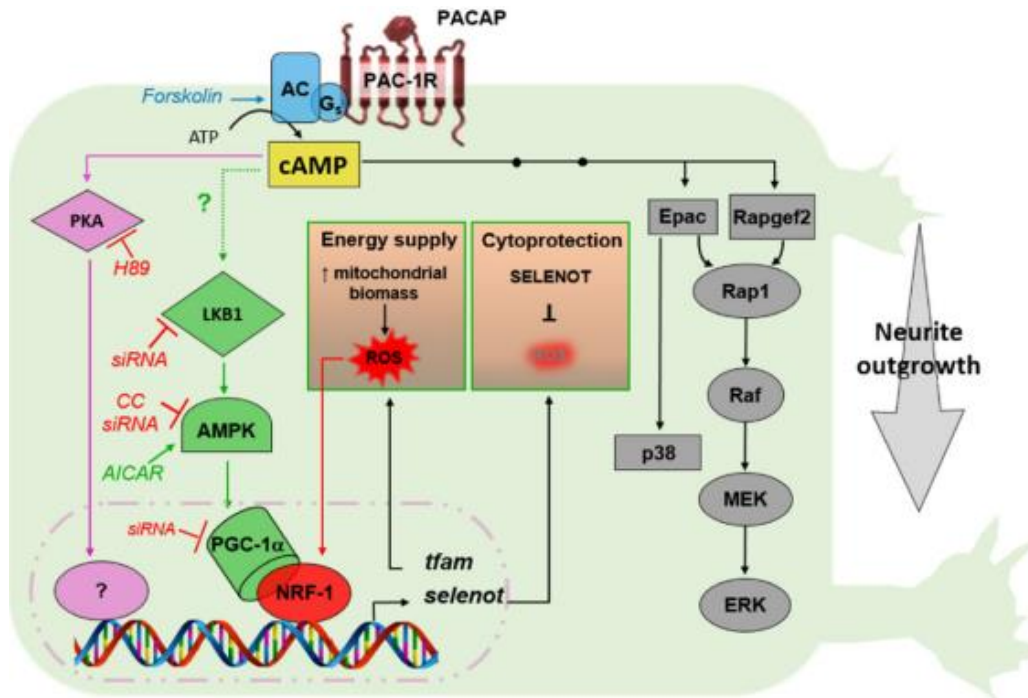
Enfin, chez *C. Elegans*, la SELENOT est nécessaire à la nociception et les mutants Selt1.1 exposé à la rotenone ne sont pas viables contrairement aux mutants Selt1.2 (Romanelli-Cedrez *et al.*, 2017).

## 2. Étude *in vitro*

L'expression de la SELENOT est influencée par différents facteurs internes et externes. Une expérience de *microarray* a permis de mettre en évidence sa surexpression lors de la différenciation neuroendocrine, dans un modèle de cellules chromaffines PC12 différenciées par le peptide neurotrophique *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP) (Grumolato *et al.* 2008, Grumolato *et al.* 2003, Abid *et al.* 2019). Le PACAP et l'AMPc induisent une augmentation rapide et durable de l'expression de la SELENOT dans les cellules PC12, de manière Ca<sup>2+</sup>-dépendante. Par ailleurs, la surexpression de la SELENOT dans ces cellules provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dépendante du résidu Sec. Dans ce modèle, l'absence de SELENOT inhibe l'effet du PACAP sur l'extension des neurites (Abid *et al.* 2019), les flux calciques et la sécrétion endocrine (Grumolato *et al.* 2008). L'expression de la SELENOT stimulée par le PACAP fait intervenir deux voies de signalisation. La voie AMPc/PKA (Abid *et al.* 2019, Grumolato *et al.* 2008), qui est une voie de signalisation neurotrophique connue pour spécifier la conversion des précurseurs sympatho-surrénaux vers différents phénotypes cellulaires en favorisant leur survie et leur

différenciation et la voie AMPK/PGC1 $\alpha$ /NRF-1, qui est la voie canonique de stimulation de la mitochondriogénèse. De cette manière, le PACAP pourrait stimuler la fonction mitochondriale et limiter la production de ROS qui en résulte en stimulant la transcription du gène *selenot* et la réponse antioxydante au cours de la différenciation neuroendocrine (Figure 24). La SELENOT est de fait stimulée par le stress oxydant induit par un traitement à l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans les cellules PC12, ou par un traitement au MPTP dans une lignée de neurones SH-SY5Y, ce qui concourt à augmenter la survie cellulaire des neurones et des cellules catécholaminergiques exposées à ce type de stress (Abid *et al.* 2019, Castex *et al.* 2016, Hamieh *et al.* 2017, Boukhzar *et al.* 2016). La mutation Sec/Ser au niveau du centre redox Cys-Val-Ser-Sec de la SELENOT abolit cet effet protecteur.

Toujours en lien avec le stress oxydant, la SELENOT est induite par des traitements qui perturbent l'homéostasie du RE et augmentent les niveaux de ROS. Par exemple, un traitement à la tunicamycine, un inhibiteur de l'UDP-HexNAc pyrophosphorylase qui catalyse le transfert de GlcNAc sur le Dol-P, au cours de la *N*-glycosylation, entraîne une élévation des niveaux de SELENOT (Hamieh *et al.* 2017). On obtient des résultats similaires avec la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA empêchant la reconstitution des stocks de Ca<sup>2+</sup> du RE. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de la SELENOT par des shRNA dans des cellules corticotropes induit un stress du RE qui se traduit par une dilatation de cet organite et l'activation des trois voies de la réponse UPR (IRE1, PERK, ATF6). L'expression de la chaperonne BiP, le signal d'activation de cette réponse, est augmentée ainsi que celle de CHOP, un effecteur final de la forme courte du facteur de transcription Xbp1s, produit par épissage alternatif. Dans ce modèle une baisse d'activité d'ERAD est également observée (Hamieh *et al.*, 2017). Enfin, en absence de SELENOT dans des fibroblastes murins, un défaut d'adhésion cellulaire est observé ainsi que la surexpression d'autres oxydoréductases comme la superoxyde dismutase1 ou la SELENOW et Dio2, montrant indirectement un rôle antioxydant (sengupta 2009).



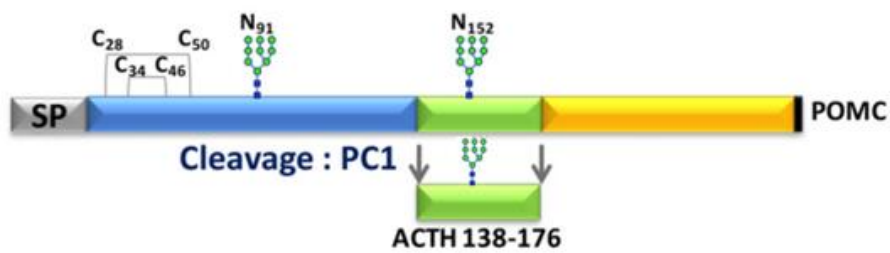
**Figure 24. Cascade de signalisation LKB1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ /NRF-1 au cours de la différenciation neuroendocrine des cellules PC12 induite par le PACAP**

*L'élévation de l'AMPc suite à l'activation du récepteur PAC1 conduit à l'activation d'au moins trois senseurs de l'AMPc (PKA, Epac, et Rapgef2). Le système PACAP/PAC1 active aussi les cascades de phosphorylation impliquant LKB1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  et NRF-1 comme effecteur en aval. PGC-1 $\alpha$ , en association avec NRF-1, orchestre la stimulation transcriptionnelle des gènes mitochondriaux, ce qui conduit à une augmentation de la biomasse mitochondriale, et une hausse de la production de ROS toxiques. D'autre part, le complexe PGC-1 $\alpha$ /NRF-1 active également la transcription du gène selenot qui joue un rôle dans la réponse antioxydante et dans la cytoprotection. Grâce à ce mécanisme, les cellules PC12 peuvent négocier les changements métaboliques provoqués par le PACAP au cours de la différenciation neuronale (Abid et al. 2019).*

### 3. Partenaires de la SELENOT

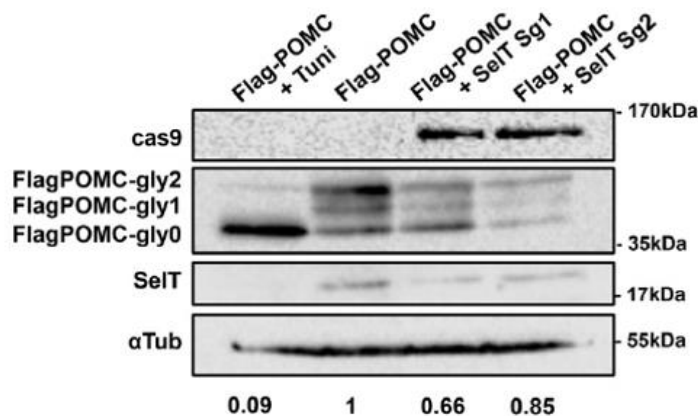
Un crible en double hybride réalisé chez la levure a permis de mettre en évidence quelques partenaires potentiels de la SELENOT. L'un d'eux, KCP2, au score élevé, est une protéine du complexe OST-A. L'association physique avec la SELENOT a été validée par immunoprécipitation, de même que l'interaction de la SELENOT avec d'autres membres de ce complexe tels que STT3A et OST48. Par contre, aucune interaction avec STT3B n'a été mise en évidence. L'interaction avec le translocon a aussi été envisagée, mais elle n'a pu être établie (Hamieh et al. 2017).

La proopiomélanocortine (POMC) est une protéine intéressante pour étudier les problèmes de maturation post-traductionnelle car elle possède 2 sites de *N*-glycosylation, dont l'un est situé à proximité d'un pont disulfure (Figure 25). C'est un précurseur polypeptidique dont le clivage par des enzymes de la famille des prohormone convertases permet de générer plusieurs peptides/hormones essentiels pour l'organisme. Dans les cellules corticotropes, la POMC est clivée en hormone corticotrope ou ACTH. L'ACTH sécrétée dans la circulation est un maillon essentiel de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien impliqué dans la réponse au stress. Lorsque les niveaux de SELENOT sont abaissés à l'aide de shRNA ou par la méthode CRISPR Cas9 dans des cellules corticotropes (AtT20), on observe par western blot une disparition des formes mono et di-glycosylées de la POMC et une augmentation de la forme non glycosylée (Figure 26). Ce défaut de *N*-glycosylation est associé à une inhibition de la sécrétion d'ACTH, en conditions basales et en réponse à une stimulation par le *corticotropin-releasing factor* (CRF) (Hamieh et al. 2017).



**Figure 25. Représentation schématique de la structure de la POMC**

Les emplacements des ponts disulfure, des sites de *N*-glycosylation et des sites de clivage par la prohormone convertase 1 (PC1) sont indiqués. SP, signal peptide (Hamieh et al. 2017).



**Figure 26. La délétion de la SELENOT altère la *N*-glycosylation de la POMC**

L'inactivation de la SELENOT par CRISPR Cas9 entraîne une diminution des formes mono et diglycosylées de la POMC (Flag POMC-gly1 et 2) dans des cellules corticotropes. Les valeurs indiquent le niveau de glycosylation de la POMC, en pourcentage du contrôle (Hamieh et al. 2017).



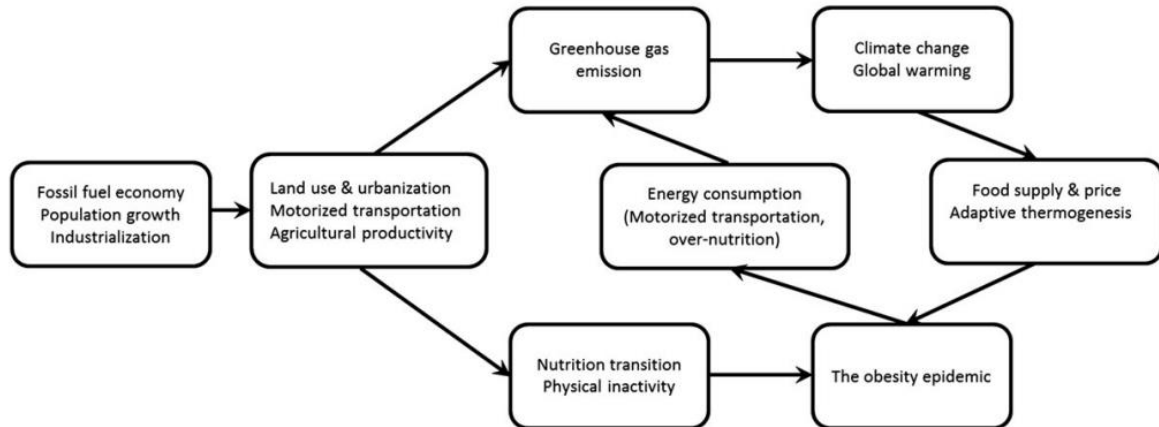
# L'obésité

## I. Généralités

L'obésité se définit par un Indice de Masse Corporelle (poids en kg divisé par la taille en m au carré) supérieur à 30. L'obésité est due à un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. Depuis les années 1990, l'obésité est qualifiée d'épidémie mondiale. En 1997, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré que l'obésité était un problème de santé mondial majeur, au même titre que la dénutrition et le changement climatique, la triade étant appelée « la Syndémie mondiale ». Il est estimé actuellement que plus de 603 millions de personnes dans le monde souffrent d'obésité. En 2015, environ 4 millions de personnes en sont mortes, les 2/3 de ces décès étant liés à des problèmes cardiovasculaires (Afshin, Reitsma, and Murray 2017). 39 % de la population adulte mondiale était en surpoids en 2016 d'après l'OMS (World Health Organization Obesity and Overweight Fact Sheet. 2016). Hruby et collaborateur (Hruby and Hu 2015) expliquent clairement que cette maladie est complexe et multifactorielle. Elle dépend de facteurs :

- Individuels : un apport énergétique supérieur aux besoins, le choix d'aliments riches en calories et pauvres en nutriments (typiquement les boissons sucrées), des expositions pré- et/ou périnatale à ce type d'aliments, une faible activité physique, la sédentarité, trop peu ou trop de sommeil, une part génétique. On peut mentionner aussi certaines maladies (comme la maladie de Cushing), l'état psychologique (par exemple dépression ou stress), des médicaments spécifiques (les stéroïdes par exemple).
- Socio-économiques : faible niveau d'instruction et pauvreté.
- Environnementaux : le manque d'accès aux ressources d'activité physique, l'existence de déserts alimentaires (c'est-à-dire de zones géographiques sans accès facile à des aliments sains, tels que des produits frais), l'exposition à des virus et à des substances « Obésogènes » (par exemple, les produits chimiques perturbateurs endocriniens), l'influence du microbiote et les liens sociaux avec des personnes obèses.

De nombreuses mesures de prévention et un nombre croissant d'études alertent sur les liens entre obésité et réchauffement climatique (Figure 27).



**Figure 27. Modèle conceptuel liant l'épidémie d'obésité et le changement climatique**

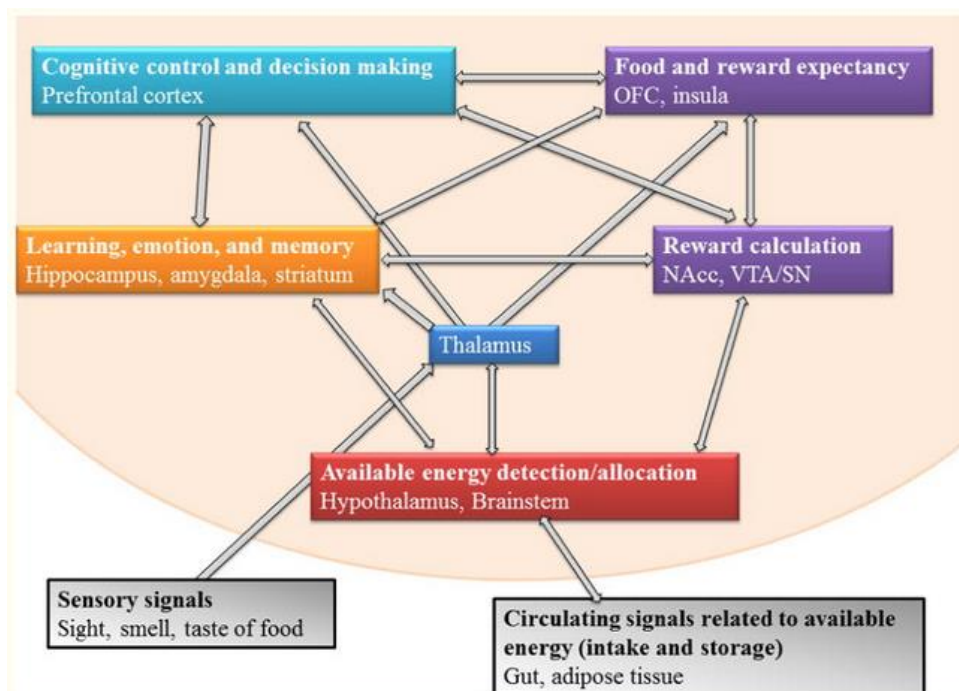
*Dans ce modèle, les combustibles fossiles, la croissance démographique et l'industrialisation entraînent l'utilisation des sols et l'urbanisation, le transport motorisé et la productivité agricole et, par conséquent, influencent d'une part le réchauffement climatique par l'émission excessive de gaz à effet de serre et d'autre part l'épidémie d'obésité par la simplicité d'accès à l'alimentation et l'inactivité physique. Le réchauffement climatique influe également directement sur l'obésité par l'augmentation des prix des aliments et en diminuant la thermogenèse, et donc la dépense énergétique. L'épidémie d'obésité influence le réchauffement climatique via une consommation d'énergie plus élevée (An, Ji, and Zhang 2018).*

## II. Le contrôle central de la prise alimentaire

### A. Le noyau arqué

Le noyau arqué de l'hypothalamus (NA) est l'une des régions cérébrales les mieux caractérisées, car elle est liée au contrôle du comportement alimentaire (Sohn 2015). Hetherington et Ranson avaient mis en évidence, en 1942, le rôle anorexigène de l'hypothalamus ventro-médian, puis l'hypothalamus médian a été décrit comme centre orexigène en 1952 (Anand and Brobeck 1952). Ce n'est que plus tard, dans les années 2000, que la régulation précise de la prise alimentaire *via* le NA a été élucidée. On sait aujourd'hui que deux populations neuronales distinctes orchestrent la prise alimentaire : les neurones anorexigènes à POMC/*cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART) et les neurones orexigènes à neuropeptide Y (NPY) et agouti-related peptide (AgRP). Ces neurones sont bien placés pour recevoir des informations des organes périphériques. En effet, la position du NA dans la partie ventro-médiane de l'hypothalamus permet un apport sanguin riche, en raison de

sa proximité avec l'éminence médiane. Cette zone renferme un réseau capillaire dénué de barrière hémato-encéphalique et donc perméable aux signaux périphériques satiétogènes comme l'insuline sécrétée par les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Marks *et al.* 1992) et la leptine produite par le tissu adipeux blanc (Jang *et al.* 2000), ou orexigènes comme la ghréline, libérée par la muqueuse gastrique (Chen *et al.* 2015). Ainsi, les informations provenant des organes périphériques peuvent facilement accéder aux neurones POMC/CART et NPY/AgRP, qui reçoivent dans le même temps des informations de plusieurs parties du système nerveux central (SNC), en particulier du thalamus, du système limbique et des structures impliquées dans la mémoire, l'apprentissage et les émotions comme l'hippocampe, le striatum et l'amygdale (Farr, Li, and Mantzoros 2016) (Figure 28).

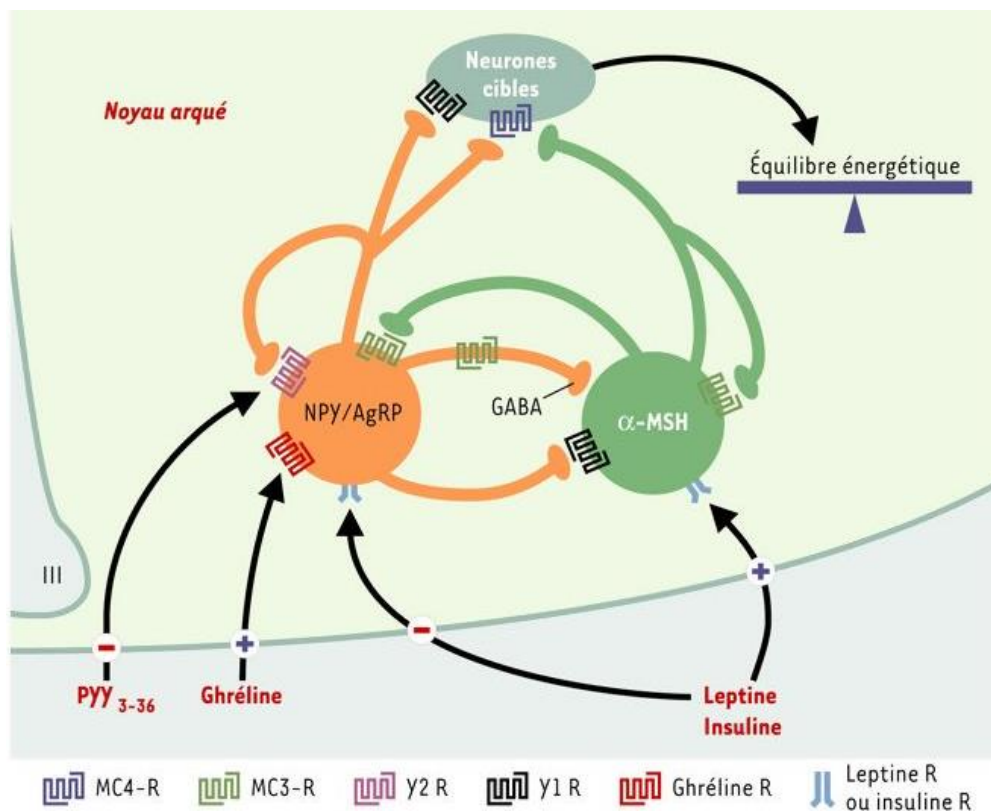


**Figure 28. Carte des connexions entre l'hypothalamus et d'autres régions du système nerveux central impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire**

Les différentes régions communiquent entre elles et avec l'hypothalamus pour contrôler l'apport énergétique. Il est important de noter que l'hypothalamus reçoit également des informations clés de la périphérie quant à la disponibilité en énergie. NAcc, nucleus accumbens; OFC, cortex orbitofrontal; SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area (Farr, Li, and Mantzoros 2016).

L'activité des neurones POMC/CART et NPY/AgRP est modulée par de multiples neurotransmetteurs et/ou hormones (Figure 29). Les afférences peuvent être inhibitrices, provenant de neurones à acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), donc GABAergiques, du noyau

dorso-médian et des populations voisines à NPY/AgRP, ou excitatrices, issues de neurones glutamatergiques/PACAP provenant de l'hypothalamus ventro-médian (Suyama and Yada 2018). Les neurones POMC/CART sont par ailleurs activés par la sérotonine (5-HT) *via* des projections issues du noyau du raphé (Heisler *et al.* 2002), ce qui a pour conséquence d'augmenter la sécrétion d' $\alpha$ -MSH. Les effets anorexigènes de la sérotonine et de la leptine sont considérés comme étant au moins en partie médiés par l'excitation des neurones POMC et l'inhibition de l'activité des neurones NPY/AgRP (Williams *et al.* 2010, Hill *et al.* 2008, Cowley *et al.* 2001, van den Top *et al.* 2004). La ghréline a l'effet inverse. Pour exercer son effet orexigène, elle excite les neurones NPY/AgRP en potentialisant la sécrétion de GABA sur les neurones POMC/CART afin de les inhiber (Cowley *et al.* 2003, Yang *et al.* 2011, van den Pol *et al.* 2009). Les effets de l'insuline sur les neurones POMC/CART et les neurones NPY/AgRP doivent être clarifiés en raison de résultats expérimentaux non concordants obtenus par des groupes indépendants (Cowley *et al.* 2001, Al-Qassab *et al.* 2009, Qiu *et al.* 2014).



**Figure 29. Schéma représentant la régulation de l'équilibre énergétique au niveau du noyau arqué**

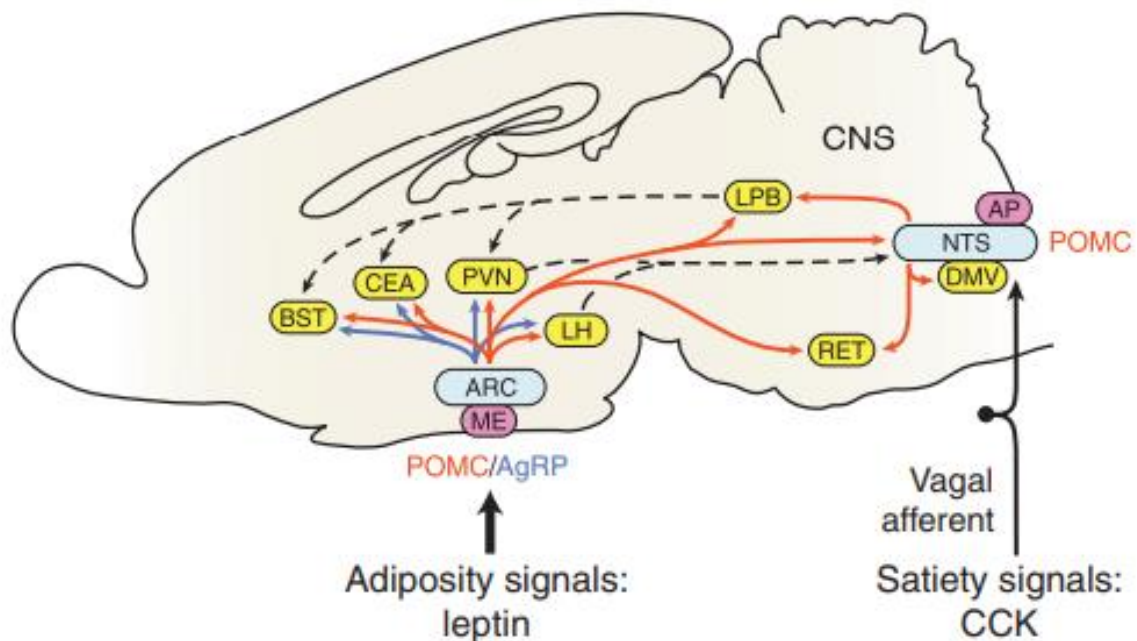
*Le NPY et l'AgRP produits par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus stimulent la prise alimentaire, tandis que l' $\alpha$ -MSH issue du clivage de la POMC l'inhibe. L'activité de ces*

deux populations neuronales est contrôlée par les hormones circulantes impliquées dans la régulation des comportements alimentaires. La leptine et l'insuline exercent leurs effets anorexigènes en freinant l'activité des neurones à NPY/AgRP et en stimulant les neurones à  $\alpha$ -MSH. La ghréline, libérée par l'estomac, stimule l'appétit en contrôlant positivement les neurones à NPY/AgRP. Le PYY3-36, qui est libéré par l'intestin en période post-prandiale, inhibe l'activité des neurones à NPY/AgRP en se liant au récepteur présynaptique Y2 (Y2R) du NPY. Les systèmes neuronaux producteurs de NPY/AgRP et d' $\alpha$ -MSH interagissent entre eux. Le NPY et le GABA (synthétisé par un tiers des neurones à NPY/AgRP) exercent un tonus inhibiteur sur les neurones à POMC. L'AgRP, qui agit comme un antagoniste naturel du récepteur des mélanocortines (MC4-R), bloque l'effet anorexigène de l' $\alpha$ -MSH. À l'inverse, l' $\alpha$ -MSH inhibe l'activité des neurones à NPY/AgRP et peut exercer un rétrocontrôle sur sa propre production via l'activation du récepteur MC3-R des mélanocortines. (Jegou et al. 2003).

## B. Les neurones à POMC

L'effet anorexigène des neurones à POMC a été mis en évidence en 1999, suite à l'invalidation de la POMC par délétion de l'exon 3, entraînant un phénotype d'hyperphagie et d'obésité (Yaswen et al. 1999). L'invalidation du récepteur MC4R qui a pour ligand l' $\alpha$ -MSH, un des produits de clivage de la POMC dans ces neurones, entraîne une hyperphagie et une obésité chez la souris, démontrant par une autre approche l'effet satiétogène du système à mélanocortine central (Fan et al. 1997). Chez l'Homme, des mutations dans les gènes de la POMC (Dubern et al. 2008, Farooqi et al. 2006) et du MC4R (Farooqi et al. 2003) corroborent les résultats obtenus dans les modèles murins. Au contraire, la suppression des récepteurs de la leptine (LepR) spécifiquement dans les neurones à POMC n'augmente pas la prise alimentaire (Balthasar et al. 2004), de même que la suppression ou la réactivation des récepteurs à la sérotonine 5-HT<sub>2</sub>CR dans ces neurones, malgré le développement d'une résistance à l'insuline (Berglund et al. 2013). Certains mettent en avant l'hétérogénéité des neurones à POMC dans leur réponse à la leptine et à la sérotonine pour expliquer ces résultats. Au total, les formes génétiques familiales représentent 40-70 % des formes d'obésité (Loos and Yeo 2021). Il est désormais possible de mettre en évidence l'importance de ces neurones en les activant spécifiquement par des méthodes d'optogénétique ou de stimulation chimio-génétique. L'excitation de 800 neurones à AgRP entraîne ainsi une prise de nourriture dans les minutes suivant la stimulation, ce qui démontre clairement que ces neurones sont directement engagés

dans les circuits de la prise alimentaire dénommés « voie centrale des mélanocortines » (Figure 30) (Aponte, Atasoy, and Sternson 2011, Zhan *et al.* 2013).

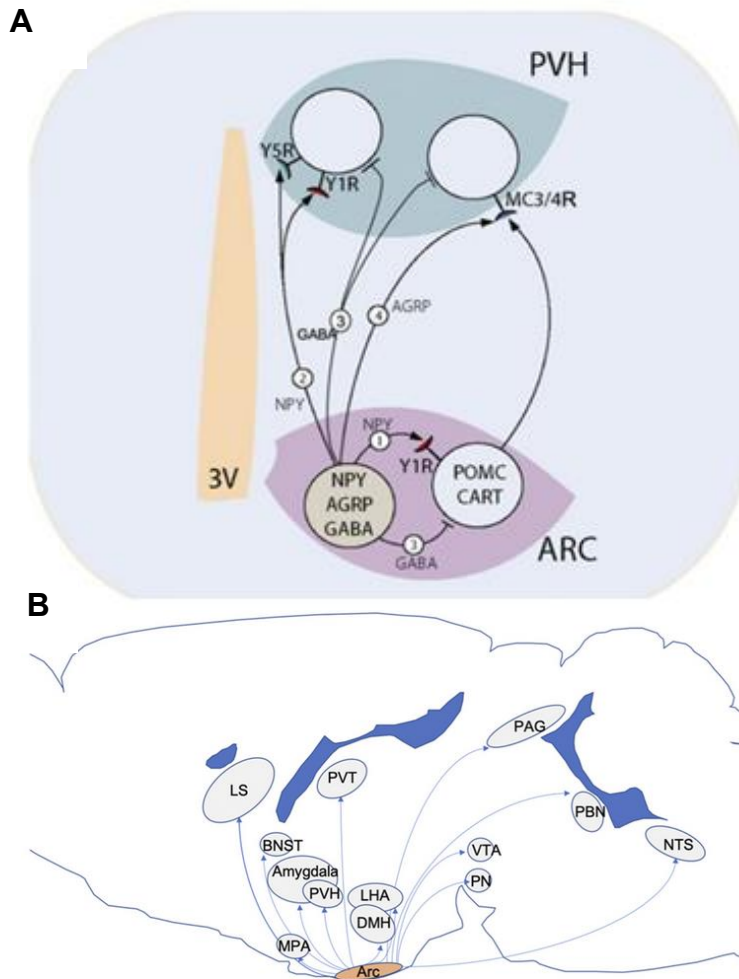


**Figure 30. Schéma de la voie centrale des mélanocortines**

Les neurones à POMC dans le noyau arqué de l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral sont tous deux adjacents aux organes circumventriculaires et reçoivent et intègrent respectivement des signaux de satiété provenant du tissu adipeux (leptine) et des afférences vagales (CCK). En bleu, noyaux contenant des neurones à POMC ; en magenta, organes circumventriculaires adjacents aux neurones à POMC ; en jaune, un petit échantillon de noyaux représentatifs contenant des neurones MC4R-positifs pouvant servir à intégrer les signaux de satiété ; flèches rouges, projections représentatives des neurones à POMC ; flèches bleues, projections représentatives des neurones à AgRP ; flèches en pointillées, projections secondaires reliant les neurones à POMC dans l'hypothalamus et le tronc cérébral avec des sites effecteurs communs ; AP, area postrema ; ARC, noyau arqué ; BST, noyau de lit de la stria terminalis ; CEA, noyau central de l'amygdale ; DMV, noyau moteur dorsal du nerf vague ; LH, aire hypothalamique latérale ; LPB, noyau parabrachial latéral ; ME, éminence médiane ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; RET, noyau réticulaire (Cone 2005).

### C. Les neurones à NPY

Le neuropeptide Y présente un éventail très large de fonctions importantes pour l'organisme, mais il est surtout connu pour ses effets orexigènes médiés par les neurones à NPY hypothalamiques. Tout comme les neurones à POMC/CART, les neurones à NPY sont contrôlés par une variété de facteurs périphériques qui signalent l'état énergétique de l'organisme au cerveau. Parmi eux, on trouve la leptine, l'insuline, mais aussi le peptide YY, tous réduisant l'expression du NPY. À *contrario*, ces neurones sont sensibles à la ghréline qui stimule l'expression du NPY et la prise alimentaire (Riediger 2012). L'effet orexigène de ces neurones est médié par les récepteurs Y1 et Y5 du NPY exprimés par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Zhang, Bijker, and Herzog 2011). Les neurones à NPY contiennent aussi deux autres neurotransmetteurs, le GABA et l'AgRP (Hahn *et al.* 1998). Le premier rôle de ces neurones est d'inhiber l'activité des neurones à POMC/CART anorexigènes (Cone 2005) et d'induire la prise alimentaire en stimulant le noyau paraventriculaire (Marsh *et al.* 1998) (Figure 31). L'AgRP est un antagoniste de l' $\alpha$ -MSH qui bloque son action sur les récepteurs MC3R/MC4R du noyau paraventriculaire. Alors que l'AgRP provoque une augmentation lente mais prolongée de l'appétence, le NPY entraîne une augmentation aiguë et transitoire de la prise alimentaire (Semjonous *et al.* 2009, Tang-Christensen *et al.* 2004). Plus récemment, les approches optogénétiques ont permis d'approfondir les recherches sur les neurones à NPY et de confirmer des résultats établis antérieurement. Ainsi, lorsqu'une stimulation lumineuse active spécifiquement les neurones à NPY de souris nourries à satiété, celles-ci se remettent à manger voracement dans la minute qui suit. La quantité de nourriture consommée et la latence de la consommation de nourriture est corrélée avec le nombre de neurones exprimant le canal-rhodopsine-2 (Aponte, Atasoy, and Sternson 2011)



**Figure 31. Schéma des voies de signalisation par lesquelles les neurones à NPY/AgRP contrôlent l'homéostasie énergétique**

A. (1) le NPY agit sur les récepteurs postsynaptiques Y1 situés sur les neurones à POMC/CART pour inhiber leur fonction ; (2) le NPY agit sur un ensemble différent de neurones postsynaptiques exprimant les récepteurs Y1 et Y5, principalement dans le PVH, pour favoriser la prise alimentaire ; (3) le GABA co-libéré inhibe les neurones à POMC/CART et d'autres cibles en aval ; (4) l'AgRP coexprimé antagonise l'effet de l'  $\alpha$ -MSH libérée par les neurones à POMC/CART, au niveau des récepteurs postsynaptiques MC3/4R. B. Schéma illustrant le réseau de projections issues des neurones à NPY. BNST, noyau de lit de la strie terminale ; DMH, noyau hypothalamique dorsomédian ; LHA, aire hypothalamique latérale ; LS, noyau septal latéral ; AMP, aire préoptique médiane ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PAG, gris périaqueducal ; PBN, noyau parabrachial ; PN, noyau paranigral ; PVT, noyau paraventriculaire du thalamus ; VTA, aire tegmentale ventrale (Zhang, Hernandez-Sanchez, and Herzog 2019).



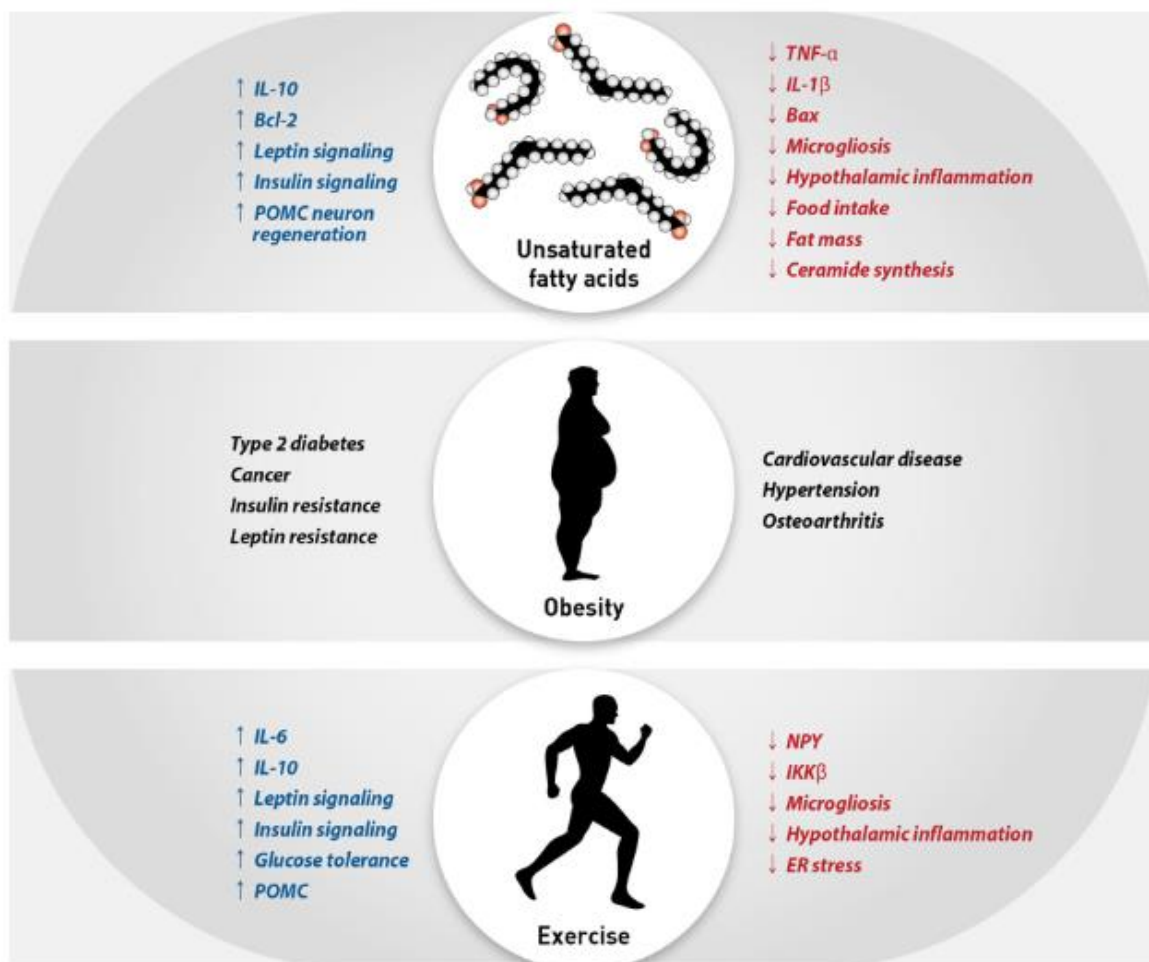
### III. Les causes d'un déséquilibre de la balance énergétique au niveau central

#### A. L'inflammation

Contrairement aux infections, aux lésions tissulaires et au stress qui peuvent déclencher une inflammation aiguë en tant que mécanisme de défense, l'obésité se manifeste par un état inflammatoire chronique de faible intensité, appelé métainflammation (Hotamisligil 2006), dans les tissus périphériques ainsi que dans le système nerveux central (Lumeng and Saltiel 2011).

En effet un régime hyperlipidique, dit *high fat diet* (HFD), entraîne la production de radicaux libres et une sécrétion élevée d'adipokines et de TNF- $\alpha$  qui entretiennent l'inflammation chronique systémique (Maurizi *et al.* 2018). Au cours des dernières années, l'inflammation hypothalamique a été mise en cause dans le développement et la progression de l'obésité et de ses séquelles. Elle est devenue non seulement un facteur important d'altération de l'équilibre énergétique, mais également un facteur de causalité dans la résistance à l'insuline associée à l'obésité, *via* l'altération des fonctions neuronales (Jais and Bruning 2017). Un régime HFD provoque l'activation des cytokines et des voies inflammatoires dans l'hypothalamus (De Souza *et al.* 2005). Trois jours de HFD sont suffisants pour réduire la sensibilité à l'insuline dans l'hypothalamus chez les rongeurs (Clegg *et al.* 2011). Ces processus précèdent en général les événements inflammatoires qui surviennent dans les tissus périphériques, le foie en particulier (Prada *et al.* 2005). En effet, les acides gras saturés tels que le palmitate et le stéarate sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et de s'accumuler spécifiquement dans l'hypothalamus, où ils abolissent la signalisation anorexigène de l'insuline et de la leptine et déséquilibrent ainsi la balance énergétique. Ces acides gras activent aussi les mécanismes de l'inflammation *via* les récepteurs TLR4, dont l'absence améliore la signalisation de l'insuline dans un modèle de résistance à l'insuline induite par les acides gras (Posey *et al.* 2009). L'activation des TLR4 entraîne aussi une cascade de signalisation pro-inflammatoire mettant en jeu les MAP kinases reliées aux voies JNK et P38. À plus long terme, les cytokines comme le TNF- $\alpha$  maintiennent l'activation de JNK impliquée dans la résistance à la leptine et à l'insuline. Le régime HFD altère aussi la plasticité synaptique des neurones à POMC et NPY, particulièrement à POMC, puisqu'ils sont les principales cibles de l'apoptose induite par l'inflammation (Moraes *et al.* 2009). Les altérations de la BHE sont fondamentalement impliquées dans le développement de l'inflammation hypothalamique (Thaler *et al.* 2013). Un régime HFD administré sur le long terme diminue

l'expression des protéines de jonction serrée au niveau des cellules endothéliales du cerveau et augmente la microgliose (Freeman and Granholm 2012), permettant l'infiltration de leucocytes dans le cerveau (Varvel *et al.* 2012). Il est aussi connu qu'un régime HFD stimule la voie de l'*inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit* IKKB/NF- $\kappa$ B, ce qui réduit à son tour la transduction du signal de la leptine au niveau central (Posey *et al.* 2009). L'ensemble de ces processus inflammatoires crée un environnement oxydant dans l'hypothalamus. L'un des leviers pour limiter les risques de morbidité et de mortalité associés au surpoids et à l'obésité est l'exercice physique. Il entraîne une réduction des taux sériques de cytokines pro-inflammatoires (Woods *et al.* 2012) et augmente la sensibilité à la leptine et à l'insuline en stimulant la production des interleukines anti-inflammatoires IL-6 et IL-10 (Ropelle *et al.* 2010) (Figure 32).



**Figure 32. Les acides gras insaturés et la pratique d'une activité sportive atténuent l'inflammation hypothalamique**

Diagramme récapitulatif montrant que l'obésité entraîne plusieurs comorbidités et que les acides gras insaturés et l'exercice physique présentent plusieurs effets bénéfiques contre l'inflammation, au niveau hypothalamique (Seong *et al.* 2019).

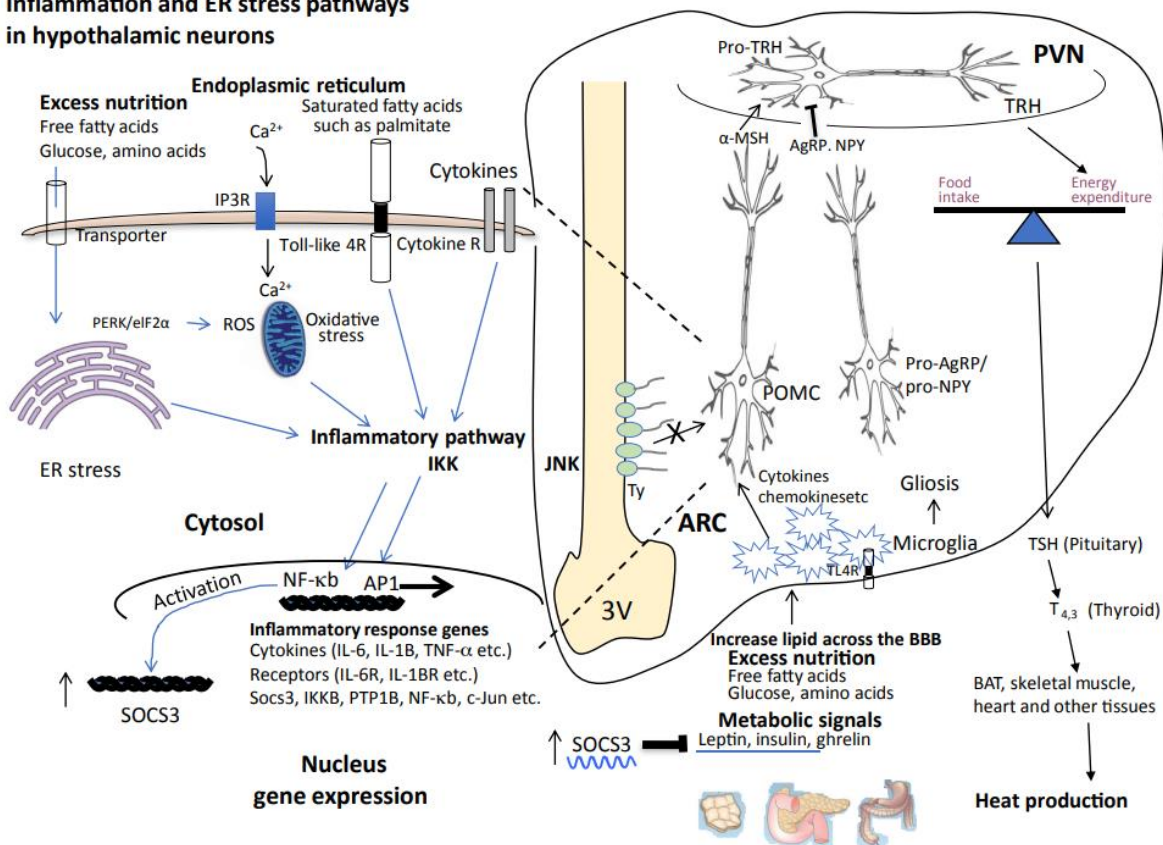
## B. Le stress du RE

Hormis l'inflammation, plusieurs autres hypothèses ont été proposées pour expliquer la résistance à la leptine. Il s'agit d'un défaut de transit de la leptine à travers la barrière hématoencéphalique pour atteindre le noyau arqué, d'une surexpression de molécules qui inhibent la voie de la leptine, ainsi qu'un stress du RE dans les neurones hypothalamiques. Il est à noter toutefois que le stress du RE est observé non seulement dans l'hypothalamus, mais aussi dans de nombreux tissus périphériques comme le foie et les tissus adipeux (Ozcan et al. 2004). L'apport calorique et la dépense énergétique sont sous le contrôle du NPY et de l' $\alpha$ -MSH, qui sont initialement synthétisés sous forme de précurseurs inactifs dans le RE rugueux. Le précurseur peut subir des modifications post-traductionnelles telles que la *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation. La protéine est ensuite clivée par les *prohormone convertases*, dans les granules de sécrétion (Tooze and Tooze 1986). Il est à noter que la POMC peut aussi être stockée dans des granules de sécrétion immatures qui la libèrent par la voie de la sécrétion constitutive et non régulée. L'abondance, la variété et les rôles biologiques des neuropeptides hypothalamiques soulignent l'importance de la maturation correcte des prohormones et des neuropeptides dans la régulation de l'homéostasie énergétique, qui repose sur une machinerie de CQ bien orchestrée. Le stress du RE est déclenché au niveau hypothalamique par un déséquilibre entre le taux de protéines mal repliées et la capacité de repliement du RE. Il existe de nombreux événements déclencheurs physiologiques ou pathologiques, notamment la privation de nutriments, le statut redox et la teneur en  $Ca^{2+}$  dans le RE (Kaufman 2002). Un stress du RE est décrit dans les deux principales populations de neurones du noyau arqué impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire. Le jeûne chez la souris entraîne dans les neurones à NPY/AgRP une augmentation des transcrits codant XBP-1s, ATF4, ATF6, différentes chaperonnes et sous-unités de la machinerie ERAD, ce qui collectivement traduit l'activation de la voie UPR (Henry *et al.* 2015). Un effet semblable est rapporté dans les neurones à POMC/CART chez la souris à jeun (Williams *et al.* 2014). Un tel stress perturbe la maturation de la POMC qui s'accumule dans le RE, alors que le taux de ses produits de clivage, l'ACTH et l' $\alpha$ -MSH, diminuent (Schneeberger *et al.* 2013, Cakir *et al.* 2013, Enriori *et al.* 2007). Les niveaux d'ARNm de la prohormone convertase 2 (PC2), responsable de la maturation de la POMC en  $\alpha$ -MSH, chutent chez les animaux sous régime HFD et l'infusion de molécules induisant un stress du RE au niveau de l'hypothalamus entraîne aussi une baisse des niveaux de PC2 et d' $\alpha$ -MSH (Cakir *et al.* 2013). Cependant, un traitement par la chaperonne chimique TUDCA rétablit la maturation de la POMC, un effet qui n'est pas observé avec les

populations à NPY/AgRP. Une étude récente montre d'une autre façon le rôle déterminant de la maturation dans les neurones à POMC. Chez la souris, la délétion de Sel1L, une protéine de la voie ERAD, dans les neurones à POMC de l'hypothalamus, mène à une résistance à la leptine et à une hyperphagie, mais sans stress du RE ni inflammation associée. Bien que les niveaux d'ARNm de la POMC restent inchangés, on observe une accumulation de la protéine au niveau du RE par manque de dégradation (Kim *et al.* 2018). Cette étude suggère donc l'existence d'un défaut de dégradation des protéines dans le phénotype obèse. Compte tenu de l'importance de la POMC et de ses produits de maturation dans la régulation de l'équilibre énergétique, ces résultats suggèrent que le maintien de l'homéostasie du RE est la clé de la production de peptides actifs dérivés de la POMC.

En conclusion, l'obésité est une pathologie multifactorielle qui résulte de l'activation de cascades de signalisation complexes liant inflammation, stress du RE et stress oxydant, à la fois dans le SNC et la périphérie (Figure 33).

#### Inflammation and ER stress pathways in hypothalamic neurons



**Figure 33. Illustration du rôle de l'inflammation hypothalamique et du stress du RE dans le développement de l'obésité**

Des changements rapides dans les cascades de signalisation liées à l'inflammation sont observés un jour après la consommation d'un régime HFD dans l'hypothalamus, qui est

*sensible aux acides gras saturés. L'inflammation hypothalamique peut être stimulée par l'administration aiguë d'acides gras saturés, sans induction d'inflammation systémique. La consommation d'un régime hypercalorique entraîne l'activation de la microglie dans le NA (ARC). Les astrocytes et la microglie résidents sont les cellules immunitaires innées du SNC, et il existe une interaction dynamique entre eux, y compris lors de l'inflammation centrale. La microglie activée peut induire l'activation d'une sous-population d'astrocytes en sécrétant des médiateurs inflammatoires dont l'IL-1 $\alpha$ , le TNF et le C1q, qui à leur tour affaiblissent la capacité neuroprotectrice des astrocytes, menant à la mort neuronale. L'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien est pris comme exemple de voie centrale régulant l'équilibre énergétique. Abréviations : ARC, noyau arqué ; BAT, tissu adipeux brun; BBB, barrière hémato-encéphalique ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; TRH, hormone de libération de la thyrotropine; TSH, hormone stimulant la thyrotropine; Ty, tanocytes ; 3V, troisième ventricule (Cakir and Nillni 2019).*

# Objectifs de la thèse

La SELENOT est une oxydoréductase de la famille des *thioredoxin fold proteins*, insérée dans la membrane du RE. Sa séquence primaire est très conservée au cours de l'évolution, ce qui est la traduction d'une fonction vitale qu'elle exerce à un stade précoce de l'embryogenèse quand son expression est maximale. Chez l'adulte, en revanche, elle est très peu exprimée sauf dans quelques tissus à activité sécrétoire, tels que le thymus et certains tissus endocrines. Le pancréas, en particulier, dépend de la SELENOT pour une production optimale d'insuline par les cellules  $\beta$ . On peut aussi mentionner les cellules chromaffines, dépendantes de la SELENOT pour le maintien du phénotype neuroendocrine. Les travaux menés jusqu'ici ont montré que la SELENOT limite le stress cellulaire dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Son action neuroprotectrice a ainsi été démontrée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Bien que le lien de causalité n'ait pas encore été établi, une étude pionnière a également proposé un rôle pour cette protéine dans la *N*-glycosylation, sur la base de son interaction physique avec certaines sous-unités du complexe OST.

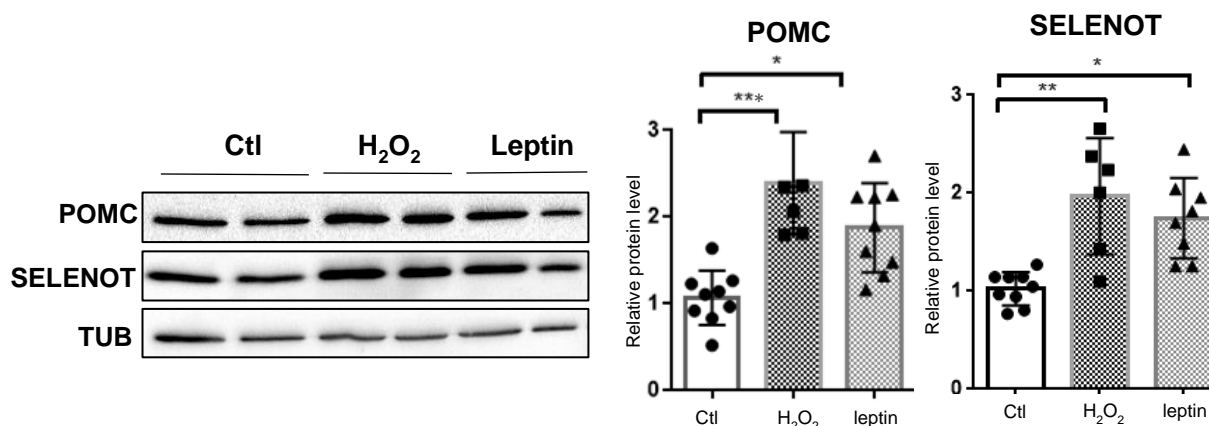
Ce projet de thèse visait à poursuivre ces travaux en explorant les mécanismes cellulaires contribuant au rôle neuroprotecteur de la SELENOT dans un modèle de neurones hypothalamiques à POMC. Ces neurones à sécrétion neuropeptidergique jouent un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire. Par ailleurs, ils présentent un dysfonctionnement du RE et de la sécrétion en contexte physiopathologique.

# Résultats

## I. L'expression de la SELENOT est stimulée par le stress oxydant et la leptine dans la lignée mhypoA-POMC

Il existe peu de modèles d'études des neurones hypothalamiques à POMC hormis la lignée mhypoA-POMC qui a été immortalisée à partir de l'hypothalamus de souris avec l'antigène T (Nazarians-Armavil *et al.* 2014). Ces cellules expriment la POMC et sécrètent l' $\alpha$ -MSH, elles répondent à l'insuline et au *ciliary neurotrophic factor*. Ces cellules expriment aussi la SELENOT, en accord avec les résultats de RNA-Seq obtenus à partir de neurones de souris POMC<sup>topazFP</sup> (Henry *et al.* 2015).

En accord avec la littérature (Nazarians-Armavil *et al.* 2014), l'expression de la POMC est stimulée dans les cellules mhypoA-POMC (1,87 ;  $p = 0,0012$  et 2,39 ;  $p = 0,0002$ ) en réponse à la leptine (100 nM) et à l' $H_2O_2$  (100  $\mu$ M), respectivement. L'expression de la SELENOT est aussi stimulée par la leptine et l' $H_2O_2$  (1,74 ;  $p = 0,0003$  et 1,96 ;  $p = 0,0048$ ) (Figure 34). La SELENOT fait donc partie de la voie de signalisation de la leptine et du stress oxydant.

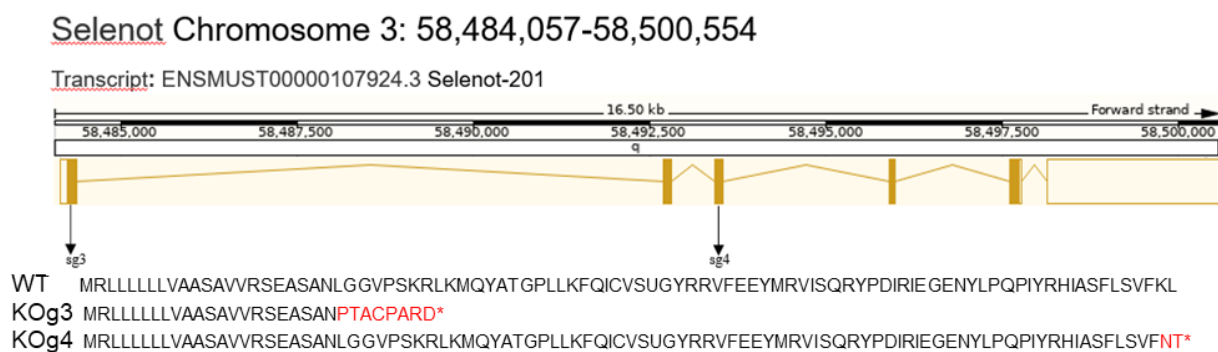


**Figure 34. Analyse par western blot de l'expression des protéines POMC et SELENOT dans les cellules mhypoA-POMC traitées à l' $H_2O_2$  ou à la leptine**

La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge interne. Les niveaux relatifs de protéines ont été mesurés avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$  ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; test U de Mann-Whitney).

## II. Invalidation du gène *selenot* dans la lignée mhypoA-POMC

Pour élucider le rôle de la SELENOT dans les cellules mhypoA-POMC, nous avons adopté une stratégie de KO. Une lignée cellulaire mhypoA-POMC (KOg3) déplétées en SELENOT a été produite en utilisant la technologie CRISPR Cas9 par la méthode *non-homologous end joining* (NHEJ). Le guide (sg3) a été sélectionné à partir de *crispr.mit.eu.edu* pour générer un codon stop précoce dans la région codante de la SELENOT et causer un arrêt prématuré de la traduction. Pour s'affranchir des effets hors cible (*Off-target*) toujours possibles, une seconde lignée KO pour la SELENOT (KOg4) a été générée par l'utilisation d'un deuxième guide (sg4) (Figure 35).

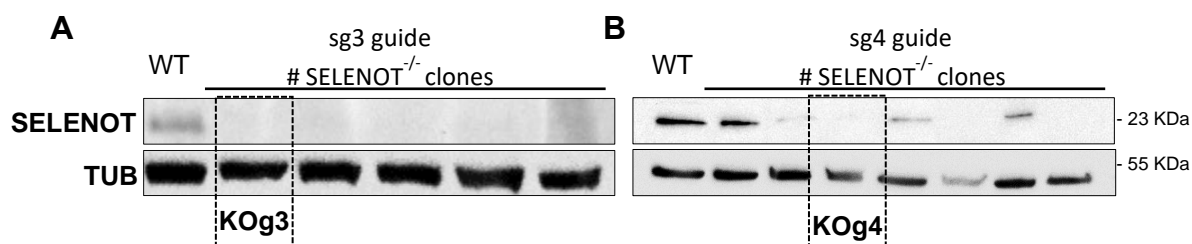


**Figure 35. Guides utilisés pour invalider le gène *selenot* par l'approche CRISPR-Cas9**

*Représentation schématique du gène selenot de souris montrant les positions (flèches) des deux guides (sg3 et sg4) utilisés pour invalider l'expression de la SELENOT dans les cellules mhypoA-POMC, et l'interruption de la séquence codante de la SELENOT dans les clones sélectionnés pour chaque guide.*

Les guides ont été clonés dans le vecteur TLCV2 afin d'exprimer la Cas9 et la GFP de façon inductible. Pour chacun d'entre eux, plusieurs clones cellulaires invalidés ont été dérivés d'une cellule unique sélectionnée par cytométrie en flux sur la base de l'expression induite de la GFP. L'absence de SELENOT a été confirmée après analyse par western blot (Figure 36). Le clone KOg3 obtenu avec le guide sg3 a été principalement utilisé dans la suite de l'étude, le clone KOg4, développé à partir du guide sg4, ayant servi à valider des résultats les plus pertinents.



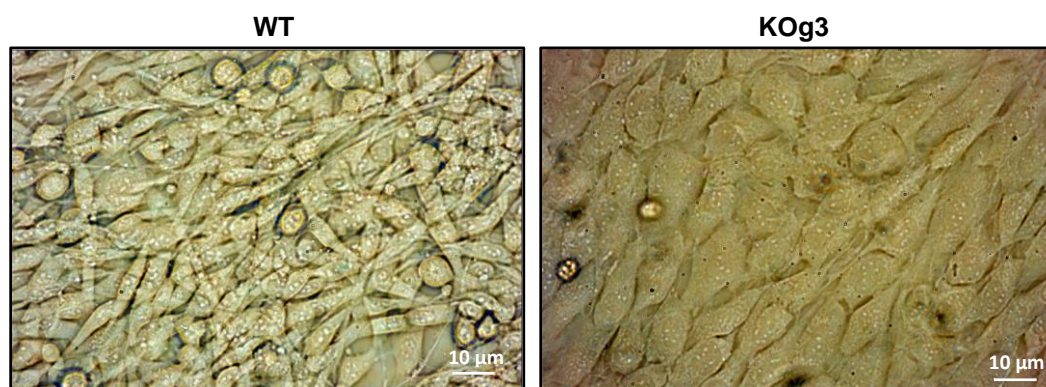


**Figure 36. Analyse par western blot de l'expression de la SELENOT dans différents clones invalidés à l'aide des guides Sg3 ou Sg4**

A. Les clones désignés KOg3 et B. KOg4 ont été sélectionnés pour la suite de l'étude. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge interne.

### III. Étude du phénotype des cellules mhypoA-POMC KO SELENOT

Des changements morphologiques importants ont été observés entre les lignées cellulaires KO pour la SELENOT et les cellules sauvages, parmi lesquels une perte de la forme fusiforme et une augmentation de la taille (Figure 37).

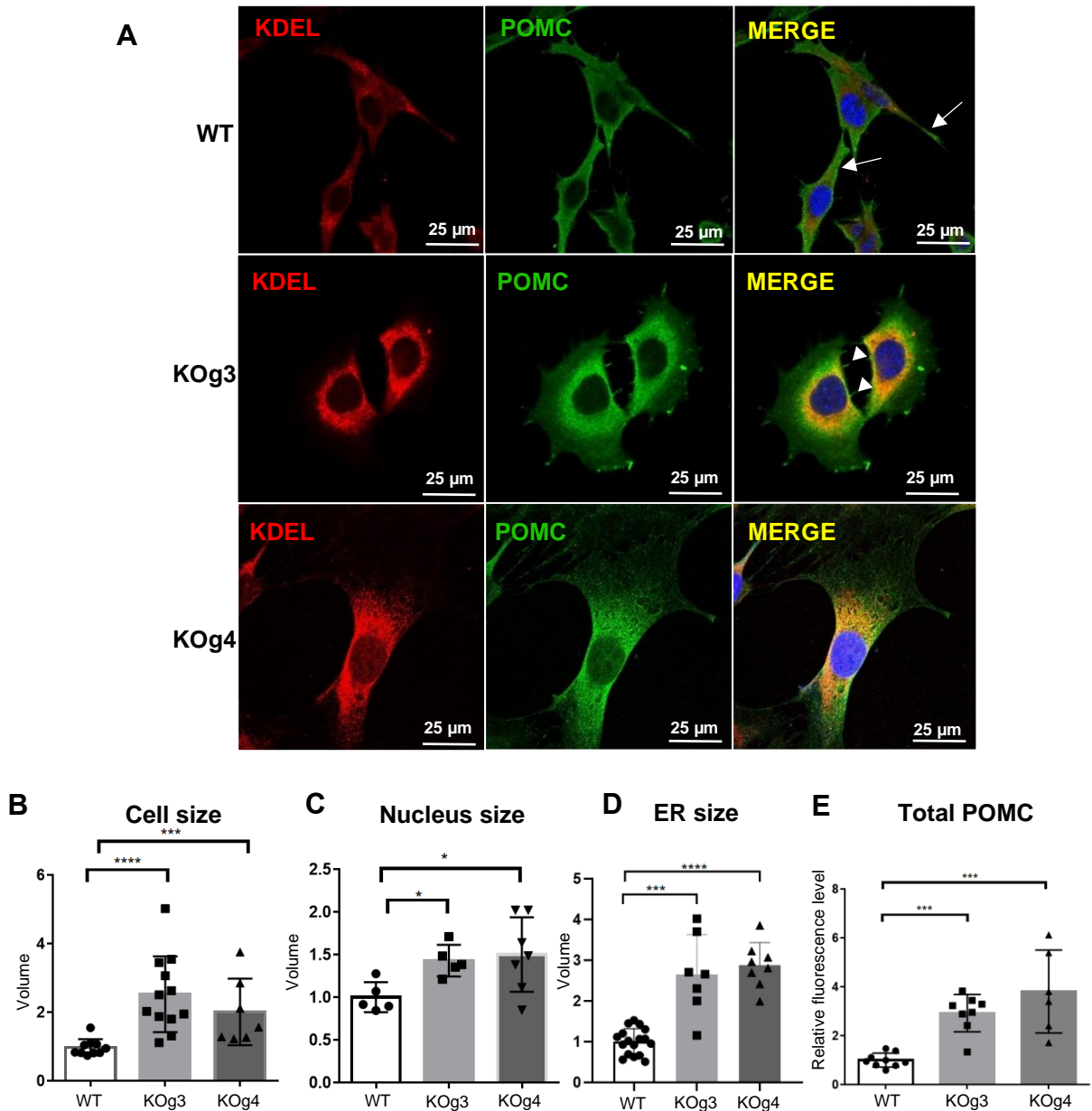


**Figure 37. Morphologie des cellules mhypoA-POMC sauvages et de la lignée KOg3 observée en microscopie à lumière transmise**

#### A. Taille du RE, production de POMC et d' $\alpha$ -MSH

La taille du RE et l'expression de la POMC ont été étudiées par immunofluorescence. En plus de l'augmentation globale de la taille des cellules déjà constatée après observation en lumière transmise (2,52 ;  $p < 0,0001$  pour KOg3 et 2,00 ;  $p = 0,0007$  pour KOg4) (Figure 38 A, B), nous avons remarqué un accroissement de la taille des noyaux (1,43 ;  $p = 0,0159$  pour KOg3 et 1,50 ;  $p = 0,0480$  pour KOg4) (Figure 38 A, C). Ceux-ci étaient parfois dupliqués et présentaient des micronoyaux. Le RE, marqué à l'aide d'un anticorps anti-KDEL (térapeptide qui agit comme signal de rétention dans le RE), était plus étalé (2,65 ;  $p = 0,0001$  pour KOg3

et 2,88 ;  $p < 0,0001$  pour KOg4) (Figure 38A, D), mais sans altération notable de sa structure (cisternes et tubules).

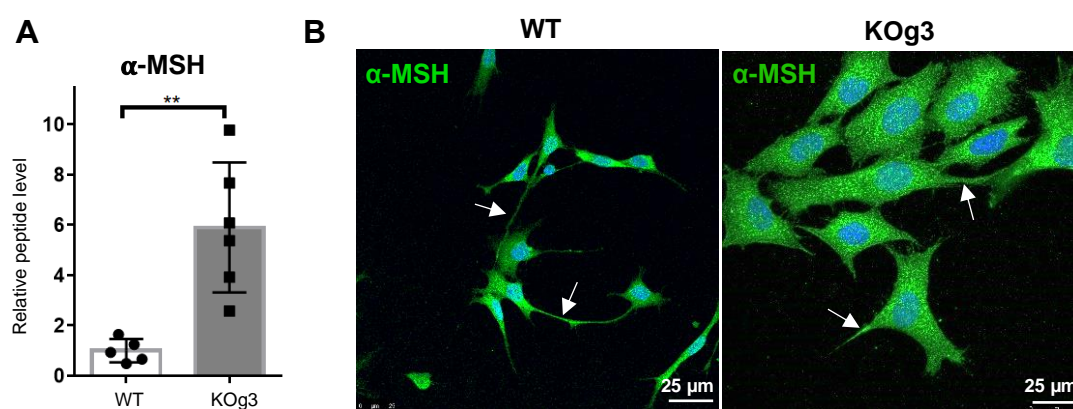


**Figure 38. Analyse par immunofluorescence de la morphologie du RE et de l'expression de la POMC dans les cellules mhyoA-POMC WT et SELENOT<sup>-/-</sup>**

A. Les cellules ont été immunomarquées par un anticorps anti-KDEL (rouge) et anti-POMC (vert). Les flèches blanches montrent les neurites, les têtes de flèche blanche, les filipodes. B. Les tailles et les intensités totales d'immunofluorescence ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$  ; \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , test U de Mann-Whitney).

L'expression de la POMC était, elle aussi, significativement augmentée (2,92 ;  $p = 0,0003$  pour KOg3 et 3,80 ;  $p = 0,0004$  pour KOg4) (Figure 38 A, E), comme la production d' $\alpha$ -MSH détectée soit par dosage ELISA (5,90 ;  $p = 0,0043$  pour KOg3 et 2,00 ;  $p = 0,019$  pour KOg4) (Figure 39 A), soit par immunofluorescence (Figure 39 B). L' $\alpha$ -MSH a été observée dans les granules de sécrétion au niveau du corps cellulaire des cellules WT et KO, ainsi que dans les axones et dendrites des cellules WT, et à la naissance des prolongements nettement plus courts ou immatures dans les cellules KO que dans les cellules sauvages (Figures 38 A, 39 B).

Les cellules mhypoA-POMC KO pour la SELENOT demeurent donc métaboliquement actives en dépit d'un phénotype neuronal altéré.



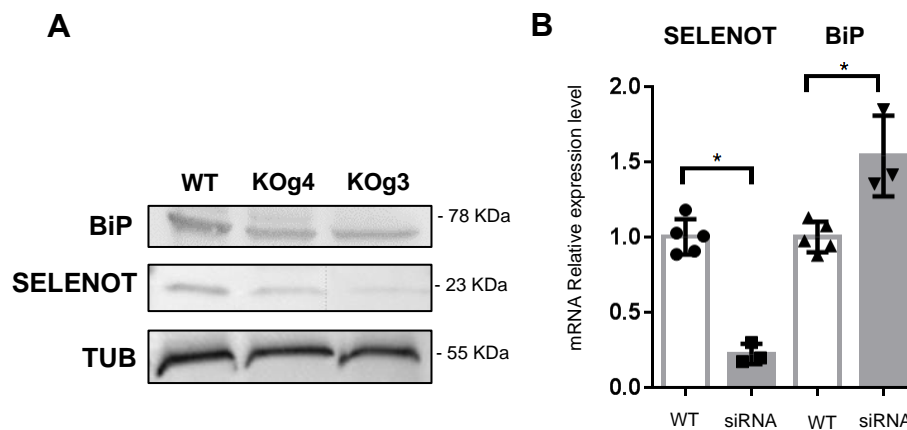
**Figure 39. La déplétion de la SELENOT n'altère pas la production d' $\alpha$ -MSH**

A. Analyse par dosage ELISA de la concentration d' $\alpha$ -MSH contenue dans les cellules WT et KOg3. Les données sont normalisées par rapport au contrôle WT et aux protéines totales. Chaque valeur est la moyenne  $\pm$  SEM ( $n < 5$ ,  $** p < 0,01$  ; test U de Mann-Whitney). B. Cellules mhypoA-POMC WT et KO immunomarquées par un anticorps anti  $\alpha$ -MSH (vert). Le marquage sous la forme de vésicules de sécrétion est présent jusque dans les prolongements (flèches blanches).

### B. Stress du RE, apoptose et sénescence

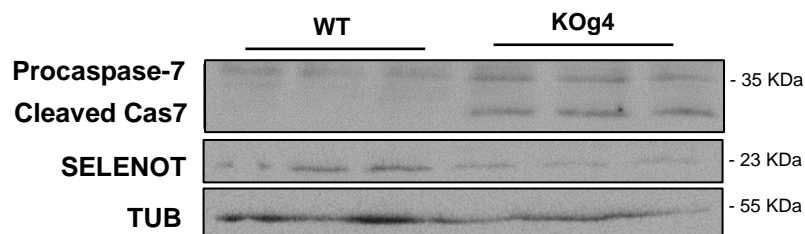
Dans les cellules corticotropes AtT20, les travaux d'Hamieh *et al.* (Hamieh *et al.* 2017) ont montré que l'inhibition de l'expression de la SELENOT par des shRNA entraîne un stress du RE, l'activation de la réponse UPR et la surexpression de BiP. De façon surprenante, dans les cellules mhypoA-POMC<sup>SELENOT<sup>-/-</sup></sup>, l'expression de la protéine BiP n'est pas augmentée, voir plutôt diminuée, suggérant un phénomène d'adaptation au manque de SELENOT à long terme (Figure 40 A). Cependant une inhibition de l'expression de la SELENOT de 77% (0,23 ;  $p =$

0,0253), induite par un traitement des cellules mhypoA-POMC avec un siRNA dirigé contre les ARNm *selenot*, entraîne une surexpression des ARNm de BiP de 54% après 48 h (1,54 ;  $p = 0,0253$ ) (Figure 40 B), conformément aux résultats obtenus dans les cellules corticotropes. Comme le stress du RE prolongé favorise l'apoptose *via* l'inhibition p53-dépendante de l'expression de BiP (Lopez *et al.* 2017), nous avons étudié l'expression d'un marqueur de l'apoptose dans les lignées KO pour la SELENOT. Nous avons observé dans les cellules KO SELENOT la présence de la forme clivée de la caspase 7 (Cas7), une caspase effectrice qui, avec la caspase 3, clive un large éventail de substrats au cours du processus apoptotique (Figure 41).



**Figure 40. Différents niveaux de BiP dans les cellules mhypoA-POMC stablement ou transitoirement déplétées en SELENOT**

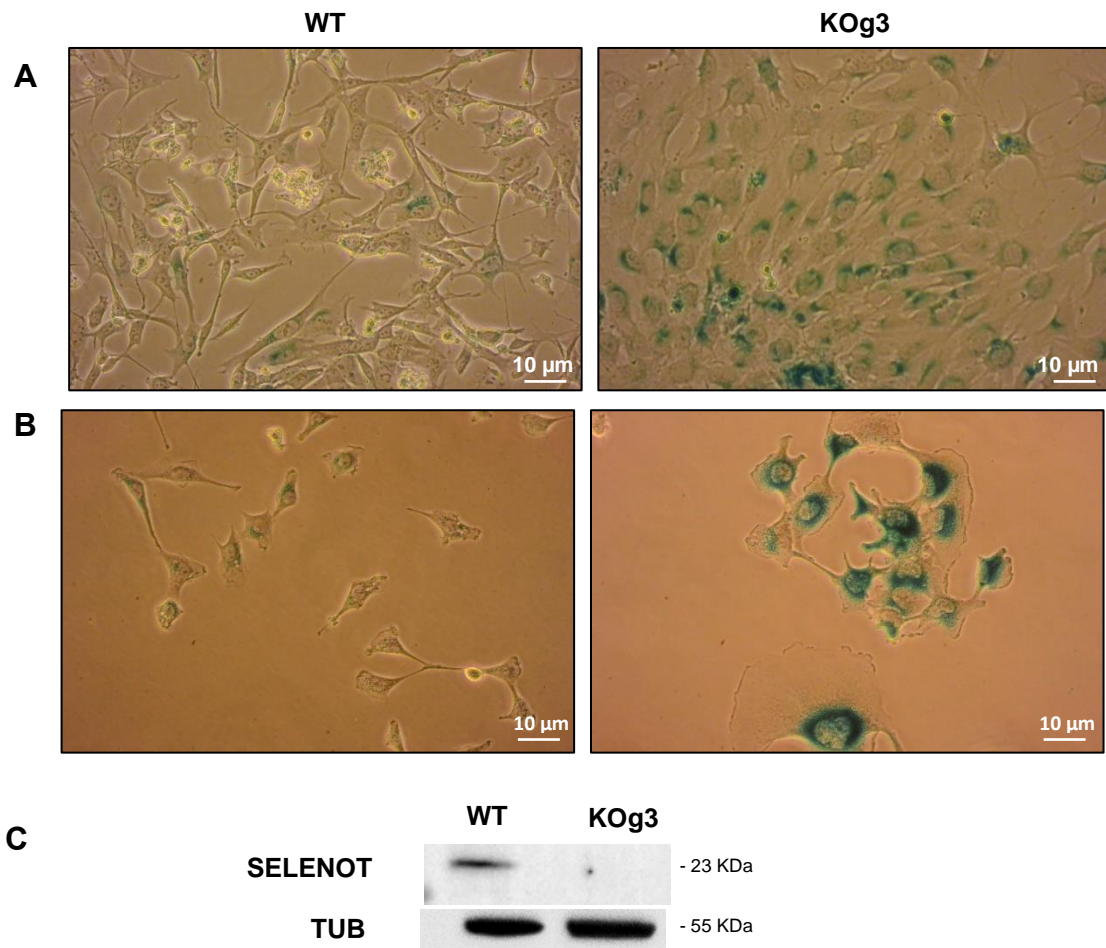
*A. Exemple représentatif de western blot montrant l'expression de BiP dans les cellules KO pour la SELENOT ; la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge interne. B. Analyse par qRT-PCR de l'expression de BiP dans la lignée mhypoA-POMC dont les taux de SELENOT ont été réduits par ARN interference. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  ;  $*p < 0,05$  ; test U de Mann-Whitney).*



**Figure 41. Analyse par western blot du clivage de la caspase 7 dans les cellules KO**

*La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge interne. Le clone KOg4 est représentatif du clone KOg3. Cas 7, caspase 7*

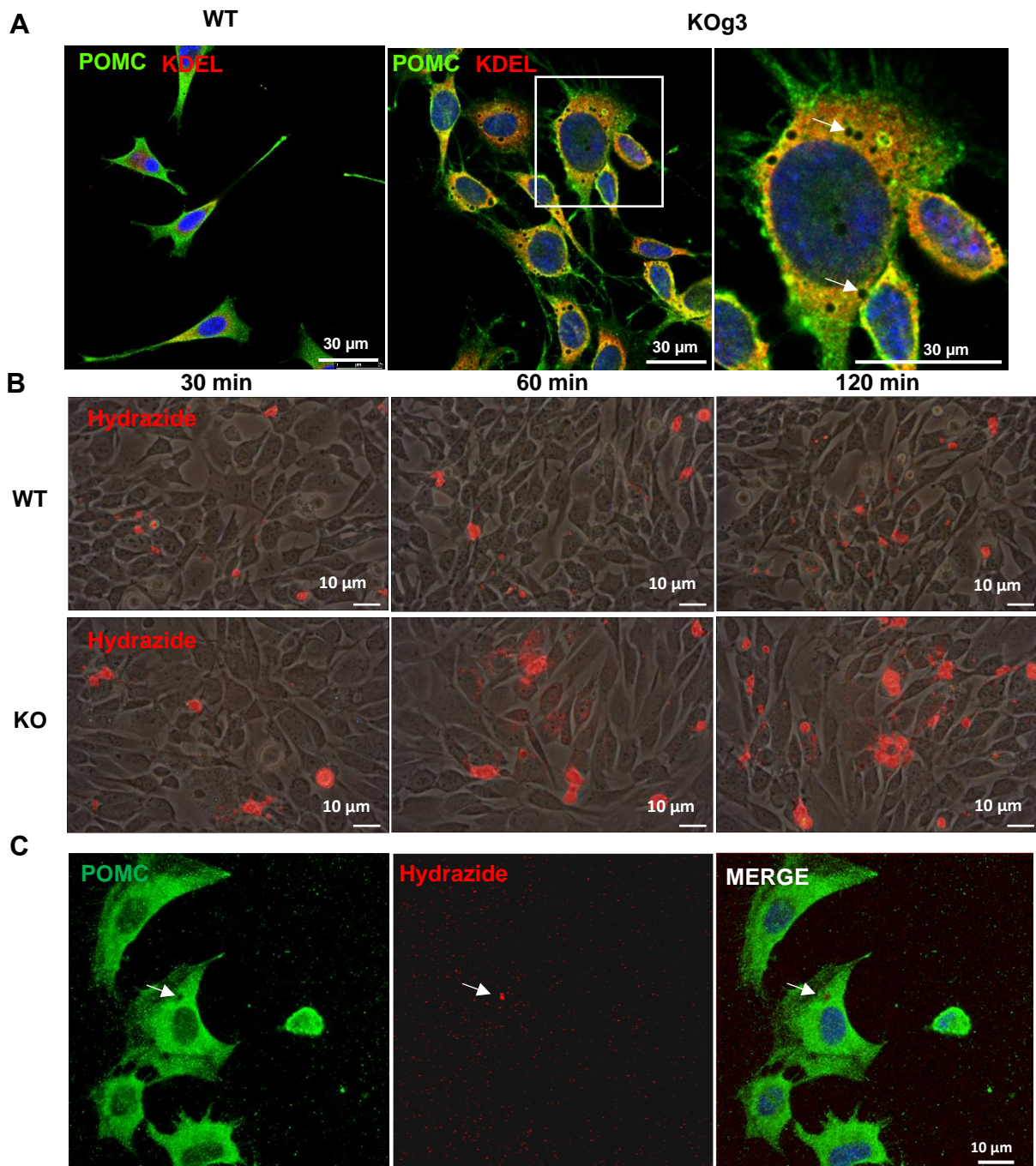
En fait, la morphologie très particulière des cellules dépourvues de SELENOT, qui adoptent un aspect élargi et aplati (~ 33 % de réduction de la hauteur), avec de nombreuses vacuoles, des noyaux très gros, des micronoyaux satellites et un RE très étalé est très proche de celle de cellules sénescents (Denoyelle *et al.* 2006). Nous avons donc étudié l'activation d'un programme de sénescence dans ces cellules en recherchant la présence d'une activité  $\beta$ -galactosidase active à pH 4 dans les lysosomes (de Mera-Rodriguez *et al.* 2021). Nous avons observé dans les cellules *mhypoA-POMC* déplétées en SELENOT une forte augmentation du marquage bleu foncé correspondant au produit insoluble généré par l'hydrolyse du X-gal (un composé incolore et soluble constitué de galactose lié à un indole) par la  $\beta$ -galactosidase (Figure 42 A). Une coloration intense a également été observée dans la lignée cellulaire PC12 invalidée pour la SELENOT par la technique CRISPR-cas9 (guide sg3) que nous n'avons pas réussi à maintenir en culture (Figure 42 B, C).



**Figure 42. Observation de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans des cellules *mhypoA-POMC* et PC12 sauvages et *SELENOT*<sup>-/-</sup> par microscopie à lumière transmise**

A. cellules *mhypoA-POMC* B. cellules PC12. C. western blot montrant l'inactivation de la *SELENOT* dans les cellules PC12. Coloration bleu foncé : activité  $\beta$ -galactosidase.

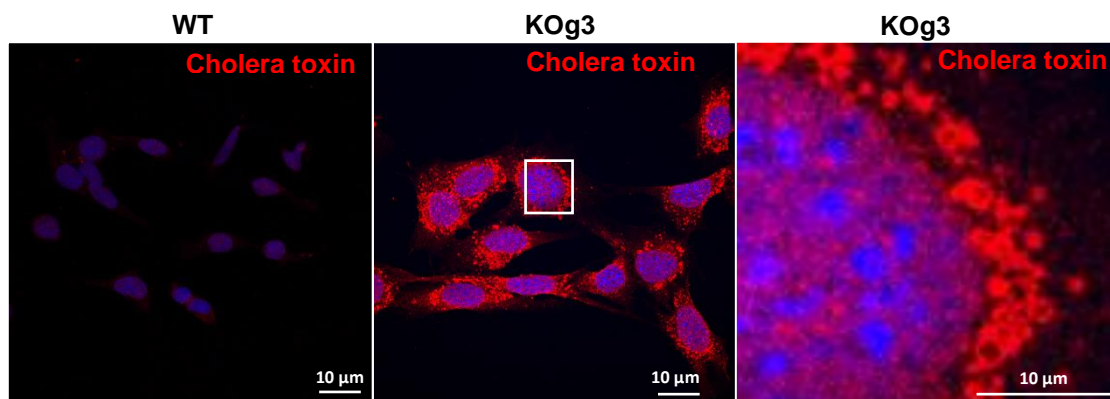
La sénescence se caractérise par la présence de vacuoles. De fait, les cellules KO abritent souvent de grosses vacuoles (Figure 43 A) générées par un processus d'endocytose comme le montre une internalisation en fonction du temps de l'hydrazide couplée à l'Alexa Fluor 594, une molécule de faible poids moléculaire qui ne passe pas la membrane plasmique (Figure 43 B). Il existe de nombreux mécanismes d'endocytose (Renard and Boucrot 2021) (dépendants et indépendants de la clathrine, dépendants de la cavéoline, macropinocytose, etc.) qui tiennent une place importante dans le recyclage membranaire et inhibent la croissance axonale et la migration cellulaire (Lin, Mintern, and Gleeson 2020, Delgado, Rivera, and Lennon-Dumenil 2022). Dans ce modèle, la taille des vacuoles suggère un phénomène de macropinocytose.



**Figure 43. Observation par microscopie confocale à balayage laser d'un processus d'endocytose dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup>**

A. Mise en évidence de grosses vésicules dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup> immunomarquées avec un anticorps anti-POMC (vert) et anti-KDEL (rouge). B. Imagerie *in vivo* de cellules *mhypoA-POMC* sauvages et KO incubées en présence d'hydrazide Alexa Fluor 594 pendant 30, 60 et 120 minutes. Les images constituent un overlay des prises de vue en microscopie à lumière transmise et à fluorescence. C. Les cellules KO fixées montrent une internalisation de l'hydrazide Alexa Fluor 594 au niveau d'une vésicule après une heure d'incubation (flèche blanche).

La sénescence s'accompagne aussi d'une augmentation des taux de gangliosides à la surface des cellules, un mécanisme qui contribue à la résistance à l'insuline (Sasaki, Itakura, and Toyoda 2015). Dans les neurones, les gangliosides (GM1) sont normalement présents au niveau des membranes des neurites, où leur regroupement induit des protrusions membranaires vers l'extérieur favorisant la croissance neuritique (Kuo and Paszek 2021). Alors que les cellules sauvages sont peu marquées par la toxine cholérique qui lie les GM1, un marquage beaucoup plus intense est détecté dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup> où il se présente sous la forme de vésicules internalisées (Figure 44).

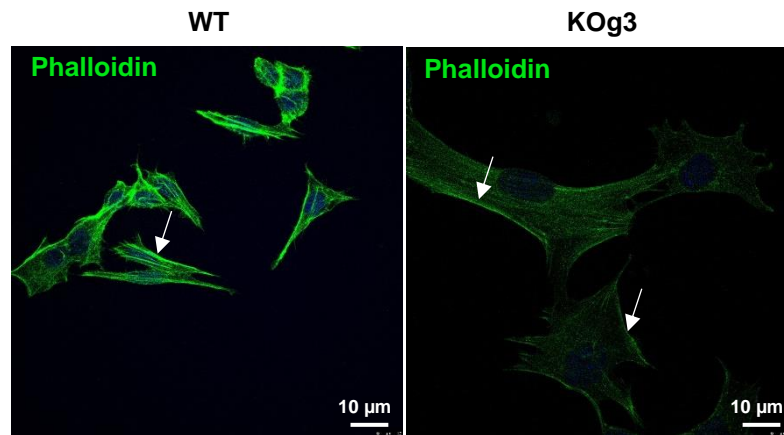


**Figure 44. Observation au microscope confocal à balayage laser des gangliosides GM1 dans les cellules sauvages et SELENOT<sup>-/-</sup>**

*Le marquage à la toxine cholérique (rouge), plus intense dans les cellules déplétées en SELENOT, se concentre sous la forme de vésicules dans le cytoplasme*

Enfin, le marquage à la phalloïdine-Alexa Fluor 488, un marqueur de l'actine filamenteuse et des fibres de stress, révèle la présence d'un réseau dense de microfilaments sous forme de câble dans les cellules sauvages. Ce réseau est nettement moins dense dans les cellules

dépourvues de SELENOT. Il est toutefois visible dans les filopodes, de fines protrusions cellulaires d'environ une centaine de nanomètre capables de déformer la membrane (Figure 45).



**Figure 45. Observation par microscopie confocale à balayage laser du cytosquelette d'actine dans les cellules mhypoA-POMC WT et SELENOT<sup>-/-</sup>.**

*Les microfilaments d'actines moins denses les cellules KO SELENOT, forment des câbles visibles au niveau des filopodes (flèches blanches).*

En conclusion, l'absence de SELENOT dans les neurones entraîne un aplatissement de la cellule, son élargissement et l'augmentation de la taille du noyau, un étalement du RE et de nombreuses vacuoles, une morphologie caractéristique de l'activation d'un programme de sénescence. La distribution des fibres de stress est affectée et le phénotype neuronal altéré. Une augmentation de l'endocytose est observée ainsi qu'une internalisation des gangliosides, des phénomènes connus pour bloquer l'extension des neurites. En revanche, les cellules KO conservent une activité de production de glycohormones.

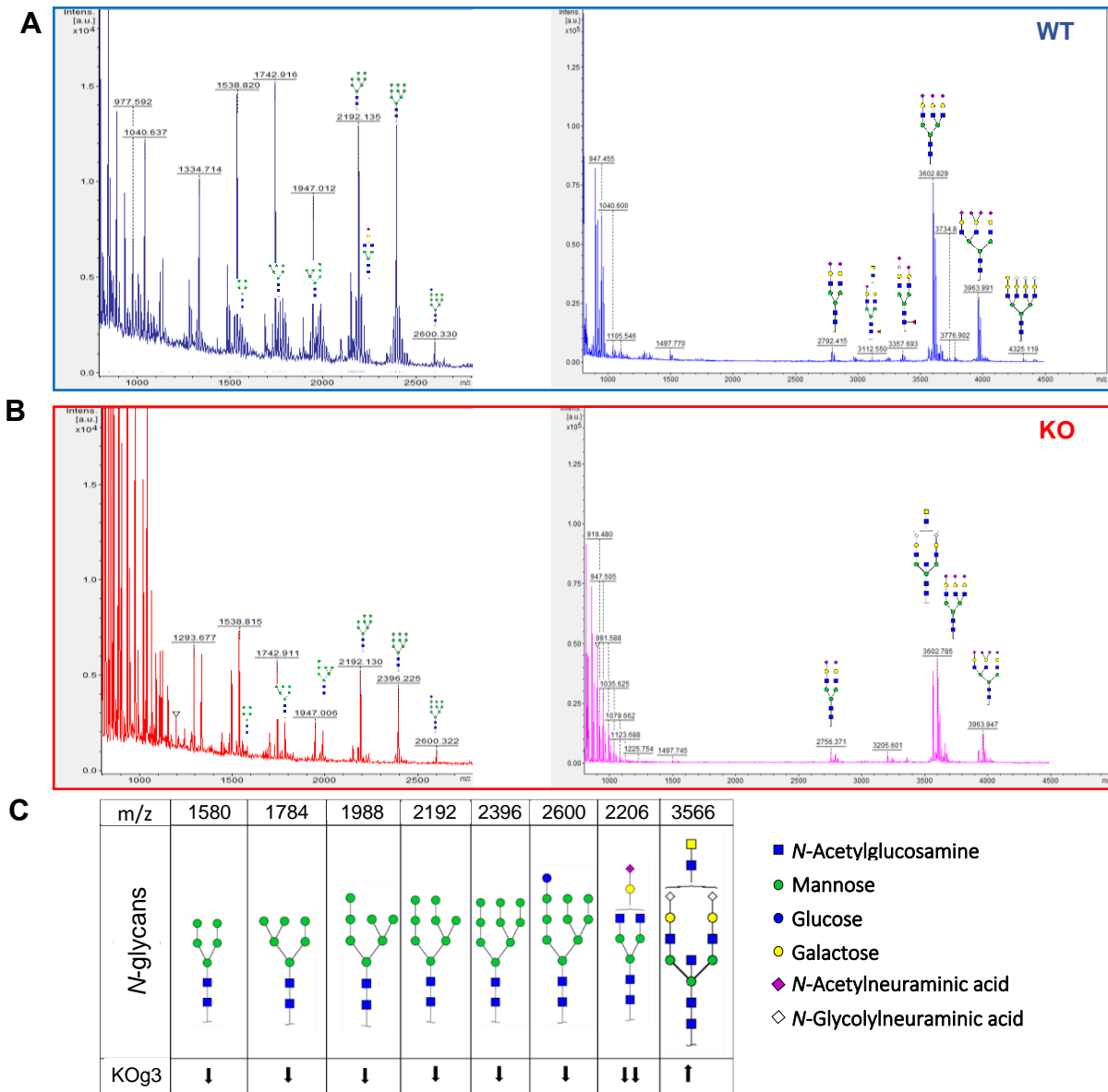
#### IV. Anomalies de la N-glycosylation des neurones SELENOT KO

L'activation de la sénescence est observée lorsque la synthèse globale des sélénoprotéines est inhibée (Lee *et al.* 2022), mais le rôle de chacune d'entre elle dans ce processus n'a jamais été étudié. Nos travaux antérieurs montrent que la SELENOT interagit avec les membres du complexe OST dans les cellules AtT20 et que l'absence de SELENOT entraîne une baisse d'expression des formes N-glycosylées de la POMC (Hamieh *et al.* 2017). Afin d'étudier la relation entre la SELENOT et la N-glycosylation, nous avons caractérisé les N-glycomes des cellules mhypoA-POMC sauvages et déficientes en SELENOT en



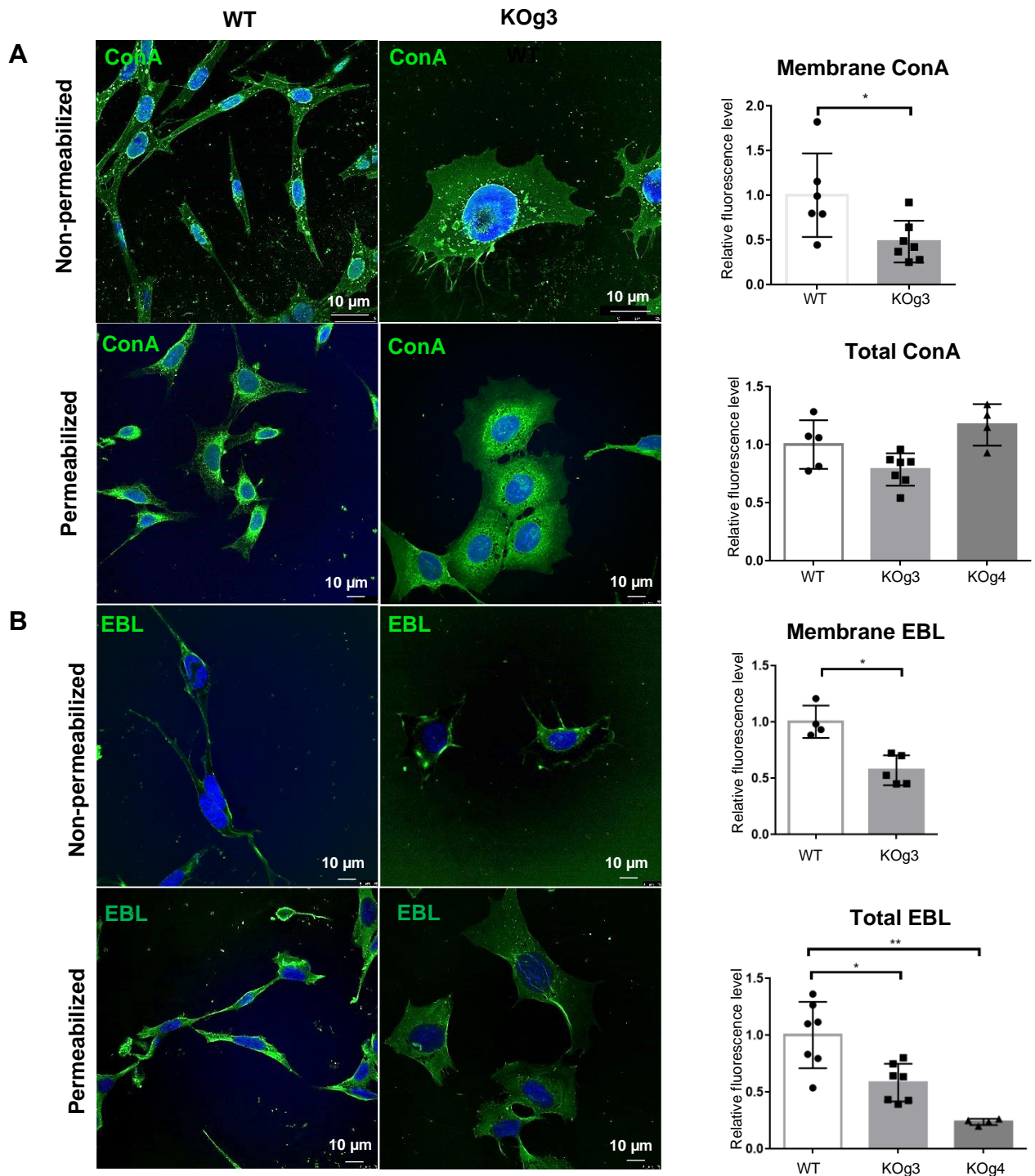
collaboration avec Muriel Bardor du laboratoire GlycoMev (EA4358, Université de Rouen Normandie) et Philippe Chan (Plateforme protéomique PISSARO, Université de Rouen Normandie). Les protéines totales des lignées sauvages et invalidées pour la SELENOT (KOg3) ont été digérées avec la PNGaseF, une peptide *N*-glycosidase qui coupe entre les résidus GlcNAc et Asn, et les *N*-glycanes issus de ce clivage ont été purifiés puis perméthylés afin de réaliser une analyse par spectrométrie de masse. L'analyse des profils de *N*-glycosylation révèle une baisse globale des *N*-glycanes dans les cellules invalidées pour la SELENOT. Les oligomannoses M5 à M9 sont détectés dans les cellules sauvages et KO (Figure 46 A-C). Par contre, il semble y avoir une tendance à la perte spécifique dans les cellules SELENOT KO de *N*-glycanes monosialylés, tels que A2G1, A2G2, A2G1F, A2G2F et A2G1 sulfaté, et au contraire une augmentation de certains *N*-glycanes oligosialylés. Comme indiqué dans la littérature, les deux types d'acides sialiques présents chez la souris, Neu5Ac et Neu5Gc sont retrouvés dans cette analyse (le Neu5Gc est absent chez l'Homme). Cette analyse, réalisée deux fois, n'a pas pu être quantifiée pour le moment, une analyse supplémentaire devra être réalisée.

L'incubation des cellules avec une lectine qui reconnaît les *N*-glycanes riches en mannose, la concanavaleine A (ConA) couplée à l'Alexa Fluor 647, en présence ou en absence de triton, montre un marquage intracellulaire équivalent entre les lignées sauvages et KO (0,79 ;  $p = 0,1490$  pour KOg3 et 1,17 ;  $p = 0,2857$  pour KOg4), mais une diminution significative de la quantité de *N*-glycanes à la membrane plasmique (0,57 ;  $p = 0,0159$ , KOg3), (Figure 47 A). En revanche, l'incubation avec la lectine *Sambucus nigra* (SNA/EBL I+II), une lectine se liant aux *N*-glycanes sialylés, révèle une diminution des espèces sialylées membranaires (0,48 ;  $p = 0,0221$ , KOg3) et intracellulaires (0,54 ;  $p = 0,0061$  pour KOg3 et 0,28 ;  $p = 0,0111$  pour KOg4) dans les cellules KO par rapport aux cellules sauvages (Figure 47 B). Ces données suggèrent que la SELENOT n'est pas impliquée dans l'assemblage du précurseur oligosaccharidique puisque tous les oligomannoses sont présents dans les cellules invalidées pour la SELENOT. La disparition d'espèces monosialylées et l'augmentation d'espèces oligosialylées est plus surprenante puisque les sialyltransférases, les enzymes catalysant la sialylation, sont présentes dans l'appareil de Golgi. Ce résultat pourrait traduire l'inhibition de la *N*-glycosylation de glycoprotéines spécifiques qui seraient porteuses de ces glycanes.



**Figure 46.** Analyse par spectrométrie MALDI-TOF du N-glycome des cellules WT et SELENOT<sup>-/-</sup>

A, B. Profils des ions des spectres de masses obtenus à partir des cellules sauvages et KO suite à l'analyse par spectrométrie MALDI-TOF des N-glycannes libérés et perméthylés. Les profils de gauche correspondent aux fractions 50 % d'acétonitrile qui contiennent notamment les oligomannoses et certaines espèces monosialylées. Les profils de droite correspondent aux fractions 75 % d'acétonitrile qui contiennent notamment les N-glycannes porteurs de quelques acides sialiques. C. Tableau montrant le sens des fluctuations observées entre cellules sauvages et KO SELENOT d'espèces choisies de N-glycannes. Sont représentés les oligomannoses et des espèces représentatives de N-glycannes mono- et oligosialylés, avec leur m/z associé.



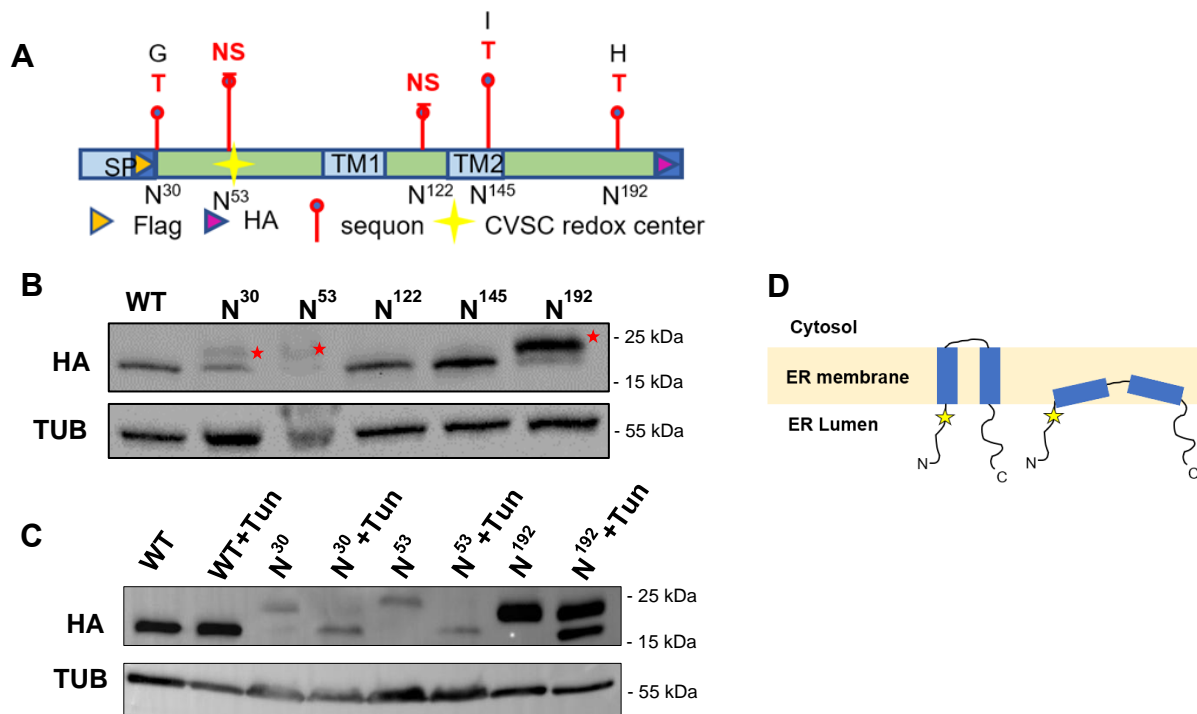
**Figure 47. La déplétion de la SELENOT conduit à une diminution de protéines sialylées et à une perte de N-glycanes membranaires**

A. Les cellules WT et KOg3 ont été marquées par la ConA couplée à Alexa Fluor 647 (vert).  
 B. Les cellules WT et KOg3 ont été marquées par l'EBL couplée à l'Alexa Fluor 488 (vert). Les intensités d'immunofluorescence ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. Chaque valeur est la moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$  ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; test U de Mann-Whitney).

## V. Orientation du centre redox de la SELENOT

Afin de comprendre le phénotype des cellules SELENOT<sup>-/-</sup> sur le plan moléculaire, nous avons recherché les partenaires redox de la SELENOT dans les neurones puisque le centre redox est essentiel pour l'activité de la SELENOT (Boukhzar *et al.* 2016, Grumolato *et al.* 2003, Hamieh *et al.* 2017). Comme la topologie de la SELENOT n'a pas été entièrement décrite (Grumolato *et al.* 2008, Hamieh *et al.* 2017, Shchedrina *et al.* 2010, Moustafa and Antar 2012), il était indispensable de déterminer au préalable l'orientation du centre redox, dans le cytoplasme ou dans la lumière du RE afin de filtrer les partenaires potentiels en fonction de leur localisation subcellulaire.

Nous avons utilisé une approche de *scanning N-glycosylation insertion mutagenesis* qui consiste à introduire artificiellement des sites de *N*-glycosylation à des emplacements stratégiques de la séquence de la SELENOT. Le principe est que seuls les sites qui émergent dans la lumière du RE peuvent être utilisés par OST (van Geest and Lolkema 2000). La SELENOT n'est pas elle-même *N*-glycosylée (Hamieh *et al.* 2017) et de nouvelles séquences ont été introduites à cinq positions dans la protéine : à l'extrémité N-terminale, adjacente au centre redox, dans la boucle située entre les TM1 et TM2 prédits *in silico* (Moustafa and Antar 2012), dans le TM2 et une dernière à l'extrémité C-terminale (Figure 48 A). Une analyse par western blot a révélé que seuls trois des cinq séquons insérés étaient utilisés dans les domaines N- et C-terminaux, ce qui se traduit par un déplacement vers le haut du gel de la bande correspondant à la SELENOT (Figure 48 B). Ce déplacement est réversible par un traitement à la tunicamycine (Figure 48 C), confirmant l'ajout de *N*-glycane sur ces trois sites. Ces résultats montrent pour la première fois que le centre redox est localisé dans la lumière du RE ce qui indique que la SELENOT échange des ponts disulfure de ce côté de la membrane, validant ainsi en partie le premier modèle proposé par Shchedrina *et al.* (Shchedrina *et al.* 2010) qui suggérait que la SELENOT adopte une structure en « épingle à cheveux ». Toutefois, l'absence de *N*-glycosylation des sites accepteurs situés entre TM1 et TM2 et dans TM2 ne permettent pas de préciser d'avantage la topologie car les séquons créés pourraient ne pas être reconnus ou accessibles au complexe OST (Figure 48 D).



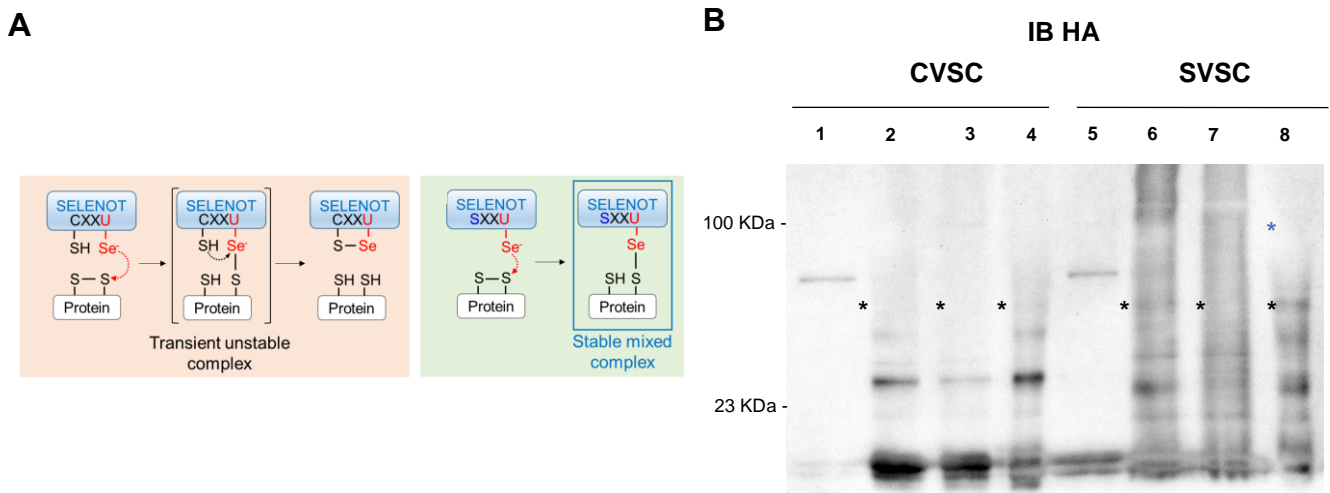
**Figure 48. La SELENOT adopte une structure en épingle à cheveux avec le centre redox émergent dans la lumière du RE**

A. Des sites individuels accepteurs de N-glycosylation ont été créés par mutagenèse dirigée à différentes positions sur la protéine SELENOT<sub>CVSC</sub> (Ctl) marquée avec un HA, dont deux dans le segment N-terminal, un dans une boucle entre les segments TM1 et TM2 putatifs, un dans le TM2 putatif et un dans l'extrémité C-terminale. Les caractères rouges représentent les substitutions ou les insertions réalisées pour chacun des séquons créés. B, C. Les protéines recombinantes ont été exprimées dans des neurones mhypoA-POMC, B. en absence ou C. en présence de tunicamycine (Tun), et analysées par western blot. Les bandes supérieures signalées par une étoile rouge correspondent aux espèces N-glycosylées. D. Modèle de topologie de la SELENOT déduit de l'analyse par scanning N-glycosylation insertion mutagenesis et inspiré de celui proposé par Shchedrina et al. (Shchedrina et al. 2010).

## VI. Identification des partenaires redox de la SELENOT dans les cellules mhypoA-POMC

Inspirés par les travaux réalisés pour identifier les partenaires redox de la SELENON (Chernorudskiy et al. 2020 ; Marino et al., 2015), nous avons appliqué le même type d'approche, dite de *thiol trapping*, pour identifier les partenaires de la SELENOT. Cette méthode repose sur l'induction de complexes redox avec des protéines *thioredoxin-like* suite à

un traitement oxydant par le 4,4'-dithiodipyridine et leur stabilisation par la mutation de la cystéine résolutive du site catalytique en présence d'un agent alkylant, le *N-ethylmaleimide*, afin de prévenir la création de ponts disulfure intermoléculaire non spécifique. Les complexes piégés, ayant établi des liaisons disulfures (ou sélénosulfure dans le cas d'une Sec), sont analysés par spectrométrie de masse (Figure 49 A) (Nakao *et al.* 2015). Au cours de ce travail, nous n'avons jamais utilisé la forme sauvage SELENOT<sub>CVSU</sub> car elle est difficile à exprimer, mais la forme SELENOT<sub>CVSC</sub>. Nous avons construit un mutant SELENOT<sub>SVSC</sub> dans lequel la Cys résolutive a été remplacée par une sérine (Figure 49 A). Les formes SELENOT<sub>SVSS</sub> et SELENOT<sub>CVSS</sub> ont servi de contrôles négatifs en plus des cellules non transfectées. Les partenaires ont été immunoprécipités avec la SELENOT recombinante marquée avec un tag HA dans la partie C-terminale de sa séquence.



**Figure 49. Principe du thiol trapping appliqué à la SELENOT**

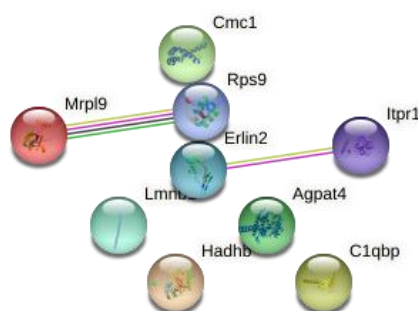
*A. Criblage protéomique basé sur le thiol trapping (panneau de gauche). Le remplacement de la cystéine résolutive du motif CXXC d'une protéine Trx-like par un aa redox-inactif, comme la sérine ou l'alanine, rend le pont disulfure stable (panneau de droite), ce qui permet de l'identifier. B. Analyse par western blot des protéines de cellules mhyoA-POMC transfectées avec les mutants SELENOT (CVSC et SVSC) étiquetés par un HA. Échantillons de protéines issues du cytosol (colonne 1, 5), des membranes en absence (colonne 2, 6) et en présence de  $\beta$ -mercaptoethanol (colonne 3, 7) et après immunoprécipitation des fractions membranaires par un anticorps anti-HA (colonne 4, 8). Certaines bandes (astérisque noires) s'accumulent en IP et disparaissent en conditions réductrices indiquant qu'il s'agit de complexes redox engageant la SELENOT. L'astérisque bleu pointe un exemple de bande enrichie spécifiquement en présence du mutant SVSC. La SELENOT étiquetée par HA est visible autour de 23 KDa.*

Les protéines présentes dans les éluats ont été analysées par LC-MS/MS et les données de spectrométrie de masse ont été exploitées à l'aide du logiciel *Progenesis*. La transfection des mutants SELENOT<sub>CVSC</sub> ou SELENOT<sub>SVSC</sub> dans des cellules mhyoA-POMC en conditions oxydantes conduit à la formation de complexes de masses moléculaires supérieurs à celle de la SELENOT seule (~23 kDa) (Figure 49 B). Certains complexes disparaissent lors de l'analyse par western blot en condition réductrice en présence de β-mercaptoéthanol, ce qui montre qu'ils résultent d'interactions covalentes avec la SELENOT. Les complexes sont plus nombreux lorsque le mutant SELENOT<sub>SVSC</sub> est utilisé. La mutation a donc stabilisé les interactions redox comme attendu. Comparé au mutant SELENOT<sub>CVSC</sub>, la forme SELENOT<sub>SVSC</sub> stabilise de manière significative l'interaction avec une dizaine de protéines (Figure 50 A).

**A**

Accession	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	N-glycosylation site	Localisation	Family	Function
Erlin2	298,07	0,00163	4,92	1	ER	ABC-family proteins mediated transport	Ubiquitin protein ligase binding
ANXA2	281,5	0,01313	1,56	0	membrane / cytosol	Annexin superfamily	Calcium channel activity / calcium-dependent protein binding / phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding
MRPL9	74,49	0,04114	3,09	0	cytosol / mitochondria	Bacterial ribosomal protein bl9 family	Structural constituent of ribosome
RPS9	66,54	0,01547	42,78	0	cytosol / nucleus	Universal ribosomal protein uS4 family	Structural constituent of ribosome
C1QBP	57,41	0,04653	6,22	0	cytosol nucleus ER	MAM33 family	Complement component C1q complex binding
ITPR1	47,43	0,02219	4,48	1	ER	IP3 receptor type 1 binding core, domain 2 superfamily	Calcium-release channel activity / phosphatidylinositol binding
HADHB	46,52	0,03802	3,05	0	ER / mitochondria	Thiolase-like superfamily	Acetyl-CoA C-acyltransferase / myristoyltransferase activity
SC6A9	43,11	0,00005	Infinity	2	membranes	Neurotransmitter:Sodium Symporter (NSS) Family	Glycine secretion, neurotransmission
LMNB1	39,92	0,01015	3,25	0	nucleus	Intermediate filament family	JUN kinase / phospholipase binding
AGPAT4	31,89	0,03889	1,87	0	ER / mitochondria	PLC-like phosphodiesterases superfamily	Calcium-dependent phospholipid binding / calcium-dependent phospholipid binding
CMC1	28,09	0,02312	7819,06	0	mitochondria	CMC family	Metal ion binding

**B**



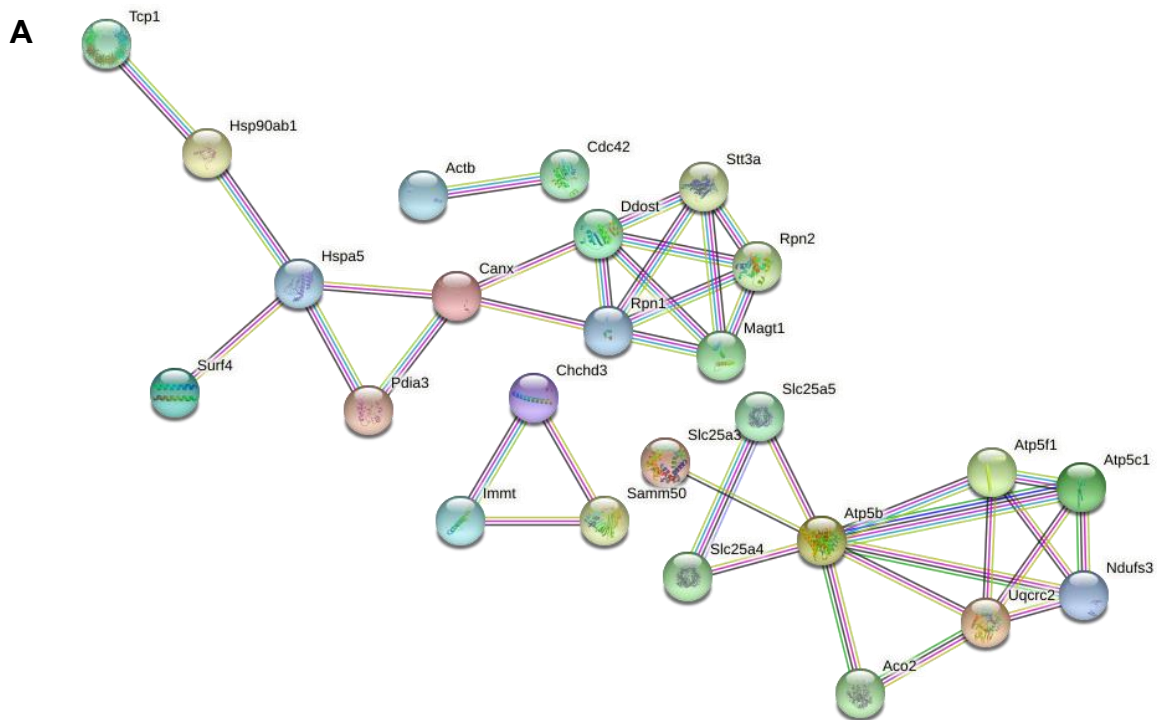
**Figure 50. Identification des partenaires redox de la SELENOT**

A. La quantification via le logiciel *progenesis* des partenaires du mutant SELENOT<sub>SVSC</sub> contre ceux du mutants SELENOT<sub>CVSC</sub> a conduit à l'identification de onze protéines potentiellement capables d'échanger des ponts disulfures avec la SELENOT. B. A partir de ces protéines, un réseau fonctionnel d'interactions a été reconstruit en utilisant *string-db.org*.

MRPL9 et RPS9 sont des protéines ribosomales tandis que C1QBP est une protéine du complément. HADHB, AGPAT4 et CMC1 sont des protéines mitochondriales, ANXA2 est une protéine cytosolique et LMNB1 est localisée à la membrane nucléaire. Trois des onze partenaires redox enrichis, SLC6A9/GLYT1, IP3R1/ITPR1 et ERLIN2, sont particulièrement intéressants car ils sont *N*-glycosylés et localisés dans le RE et/ou la membrane plasmique. Comme certaines de ces protéines telles que MRPL9, C1QBP et RPS9 sont également mises en évidence en grande quantité dans la fraction obtenue à partir des cellules non transfectées elles ne sont probablement pas impliquées dans des interactions spécifiques avec la SELENOT. Nous avons analysé ces partenaires par string-db (*string-db.org*), un logiciel qui génère des réseaux d'interactions de protéines en agrégeant différentes bases de données issues de données expérimentales, de prédictions *in silico* et de la bibliographie. Les partenaires redox de la SELENOT obtenus en comparant la forme SELENOT<sub>SVSC</sub> avec la forme SELENOT<sub>CVSC</sub> ne forment pas de véritable réseau d'interaction. Il montre néanmoins qu'ITPR1/IP3R1 et ERLIN2 sont associés et que l'interaction a été déterminée expérimentalement (Figure 50 B).

Outre les partenaires redox, ce type d'approche permet de montrer l'interaction de la SELENOT avec d'autres protéines significativement enrichies dans les fractions des cellules transfectées avec tous les mutants SELENOT par rapport aux cellules non transfectées. En accord avec les travaux précédents (Hamieh *et al.* 2017), nous retrouvons dans ces fractions les sous-unités du complexe OST. Cependant, ces protéines ne sont pas plus enrichies avec le mutant SELENOT<sub>SVSC</sub>, suggérant qu'il s'agit de partenaires qui ne se lient pas aux cystéines du centre catalytique. Parmi eux figurent des membres du complexe OST et du translocon, comme Sec61 $\alpha$ , et certaines protéines ribosomales qui forment des réseaux d'interactions (Figure 51 A). En appliquant le plus haut indice de confiance, nous avons recherché quels processus biologiques leur étaient associés dans *gene ontology* (GO ; *geneontology.org*). La *N*-glycosylation (STT3A, DDOST, RPN1, MAGT1) et le repliement des protéines (CANX, PDIA3, TCP1, HSPA5, HSP90AB1) sont des processus biologiques significativement associés à ces protéines (Figure 51 B). Il est probable que la SELENOT interagissent avec certaines de ces protéines *via* des interactions impliquant leurs domaines transmembranaires ou d'autres cystéines situées en dehors du centre redox.





**B**

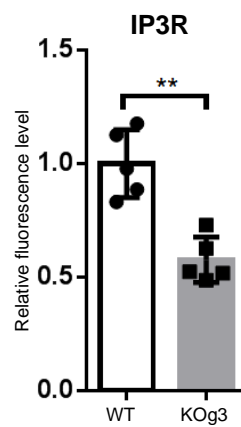
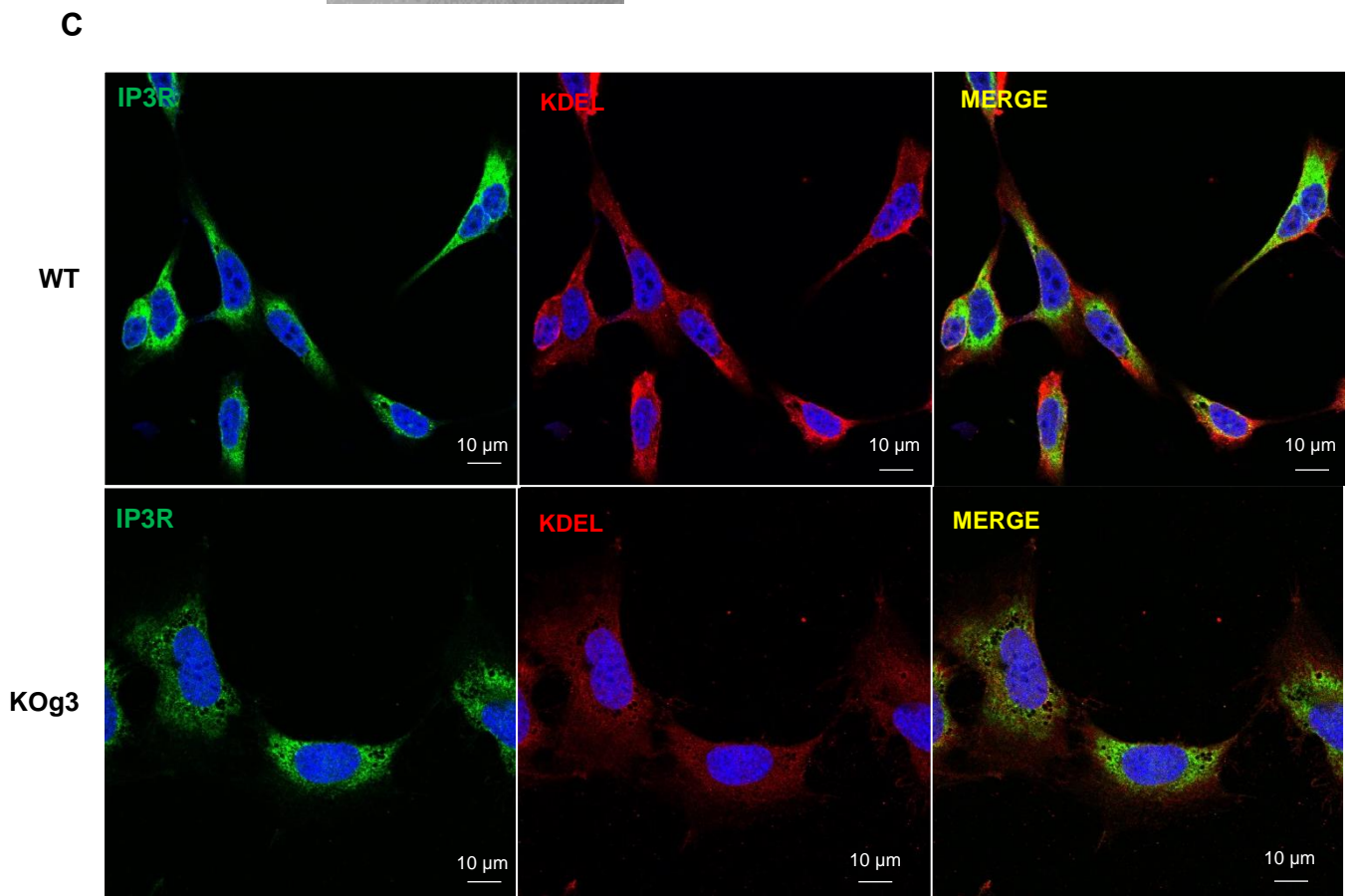
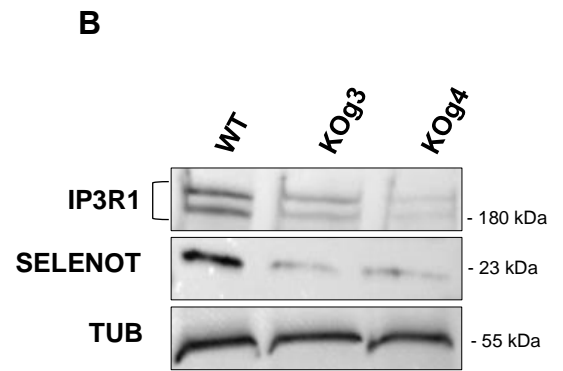
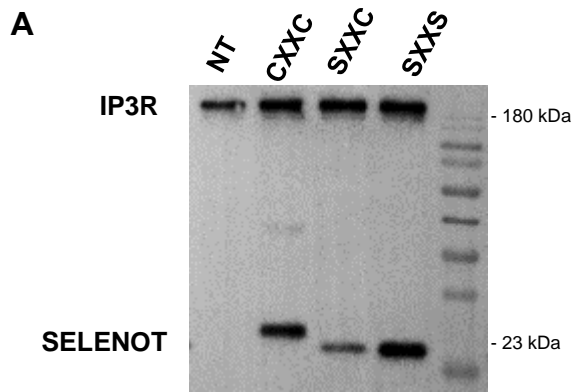
PANTHER GO-Slim Biological Process	Raw P-value
<u>protein N-linked glycosylation via asparagine</u>	1.45E-08
<u>C4-dicarboxylate transport</u>	2.52E-04
<u>amino acid transmembrane transport</u>	4.91E-06
<u>protein folding</u>	5.32E-06
<u>cellular respiration</u>	5.88E-04
<u>mitochondrial transmembrane transport</u>	6.53E-09
<u>carbohydrate derivative transport</u>	7.53E-04
<u>anion transmembrane transport</u>	7.80E-10
<u>protein processing involved in protein targeting to mitochondrion</u>	8.45E-05

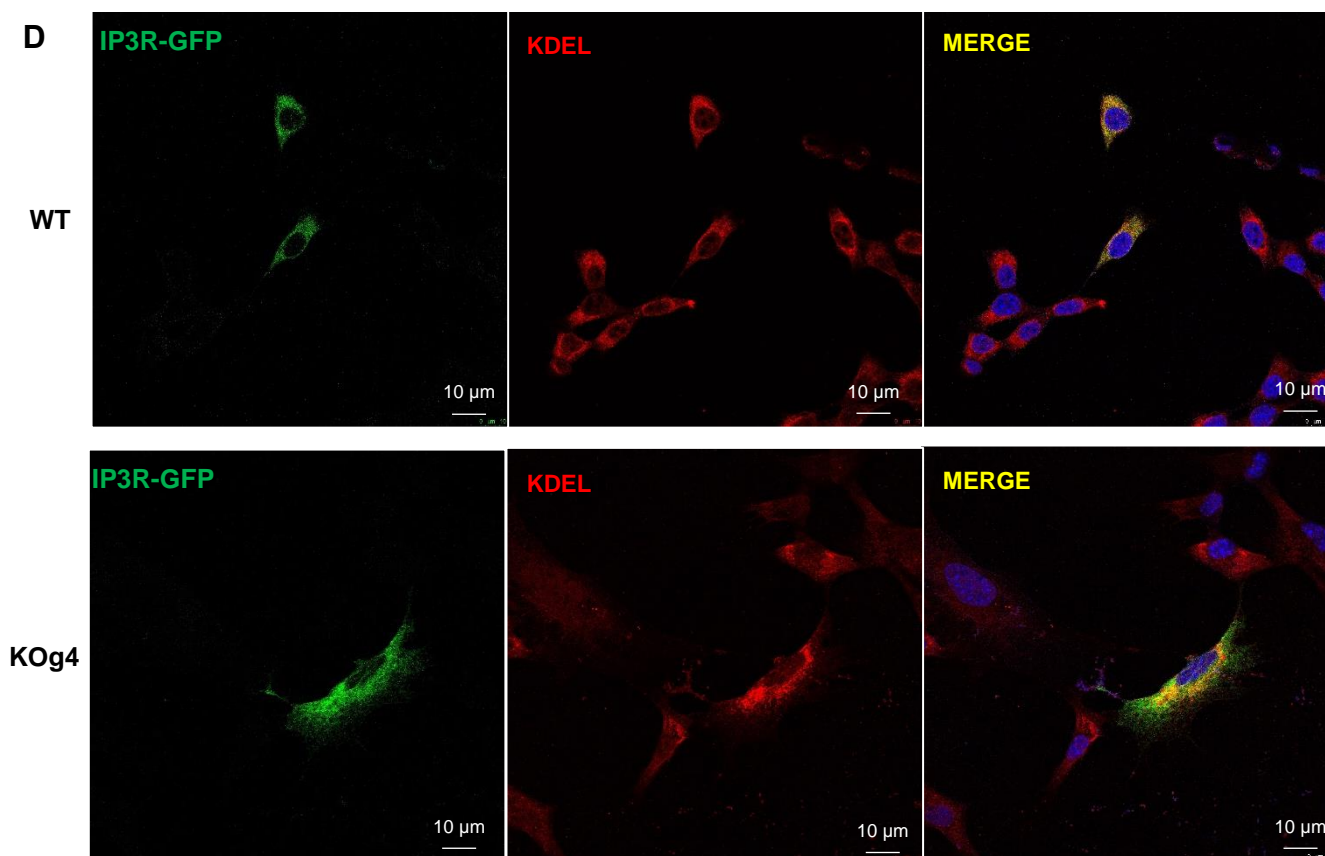
**Figure 51. Caractérisation des partenaires de la SELENOT dont la liaison est indépendante du centre CVSC**

*A. Les partenaires enrichis entre les fractions immunoprécipitées avec la SELENOT<sub>SVSS</sub> et les fractions des cellules non transfectées ont permis de constituer un réseau fonctionnel d'interactions en utilisant string-db.org. B. Les termes ontologiques de ces protéines ont été recherchés à l'aide de <http://geneontology.org/> et représentés sous forme de tableau.*

## VII. Validation de l'interaction avec IP3R1

Les cellules déplétées en SELENOT présentent un défaut de mobilisation calcique attribué à une vidange des stocks du RE (Grumolato *et al.* 2008). L'IP3R est un acteur majeur de la régulation des flux calciques au niveau du RE et des travaux précédents ont montré l'importance d'une paire de résidus cystéine dirigée vers la lumière du RE pour la régulation redox de l'activité d'IP3R1 (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016). C'est pourquoi nous avons sélectionné ce partenaire en particulier pour valider l'interaction avec la SELENOT. La capacité des mutants SELENOT à piéger IP3R1 dans les fractions de *thiol trapping* a été vérifiée par une analyse par western blot en utilisant un anticorps pan-IP3R disponible au laboratoire qui reconnaît les trois sous-types IP3R1-3, sachant que la forme IP3R1 est majoritaire dans le cerveau (Figure 52 A). Il est à noter que l'IP3R est aussi présent dans la fraction contrôle en moindre quantité ce qui montre les limites de la technique d'immunoprécipitation. Nous avons ensuite analysé l'expression de l'IP3R1 par la technique de western blot en utilisant un gel à gradient de polyacrylamide (4-12%) afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines de haut poids moléculaire (~ 300 kDa). Une bande correspondant à l'IP3R1 migrant au même niveau que la protéine IP3R1 recombinante a été détectée parmi les protéines totales extraites à partir de cellules sauvages. L'intensité de cette bande a une tendance à diminuer dans les clones KOg3 et KOg4 (figure 52 B). Avec l'anticorps pan-IP3R nous avons examiné la distribution d'IP3R par immunofluorescence dans les lignées cellulaires WT et déplétées en SELENOT (Figure 52 C). Nous avons observé une diminution de l'intensité de la fluorescence dans les neurones KO (0,58 ;  $p = 0.0079$ ), rejoignant les résultats du western blot (Figure 52 C). L'expression d'IP3R1 recombinant couplé à la GFP montre une distribution périnucléaire et diffuse dans les deux lignées WT et KO, avec une tendance à une expression plus faible, comme celle de l'IP3R1 endogène, dans les cellules KO imputable à la transfection ou à l'abaissement des taux de SELENOT. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la SELENOT interagit avec l'IP3R1 *via* le centre redox CVSC et que la déplétion en SELENOT modifie l'expression globale d'IP3R1. Des résultats obtenus par qRT-PCR montrant la surexpression des ARNm des trois formes d'IP3R dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup> indique que la baisse d'expression d'IP3R pourrait être le résultat de sa régulation post-traductionnelle.





#### Figure 52. Validation de l'interaction de la SELENOT avec IP3R1

A. Analyse par western blot de l'interaction de l'IP3R avec la SELENOT mutée au niveau du site redox dans les fractions de thiol trapping. La membrane a été incubée avec un anticorps reconnaissant les 3 isoformes d'IP3R. B. Analyse par western blot de l'expression de l'IP3R dans les cellules mhypA-POMC sauvages et KO. L'isoforme IP3R1 est identifiée par comparaison avec la migration de la forme recombinante. C. Les cellules WT et KOg3 ont été doublement immunomarquées par des anticorps anti-IP3R pan (vert) et anti-KDEL (rouge). Les intensités d'immunofluorescence ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$  ;  $**p < 0,01$  ; test U de Mann-Whitney). D. Expression de l'IP3R1 couplé à la GFP et de KDEL dans les cellules WT et KOg4.

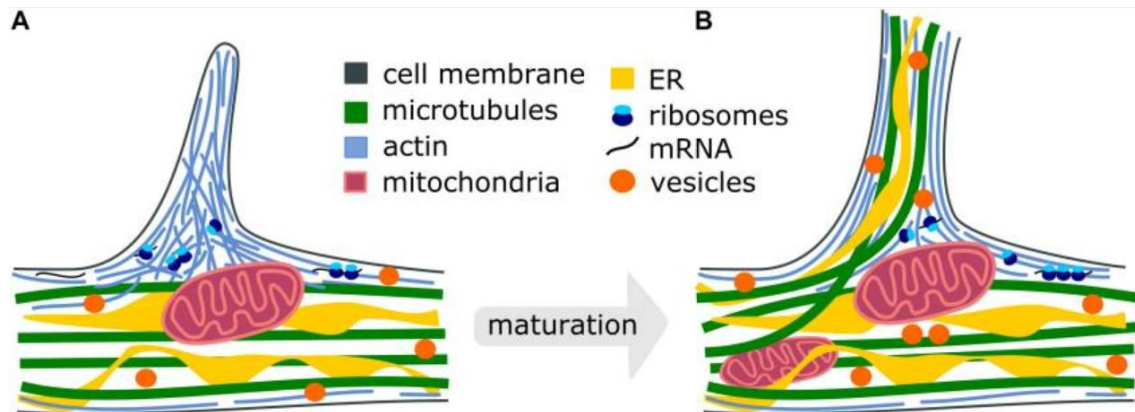
# Discussion

## I. Les cellules mhypoA-POMC déplétées en SELENOT sont sénescentes

Nous avons précédemment montré que la diminution des niveaux de SELENOT à l'aide d'un shRNA dans des cellules endocrines AtT20 engendrait un stress du RE et diminuait le contenu en POMC et la sécrétion d'ACTH (Hamieh *et al.* 2017). De faibles taux de SELENOT inhibent également la sécrétion neuroendocrine dans les cellules PC12 (Grumolato *et al.* 2008), et la production d'insuline chez des souris transgéniques portant une délétion du gène *selenot* dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Prevost *et al.* 2013). A l'inverse, cette étude réalisée dans les neurones mhypoA-POMC déplétés en SELENOT de façon permanente ne montre pas de surexpression de BiP, un marqueur du stress du RE, et la production de POMC et d' $\alpha$ -MSH ne sont pas inhibés. Il n'a pas été possible de mesurer l' $\alpha$ -MSH par la méthode ELISA dans le milieu de culture. Des résultats préliminaires en microscopie à onde évanescente (TIRF) montrant des événements d'exocytose dans les cellules KO en collaboration avec le groupe de Maïté Montero, suggère que la voie de sécrétion reste au moins en partie fonctionnelle.

La déplétion de la SELENOT provoque l'étalement du RE vers la périphérie et une dépolymérisation partielle du cytosquelette d'actine. Le cytosquelette reste visible sous la forme de fuseaux mais il est moins dense, notamment à la membrane. La baisse du marquage du cytosquelette d'actine dans les prolongements pourrait être à l'origine de l'inhibition de l'extension des neurites observé dans les cellules mhypoA-POMC KO et dans les cellules PC12 déplétées en SELENOT (Abid *et al.* 2019), comme décrit par Wit et Hiesinger (Figure 53) (Wit and Hiesinger 2022). Une augmentation de la macropinocytose, un phénomène d'endocytose clathrine-indépendant générant de grandes vacuoles de 0,2 à 5  $\mu$ m de diamètre afin de recycler les protéines membranaires serait associé à l'inhibition de la croissance neuritique (Kuo and Paszek 2021). Ces résultats confirment ceux d'études réalisées chez des souris transgéniques portant une délétion du gène *selenot* dans les progéniteurs neuronaux nestin-positifs, montrant un retard dans la croissance de plusieurs structures cérébrales au cours du développement, une diminution du nombre de neurones catécholaminergiques, et une augmentation de l'apoptose

de ces précurseurs (Castex *et al.* 2016, Godefroy *et al.* 2022). De fait, nous avons aussi observé de l'apoptose dans les cellules mhypoA-POMC SELENOT<sup>-/-</sup> via le clivage de la caspase 7.



**Figure 53. Rôle du cytosquelette dans les premières étapes de la maturation de l'axone**

*A. Prolongement immature : Des patches d'actine se forment le long du futur axone et poussent la membrane plasmique pour initier la formation d'un filopode. Les mitochondries restent bloquées au niveau du cône et les systèmes de traduction s'accumulent à la base du prolongement pour synthétiser localement de nouvelles protéines du cytosquelette. (Spillane et al. 2013, Armijo-Weingart and Gallo 2017). B. Branche mature : Les filaments d'actine dispersés se réorientent et forment des faisceaux. Les microtubules et le RE peuvent co-migrer dans le prolongement en croissance pour la stabiliser, les vésicules fournissent des composants membranaires. Les organelles intracellulaires tels que les mitochondries, le RE, les vésicules synaptiques et les vésicules à cœur dense se redistribuent et s'accumulent au niveau de l'axone pour répondre à la forte demande en énergie, protéines, lipides et composants membranaires (Bodakuntla et al. 2021).*

L'inhibition de la synthèse de toutes les sélénoprotéines, suite à l'inhibition d'ALKBH8, une *tRNA uracile methyltransferase*, entraîne aussi l'activation des processus de sénescence (Lee *et al.* 2022). L'accroissement du corps et des noyaux des cellules mhypoA-POMC SELENOT<sup>-/-</sup>, leur aplatissement, l'étalement du RE, la vacuolisation et l'expression de la  $\beta$ -galactosidase que nous décrivons sont des caractéristiques de la sénescence observée dans les cellules vieillissantes, qui en plus, présentent un l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (en raison du rétrécissement des télomères) et un phénotype sécréteur inflammatoire (Denoyelle *et al.* 2006, de Mera-Rodriguez *et al.* 2021). Cela semble donc être le cas dans notre modèle qui exprime aussi le marqueur de sénescence  $\beta$ -Galactosidase. L'expression de la  $\beta$ -Galactosidase

a aussi été observé dans un modèle de cellules PC12 invalidées pour la SELENOT, avec un phénotype plus sévère que celui des neurones mhypoA-POMC aboutissant à la mort cellulaire et l'impossibilité de les cultiver. Appuyant ce phénotype de sénescence, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 a été décrit dans une lignée de neuroblastome dépourvus de SELENOT (Shao *et al.* 2019, Kumari and Jat 2021). Les sélénoprotéines, et la SELENOT en particulier, pourraient donc médier le rôle du sélénium dans l'allongement de la durée de vie (Hornsby and Harris 1987). Elle n'est sans doute pas la seule protéine impliquée dans ce processus puisqu'un phénotype équivalent est décrit, sans être nommé, dans des cellules rénales HEK 293T dans lesquelles l'expression de la SELENOS a été inhibée par des siRNA (Noda *et al.* 2014). Le RE de ces cellules présente un étalement similaire à celui observé dans notre modèle avec un réseau de microtubules perturbé. Le stress oxydant est l'une des causes principales d'activation de la sénescence et toutes les sélénoprotéines possèdent une fonction antioxydante, quelle que soit leur localisation cellulaire, bien qu'elles agissent *via* des mécanismes distincts. La SELENOS façonnerait la structure du RE par l'intermédiaire de son interaction avec CLIMP-63 (Abid *et al.* 2019, Noda *et al.* 2014). Nous avons montré dans une étude précédente que la SELENOT interagit avec le complexe OST (Hamieh *et al.* 2017), suggérant un rôle dans la *N*-glycosylation.

## II. Défauts de *N*-glycosylation à la membrane des cellules mhypoA-POMC SELENOT KO

L'immunoprécipitation de la SELENOT entraîne dans les cellules mhypoA-POMC la plupart des sous-unités du complexe OST de type A. Certains partenaires appartiennent aussi au complexe OST de type B, tels que STT3B et MLEC, contrairement à l'étude précédente. Ceci n'est pas très surprenant car l'expression de STT3A est très faible dans le cerveau alors que STT3B est exprimé de façon plus uniforme (Kelleher and Gilmore 2006). Par contre, KCP2, un membre accessoire du complexe OST de type A (Roboti and High 2012b, a) précédemment identifié comme partenaire de la SELENOT (Hamieh *et al.* 2017), n'a pas été précipité au cours de cette étude. Il est bien établi que l'interaction entre OST et KCP2 est instable et/ou transitoire par Cryo-EM (Ramirez, Kowal, and Locher 2019, Braunger *et al.* 2018) et donc difficile à mettre en évidence. L'absence d'enrichissement significatif de ces partenaires par *thiol trapping* a toutefois montré que ces interactions n'impliquent pas le site redox de la SELENOT. Elles résultent donc probablement d'associations entre leurs domaines membranaires respectifs ou bien elles engagent des cystéines localisées hors du centre redox. Les autres partenaires immunoprécipités avec la SELENOT, indépendamment du centre redox,

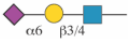

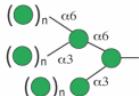
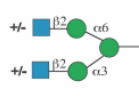
comprennent des protéines impliquées dans le repliement des protéines (CANX, PDIA3, TCP1, HSPA5, HSP90AB1). L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les études récentes montrant l'implication de la SELENOT dans la *N*-glycosylation et le CQ des glycoprotéines (Liu *et al.* 2018, Hamieh *et al.* 2017).

La comparaison des *N*-glycomes montre une tendance à la baisse globale de la *N*-glycosylation dans les cellules SELENOT<sup>-/-</sup> par rapport aux cellules sauvages. L'ensemble des oligomannoses est détecté dans les cellules KO, impliquant que la synthèse du précurseur oligosaccharidique n'est pas impactée. Le marquage à la ConA, marquant principalement les oligomannoses (Figure 54), ne révèle pas de différence significative entre les cellules sauvages et KO pour les glycoprotéines intracellulaires malgré une baisse de leur expression à la membrane, résultant d'un défaut de trafic cellulaire, de l'intégrité membranaire ou de l'augmentation de l'activité d'endocytose. De façon générale, les glycoprotéines riches en mannose ne sont pas, ou peu, exposées à la membrane des cellules, excepté dans les neurones. Certaines d'entre-elles, comme le récepteur du glutamate GluA2, ont été décrites au niveau des prolongements nerveux, là où il n'y a pas d'appareil de Golgi (Hanus *et al.* 2016). On peut donc aussi supposer qu'en absence de prolongement dans les cellules dépourvues de SELENOT, les glycoprotéines membranaires et sécrétées passent nécessairement par l'appareil de Golgi, augmentant la complexité des *N*-glycanes.

Comme pour les oligomannoses, le marquage EBL est moins intense à la membrane des cellules invalidées pour la SELENOT et une baisse des espèces monosialylées après analyse par spectrométrie de masse a été observée. Cela pourrait résulter d'un défaut de transfert des acides sialiques sur les protéines, le marquage EBL étant également moins fort à l'intérieur des cellules. Cependant, étant donné que la vingtaine de sialyltransférases se trouve à la membrane de l'appareil de Golgi alors que la SELENOT réside dans le RE et qu'on retrouve des espèces oligosialylées dans l'analyse par spectrométrie de masse, il est peu probable que la SELENOT affecte directement la biosynthèse des *N*-glycanes sialylés. L'absence de SELENOT affectant le repliement des protéines, les protéines avec une conformation native atteignant l'appareil de Golgi seraient susceptibles d'être moins abondantes et donc plus oligosialylées en fonction de la disponibilité en *CMP-SialicAcid*, de la même façon que le nombre de branches des *N*-glycanes est dépendant de la disponibilité en UDP-GlcNac (Stanley 2007). La perte des espèces monosialylées est plus difficile à interpréter. La fonction de la monosialylation n'est pas complètement comprise, en particulier dans le cerveau, probablement parce qu'elle coiffe presque tous les sialoglycoconjugués, et en raison de l'absence de souris KO pour les sialyltransférases St3gal, St6gal1/2 ou St6galnac (Sato and Kitajima 2019). Il est actuellement



possible d'identifier les protéines portant certaines espèces de *N*-glycanes, une étude récente montre qu'un type de *N*-glycane sialylé est très fortement exprimée au cours du développement du système nerveux de la souris et qu'il est particulièrement enrichi au niveau des synaptosomes (Handa-Narumi *et al.* 2018). Les protéines qui portent ce glycane, qui incluent la CRT, jouerait un rôle important au niveau des contacts entre les épines dendritiques et la microglie (Handa-Narumi *et al.* 2018).

Latin name	Predominant binding motifs	Additional binding motifs	Annotations
<b>Sambucus nigra-l</b> (SNA, SNA-I)	a 	b 	a. $\alpha$ 2-6-sialylated LacNAc <u>Tolerates</u> sialic acid variants (KDN, acetylation, etc.) b. $\alpha$ 2-6-sialylated LacdiNAc
<b>Concanavalin-A</b> (Con-A)	a 	b 	a. Mannose-terminated ( $\text{Man}_2\text{-Man}_6$ ) b. Biantennary with most extensions <u>Inhibited</u> by $\alpha$ Fuc on proximal residue

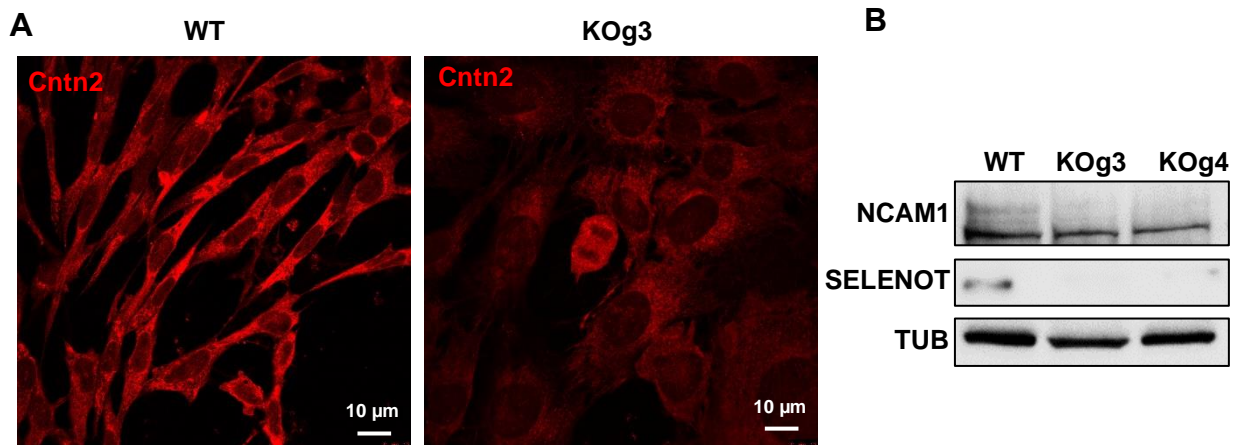
**Figure 54. Motifs de liaison des lectines ConA et d'EBL**

Modifié d'après (Bojar *et al.* 2022).

On retrouve aussi parmi les protéines sialylées une part importante des GPI-AP, une classe de protéines dont l'une des étapes de la biosynthèse, la déacylation qui conditionne leur export à la membrane et leur activité, est dépendante de la SELENOT (Liu *et al.* 2018). Nous avons comparé les niveaux d'expression de deux GPI-AP sialylées dans notre modèle. NCAM1, qui représente à elle seule 90 % des glycoprotéines polysialylées. Sous sa forme polysialylée (PSA-NCAM), elle joue un rôle prépondérant dans le développement du système nerveux en régulant la neurogenèse, la croissance des neurites et la migration cellulaire, et serait aussi un marqueur des neurones figés dans un état d'immaturité (Bonfanti 2006, Bonfanti and Seki 2021). Il est intéressant de souligner que chez la souris, la vulnérabilité à l'obésité liée à l'alimentation est associée à un faible niveau de PSA-NCAM, considéré comme un facteur de plasticité neurale dans l'hypothalamus (Benani *et al.* 2012, Brenachot *et al.* 2018). La seconde GPI-AP étudiée est la contactine 2 (CNTN2), nécessaire à la prolifération, la migration et la guidance axonale (Lieberoth *et al.* 2009). Nos résultats préliminaires montrent une baisse d'expression de NCAM1 et une altération de la distribution de CNTN2 en absence de SELENOT (Figure 55), confirmant l'implication directe ou indirecte de la SELENOT dans la maturation et le trafic des GPI-AP (Liu *et al.* 2018). A l'appui d'un effet indirect, la plupart des protéines pour lesquelles nous avons étudié la distribution cellulaire par immunofluorescence

(CNTN2, NCAM, POMC et IP3R) montrent une rétention dans le RE et peu de marquage dans le cytosol et à la membrane plasmique des cellules SELENOT<sup>-/-</sup>.

De façon intéressante, les protéines sialylées disparaissent à la membrane au cours du vieillissement et dans les cellules en culture ayant activées les programmes de sénescences, les défauts de *N*-glycosylation semblant précéder les changements morphologiques issues de la sénescence (Itakura *et al.* 2016).



**Figure 55. Le KO SELENOT modifie l'expression et la distribution cellulaire de deux GPI-AP impliquées dans l'adhésion et la plasticité neuronale**

A. Les cellules WT et KOg3 ont été marquées par un anticorps anti POMC (vert) et anti Cntn2 (rouge) puis avec la lectine ConA (blanc). B. Analyse par western blot de l'expression de NCAM1 dans des cellules sauvages et SELENOT<sup>-/-</sup>.

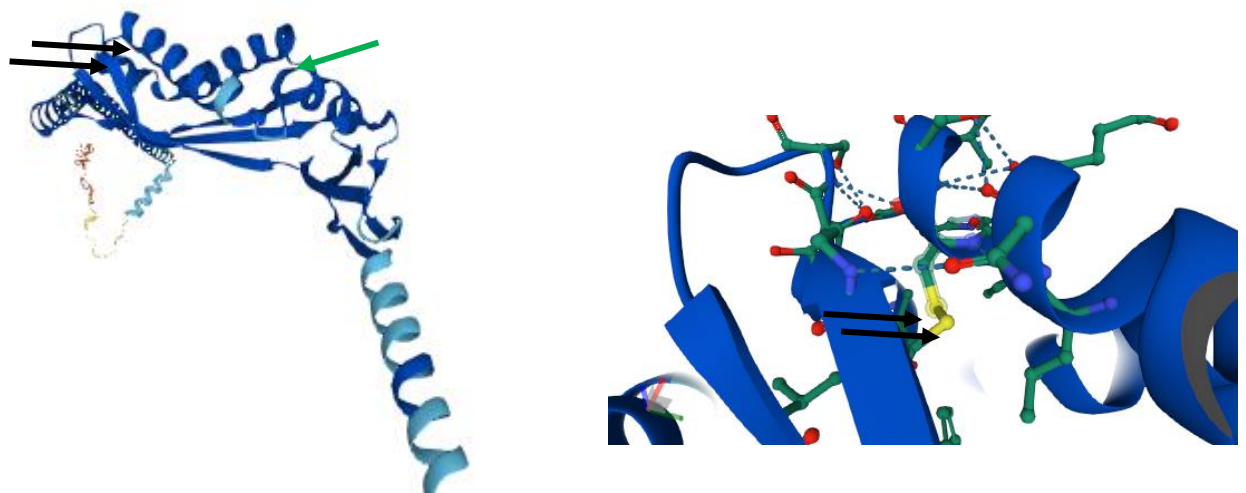
### III. Identification des partenaires redox potentiels de la SELENOT

Plusieurs travaux ont montré que la SELENOT est localisée dans la membrane du RE (Grumolato *et al.* 2008, Hamieh *et al.* 2017, Shchedrina *et al.* 2011) mais l'orientation du centre redox n'avait jamais été montrée. Or il s'agit d'une information importante pour l'identification des partenaires redox. Bien qu'il n'ait pas été possible par cette approche de déterminer complètement la topologie de la SELENOT dans la membrane du RE, car il est impossible de conclure à partir des sites qui n'ont pas été *N*-glycosylés, ce travail a validé expérimentalement un modèle précédemment établi par une approche bioinformatique proposant que la SELENOT adopterait une structure monotopique qui positionnerait le centre redox dans la lumière du RE (Moustafa and Antar 2012). Généralement, les protéines membranaires monotopiques ont des homologues solubles et utilisent des caractéristiques structurales communes pour s'insérer peu

profondément dans la membrane (Allen *et al.* 2019). La SELENOW pourrait être l'homologue soluble de la SELENOT, puisque ces deux protéines structurellement proches l'une de l'autre diffèrent par la présence d'hélices alpha dans la SELENOT responsables de son insertion dans la membrane du RE et que la SELENOW est surexprimée dans un modèle de fibroblastes déplétés en SELENOT (Sengupta *et al.* 2009). Toutefois, la SELENOW est cytosolique et elle interagit de manière redox avec des protéines cytosoliques telles que les protéines de la famille 14-3-3 (Aachmann *et al.* 2007, Jeon *et al.* 2016, Dikiy *et al.* 2007). Par ailleurs le centre redox de la SELENOT émergeant dans la lumière du RE, il est difficile d'envisager un mécanisme par lequel ces deux sélénoprotéines pourraient se compenser l'une l'autre.

L'approche par *thiol trapping* a révélé une dizaine de protéines dont l'interaction a été significativement stabilisée avec le mutant SELENOT<sub>SVSC</sub>, par rapport au mutant SELENOT<sub>CSVSC</sub>. Il s'agit des protéines ERLIN2, ANXA2, MRPL9, RPS9, C1QBP, ITPR1, HADHB, SC6A9, LMNB1, AGPAT4, et CMC1. MRPL9 et RPS9 sont des protéines ribosomales tandis que C1QBP est une protéine du complément. HADHB, AGPAT4 et CMC1 sont des protéines mitochondriales, AnxA2 est une protéine cytosolique et LMNB1 localise à la membrane nucléaire. Seulement trois des onze partenaires nous ont semblé pertinents (SLC6A9/GLYT1, IP3R1/ITPR1 et ERLIN2) car ils sont *N*-glycosylés et localisés dans le RE et/ou la membrane plasmique. De façon intéressante, deux protéines présentent un lien fonctionnel dans le réseau d'interaction des partenaires redox, ERLIN2 et IP3R1.

ERLIN2 est localisée dans la membrane du RE. Une étude a montré sa glycosylation sur l'asparagine 106 par des glycanes riches en mannose (puisque sensible à l'endoglycosidase H) (Pearce *et al.* 2007). Par ailleurs, une recherche *uniprot* montre qu'elle pourrait présenter un pont disulfure au voisinage du site de *N*-glycosylation, entre les cystéines 76 et 128 (Figure 56). Elle est considérée comme un marqueur des *lipid rafts* et participe à la régulation du métabolisme des lipides, à la maturation des protéines et à une boucle de rétroaction conduisant à l'inactivation de l'IP3R pour qui elle possède un site de liaison, en favorisant son ubiquitination et sa dégradation *via* la voie ERAD (Wright *et al.* 2018).



**Figure 56. Prédiction uniprot de la structure d'ERLIN2**

*Les cystéines 76 et 128 sont désignées par les flèches noires, l'asparagine 106 est désignée par la flèche verte.*

Le deuxième partenaire d'intérêt est SC6A9 (*Sodium- And Chloride-Dependent Glycine Transporter 1*), une protéine membranaire qui permet la recapture de la glycine au niveau synaptique, potentiellement glycosylée en deux sites (Asn 250 et 256) et possédant au moins un pont disulfure au niveau des cystéines 220 et 229. Un défaut de *N*-glycosylation altère son trafic cellulaire et entraîne une perte de la protéine à la membrane (Olivares *et al.* 1995). Dans ce cas précis, son interaction avec la SELENOT pourrait être transitoire lors de son transit dans la voie de sécrétion.

Enfin, IP3R1 nous a semblé le plus pertinent de tous les partenaires sur la base de sa localisation à la membrane du RE et du fait qu'il est décrit comme une glycoprotéine sialylée (Michikawa *et al.* 1994, Khan, Steiner, and Snyder 1992). Jusqu'à 30 % de l'isoforme IP3R1 est un sialoconjugué dans le thymus, un tissu dans lequel la SELENOT est également fortement exprimée chez le rat adulte (Tanguy *et al.* 2011, Dikiy *et al.* 2007, Khan, Steiner, and Snyder 1992). L'IP3R possède également un pont disulfure important pour son activité de canal calcique. L'hypothèse d'une interaction de la SELENOT avec IP3R avait été avancée sur la base de résultats montrant une altération de l'homéostasie calcique en absence de SELENOT dans un modèle de cellules neuroendocrines, mais jamais explorée expérimentalement (Grumolato *et al.* 2008, Liu and Rozovsky 2015). L'isoforme IP3R1 est très enrichie par rapport aux isoformes 2 et 3 dans le cerveau (Sharp *et al.* 1999). L'IP3R est immunoprécipité avec la SELENOT dans les fractions de *thiol trapping* et l'expression de l'IP3R1 endogène et recombinant semble diminuer dans les cellules déplétées en SELENOT. La diminution des

niveaux d'IP3R dans les cellules dépourvues de SELENOT suggère que cette dernière pourrait stabiliser l'IP3R1, et son interaction potentielle avec ERLIN2 qui favorise l'ubiquitination de l'IP3R laisse envisager un rôle de la SELENOT dans la dégradation d'IP3R via ERAD (Gao, Bonzerato, and Wojcikiewicz 2022).

IP3R1 possède un pont disulfure au niveau de la boucle L3 qui émerge dans la lumière du RE entre les domaines membranaires V et VI, dont l'état redox conditionne la liaison à un certain nombre d'oxydoréductases et de protéines chaperonnes (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016). La configuration dithiol des deux cystéines conservées dans la boucle luminale L3 de IP3R1 est strictement nécessaire à la liaison de l'inhibiteur luminal ERp44, une thiorédoxine qui inhibe l'ouverture du canal calcique. La mutation ou l'oxydation de cette paire de cystéines libère ERp44 et désinhibe l'ouverture du canal calcique. On ignore actuellement si ces cystéines médient l'interaction covalente entre la SELENOT et l'IP3R1 étant donné qu'aucune cystéine d'ERP44 n'est requise pour l'interaction avec l'IP3R1 (Higo *et al.* 2005). Les cellules déplétées en SELENOT ont leurs réserves de  $Ca^{2+}$  épuisées (Grumolato *et al.* 2008), suggérant que la SELENOT, comme ERp44, pourrait inhiber l'ouverture du pore IP3R limitant ainsi le flux de  $Ca^{2+}$  du RE, sous stress oxydatif (Appenzeller-Herzog and Simmen 2016). Comme ERp44, de nombreuses protéines inhibitrices qui interagissent avec les IP3R agissent de manière à provoquer une inhibition irréversible des IP3R ou leur dégradation. Ceci a pour effet d'entraîner un *feedback* rapide de la libération de  $Ca^{2+}$  et une atténuation à long terme de l'activité des IP3R pour éviter les effets délétères (nécrose, apoptose, autophagie, sénescence) lié à une augmentation excessive de  $Ca^{2+}$  cytosolique (Orrenius, Gogvadze, and Zhivotovsky 2015, Martin and Bernard 2018). La fuite de  $Ca^{2+}$  vers le cytosol dans les cellules déplétées en SELENOT permettrait d'expliquer les phénomènes d'apoptose et de sénescence observés dans ces cellules. Cette hypothèse est aussi appuyée par le fait que la SELENOT est stimulée par l'AMPK (Castex *et al.* 2016) (Abid *et al.* 2019, Grumolato *et al.* 2008), un senseur métabolique inhibant l'activité d'IP3R (Arias-Del-Val *et al.* 2019). De façon intéressante, le KO ERP44 entraîne, comme le KO SELENOT, une forte léthalité embryonnaire, une taille et une masse réduite des souriceaux et une augmentation des marqueurs de l'apoptose sans stimuler l'expression d'IP3R (Wang *et al.* 2014).

Parmi les partenaires identifiés, ERLIN2, IP3R1 et AGPAT4 (*Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Delta*) sont des protéines enrichies au niveau des zones de contact entre le RE et la mitochondrie. Ainsi, l'identification de ces protéines nous renseigne sur la nature des substrats de la SELENOT dans les neurones, probablement des glycoprotéines à domaine(s) transmembranaire(s), particulièrement enrichies au niveau des MAM.

#### IV. Comparaison de la SELENOT avec les autres sélénoprotéines résidentes du RE

Six autres sélénoprotéines sont présentes dans le RE, notamment la SELENOF, la SELENOK, et la SELENOM qui toutes sont fortement exprimées dans le cerveau. On y trouve aussi Dio2, la SELENOS et la SELENON (Shchedrina *et al.* 2010) qui, hormis DIO2, contribuent à maintenir l'homéostasie du RE. Parmi elles, deux sont solubles (la SELENOM et la SELENOF) et trois sont membranaires comme la SELENOT (la SELENOK, la SELENOS et la SELENON). Une seule de ces dernières, la SELENON, est orientée dans la membrane de la même manière que la SELENOT, exposant le centre redox dans la lumière du RE. Bien qu'elles possèdent toutes une fonction antioxydante et une activité d'oxydoréductase, elles présentent chacune des mécanismes d'action et des partenaires spécifiques impliqués soit dans le CQ des glycoprotéines soit dans la régulation de l'homéostasie calcique (Figure 57).

Comme la SELENOT, trois sélénoprotéines contrôlent l'homéostasie calcique suivant différents mécanismes : ce sont les SELENOM, SELENOK et SELENON.

La SELENOM est structurellement homologue à la SELENOF (Martin 1995). Elle est impliquée dans la régulation des flux calciques par un mécanisme restant indéterminé dans des cultures primaires de neurones (Reeves, Bellinger, and Berry 2010). Son inhibition entraîne, dans une lignée de neurones hypothalamique produisant l'AGRP, une augmentation des niveaux cytosoliques de  $Ca^{2+}$  et, à l'inverse, sa surexpression entraîne leur diminution (Gong *et al.* 2019). Son interaction avec la Galectine1 (Qiao *et al.* 2013) aurait un rôle important dans la prévention de la neurodégénérescence en réduisant l'inflammation. Des souris invalidées pour la SELENOM ne montrent pas de déficit cognitif mais elles développent une obésité, une résistance à la leptine et une altération du tissu adipeux (Pitts *et al.* 2013).

La délétion de la SELENOK entraîne une diminution du flux de  $Ca^{2+}$  dans les macrophages, les cellules T et les cellules B, un effet qui résulte d'un défaut de palmitoylation de l'IP3R, et non de sa production (Fredericks *et al.* 2014). Elle interagit avec DHHC6, une palmitoyl transférase qui entraîne l'ajout d'acide palmitique à au moins trois résidus cystéine dans la partie cytosolique d'IP3R, ce qui stabilise son expression et/ou son assemblage en un canal  $Ca^{2+}$  tétramérique fonctionnel dans la membrane du RE (Fredericks *et al.* 2014). La SELENOK est aussi impliquée dans la dégradation des protéines *via* la voie ERAD. Elle possède un domaine riche en glycine et en proline dans la queue cytosolique qui est nécessaire pour l'interaction avec p97(VCP) et Derlin1 (Lee *et al.* 2015). La dégradation des protéines glycosylées mal repliées par le complexe ERAD résultant (SELENOS-p97(VCP)-SELENOK), combinée à la

fonction antioxydante de la SELENOK et de la SELENOS, contribue à limiter le stress du RE (Lee *et al.* 2015, Shchedrina *et al.* 2011, Liu, Zhang, and Rozovsky 2014). Elle est fortement exprimée dans le cerveau, en particulier dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Zhang *et al.* 2008). La délétion du gène *selenok* entraîne une augmentation des niveaux de marqueurs de stress du RE dans le cortex et l'hippocampe des souris SELENOK KO (Jia *et al.* 2021). L'invalidation augmente également le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique, conduisant à l'activation de la cascade m-calpaïne/caspase-12, la voie apoptotique induite par le stress du RE. L'apoptose neuronale pourrait en outre conduire aux déficiences cognitives et à l'anxiété observées chez ces souris (Jia *et al.* 2021).

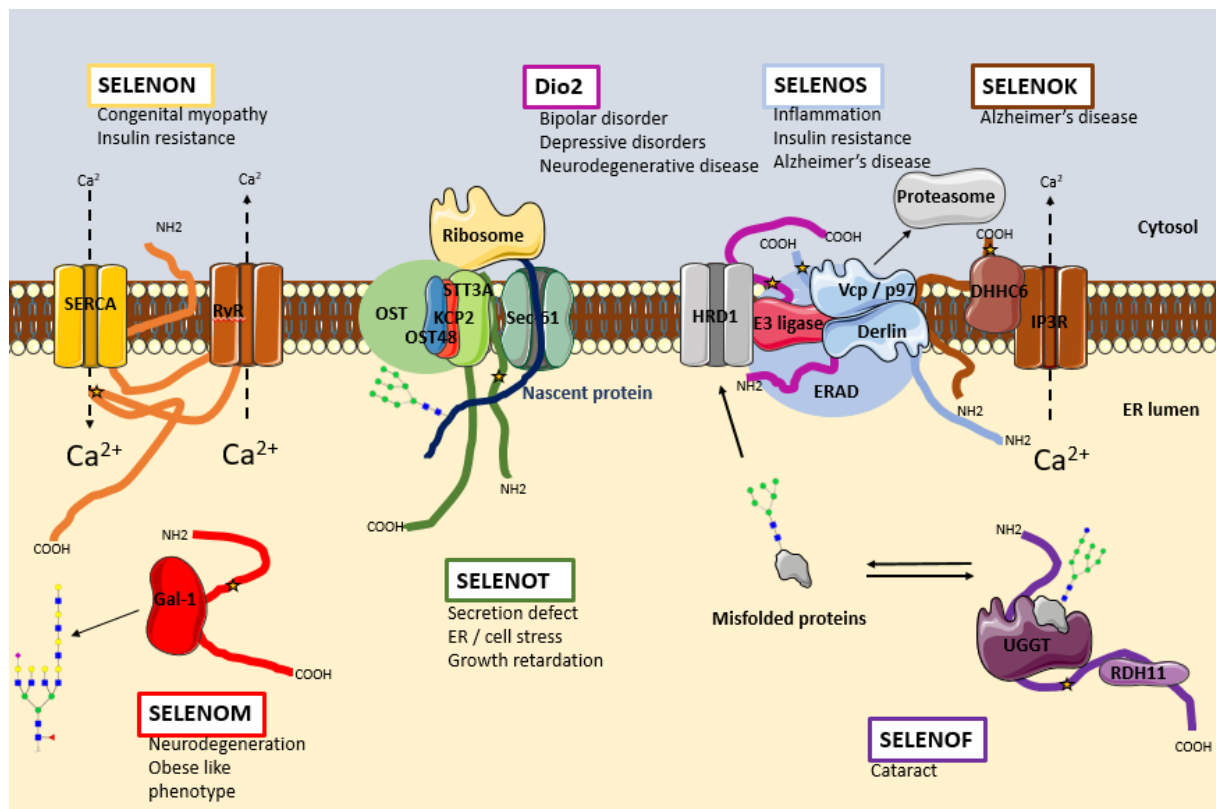
La SELENON est une glycoprotéine sensible aux fluctuations du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE en se liant à cet ion par l'intermédiaire d'un domaine *EF-hand* luminal. Elle répond à la diminution des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal en changeant son état oligomérique, en activant son activité redox envers son partenaire, la pompe SERCA. Son interaction avec SERCA réduit les cystéines luminales de cette pompe à  $\text{Ca}^{2+}$ , qui sont hyperoxydées par les peroxydes générés par ERO1. La fonction de la SELENON devient essentielle dans le cas d'un RE hyperoxydé provoqué par la surexpression d'ERO1, comme l'indique l'incapacité des myoblastes à croître dans ces conditions en l'absence de SELENON (Marino *et al.* 2015). Les cellules dépourvues de SELENON sont également clairement défectueuses dans la réabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE (Chernorudskiy *et al.* 2020). Bien que la SELENON soit la seule sélénoprotéine membranaire du RE exposant le motif redox dans la lumière du RE comme la SELENOT, il n'y aurait a priori pas de lien fonctionnel avec l'IP3R1 (Marino *et al.* 2015). La perte de fonction de SELENON entraîne une myopathie congénitale associée à une résistance à l'insuline (myopathie liée à SEPN1).

Les deux autres sélénoprotéines sont impliquées dans le CQ des glycoprotéines. La SELENOF interagit avec l'UGGT *via* un domaine riche en cystéine conservé présent dans sa partie N-terminale, une interaction essentielle pour la rétention de la SELENOF dans le RE (Korotkov *et al.* 2001). Il a été proposé que le motif CXU puisse être impliqué dans la réduction, l'isomérisation ou l'oxydation des liaisons disulfure des substrats glycoprotéiques de l'UGGT (Labunskyy *et al.* 2005).

La SELENOS est nécessaire à l'interaction de p97(VCP) avec la SELENOK pour le fonctionnement d'ERAD en cas de stress du RE (Lee *et al.* 2015). Elle interagit également avec les Derlins, les sous-unités du complexe ERAD qui effectuent la rétrotranslocation des glycoprotéines mal repliées dans le cytosol, la SELENOS servant de lien entre les Derlins et p97(VCP) (Ye *et al.* 2004). La déplétion de la SELENOS, tout comme celle de la SELENOT,

provoque l'étalement du RE. Ceci serait dû à une rupture du lien entre le RE et les microtubules (Noda *et al.* 2014). Une expression élevée est trouvée dans les tissus métaboliquement actifs (rein, foie, tissu adipeux, vaisseaux sanguins, îlots pancréatiques et muscles squelettiques) (Gao *et al.* 2004, Yu *et al.* 2016). De plus, l'expression de la SELENOS est dérégulée dans les troubles métaboliques. Elle est surexprimée après une privation de glucose et une inflammation induite par le lipopolysaccharide (Walder *et al.* 2002, Gao *et al.* 2004, Zeng *et al.* 2008). La SELENOS est exprimé dans tout le cerveau, à des niveaux plus élevés dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Zhang *et al.* 2008, Fradejas *et al.* 2011).

En conclusion, malgré des structures plus éloignées et une localisation différente dans le RE, la SELENOS serait la protéine qui partagerait le plus d'aspects fonctionnels avec la SELENOT parmi les sélénoprotéines résidentes du RE.



**Figure 57. Résumé schématique des différentes fonctions réalisées par les sept sélénoprotéines résidentes du RE**

Les pathologies et dysfonctionnements cellulaires associés à chaque sélénoprotéine du RE sont indiqués. La SELENON est activée par un faible niveau de calcium dans le RE. Cela conduit à son interaction avec la pompe SERCA et à son activation. Sa perte de fonction conduit à une hypersensibilité à ERO1, à un défaut de recaptage du  $Ca^{2+}$  dans le RE, et à une maladie appelée myopathie SEPNI-dépendante associée à une résistance à l'insuline. Le SELENOM réduit le



niveau de ROS en culture cellulaire. Elle interagit avec Gal-1, une lectine ayant une plus grande affinité pour le galactose favorisant la neuroprotection dans le cerveau. La délétion de la SELENOM entraîne une obésité sans déficience cognitive. La délétion de la SELENOT dans les précurseurs neuronaux entraîne un retard de croissance du cerveau associé à des niveaux élevés de ROS, et une vulnérabilité accrue à la neurodégénérescence. Elle interagit avec le complexe OST et module la N-glycosylation. Son inhibition entraîne des défauts de sécrétion et un stress du RE dans les cellules endocrines. La Dio2 catalyse la déiodation de la T4 (3,5,3',5'-tétraiodothyronine) en T3 (3,5,3'-triiodothyronine). La DIO2 dans le cerveau pourrait être un déterminant du bien-être et de la fonction neurocognitive. La mutation Thr92Ala, un polymorphisme présent dans 12 à 36 % de la population, entraîne un stress du RE et une hypothyroïdie. Cette mutation est vraisemblablement responsable d'une diminution de l'ubiquitination de DIO2 et de sa dégradation par le protéasome. L'inhibition de la SELENOS augmente l'agrégation de Tau. Elle est impliquée dans la dégradation de C99 par son interaction avec le complexe ERAD et son expression est corrélée aux enchevêtrements neurofibrillaires de cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La surexpression de la SELENOS peut également entraîner une résistance à l'insuline. La SELENOK interagit avec la SELENOS et ERAD, limitant le stress du RE. Elle interagit également avec DHHC6, une protéine responsable de la palmitoylation de IP3R, une étape nécessaire à sa stabilisation. On pense que ce lien avec la régulation du  $Ca^{2+}$  favoriserait la migration microgliale et l'élimination des dépôts amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. La SELENOF est un partenaire de l'UGGT, un senseur de l'état de repliement des protéines du RE. La délétion de la SELENOF chez l'animal entraîne une cataracte précoce. Cela pourrait être dû à une augmentation des protéines mal repliées ou à un manque d'interaction avec RDH11, une protéine impliquée dans le métabolisme de la vitamine A.

# Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour but de mieux comprendre le rôle moléculaire de la SELENOT dans un modèle de neurones hypothalamiques. Le résultat majeur de ce travail est la mise en évidence d'une interaction redox de la SELENOT avec l'IP3R1, en lien avec son rôle dans la mobilisation calcique et l'homéostasie du RE. La proximité de la SELENOT avec IP3R1 reste à démontrer par la technique de *proximity-dependent biotinylation identification (BioID)* et /ou de *Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)*. Par ailleurs la mutation des cystéines présentes dans la boucle L3V1 de IP3R1 est à réaliser pour permettre de confirmer l'interaction redox avec la SELENOT. L'absence de SELENOT semble déstabiliser cet acteur majeur de régulation des flux calciques en accord avec les travaux montrant que l'expression de la SELENOT est stimulée par l'AMPK qui elle-même inhibe l'activité de l'IP3R1 (Arias-Del-Val *et al.* 2019, Abid *et al.* 2019).

Des résultats préliminaires suggèrent que l'absence de SELENOT entraîne une diminution des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, comme c'est le cas dans le modèle des cellules PC12 (Grumolato *et al.* 2008), qui pourrait résulter de la levée de l'inhibition exercée sur IP3R1. L'IP3R1 étant une glycoprotéine sialylée, notre première hypothèse est donc que la SELENOT pourrait inhiber IP3R1 en modifiant son état de glycosylation. Elle jouerait ainsi un rôle similaire à Magt1 dans le complexe STT3B, pour permettre de glycosyler le deuxième séquon (NCS) situé au sein de la boucle intracellulaire de IP3R1 (Cherepanova *et al.* 2019, Cherepanova, Shrimal, and Gilmore 2014). La grande taille d'IP3R1 (2758 acides aminés chez l'Homme) rend cependant difficile l'étude de sa glycosylation par western blot. Nous pourrions purifier la protéine recombinante sauvage ou mutée au niveau de chacun des deux séquons par chromatographie sur colonne de Sepharose couplée à différentes lectines (ConA, EBL) et l'analyser ensuite par western blot.

La seconde hypothèse serait que la SELENOT se comporte comme ERp44 et réduise les cystéines de l'IP3R1 en condition hyperoxydée afin de l'inhiber puisque l'expression de la SELENOT est stimulée par le stress oxydant. Pour valider l'hypothèse de l'inhibition redox de l'activité de l'IP3R1 par la SELENOT, nous envisageons des expériences de *rescue* en transfectant les différentes constructions de SELENOT réalisées pour le *thiol trapping* qui comportent des mutations dans le centre redox et en analysant les marqueurs de sénescence.

Quelle que soit l'hypothèse, l'absence de SELENOT devrait non seulement dépléter les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE mais aussi conduire à une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$

dans le cytosol, du fait de l'ouverture de l'IP3R1. L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est nécessaire à l'expression d'un sécrétome spécifique des cellules sénescences, le *senescence-associated secretory phenotype* (SAPS) (Raynard *et al.* 2022, Gonzalez-Gualda *et al.* 2021). Le phénotype de sénescence observé dans les neurones KO tend à valider ce scénario. Après avoir vérifié l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans les cellules KO en utilisant une sonde calcique ratiométrique comme le Fura2, nous effectuerons une autre forme de *rescue* par chélation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire avec le BAPTA-AM (Borodkina *et al.* 2016) pour réverser le phénotype de sénescence.

La SELENOT co-précipite avec ERLIN2 et d'autres protéines mitochondriales décrites au niveau des MAM (Wright *et al.* 2018, Poston *et al.* 2011) dans les expériences de *thiol trapping*. Ainsi, si les deux modèles précédant ne se confirment pas, nous pourrions explorer la piste de l'interaction avec ERLIN2, puisqu'elle participe à une boucle de rétroaction conduisant à l'inactivation de l'IP3R par ubiquitination et dégradation *via* la voie ERAD (Wright *et al.* 2018). L'IP3R potentialise les contacts entre la mitochondrie et le RE au niveau des MAM (Bartok *et al.* 2019) et il participe à l'activation du processus de sénescence en favorisant le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers la mitochondrie (Ahumada-Castro *et al.* 2021). Il serait donc intéressant de commencer par valider l'interaction de la SELENOT avec ERLIN2 par immunoprécipitation et d'étudier non seulement la co-localisation de la SELENOT avec IP3R1, mais aussi avec ERLIN2, dans les MAM en condition contrôle et de stress.

Les cellules sénescences sont métaboliquement actives puisqu'elles produisent des cytokines, des interleukines et des facteurs de croissance (SAPS), ce qui reste à démontrer par différentes approches dans notre modèle (Gonzalez-Gualda *et al.* 2021). Elles sont au moins capables de produire de la POMC et de l' $\alpha$ -MSH, contrairement à ce que nous avons démontré précédemment dans différents modèles de cellules endocrine et neuroendocrines (PC12, min6, AtT20) (Hamieh *et al.* 2017, Grumolato *et al.* 2008, Prevost *et al.* 2013). La POMC recombinante ne semble pas glycosylée dans les neurones contrairement aux résultats obtenus dans les cellules corticotropes. Ce résultat met à mal l'hypothèse originale qui était que le défaut de *N*-glycosylation de la POMC entraîne l'altération de son *processing* par les pro-hormones convertases en  $\alpha$ -MSH (Hamieh *et al.* 2017).

Il est maintenant admis que le stress oxydant et le stress du RE caractérisent de nombreuses maladies. Certaines, comme le diabète de type II, touchent les fonctions endocrines (Kaneto *et al.* 2005) et d'autres, comme les maladies neurodégénératives, affectent le système nerveux, ou le cœur pour les cardiopathies ischémiques (Halliwell 2007). Ce type de stress est également décrit dans les neurones à POMC chez la souris obèse sous régime HF (Cakir and

Nilini 2019). Dans des cellules endocrines ou neuroendocrines, l'abaissement des niveaux de SELENOT par RNA interférence entraîne un stress du RE et l'activation de la réponse UPR. Nous n'avons pas observé de stress du RE dans les neurones dépourvus de SELENOT dans lesquels celui-ci a probablement été compensé. Par contre le phénotype de sénescence s'accorde avec le fait que la SELENOT figure parmi les sélénoprotéines dont la perte de fonction est la moins tolérée, à la fois chez l'homme et la souris (Santesmasses, Mariotti, and Gladyshev 2019). De ce fait, la SELENOT n'a pu être reliée à aucune maladie à ce jour. Seuls les modèles animaux avec une invalidation conditionnelle de la SELENOT ont permis d'étudier sa fonction. Lorsque la SELENOT est invalidée spécifiquement dans les précurseurs neuronaux, une diminution de la densité des neurones catécholaminergiques est constatée (Godefroy *et al.* 2022) ainsi que des déficits cognitifs (Castex *et al.* 2016). Un modèle murin est actuellement en cours de développement pour invalider spécifiquement la SELENOT dans les neurones à POMC et en étudier les effets sur le comportement alimentaire et les paramètres métaboliques. Au vu des résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail (altération de l'expression de NCAM1 et défaut d'adhésion), il est probable que l'effet d'une invalidation de la SELENOT entraîne au moins des défauts de projection des neurones à POMC dans ce modèle, responsable d'une sensibilité accrue au régime HF. En effet, les glycoprotéines sialylées sont importantes pour le développement des neurones et la stabilisation des synapses (Handa-Narumi *et al.* 2018) c'est le cas notamment de l'inhibition de la polysialylation de NCAM1 qui altère la neurotransmission hypothalamique et sensibilise les souris à la prise de poids durant un régime HF (Benani *et al.* 2012). La technique de microscopie 3D à feuille de lumière, actuellement disponible au laboratoire, permettra de vérifier cette hypothèse. D'autre part, l'obésité est aussi associée à un phénotype de sénescence (que l'on retrouve aussi dans les cellules  $\beta$ -pancréatique) (Ogrodnik *et al.* 2019, Rubio-Tomas *et al.* 2022) de même qu'à la sécrétion de chimiokines inflammatoires comme l'interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, et le TNF- $\alpha$  (Le Thuc *et al.* 2017) et à des défauts de mobilisation calcique dans les neurones à POMC (Paeger *et al.* 2017), en lien avec la perte de contacts RE-mitochondrie au niveau des MAM (Schneeberger *et al.* 2013).

L'administration d'un peptide mimétique de la SELENOT (PSELT, une dizaine d'acides aminés choisis dans la région redox) chez des souris modèle de la maladie de Parkinson protège les neurones dopaminergiques contre le stress oxydant et la mort cellulaire. Cette activité protectrice a permis de prévenir la neurodégénérescence, de restaurer les niveaux de tyrosine hydroxylase phosphorylée et d'améliorer les capacités motrices des animaux (Alsharif *et al.* 2021). Chez le rat l'administration de ce peptide entraîne après l'épisode d'ischémie-reperfusion une protection accrue du tissu cardiaque en limitant l'apoptose via la réduction des

niveaux de Bax, Caspase 3 et du cytochrome C (Rocca *et al.* 2018), ce qui montre qu'à l'instar de toutes les autres sélénoprotéines, la SELENOT présente une activité antioxydante portée par le centre redox. L'administration de ce peptide à des souris sous régime HF est en cours de réalisation pour tester l'activité protectrice de ce sélénopeptide. Nous testerons aussi l'effet du PSELT sur les neurones mhypoA-POMC KO pour voir s'il est capable de compenser la sénescence, auquel cas il ferait un excellent outil thérapeutique non seulement pour les maladies en lien avec un stress oxydant mais aussi dans le cadre du vieillissement cellulaire prématuré.

# Références

- Aachmann, F. L., D. E. Fomenko, A. Soragni, V. N. Gladyshev, and A. Dikiy. 2007. "Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins." *J Biol Chem* 282 (51):37036-44. doi: 10.1074/jbc.M705410200.
- Abid, H., D. Cartier, A. Hamieh, A. M. Francois-Bellan, C. Bucharles, H. Pothion, D. L. Manecka, J. Leprince, S. Adriouch, O. Boyer, Y. Anouar, and I. Lihrmann. 2019. "AMPK Activation of PGC-1alpha/NRF-1-Dependent SELENOT Gene Transcription Promotes PACAP-Induced Neuroendocrine Cell Differentiation Through Tolerance to Oxidative Stress." *Mol Neurobiol* 56 (6):4086-4101. doi: 10.1007/s12035-018-1352-x.
- Adachi, Y., K. Yamamoto, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori. 2008. "ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum." *Cell Struct Funct* 33 (1):75-89. doi: 10.1247/csf.07044.
- Adams, B. M., M. E. Oster, and D. N. Hebert. 2019. "Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum." *Protein J* 38 (3):317-329. doi: 10.1007/s10930-019-09831-w.
- Adams, J. 2003. "The proteasome: structure, function, and role in the cell." *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1:3-9. doi: 10.1016/s0305-7372(03)00081-1.
- Afshin, A., M. B. Reitsma, and C. J. L. Murray. 2017. "Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries." *N Engl J Med* 377 (15):1496-7. doi: 10.1056/NEJMc1710026.
- Ahumada-Castro, U., G. Bustos, E. Silva-Pavez, A. Puebla-Huerta, A. Lovy, and C. Cardenas. 2021. "In the Right Place at the Right Time: Regulation of Cell Metabolism by IP3R-Mediated Inter-Organellar Ca(2+) Fluxes." *Front Cell Dev Biol* 9:629522. doi: 10.3389/fcell.2021.629522.
- Ajmone-Cat, M. A., R. De Simone, A. M. Tartaglione, A. Di Biase, R. Di Benedetto, M. D'Archivio, R. Vari, L. Ricceri, F. Aureli, F. Iacoponi, A. Raggi, F. Cubadda, S. J. Fairweather-Tait, G. Calamandrei, and L. Minghetti. 2022. "Critical Role of Maternal Selenium Nutrition in Neurodevelopment: Effects on Offspring Behavior and Neuroinflammatory Profile." *Nutrients* 14 (9). doi: 10.3390/nu14091850.
- Al-Qassab, H., M. A. Smith, E. E. Irvine, J. Guillermet-Guibert, M. Claret, A. I. Choudhury, C. Selman, K. Piipari, M. Clements, S. Lingard, K. Chandarana, J. D. Bell, G. S. Barsh, A. J. Smith, R. L. Batterham, M. L. Ashford, B. Vanhaesebroeck, and D. J. Withers. 2009. "Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons." *Cell Metab* 10 (5):343-54. doi: 10.1016/j.cmet.2009.09.008.
- Alder, N. N., Y. Shen, J. L. Brodsky, L. M. Hendershot, and A. E. Johnson. 2005. "The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 168 (3):389-99. doi: 10.1083/jcb.200409174.
- Alim, I., J. T. Caulfield, Y. Chen, V. Swarup, D. H. Geschwind, E. Ivanova, J. Seravalli, Y. Ai, L. H. Sansing, E. J. Ste Marie, R. J. Hondal, S. Mukherjee, J. W. Cave, B. T. Sagdullaev, S. S. Karuppagounder, and R. R. Ratan. 2019. "Selenium Drives a Transcriptional Adaptive Program to Block Ferroptosis and Treat Stroke." *Cell* 177 (5):1262-1279 e25. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.032.
- Allen, K. N., S. Entova, L. C. Ray, and B. Imperiali. 2019. "Monotopic Membrane Proteins Join the Fold." *Trends Biochem Sci* 44 (1):7-20. doi: 10.1016/j.tibs.2018.09.013.
- Allmang, C., L. Wurth, and A. Krol. 2009. "The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated." *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1415-23. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.003.
- Alsharif, I., L. Boukhar, B. Lefranc, D. Godefroy, J. Aury-Landas, J. D. Rego, J. D. Rego, F. Naudet, A. Arabo, A. Chagraoui, D. Maltete, A. Benazzouz, C. Bauge, J. Leprince, A. G. Elkahlon, L. E. Eiden, and Y. Anouar. 2021. "Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models." *Redox Biol* 40:101839. doi: 10.1016/j.redox.2020.101839.

- Altshuler, I., J. J. Vaillant, S. Xu, and M. E. Cristescu. 2012. "The evolutionary history of sarco(endo)plasmic calcium ATPase (SERCA)." *PLoS One* 7 (12):e52617. doi: 10.1371/journal.pone.0052617.
- Amador, F. J., P. B. Stathopoulos, M. Enomoto, and M. Ikura. 2013. "Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies." *FEBS J* 280 (21):5456-70. doi: 10.1111/febs.12194.
- An, H. J., J. W. Froehlich, and C. B. Lebrilla. 2009. "Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins." *Curr Opin Chem Biol* 13 (4):421-6. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.07.022.
- An, R., M. Ji, and S. Zhang. 2018. "Global warming and obesity: a systematic review." *Obes Rev* 19 (2):150-163. doi: 10.1111/obr.12624.
- Anand, B. K., and J. R. Brobeck. 1952. "Food intake and spontaneous activity of rats with lesions in the amygdaloid nuclei." *J Neurophysiol* 15 (5):421-30. doi: 10.1152/jn.1952.15.5.421.
- Andreu, C. I., U. Woehlbier, M. Torres, and C. Hetz. 2012. "Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications." *FEBS Lett* 586 (18):2826-34. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.023.
- Anestal, K., and E. S. Arner. 2003. "Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine." *J Biol Chem* 278 (18):15966-72. doi: 10.1074/jbc.M210733200.
- Anouar, Y., I. Lihmann, A. Falluel-Morel, and L. Boukhar. 2018. "Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection." *Free Radic Biol Med* 127:145-152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076.
- Aponte, Y., D. Atasoy, and S. M. Sternson. 2011. "AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training." *Nat Neurosci* 14 (3):351-5. doi: 10.1038/nn.2739.
- Appenzeller-Herzog, C. 2011. "Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* 124 (Pt 6):847-55. doi: 10.1242/jcs.080895.
- Appenzeller-Herzog, C., and T. Simmen. 2016. "ER-luminal thiol/selenol-mediated regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling." *Biochem Soc Trans* 44 (2):452-9. doi: 10.1042/BST20150233.
- Area-Gomez, E., A. de Groof, E. Bonilla, J. Montesinos, K. Tanji, I. Boldogh, L. Pon, and E. A. Schon. 2018. "A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." *Cell Death Dis* 9 (3):335. doi: 10.1038/s41419-017-0215-0.
- Arias-Del-Val, J., J. Santo-Domingo, P. Garcia-Casas, P. Alvarez-Illera, A. Nunez Galindo, A. Wiederkehr, R. I. Fonteriz, M. Montero, and J. Alvarez. 2019. "Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum by AMP-activated kinase modulators." *Cell Calcium* 77:68-76. doi: 10.1016/j.ceca.2018.12.004.
- Armijo-Weingart, L., and G. Gallo. 2017. "It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches." *Mol Cell Neurosci* 84:36-47. doi: 10.1016/j.mcn.2017.03.007.
- Arner, E. S. 2010. "Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine?" *Exp Cell Res* 316 (8):1296-303. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.032.
- Arthur, J. R. 2000. "The glutathione peroxidases." *Cell Mol Life Sci* 57 (13-14):1825-35. doi: 10.1007/pl00000664.
- Artus, C., H. Boujrad, A. Bouharrou, M. N. Brunelle, S. Hoos, V. J. Yuste, P. Lenormand, J. C. Rousselle, A. Namane, P. England, H. K. Lorenzo, and S. A. Susin. 2010. "AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX." *EMBO J* 29 (9):1585-99. doi: 10.1038/emboj.2010.43.
- Bai, L., and H. Li. 2019. "Cryo-EM is uncovering the mechanism of eukaryotic protein N-glycosylation." *FEBS J* 286 (9):1638-1644. doi: 10.1111/febs.14705.
- Bai, L., T. Wang, G. Zhao, A. Kovach, and H. Li. 2018. "The atomic structure of a eukaryotic oligosaccharyltransferase complex." *Nature* 555 (7696):328-333. doi: 10.1038/nature25755.

- Bakunts, A., A. Orsi, M. Vitale, A. Cattaneo, F. Lari, L. Tade, R. Sitia, A. Raimondi, A. Bachi, and E. van Anken. 2017. "Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.27518.
- Balthasar, N., R. Coppari, J. McMinn, S. M. Liu, C. E. Lee, V. Tang, C. D. Kenny, R. A. McGovern, S. C. Chua, Jr., J. K. Elmquist, and B. B. Lowell. 2004. "Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis." *Neuron* 42 (6):983-91. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.004.
- Banhegyi, G., M. Csala, G. Nagy, V. Sorrentino, R. Fulceri, and A. Benedetti. 2003. "Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1." *Biochem J* 376 (Pt 3):807-12. doi: 10.1042/BJ20031419.
- Banning, A., S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou, and R. Brigelius-Flohe. 2005. "The GI-GPx gene is a target for Nrf2." *Mol Cell Biol* 25 (12):4914-23. doi: 10.1128/MCB.25.12.4914-4923.2005.
- Barrett, C. W., S. P. Short, and C. S. Williams. 2017. "Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut." *Cell Mol Life Sci* 74 (4):607-616. doi: 10.1007/s00018-016-2339-2.
- Bartok, A., D. Weaver, T. Golenar, Z. Nichtova, M. Katona, S. Bansaghi, K. J. Alzayady, V. K. Thomas, H. Ando, K. Mikoshiba, S. K. Joseph, D. I. Yule, G. Csordas, and G. Hajnoczky. 2019. "IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer." *Nat Commun* 10 (1):3726. doi: 10.1038/s41467-019-11646-3.
- Behne, D., A. Kyriakopoulos, H. Meinhold, and J. Kohrle. 1990. "Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme." *Biochem Biophys Res Commun* 173 (3):1143-9. doi: 10.1016/s0006-291x(05)80905-2.
- Benani, A., C. Hryhorczuk, A. Gouaze, X. Fioramonti, X. Brenachot, C. Guissard, A. Krezymon, T. Duparc, A. Colom, E. Nedelec, C. Rigault, A. Lemoine, J. Gascuel, R. Gerardy-Schahn, P. Valet, C. Knaut, A. Lorsignol, and L. Penicaud. 2012. "Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice." *J Neurosci* 32 (35):11970-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012.
- Benyair, R., N. Ogen-Shtern, N. Mazkereth, B. Shai, M. Ehrlich, and G. Z. Lederkremer. 2015. "Mammalian ER mannosidase I resides in quality control vesicles, where it encounters its glycoprotein substrates." *Mol Biol Cell* 26 (2):172-84. doi: 10.1091/mbc.E14-06-1152.
- Benyair, R., E. Ron, and G. Z. Lederkremer. 2011. "Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum." *Int Rev Cell Mol Biol* 292:197-280. doi: 10.1016/B978-0-12-386033-0.00005-0.
- Berglund, E. D., C. Liu, J. W. Sohn, T. Liu, M. H. Kim, C. E. Lee, C. R. Vianna, K. W. Williams, Y. Xu, and J. K. Elmquist. 2013. "Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis." *J Clin Invest* 123 (12):5061-70. doi: 10.1172/JCI70338.
- Berridge, M. J. 1998. "Neuronal calcium signaling." *Neuron* 21 (1):13-26. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80510-3.
- Berridge, M. J. 2002. "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle." *Cell Calcium* 32 (5-6):235-49. doi: 10.1016/s0143416002001823.
- Berry, M. J., L. Banu, J. W. Harney, and P. R. Larsen. 1993. "Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons." *EMBO J* 12 (8):3315-22.
- Berry, M. J., L. Banu, and P. R. Larsen. 1991. "Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme." *Nature* 349 (6308):438-40. doi: 10.1038/349438a0.
- Bianco, A. C., D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry, and P. R. Larsen. 2002. "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." *Endocr Rev* 23 (1):38-89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto, and H. J. Forman. 2008. "Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling." *Antioxid Redox Signal* 10 (9):1549-64. doi: 10.1089/ars.2008.2063.
- Blobel, G. 1980. "Intracellular protein topogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (3):1496-500. doi: 10.1073/pnas.77.3.1496.



- Bodakuntla, S., H. Nedozralova, N. Basnet, and N. Mizuno. 2021. "Cytoskeleton and Membrane Organization at Axon Branches." *Front Cell Dev Biol* 9:707486. doi: 10.3389/fcell.2021.707486.
- Bojar, D., L. Meche, G. Meng, W. Eng, D. F. Smith, R. D. Cummings, and L. K. Mahal. 2022. "A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities." *ACS Chem Biol*. doi: 10.1021/acscchembio.1c00689.
- Bonfanti, L. 2006. "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." *Prog Neurobiol* 80 (3):129-64. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.003.
- Bonfanti, L., and T. Seki. 2021. "The PSA-NCAM-Positive "Immature" Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity." *Cells* 10 (10). doi: 10.3390/cells10102542.
- Borodkina, A. V., A. N. Shatrova, P. I. Deryabin, A. A. Griukova, P. A. Abushik, S. M. Antonov, N. N. Nikolsky, and E. B. Burova. 2016. "Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress." *Aging (Albany NY)* 8 (12):3400-3418. doi: 10.18632/aging.101130.
- Boukhar, L., A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. El Hajji, J. J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihmann, and Y. Anouar. 2016. "Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease." *Antioxid Redox Signal* 24 (11):557-74. doi: 10.1089/ars.2015.6478.
- Braunger, K., S. Pfeffer, S. Shrimal, R. Gilmore, O. Berninghausen, E. C. Mandon, T. Becker, F. Forster, and R. Beckmann. 2018. "Structural basis for coupling protein transport and N-glycosylation at the mammalian endoplasmic reticulum." *Science* 360 (6385):215-219. doi: 10.1126/science.aar7899.
- Bravo, R., J. M. Vicencio, V. Parra, R. Troncoso, J. P. Munoz, M. Bui, C. Quiroga, A. E. Rodriguez, H. E. Verdejo, J. Ferreira, M. Iglewski, M. Chiong, T. Simmen, A. Zorzano, J. A. Hill, B. A. Rothermel, G. Szabadkai, and S. Lavandero. 2011. "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress." *J Cell Sci* 124 (Pt 13):2143-52. doi: 10.1242/jcs.080762.
- Breitling, J., and M. Aebi. 2013. "N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (8):a013359. doi: 10.1101/cshperspect.a013359.
- Brenachot, X., E. Nedelec, S. Ben Fradj, G. Boudry, V. Douard, A. Laderriere, A. Lemoine, F. Lienard, D. Nuzzaci, L. Penicaud, C. Rigault, and A. Benani. 2018. "Lack of Hypothalamus Polysialylation Inducibility Correlates With Maladaptive Eating Behaviors and Predisposition to Obesity." *Front Nutr* 5:125. doi: 10.3389/fnut.2018.00125.
- Brigelius-Flohe, R. 2009. "Commentary: oxidative stress reconsidered." *Genes Nutr* 4 (3):161-3. doi: 10.1007/s12263-009-0131-8.
- Brostrom, M. A., and C. O. Brostrom. 2003. "Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability." *Cell Calcium* 34 (4-5):345-63. doi: 10.1016/s0143-4160(03)00127-1.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, and M. Stefani. 2002. "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." *Nature* 416 (6880):507-11. doi: 10.1038/416507a.
- Budiman, M. E., J. L. Bubenik, A. C. Miniard, L. M. Middleton, C. A. Gerber, A. Cash, and D. M. Driscoll. 2009. "Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation." *Mol Cell* 35 (4):479-89. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.026.
- Burk, R. F., and K. E. Hill. 2015. "Regulation of Selenium Metabolism and Transport." *Annu Rev Nutr* 35:109-34. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
- Cai, H., C. C. Wang, and C. L. Tsou. 1994. "Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds." *J Biol Chem* 269 (40):24550-2.

- Cakir, I., N. E. Cyr, M. Perello, B. P. Litvinov, A. Romero, R. C. Stuart, and E. A. Nillni. 2013. "Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing." *J Biol Chem* 288 (24):17675-88. doi: 10.1074/jbc.M113.475343.
- Cakir, I., and E. A. Nillni. 2019. "Endoplasmic Reticulum Stress, the Hypothalamus, and Energy Balance." *Trends Endocrinol Metab* 30 (3):163-176. doi: 10.1016/j.tem.2019.01.002.
- Campos-Bedolla, P., F. R. Walter, S. Veszeka, and M. A. Deli. 2014. "Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system." *Arch Med Res* 45 (8):610-38. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.11.018.
- Cao, S. S., and R. J. Kaufman. 2014. "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease." *Antioxid Redox Signal* 21 (3):396-413. doi: 10.1089/ars.2014.5851.
- Carlson, B. A., S. V. Novoselov, E. Kumaraswamy, B. J. Lee, M. R. Anver, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2004. "Specific excision of the selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function." *J Biol Chem* 279 (9):8011-7. doi: 10.1074/jbc.M310470200.
- Carlson, B. A., X. M. Xu, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2005. "Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA." *J Biol Chem* 280 (7):5542-8. doi: 10.1074/jbc.M411725200.
- Carreras-Sureda, A., P. Pihan, and C. Hetz. 2018. "Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses." *Cell Calcium* 70:24-31. doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.004.
- Carvalho, P., A. M. Stanley, and T. A. Rapoport. 2010. "Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p." *Cell* 143 (4):579-91. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.028.
- Castex, M. T., A. Arabo, M. Benard, V. Roy, V. Le Joncour, G. Prevost, J. J. Bonnet, Y. Anouar, and A. Falluel-Morel. 2016. "Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice." *Mol Neurobiol* 53 (9):5818-5832. doi: 10.1007/s12035-015-9505-7.
- Cecarini, V., Q. Ding, and J. N. Keller. 2007. "Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease." *Free Radic Res* 41 (6):673-80. doi: 10.1080/10715760701286159.
- Chambers, I., J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, and P. R. Harrison. 1986. "The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA." *EMBO J* 5 (6):1221-7. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04350.x.
- Chang, I. J., M. He, and C. T. Lam. 2018. "Congenital disorders of glycosylation." *Ann Transl Med* 6 (24):477. doi: 10.21037/atm.2018.10.45.
- Chen, V. P., Y. Gao, L. Geng, and S. Brimijoin. 2015. "Radiometric assay of ghrelin hydrolase activity and 3H-ghrelin distribution into mouse tissues." *Biochem Pharmacol* 98 (4):732-9. doi: 10.1016/j.bcp.2015.10.016.
- Chen, W., Z. Zhang, F. Yan, X. Jiang, S. Qin, and H. Dong. 2017. "Identification of three selenoprotein T paralogs in goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis in response to environmental stressors." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 203:65-75. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.09.004.
- Chen, X., A. Karnovsky, M. D. Sans, P. C. Andrews, and J. A. Williams. 2010. "Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies." *Proteomics* 10 (22):4040-52. doi: 10.1002/pmic.201000234.
- Cherepanova, N. A., S. Shrimal, and R. Gilmore. 2014. "Oxidoreductase activity is necessary for N-glycosylation of cysteine-proximal acceptor sites in glycoproteins." *J Cell Biol* 206 (4):525-39. doi: 10.1083/jcb.201404083.
- Cherepanova, N. A., S. V. Venev, J. D. Leszyk, S. A. Shaffer, and R. Gilmore. 2019. "Quantitative glycoproteomics reveals new classes of STT3A- and STT3B-dependent N-glycosylation sites." *J Cell Biol* 218 (8):2782-2796. doi: 10.1083/jcb.201904004.

- Chernorudskiy, A., E. Varone, S. F. Colombo, S. Fumagalli, A. Cagnotto, A. Cattaneo, M. Briens, M. Baltzinger, L. Kuhn, A. Bachi, A. Berardi, M. Salmona, G. Musco, N. Borgese, A. Lescure, and E. Zito. 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 (35):21288-21298. doi: 10.1073/pnas.2003847117.
- Clegg, D. J., K. Gotoh, C. Kemp, M. D. Wortman, S. C. Benoit, L. M. Brown, D. D'Alessio, P. Tso, R. J. Seeley, and S. C. Woods. 2011. "Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity." *Physiol Behav* 103 (1):10-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.010.
- Cone, R. D. 2005. "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." *Nat Neurosci* 8 (5):571-8. doi: 10.1038/nn1455.
- Conrad, M., C. Jakupoglu, S. G. Moreno, S. Lippl, A. Banjac, M. Schneider, H. Beck, A. K. Hatzopoulos, U. Just, F. Sinowatz, W. Schmahl, K. R. Chien, W. Wurst, G. W. Bornkamm, and M. Brielmeier. 2004. "Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function." *Mol Cell Biol* 24 (21):9414-23. doi: 10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004.
- Conrad, M., and B. Proneth. 2020. "Selenium: Tracing Another Essential Element of Ferroptotic Cell Death." *Cell Chem Biol* 27 (4):409-419. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.03.012.
- Conus, S., T. Kaufmann, I. Fellay, I. Otter, T. Rosse, and C. Borner. 2000. "Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints." *EMBO J* 19 (7):1534-44. doi: 10.1093/emboj/19.7.1534.
- Copeland, P. R., J. E. Fletcher, B. A. Carlson, D. L. Hatfield, and D. M. Driscoll. 2000. "A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs." *EMBO J* 19 (2):306-14. doi: 10.1093/emboj/19.2.306.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone, and M. J. Low. 2001. "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." *Nature* 411 (6836):480-4. doi: 10.1038/35078085.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschop, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone, and T. L. Horvath. 2003. "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." *Neuron* 37 (4):649-61. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00063-1.
- Csordas, G., C. Renken, P. Varnai, L. Walter, D. Weaver, K. F. Buttle, T. Balla, C. A. Mannella, and G. Hajnoczky. 2006. "Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria." *J Cell Biol* 174 (7):915-21. doi: 10.1083/jcb.200604016.
- Cullen, S. P., and S. J. Martin. 2009. "Caspase activation pathways: some recent progress." *Cell Death Differ* 16 (7):935-8. doi: 10.1038/cdd.2009.59.
- Cuozzo, J. W., and C. A. Kaiser. 1999. "Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation." *Nat Cell Biol* 1 (3):130-5. doi: 10.1038/11047.
- Daiho, T., K. Yamasaki, T. Saino, M. Kamidochi, K. Satoh, H. Iizuka, and H. Suzuki. 2001. "Mutations of either or both Cys876 and Cys888 residues of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase result in a complete loss of Ca<sup>2+</sup> transport activity without a loss of Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity. Role of the CYS876-CYS888 disulfide bond." *J Biol Chem* 276 (35):32771-8. doi: 10.1074/jbc.M101229200.
- de Mera-Rodriguez, J. A., G. Alvarez-Hernan, Y. Ganán, G. Martín-Partido, J. Rodríguez-Leon, and J. Francisco-Morcillo. 2021. "Is Senescence-Associated beta-Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development?" *Front Cell Dev Biol* 9:623175. doi: 10.3389/fcell.2021.623175.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R. L. Zollner, A. C. Boschero, M. J. Saad, and L. A. Velloso. 2005. "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and

- induces insulin resistance in the hypothalamus." *Endocrinology* 146 (10):4192-9. doi: 10.1210/en.2004-1520.
- de Toledo, Jhds, T. F. C. Fraga-Silva, P. A. Borim, L. R. C. de Oliveira, E. D. S. Oliveira, L. L. Perico, C. A. Hiruma-Lima, A. A. L. de Souza, C. A. F. de Oliveira, P. M. Padilha, M. F. Pinatto-Botelho, A. A. Dos Santos, A. Sartori, and S. F. G. Zorzella-Pezavento. 2020. "Organic Selenium Reaches the Central Nervous System and Downmodulates Local Inflammation: A Complementary Therapy for Multiple Sclerosis?" *Front Immunol* 11:571844. doi: 10.3389/fimmu.2020.571844.
- Degechisa, S. T., Y. T. Dabi, and S. T. Gizaw. 2022. "The mitochondrial associated endoplasmic reticulum membranes: A platform for the pathogenesis of inflammation-mediated metabolic diseases." *Immun Inflamm Dis* 10 (7):e647. doi: 10.1002/iid3.647.
- Delaunay-Moisan, A., A. Ponsero, and M. B. Toledano. 2017. "Reexamining the Function of Glutathione in Oxidative Protein Folding and Secretion." *Antioxid Redox Signal* 27 (15):1178-1199. doi: 10.1089/ars.2017.7148.
- Delgado, M. G., C. A. Rivera, and A. M. Lennon-Dumenil. 2022. "Macropinocytosis and Cell Migration: Don't Drink and Drive." *Subcell Biochem* 98:85-102. doi: 10.1007/978-3-030-94004-1\_5.
- Denoyelle, C., G. Abou-Rjaily, V. Bezrookove, M. Verhaegen, T. M. Johnson, D. R. Fullen, J. N. Pointer, S. B. Gruber, L. D. Su, M. A. Nikiforov, R. J. Kaufman, B. C. Bastian, and M. S. Soengas. 2006. "Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway." *Nat Cell Biol* 8 (10):1053-63. doi: 10.1038/ncb1471.
- Deprez, P., M. Gautschi, and A. Helenius. 2005. "More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle." *Mol Cell* 19 (2):183-95. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.029.
- Dikiy, A., S. V. Novoselov, D. E. Fomenko, A. Sengupta, B. A. Carlson, R. L. Cerny, K. Ginalski, N. V. Grishin, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2007. "SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family." *Biochemistry* 46 (23):6871-82. doi: 10.1021/bi602462q.
- Ding, Q., E. Dimayuga, and J. N. Keller. 2006. "Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS." *Antioxid Redox Signal* 8 (1-2):163-72. doi: 10.1089/ars.2006.8.163.
- Dixon, B. M., S. H. Heath, R. Kim, J. H. Suh, and T. M. Hagen. 2008. "Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation." *Antioxid Redox Signal* 10 (5):963-72. doi: 10.1089/ars.2007.1869.
- Downey, C. M., C. R. Horton, B. A. Carlson, T. E. Parsons, D. L. Hatfield, B. Hallgrimsson, and F. R. Jirik. 2009. "Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, Trsp, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: a putative model for Kashin-Beck disease." *PLoS Genet* 5 (8):e1000616. doi: 10.1371/journal.pgen.1000616.
- Dubern, B., C. Lubrano-Berthelie, M. Mencarelli, B. Ersoy, M. L. Frelut, D. Bougle, B. Costes, C. Simon, P. Tounian, C. Vaisse, and K. Clement. 2008. "Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the alpha-melanocyte stimulating hormone domain." *Pediatr Res* 63 (2):211-6. doi: 10.1203/PDR.0b013e31815ed62b.
- Dulary, E., S. Potelle, D. Legrand, and F. Foulquier. 2017. "TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis." *Tissue Cell* 49 (2 Pt A):150-156. doi: 10.1016/j.tice.2016.06.006.
- Dulhunty, A., C. Haarmann, D. Green, and J. Hart. 2000. "How many cysteine residues regulate ryanodine receptor channel activity?" *Antioxid Redox Signal* 2 (1):27-34. doi: 10.1089/ars.2000.2.1-27.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah, E. E. Jobst, L. Tonelli-Lemos, S. K. Billes, M. M. Glavas, B. E. Grayson, M. Perello, E. A. Nillni, K. L. Grove, and M. A. Cowley. 2007. "Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons." *Cell Metab* 5 (3):181-94. doi: 10.1016/j.cmet.2007.02.004.

- Fan, W., B. A. Boston, R. A. Kesterson, V. J. Hruby, and R. D. Cone. 1997. "Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome." *Nature* 385 (6612):165-8. doi: 10.1038/385165a0.
- Farooqi, I. S., S. Drop, A. Clements, J. M. Keogh, J. Biernacka, S. Lowenbein, B. G. Challis, and S. O'Rahilly. 2006. "Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans." *Diabetes* 55 (9):2549-53. doi: 10.2337/db06-0214.
- Farooqi, I. S., J. M. Keogh, G. S. Yeo, E. J. Lank, T. Cheetham, and S. O'Rahilly. 2003. "Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene." *N Engl J Med* 348 (12):1085-95. doi: 10.1056/NEJMoa022050.
- Farr, O. M., C. R. Li, and C. S. Mantzoros. 2016. "Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging." *Metabolism* 65 (5):699-713. doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.002.
- Fenech, E. J., S. Ben-Dor, and M. Schuldiner. 2020. "Double the Fun, Double the Trouble: Paralogs and Homologs Functioning in the Endoplasmic Reticulum." *Annu Rev Biochem* 89:637-666. doi: 10.1146/annurev-biochem-011520-104831.
- Filadi, R., N. S. Leal, B. Schreiner, A. Rossi, G. Dentoni, C. M. Pinho, B. Wiehager, D. Cieri, T. Cali, P. Pizzo, and M. Ankarcona. 2018. "TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca(2+) Transfer." *Curr Biol* 28 (3):369-382 e6. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.047.
- Flohe, L., W. A. Gunzler, and H. H. Schock. 1973. "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." *FEBS Lett* 32 (1):132-4. doi: 10.1016/0014-5793(73)80755-0.
- Ford, K. L., W. Zeng, J. L. Heazlewood, and A. Bacic. 2015. "Characterization of protein N-glycosylation by tandem mass spectrometry using complementary fragmentation techniques." *Front Plant Sci* 6:674. doi: 10.3389/fpls.2015.00674.
- Forstrom, J. W., J. J. Zakowski, and A. L. Tappel. 1978. "Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry* 17 (13):2639-44. doi: 10.1021/bi00606a028.
- Fradejas, N., C. Serrano-Perez Mdel, P. Tranque, and S. Calvo. 2011. "Selenoprotein S expression in reactive astrocytes following brain injury." *Glia* 59 (6):959-72. doi: 10.1002/glia.21168.
- Fredericks, G. J., F. W. Hoffmann, A. H. Rose, H. J. Osterheld, F. M. Hess, F. Mercier, and P. R. Hoffmann. 2014. "Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (46):16478-83. doi: 10.1073/pnas.1417176111.
- Freeman, L. R., and A. C. Granholm. 2012. "Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet." *J Cereb Blood Flow Metab* 32 (4):643-53. doi: 10.1038/jcbfm.2011.168.
- Freret, M., L. Drouot, A. Obry, S. Ahmed-Lacheheb, C. Dauly, S. Adriouch, P. Cosette, F. J. Authier, and O. Boyer. 2013. "Overexpression of MHC class I in muscle of lymphocyte-deficient mice causes a severe myopathy with induction of the unfolded protein response." *Am J Pathol* 183 (3):893-904. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.003.
- Friedmann Angeli, J. P., D. V. Krysko, and M. Conrad. 2019. "Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion." *Nat Rev Cancer* 19 (7):405-414. doi: 10.1038/s41568-019-0149-1.
- Fu, Y., W. H. Cheng, D. A. Ross, and Xg Lei. 1999. "Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat." *Proc Soc Exp Biol Med* 222 (2):164-9. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-127.x.
- Fujino, I., N. Yamada, A. Miyawaki, M. Hasegawa, T. Furuichi, and K. Mikoshiba. 1995. "Differential expression of type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNAs in various mouse tissues: in situ hybridization study." *Cell Tissue Res* 280 (2):201-10. doi: 10.1007/BF00307790.

- Galante, M., and A. Marty. 2003. "Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse." *J Neurosci* 23 (35):11229-34.
- Gao, X., C. G. Bonzerato, and R. J. H. Wojcikiewicz. 2022. "Binding of the erlin1/2 complex to the third intraluminal loop of IP3R1 triggers its ubiquitin-proteasomal degradation." *J Biol Chem* 298 (6):102026. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102026.
- Gao, Y., H. C. Feng, K. Walder, K. Bolton, T. Sunderland, N. Bishara, M. Quick, L. Kantham, and G. R. Collier. 2004. "Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein." *FEBS Lett* 563 (1-3):185-90. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00296-0.
- Gayen, S., and C. Kang. 2011. "Solution structure of a human minimembrane protein Ost4, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex." *Biochem Biophys Res Commun* 409 (3):572-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.050.
- Ghemrawi, R., and M. Khair. 2020. "Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases." *Int J Mol Sci* 21 (17). doi: 10.3390/ijms21176127.
- Giacomello, M., and L. Pellegrini. 2016. "The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness." *Cell Death Differ* 23 (9):1417-27. doi: 10.1038/cdd.2016.52.
- Gladyshev, V. N., E. S. Arner, M. J. Berry, R. Brigelius-Flohe, E. A. Bruford, R. F. Burk, B. A. Carlson, S. Castellano, L. Chavatte, M. Conrad, P. R. Copeland, A. M. Diamond, D. M. Driscoll, A. Ferreira, L. Flohe, F. R. Green, R. Guigo, D. E. Handy, D. L. Hatfield, J. Hesketh, P. R. Hoffmann, A. Holmgren, R. J. Hondal, M. T. Howard, K. Huang, H. Y. Kim, I. Y. Kim, J. Kohrle, A. Krol, G. V. Kryukov, B. J. Lee, B. C. Lee, X. G. Lei, Q. Liu, A. Lescure, A. V. Lobanov, J. Loscalzo, M. Maiorino, M. Mariotti, K. Sandeep Prabhu, M. P. Rayman, S. Rozovsky, G. Salinas, E. E. Schmidt, L. Schomburg, U. Schweizer, M. Simonovic, R. A. Sunde, P. A. Tsuji, S. Tweedie, F. Ursini, P. D. Whanger, and Y. Zhang. 2016. "Selenoprotein Gene Nomenclature." *J Biol Chem* 291 (46):24036-24040. doi: 10.1074/jbc.M116.756155.
- Godefroy, D., L. Boukhar, B. Y. Mallouki, E. Carpentier, C. Dubessy, F. Chigr, Y. Tillet, and Y. Anouar. 2022. "SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study." *Neuroendocrinology*. doi: 10.1159/000522091.
- Goffart, S., P. Tikkanen, C. Michell, T. Wilson, and J. Pohjoismaki. 2021. "The Type and Source of Reactive Oxygen Species Influences the Outcome of Oxidative Stress in Cultured Cells." *Cells* 10 (5). doi: 10.3390/cells10051075.
- Gong, T., A. C. Hashimoto, A. R. Sasuclark, V. S. Khadka, A. Gurary, and M. W. Pitts. 2019. "Selenoprotein M Promotes Hypothalamic Leptin Signaling and Thioredoxin Antioxidant Activity." *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2018.7594.
- Gonzalez-Gualda, E., A. G. Baker, L. Fruk, and D. Munoz-Espin. 2021. "A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo." *FEBS J* 288 (1):56-80. doi: 10.1111/febs.15570.
- Grumolato, L., A. G. Elkahlon, H. Ghzili, D. Alexandre, C. Coulouarn, L. Yon, J. P. Salier, L. E. Eiden, A. Fournier, H. Vaudry, and Y. Anouar. 2003. "Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion." *Endocrinology* 144 (6):2368-79. doi: 10.1210/en.2002-0106.
- Grumolato, L., H. Ghzili, M. Montero-Hadjadje, S. Gasman, J. Lesage, Y. Tanguy, L. Galas, D. Ait-Ali, J. Leprince, N. C. Guerineau, A. G. Elkahlon, A. Fournier, D. Vieau, H. Vaudry, and Y. Anouar. 2008. "Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion." *FASEB J* 22 (6):1756-68. doi: 10.1096/fj.06-075820.
- Grunewald, S., G. Matthijs, and J. Jaeken. 2002. "Congenital disorders of glycosylation: a review." *Pediatr Res* 52 (5):618-24. doi: 10.1203/00006450-200211000-00003.
- Guerrero-Hernandez, A., A. Dagnino-Acosta, and A. Verkhatsky. 2010. "An intelligent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca<sup>2+</sup> pool." *Cell Calcium* 48 (2-3):143-9. doi: 10.1016/j.ceca.2010.08.001.

- Gump, J. M., and A. Thorburn. 2011. "Autophagy and apoptosis: what is the connection?" *Trends Cell Biol* 21 (7):387-92. doi: 10.1016/j.tcb.2011.03.007.
- Guo, L., W. Yang, Q. Huang, J. Qiang, J. R. Hart, W. Wang, J. Hu, J. Zhu, N. Liu, and Y. Zhang. 2018. "Selenocysteine-Specific Mass Spectrometry Reveals Tissue-Distinct Selenoproteomes and Candidate Selenoproteins." *Cell Chem Biol* 25 (11):1380-1388 e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.08.006.
- Haas, I. G., and M. Wabl. 1983. "Immunoglobulin heavy chain binding protein." *Nature* 306 (5941):387-9. doi: 10.1038/306387a0.
- Hadley, K. B., and R. A. Sunde. 2001. "Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver." *J Nutr Biochem* 12 (12):693-702. doi: 10.1016/s0955-2863(01)00189-9.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. 1998. "Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons." *Nat Neurosci* 1 (4):271-2. doi: 10.1038/1082.
- Halliwell, B. 2006. "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J Neurochem* 97 (6):1634-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.
- Halliwell, B. 2007. "Biochemistry of oxidative stress." *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 5):1147-50. doi: 10.1042/BST0351147.
- Hambright, W. S., R. S. Fonseca, L. Chen, R. Na, and Q. Ran. 2017. "Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration." *Redox Biol* 12:8-17. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.021.
- Hamieh, A., D. Cartier, H. Abid, A. Calas, C. Burel, C. Bucharles, C. Jehan, L. Grumolato, M. Landry, P. Lerouge, Y. Anouar, and I. Lihmann. 2017. "Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion." *EMBO Rep* 18 (11):1935-1946. doi: 10.15252/embr.201643504.
- Handa-Narumi, M., T. Yoshimura, H. Konishi, Y. Fukata, Y. Manabe, K. Tanaka, G. M. Bao, H. Kiyama, K. Fukase, and K. Ikenaka. 2018. "Branched Sialylated N-glycans Are Accumulated in Brain Synaptosomes and Interact with Siglec-H." *Cell Struct Funct* 43 (2):141-152. doi: 10.1247/csf.18009.
- Hanus, C., H. Geptin, G. Tushev, S. Garg, B. Alvarez-Castelao, S. Sambandan, L. Kochen, A. S. Hafner, J. D. Langer, and E. M. Schuman. 2016. "Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties." *Elife* 5. doi: 10.7554/eLife.20609.
- Hatahet, F., and L. W. Ruddock. 2009. "Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation." *Antioxid Redox Signal* 11 (11):2807-50. doi: 10.1089/ARS.2009.2466.
- Hatfield, D. L., B. A. Carlson, X. M. Xu, H. Mix, and V. N. Gladyshev. 2006. "Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81:97-142. doi: 10.1016/S0079-6603(06)81003-2.
- Hebert, D. N., and M. Molinari. 2007. "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." *Physiol Rev* 87 (4):1377-408. doi: 10.1152/physrev.00050.2006.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, L. H. Tecott, W. Fan, M. J. Low, J. L. Smart, M. Rubinstein, J. B. Tatro, J. N. Marcus, H. Holstege, C. E. Lee, R. D. Cone, and J. K. Elmquist. 2002. "Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine." *Science* 297 (5581):609-11. doi: 10.1126/science.1072327.
- Hendershot, L. M. 2004. "The ER function BiP is a master regulator of ER function." *Mt Sinai J Med* 71 (5):289-97.
- Henry, F. E., K. Sugino, A. Tozer, T. Branco, and S. M. Sternson. 2015. "Cell type-specific transcriptomics of hypothalamic energy-sensing neuron responses to weight-loss." *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.09800.
- Hetz, C. 2012. "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (2):89-102. doi: 10.1038/nrm3270.

- Hetz, C., and F. R. Papa. 2018. "The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control." *Mol Cell* 69 (2):169-181. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
- Higo, T., M. Hattori, T. Nakamura, T. Natsume, T. Michikawa, and K. Mikoshiba. 2005. "Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44." *Cell* 120 (1):85-98. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.048.
- Hill, J. W., K. W. Williams, C. Ye, J. Luo, N. Balthasar, R. Coppari, M. A. Cowley, L. C. Cantley, B. B. Lowell, and J. K. Elmquist. 2008. "Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice." *J Clin Invest* 118 (5):1796-805. doi: 10.1172/JCI32964.
- Hill, K. E., P. R. Lyons, and R. F. Burk. 1992. "Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency." *Biochem Biophys Res Commun* 185 (1):260-3. doi: 10.1016/s0006-291x(05)80984-2.
- Hill, K. E., J. Zhou, W. J. McMahan, A. K. Motley, and R. F. Burk. 2004. "Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene." *J Nutr* 134 (1):157-61. doi: 10.1093/jn/134.1.157.
- Horibata, Y., O. Elpeleg, A. Eran, Y. Hirabayashi, D. Savitzki, G. Tal, H. Mandel, and H. Sugimoto. 2018. "EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans." *J Lipid Res* 59 (6):1015-1026. doi: 10.1194/jlr.P081620.
- Horn, S. C., J. Hanna, C. Hirsch, C. Volkwein, A. Schutz, U. Heinemann, T. Sommer, and E. Jarosch. 2009. "Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase." *Mol Cell* 36 (5):782-93. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.015.
- Hornsby, P. J., and S. E. Harris. 1987. "Oxidative damage to DNA and replicative lifespan in cultured adrenocortical cells." *Exp Cell Res* 168 (1):203-17. doi: 10.1016/0014-4827(87)90429-0.
- Hotamisligil, G. S. 2006. "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444 (7121):860-7. doi: 10.1038/nature05485.
- Houck, S. A., H. Y. Ren, V. J. Madden, J. N. Bonner, M. P. Conlin, J. A. Janovick, P. M. Conn, and D. M. Cyr. 2014. "Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR." *Mol Cell* 54 (1):166-179. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.025.
- Houdou, M., and F. Foulquier. 2020. "[Panorama on congenital disorders of glycosylation (CDG): from 1980 to 2020]." *Med Sci (Paris)* 36 (8-9):735-746. doi: 10.1051/medsci/2020128.
- Hruby, A., and F. B. Hu. 2015. "The Epidemiology of Obesity: A Big Picture." *Pharmacoeconomics* 33 (7):673-89. doi: 10.1007/s40273-014-0243-x.
- Huang, C., R. Bhaskaran, and S. Mohanty. 2012. "Eukaryotic N-glycosylation occurs via the membrane-anchored C-terminal domain of the Stt3p subunit of oligosaccharyltransferase." *J Biol Chem* 287 (39):32450-8. doi: 10.1074/jbc.M112.342253.
- Hwang, C., A. J. Sinskey, and H. F. Lodish. 1992. "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science* 257 (5076):1496-502. doi: 10.1126/science.1523409.
- Hwang, J., and L. Qi. 2018. "Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways." *Trends Biochem Sci* 43 (8):593-605. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.
- Ikematsu, K., R. Tsuda, S. Tsuruya, and I. Nakasono. 2007. "Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display." *Forensic Sci Int* 169 (2-3):168-72. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.015.
- Itakura, Y., N. Sasaki, D. Kami, S. Gojo, A. Umezawa, and M. Toyoda. 2016. "N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging." *Cell Biosci* 6:14. doi: 10.1186/s13578-016-0079-5.
- Jais, A., and J. C. Bruning. 2017. "Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease." *J Clin Invest* 127 (1):24-32. doi: 10.1172/JCI88878.
- Jakupoglu, C., G. K. Przemeck, M. Schneider, S. G. Moreno, N. Mayr, A. K. Hatzopoulos, M. H. de Angelis, W. Wurst, G. W. Bornkamm, M. Brielmeier, and M. Conrad. 2005. "Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development." *Mol Cell Biol* 25 (5):1980-8. doi: 10.1128/MCB.25.5.1980-1988.2005.



- Jang, M., A. Mistry, A. G. Swick, and D. R. Romsos. 2000. "Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice." *J Nutr* 130 (11):2813-20. doi: 10.1093/jn/130.11.2813.
- Jegou, S., L. Mounien, I. Boutelet, and H. Vaudry. 2003. "[The YY3-36 peptide, a new therapeutic weapon against obesity?]." *Med Sci (Paris)* 19 (5):537-9. doi: 10.1051/medsci/2003195537.
- Jeon, Y. H., K. Y. Ko, J. H. Lee, K. J. Park, J. K. Jang, and I. Y. Kim. 2016. "Identification of a redox-modulatory interaction between selenoprotein W and 14-3-3 protein." *Biochim Biophys Acta* 1863 (1):10-8. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.006.
- Jia, S. Z., X. W. Xu, Z. H. Zhang, C. Chen, Y. B. Chen, S. L. Huang, Q. Liu, P. R. Hoffmann, and G. L. Song. 2021. "Selenoprotein K deficiency-induced apoptosis: A role for calpain and the ERS pathway." *Redox Biol* 47:102154. doi: 10.1016/j.redox.2021.102154.
- John, L. M., J. D. Lechleiter, and P. Camacho. 1998. "Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin." *J Cell Biol* 142 (4):963-73. doi: 10.1083/jcb.142.4.963.
- Joseph, S. K., M. P. Young, K. Alzayady, D. I. Yule, M. Ali, D. M. Booth, and G. Hajnoczky. 2018. "Redox regulation of type-I inositol trisphosphate receptors in intact mammalian cells." *J Biol Chem* 293 (45):17464-17476. doi: 10.1074/jbc.RA118.005624.
- Kanemura, S., M. Matsusaki, K. Inaba, and M. Okumura. 2020. "PDI Family Members as Guides for Client Folding and Assembly." *Int J Mol Sci* 21 (24). doi: 10.3390/ijms21249351.
- Kaneto, H., T. A. Matsuoka, Y. Nakatani, D. Kawamori, M. Matsuhisa, and Y. Yamasaki. 2005. "Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes." *Curr Diabetes Rev* 1 (1):65-72. doi: 10.2174/1573399052952613.
- Karagas, N. E., and K. Venkatachalam. 2019. "Roles for the Endoplasmic Reticulum in Regulation of Neuronal Calcium Homeostasis." *Cells* 8 (10). doi: 10.3390/cells8101232.
- Kasaikina, M. V., D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2012. "Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models." *Biochim Biophys Acta* 1823 (9):1633-42. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.018.
- Kaufman, R. J. 2002. "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." *J Clin Invest* 110 (10):1389-98. doi: 10.1172/JCI16886.
- Kelleher, D. J., and R. Gilmore. 2006. "An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase." *Glycobiology* 16 (4):47R-62R. doi: 10.1093/glycob/cwj066.
- Kelleher, D. J., D. Karaoglu, E. C. Mandon, and R. Gilmore. 2003. "Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties." *Mol Cell* 12 (1):101-11. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00243-0.
- Khan, A. A., J. P. Steiner, and S. H. Snyder. 1992. "Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7):2849-53. doi: 10.1073/pnas.89.7.2849.
- Kieliszek, M. 2019. "Selenium(-)Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food." *Molecules* 24 (7). doi: 10.3390/molecules24071298.
- Kim, L. K., T. Matsufuji, S. Matsufuji, B. A. Carlson, S. S. Kim, D. L. Hatfield, and B. J. Lee. 2000. "Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure." *RNA* 6 (9):1306-15. doi: 10.1017/s1355838200000388.
- Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, and S. Murakami. 2006. "Role of the unfolded protein response in cell death." *Apoptosis* 11 (1):5-13. doi: 10.1007/s10495-005-3088-0.
- Kitazumi, I., and M. Tsukahara. 2011. "Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation." *FEBS J* 278 (3):427-41. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07975.x.
- Kopito, R. R. 2000. "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." *Trends Cell Biol* 10 (12):524-30. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01852-3.
- Korotkov, K. V., E. Kumaraswamy, Y. Zhou, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2001. "Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells." *J Biol Chem* 276 (18):15330-6. doi: 10.1074/jbc.M009861200.

- Kozlov, G., S. Bastos-Aristizabal, P. Maattanen, A. Rosenauer, F. Zheng, A. Killikelly, J. F. Trempe, D. Y. Thomas, and K. Gehring. 2010. "Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain." *J Biol Chem* 285 (46):35551-7. doi: 10.1074/jbc.M110.160101.
- Kozlov, G., and K. Gehring. 2020. "Calnexin cycle - structural features of the ER chaperone system." *FEBS J* 287 (20):4322-4340. doi: 10.1111/febs.15330.
- Krol, A. 2002. "Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis." *Biochimie* 84 (8):765-74. doi: 10.1016/s0300-9084(02)01405-0.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo, and V. N. Gladyshev. 2003. "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* 300 (5624):1439-43. doi: 10.1126/science.1083516.
- Kryukov, G. V., V. M. Kryukov, and V. N. Gladyshev. 1999. "New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements." *J Biol Chem* 274 (48):33888-97. doi: 10.1074/jbc.274.48.33888.
- Kuhbacher, M., J. Bartel, B. Hoppe, D. Alber, G. Bukalis, A. U. Brauer, D. Behne, and A. Kyriakopoulos. 2009. "The brain selenoproteome: priorities in the hierarchy and different levels of selenium homeostasis in the brain of selenium-deficient rats." *J Neurochem* 110 (1):133-42. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06109.x.
- Kumar, C., A. Igbaria, B. D'Autreaux, A. G. Planson, C. Junot, E. Godat, A. K. Bachhawat, A. Delaunay-Moisan, and M. B. Toledano. 2011. "Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control." *EMBO J* 30 (10):2044-56. doi: 10.1038/emboj.2011.105.
- Kumari, R., and P. Jat. 2021. "Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype." *Front Cell Dev Biol* 9:645593. doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
- Kuo, J. C., and M. J. Paszek. 2021. "Glycocalyx Curving the Membrane: Forces Emerging from the Cell Exterior." *Annu Rev Cell Dev Biol* 37:257-283. doi: 10.1146/annurev-cellbio-120219-054401.
- Labunskyy, V. M., A. D. Ferguson, D. E. Fomenko, Y. Chelliah, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2005. "A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." *J Biol Chem* 280 (45):37839-45. doi: 10.1074/jbc.M508685200.
- Labunskyy, V. M., D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2014. "Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles." *Physiol Rev* 94 (3):739-77. doi: 10.1152/physrev.00039.2013.
- Lacampagne, A., J. Fauconnier, and S. Richard. 2008. "[Ryanodine receptor and heart disease]." *Med Sci (Paris)* 24 (4):399-405. doi: 10.1051/medsci/2008244399.
- Lamark, T., S. Svenning, and T. Johansen. 2017. "Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm." *Essays Biochem* 61 (6):609-624. doi: 10.1042/EBC20170035.
- Larkum, M. E., S. Watanabe, N. Lasser-Ross, P. Rhodes, and W. N. Ross. 2008. "Dendritic properties of turtle pyramidal neurons." *J Neurophysiol* 99 (2):683-94. doi: 10.1152/jn.01076.2007.
- Le Thuc, O., K. Stobbe, C. Cansell, J. L. Nahon, N. Blondeau, and C. Rovere. 2017. "Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines." *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:197. doi: 10.3389/fendo.2017.00197.
- Lee, J. H., K. J. Park, J. K. Jang, Y. H. Jeon, K. Y. Ko, J. H. Kwon, S. R. Lee, and I. Y. Kim. 2015. "Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K Binding to p97(VCP) Protein Is Essential for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation." *J Biol Chem* 290 (50):29941-52. doi: 10.1074/jbc.M115.680215.
- Lee, M. Y., S. Ojeda-Britez, D. Ehrbar, A. Samwer, T. J. Begley, and J. A. Melendez. 2022. "Selenoproteins and the senescence-associated epitranscriptome." *Exp Biol Med (Maywood)*:15353702221116592. doi: 10.1177/15353702221116592.
- Lei, X. G., J. K. Evenson, K. M. Thompson, and R. A. Sunde. 1995. "Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium." *J Nutr* 125 (6):1438-46. doi: 10.1093/jn/125.6.1438.

- Lennicke, C., and H. M. Cocheme. 2021. "Redox regulation of the insulin signalling pathway." *Redox Biol* 42:101964. doi: 10.1016/j.redox.2021.101964.
- Lescure, A., C. Allmang, K. Yamada, P. Carbon, and A. Krol. 2002. "cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2." *Gene* 291 (1-2):279-85. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00629-7.
- Lescure, A., D. Gautheret, P. Carbon, and A. Krol. 1999. "Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif." *J Biol Chem* 274 (53):38147-54. doi: 10.1074/jbc.274.53.38147.
- Li, G., M. Mongillo, K. T. Chin, H. Harding, D. Ron, A. R. Marks, and I. Tabas. 2009. "Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." *J Cell Biol* 186 (6):783-92. doi: 10.1083/jcb.200904060.
- Li, J. L., H. X. Li, X. J. Gao, J. L. Zhang, S. Li, S. W. Xu, and Z. X. Tang. 2012. "Priority in selenium homeostasis involves regulation of SepSecS transcription in the chicken brain." *PLoS One* 7 (4):e35761. doi: 10.1371/journal.pone.0035761.
- Li, K., T. Feng, L. Liu, H. Liu, K. Huang, and J. Zhou. 2021. "Hepatic Proteomic Analysis of Selenoprotein T Knockout Mice by TMT: Implications for the Role of Selenoprotein T in Glucose and Lipid Metabolism." *Int J Mol Sci* 22 (16). doi: 10.3390/ijms22168515.
- Li, W., J. Bandyopadhyay, H. S. Hwaang, B. J. Park, J. H. Cho, J. I. Lee, J. Ahnn, and S. K. Lee. 2012. "Two thioredoxin reductases, trxr-1 and trxr-2, have differential physiological roles in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Cells* 34 (2):209-18. doi: 10.1007/s10059-012-0155-6.
- Lieberoth, A., F. Splittstoesser, N. Katagihallimath, I. Jakovcevski, G. Loers, B. Ranscht, D. Karagogeos, M. Schachner, and R. Kleene. 2009. "Lewis(x) and alpha2,3-sialyl glycans and their receptors TAG-1, Contactin, and L1 mediate CD24-dependent neurite outgrowth." *J Neurosci* 29 (20):6677-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4361-08.2009.
- Lievremont, J. P., R. Rizzuto, L. Hendershot, and J. Meldolesi. 1997. "BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca<sup>2+</sup>." *J Biol Chem* 272 (49):30873-9. doi: 10.1074/jbc.272.49.30873.
- Lin, X. P., J. D. Mintern, and P. A. Gleeson. 2020. "Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences." *Membranes (Basel)* 10 (8). doi: 10.3390/membranes10080177.
- Lipson, C., G. Alalouf, M. Bajorek, E. Rabinovich, A. Atir-Lande, M. Glickman, and S. Bar-Nun. 2008. "A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates." *J Biol Chem* 283 (11):7166-75. doi: 10.1074/jbc.M705893200.
- Liu, J., and S. Rozovsky. 2015. "Membrane-bound selenoproteins." *Antioxid Redox Signal* 23 (10):795-813. doi: 10.1089/ars.2015.6388.
- Liu, J., Z. Zhang, and S. Rozovsky. 2014. "Selenoprotein K form an intermolecular diselenide bond with unusually high redox potential." *FEBS Lett* 588 (18):3311-21. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.037.
- Liu, Y. S., X. Y. Guo, T. Hirata, Y. Rong, D. Motooka, T. Kitajima, Y. Murakami, X. D. Gao, S. Nakamura, T. Kinoshita, and M. Fujita. 2018. "N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing." *J Cell Biol* 217 (2):585-599. doi: 10.1083/jcb.201706135.
- Lobanov, A. V., S. Gromer, G. Salinas, and V. N. Gladyshev. 2006. "Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein." *Nucleic Acids Res* 34 (14):4012-24. doi: 10.1093/nar/gkl541.
- Loos, R. J. F., and G. S. H. Yeo. 2021. "The genetics of obesity: from discovery to biology." *Nat Rev Genet*. doi: 10.1038/s41576-021-00414-z.
- Lopez, I., A. S. Tournillon, R. Prado Martins, K. Karakostis, L. Malbert-Colas, K. Nylander, and R. Fahraeus. 2017. "p53-mediated suppression of BiP triggers BIK-induced apoptosis during prolonged endoplasmic reticulum stress." *Cell Death Differ* 24 (10):1717-1729. doi: 10.1038/cdd.2017.96.

- Low, S. C., E. Grundner-Culemann, J. W. Harney, and M. J. Berry. 2000. "SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy." *EMBO J* 19 (24):6882-90. doi: 10.1093/emboj/19.24.6882.
- Lu, J., and A. Holmgren. 2014. "The thioredoxin antioxidant system." *Free Radic Biol Med* 66:75-87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
- Lucas, P. L., R. Dumontier, C. Loutelier-Bourhis, A. Mareck, C. Afonso, P. Lerouge, N. Mati-Baouche, and M. Bardor. 2018. "User-friendly extraction and multistage tandem mass spectrometry based analysis of lipid-linked oligosaccharides in microalgae." *Plant Methods* 14:107. doi: 10.1186/s13007-018-0374-8.
- Lumeng, C. N., and A. R. Saltiel. 2011. "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." *J Clin Invest* 121 (6):2111-7. doi: 10.1172/JCI57132.
- Lytton, J., M. Westlin, and M. R. Hanley. 1991. "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." *J Biol Chem* 266 (26):17067-71.
- Margis, R., C. Dunand, F. K. Teixeira, and M. Margis-Pinheiro. 2008. "Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview." *FEBS J* 275 (15):3959-70. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
- Margittai, E., P. Low, I. Stiller, A. Greco, J. M. Garcia-Manteiga, N. Pengo, A. Benedetti, R. Sitia, and G. Banhegyi. 2012. "Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the endoplasmic reticulum promotes in vivo disulfide bond formation." *Antioxid Redox Signal* 16 (10):1088-99. doi: 10.1089/ars.2011.4221.
- Marino, M., T. Stoilova, C. Giorgi, A. Bachi, A. Cattaneo, A. Auricchio, P. Pinton, and E. Zito. 2015. "SEPN1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity." *Hum Mol Genet* 24 (7):1843-55. doi: 10.1093/hmg/ddu602.
- Mariotti, M., P. G. Ridge, Y. Zhang, A. V. Lobanov, T. H. Pringle, R. Guigo, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2012. "Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes." *PLoS One* 7 (3):e33066. doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
- Marks, J. L., M. Li, M. Schwartz, D. Porte, Jr., and D. G. Baskin. 1992. "Effect of fasting on regional levels of neuropeptide Y mRNA and insulin receptors in the rat hypothalamus: An autoradiographic study." *Mol Cell Neurosci* 3 (3):199-205. doi: 10.1016/1044-7431(92)90039-5.
- Marsh, D. J., G. Hollopeter, K. E. Kafer, and R. D. Palmiter. 1998. "Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity." *Nat Med* 4 (6):718-21. doi: 10.1038/nm0698-718.
- Martin, J. L. 1995. "Thioredoxin--a fold for all reasons." *Structure* 3 (3):245-50. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00154-x.
- Martin, N., and D. Bernard. 2018. "Calcium signaling and cellular senescence." *Cell Calcium* 70:16-23. doi: 10.1016/j.ceca.2017.04.001.
- Matlack, K. E., B. Misselwitz, K. Plath, and T. A. Rapoport. 1999. "BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane." *Cell* 97 (5):553-64. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80767-9.
- Maurizi, G., L. Della Guardia, A. Maurizi, and A. Poloni. 2018. "Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation." *J Cell Physiol* 233 (1):88-97. doi: 10.1002/jcp.25855.
- Mazza, R., A. Gattuso, S. Imbrogno, L. Boukhar, S. Leo, B. Y. Mallouki, M. Filice, C. Rocca, T. Angelone, Y. Anouar, and M. C. Cerra. 2019. "Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*." *J Exp Biol* 222 (Pt 11). doi: 10.1242/jeb.201202.
- Mehnert, M., T. Sommer, and E. Jarosch. 2014. "Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane." *Nat Cell Biol* 16 (1):77-86. doi: 10.1038/ncb2882.
- Michikawa, T., H. Hamanaka, H. Otsu, A. Yamamoto, A. Miyawaki, T. Furuichi, Y. Tashiro, and K. Mikoshiba. 1994. "Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor." *J Biol Chem* 269 (12):9184-9.

- Miniard, A. C., L. M. Middleton, M. E. Budiman, C. A. Gerber, and D. M. Driscoll. 2010. "Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression." *Nucleic Acids Res* 38 (14):4807-20. doi: 10.1093/nar/gkq247.
- Mohanty, S., B. P. Chaudhary, and D. Zoetewey. 2020. "Structural Insight into the Mechanism of N-Linked Glycosylation by Oligosaccharyltransferase." *Biomolecules* 10 (4). doi: 10.3390/biom10040624.
- Mohorko, E., R. L. Owen, G. Malojcic, M. S. Brozzo, M. Aebi, and R. Glockshuber. 2014. "Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation." *Structure* 22 (4):590-601. doi: 10.1016/j.str.2014.02.013.
- Molinari, M., and A. Helenius. 1999. "Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells." *Nature* 402 (6757):90-3. doi: 10.1038/47062.
- Montero, D., C. Tachibana, J. Rahr Winther, and C. Appenzeller-Herzog. 2013. "Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated." *Redox Biol* 1:508-13. doi: 10.1016/j.redox.2013.10.005.
- Moraes, J. C., A. Coope, J. Morari, D. E. Cintra, E. A. Roman, J. R. Pauli, T. Romanatto, J. B. Carvalheira, A. L. Oliveira, M. J. Saad, and L. A. Velloso. 2009. "High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons." *PLoS One* 4 (4):e5045. doi: 10.1371/journal.pone.0005045.
- Moustafa, M. E., and H. A. Antar. 2012. "A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T." *Biochem Genet* 50 (9-10):736-47. doi: 10.1007/s10528-012-9516-2.
- Muthana, S. M., C. T. Campbell, and J. C. Gildersleeve. 2012. "Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities." *ACS Chem Biol* 7 (1):31-43. doi: 10.1021/cb2004466.
- Nakao, L. S., R. A. Everley, S. M. Marino, S. M. Lo, L. E. de Souza, S. P. Gygi, and V. N. Gladyshev. 2015. "Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins." *J Biol Chem* 290 (9):5685-95. doi: 10.1074/jbc.M114.597245.
- Nazarians-Armavil, A., J. A. Chalmers, C. B. Lee, W. Ye, and D. D. Belsham. 2014. "Cellular insulin resistance disrupts hypothalamic mHypA-POMC/GFP neuronal signaling pathways." *J Endocrinol* 220 (1):13-24. doi: 10.1530/JOE-13-0334.
- Nguyen, V. D., M. J. Saaranen, A. R. Karala, A. K. Lappi, L. Wang, I. B. Raykhel, H. I. Alanen, K. E. Salo, C. C. Wang, and L. W. Ruddock. 2011. "Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation." *J Mol Biol* 406 (3):503-15. doi: 10.1016/j.jmb.2010.12.039.
- Nikolaienko, R., E. Bovo, and A. V. Zima. 2018. "Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases." *Front Physiol* 9:1775. doi: 10.3389/fphys.2018.01775.
- Nikolovski, N., D. Rubtsov, M. P. Segura, G. P. Miles, T. J. Stevens, T. P. Dunkley, S. Munro, K. S. Lilley, and P. Dupree. 2012. "Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics." *Plant Physiol* 160 (2):1037-51. doi: 10.1104/pp.112.204263.
- Noda, C., H. Kimura, K. Arasaki, M. Matsushita, A. Yamamoto, Y. Wakana, H. Inoue, and M. Tagaya. 2014. "Valosin-containing protein-interacting membrane protein (VIMP) links the endoplasmic reticulum with microtubules in concert with cytoskeleton-linking membrane protein (CLIMP)-63." *J Biol Chem* 289 (35):24304-13. doi: 10.1074/jbc.M114.571372.
- Ogata, M., S. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tani, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J. A. Hammarback, F. Urano, and K. Imaizumi. 2006. "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* 26 (24):9220-31. doi: 10.1128/MCB.01453-06.
- Ogrodnik, M., Y. Zhu, L. G. P. Langhi, T. Tchkonja, P. Kruger, E. Fielder, S. Victorelli, R. A. Ruswhandi, N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, O. Podgorni, G. Enikolopov, K. O. Johnson, M. Xu, C. Inman, A. K. Palmer, M. Schafer, M. Weigl, Y. Ikeno, T. C. Burns, J. F. Passos, T. von Zglinicki, J. L.

- Kirkland, and D. Jurk. 2019. "Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis." *Cell Metab* 29 (5):1233. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.013.
- Olivares, L., C. Aragon, C. Gimenez, and F. Zafra. 1995. "The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter." *J Biol Chem* 270 (16):9437-42. doi: 10.1074/jbc.270.16.9437.
- Ondruskova, N., A. Cechova, H. Hansikova, T. Honzik, and J. Jaeken. 2021. "Congenital disorders of glycosylation: Still "hot" in 2020." *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865 (1):129751. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129751.
- Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky. 2015. "Calcium and mitochondria in the regulation of cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 460 (1):72-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.137.
- Osawa, S., T. H. Jukes, K. Watanabe, and A. Muto. 1992. "Recent evidence for evolution of the genetic code." *Microbiol Rev* 56 (1):229-64. doi: 10.1128/mr.56.1.229-264.1992.
- Ostergaard, H., C. Tachibana, and J. R. Winther. 2004. "Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol." *J Cell Biol* 166 (3):337-45. doi: 10.1083/jcb.200402120.
- Ozcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher, and G. S. Hotamisligil. 2004. "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* 306 (5695):457-61. doi: 10.1126/science.1103160.
- Ozturk, Z., C. J. O'Kane, and J. J. Perez-Moreno. 2020. "Axonal Endoplasmic Reticulum Dynamics and Its Roles in Neurodegeneration." *Front Neurosci* 14:48. doi: 10.3389/fnins.2020.00048.
- Paeger, L., A. Pippow, S. Hess, M. Paehler, A. C. Klein, A. Husch, C. Pouzat, J. C. Bruning, and P. Kloppenburg. 2017. "Energy imbalance alters Ca(2+) handling and excitability of POMC neurons." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.25641.
- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren, and K. K. Khanna. 2007. "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." *Antioxid Redox Signal* 9 (7):775-806. doi: 10.1089/ars.2007.1528.
- Papp, L. V., J. Lu, F. Striebel, D. Kennedy, A. Holmgren, and K. K. Khanna. 2006. "The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function." *Mol Cell Biol* 26 (13):4895-910. doi: 10.1128/MCB.02284-05.
- Parakh, S., and J. D. Atkin. 2021. "The Mitochondrial-associated ER membrane (MAM) compartment and its dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)." *Semin Cell Dev Biol* 112:105-113. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.02.002.
- Patel, C., H. Saad, M. Shenkman, and G. Z. Lederkremer. 2020. "Oxidoreductases in Glycoprotein Glycosylation, Folding, and ERAD." *Cells* 9 (9). doi: 10.3390/cells9092138.
- Pearce, M. M., Y. Wang, G. G. Kelley, and R. J. Wojcikiewicz. 2007. "SPFH2 mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and other substrates in mammalian cells." *J Biol Chem* 282 (28):20104-15. doi: 10.1074/jbc.M701862200.
- Pena-Blanco, A., and A. J. Garcia-Saez. 2018. "Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis." *FEBS J* 285 (3):416-431. doi: 10.1111/febs.14186.
- Peng, J. J., S. Y. Yue, Y. H. Fang, X. L. Liu, and C. H. Wang. 2021. "Mechanisms Affecting the Biosynthesis and Incorporation Rate of Selenocysteine." *Molecules* 26 (23). doi: 10.3390/molecules26237120.
- Peric, D., C. Durrant-Arico, C. Delenda, T. Dupre, P. De Lonlay, H. O. de Baulny, C. Pelatan, B. Bader-Meunier, O. Danos, I. Chantret, and S. E. Moore. 2010. "The compartmentalisation of phosphorylated free oligosaccharides in cells from a CDG Ig patient reveals a novel ER-to-cytosol translocation process." *PLoS One* 5 (7):e11675. doi: 10.1371/journal.pone.0011675.
- Pham, A. H., S. Meng, Q. N. Chu, and D. C. Chan. 2012. "Loss of Mfn2 results in progressive, retrograde degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal circuit." *Hum Mol Genet* 21 (22):4817-26. doi: 10.1093/hmg/dd3311.
- Phillips, M. J., and G. K. Voeltz. 2016. "Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles." *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (2):69-82. doi: 10.1038/nrm.2015.8.

- Pillai, R., J. H. Uyehara-Lock, and F. P. Bellinger. 2014. "Selenium and selenoprotein function in brain disorders." *IUBMB Life* 66 (4):229-39. doi: 10.1002/iub.1262.
- Pitts, M. W., C. N. Byrns, A. N. Ogawa-Wong, P. Kremer, and M. J. Berry. 2014. "Selenoproteins in nervous system development and function." *Biol Trace Elem Res* 161 (3):231-45. doi: 10.1007/s12011-014-0060-2.
- Pitts, M. W., M. A. Reeves, A. C. Hashimoto, A. Ogawa, P. Kremer, L. A. Seale, and M. J. Berry. 2013. "Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits." *J Biol Chem* 288 (36):26121-34. doi: 10.1074/jbc.M113.471235.
- Pobre, K. F. R., G. J. Poet, and L. M. Hendershot. 2019. "The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends." *J Biol Chem* 294 (6):2098-2108. doi: 10.1074/jbc.REV118.002804.
- Ponsero, A. J., A. Igbaria, M. A. Darch, S. Miled, C. E. Outten, J. R. Winther, G. Palais, B. D'Autreaux, A. Delaunay-Moisan, and M. B. Toledano. 2017. "Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip." *Mol Cell* 67 (6):962-973 e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.012.
- Posey, K. A., D. J. Clegg, R. L. Printz, J. Byun, G. J. Morton, A. Vivekanandan-Giri, S. Pennathur, D. G. Baskin, J. W. Heinecke, S. C. Woods, M. W. Schwartz, and K. D. Niswender. 2009. "Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (5):E1003-12. doi: 10.1152/ajpendo.90377.2008.
- Poston, C. N., E. Duong, Y. Cao, and C. R. Bazemore-Walker. 2011. "Proteomic analysis of lipid raft-enriched membranes isolated from internal organelles." *Biochem Biophys Res Commun* 415 (2):355-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.072.
- Pothion, H., C. Jehan, H. Tostivint, D. Cartier, C. Bucharles, A. Falluel-Morel, L. Boukhzar, Y. Anouar, and I. Lihrmann. 2020a. "Selenoprotein T: An Essential Oxidoreductase Serving as a Guardian of Endoplasmic Reticulum Homeostasis." *Antioxid Redox Signal* 33 (17):1257-1275. doi: 10.1089/ars.2019.7931.
- Pothion, H., C. Jehan, H. Tostivint, D. Cartier, C. Bucharles, A. Falluel-Morel, L. Boukhzar, Y. Anouar, and I. Lihrmann. 2020b. "Selenoprotein T: An Essential Oxidoreductase Serving as a Guardian of Endoplasmic Reticulum Homeostasis." *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2019.7931.
- Prada, P. O., H. G. Zecchin, A. L. Gasparetti, M. A. Torsoni, M. Ueno, A. E. Hirata, M. E. Corezola do Amaral, N. F. Hoer, A. C. Boschero, and M. J. Saad. 2005. "Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion." *Endocrinology* 146 (3):1576-87. doi: 10.1210/en.2004-0767.
- Preissler, S., C. Rato, L. Perera, V. Saudek, and D. Ron. 2017. "FICD acts bifunctionally to AMPylate and de-AMPylate the endoplasmic reticulum chaperone BiP." *Nat Struct Mol Biol* 24 (1):23-29. doi: 10.1038/nsmb.3337.
- Preissler, S., L. Rohland, Y. Yan, R. Chen, R. J. Read, and D. Ron. 2017. "AMPylation targets the rate-limiting step of BiP's ATPase cycle for its functional inactivation." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.29428.
- Preissler, S., and D. Ron. 2019. "Early Events in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11 (4). doi: 10.1101/cshperspect.a033894.
- Prevost, G., A. Arabo, L. Jian, E. Quelennec, D. Cartier, S. Hassan, A. Falluel-Morel, Y. Tanguy, S. Gargani, I. Lihrmann, J. Kerr-Conte, H. Lefebvre, F. Pattou, and Y. Anouar. 2013. "The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance." *Endocrinology* 154 (10):3796-806. doi: 10.1210/en.2013-1167.
- Prohaska, J. R., and H. E. Ganther. 1976. "Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain." *J Neurochem* 27 (6):1379-87. doi: 10.1111/j.1471-4159.1976.tb02619.x.

- Puig, A., and H. F. Gilbert. 1994. "Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme." *J Biol Chem* 269 (41):25889-96.
- Qiao, X., J. Tian, P. Chen, C. Wang, J. Ni, and Q. Liu. 2013. "Galectin-1 is an interactive protein of selenoprotein M in the brain." *Int J Mol Sci* 14 (11):22233-45. doi: 10.3390/ijms141122233.
- Qiu, J., C. Zhang, A. Borgquist, C. C. Nestor, A. W. Smith, M. A. Bosch, S. Ku, E. J. Wagner, O. K. Ronnekleiv, and M. J. Kelly. 2014. "Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels." *Cell Metab* 19 (4):682-93. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.004.
- Quan, H., G. Fan, and C. C. Wang. 1995. "Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site." *J Biol Chem* 270 (29):17078-80. doi: 10.1074/jbc.270.29.17078.
- Raffaello, A., C. Mammucari, G. Gherardi, and R. Rizzuto. 2016. "Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes." *Trends Biochem Sci* 41 (12):1035-1049. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.001.
- Ramirez, A. S., J. Kowal, and K. P. Locher. 2019. "Cryo-electron microscopy structures of human oligosaccharyltransferase complexes OST-A and OST-B." *Science* 366 (6471):1372-1375. doi: 10.1126/science.aaz3505.
- Raynard, C., N. Tessier, A. Huna, M. Warnier, J. M. Flaman, F. Van Coppenolle, S. Ducreux, N. Martin, and D. Bernard. 2022. "Expression of the Calcium-Binding Protein CALB1 Is Induced and Controls Intracellular Ca(2+) Levels in Senescent Cells." *Int J Mol Sci* 23 (16). doi: 10.3390/ijms23169376.
- Read, A., and M. Schroder. 2021. "The Unfolded Protein Response: An Overview." *Biology (Basel)* 10 (5). doi: 10.3390/biology10050384.
- Reeves, M. A., F. P. Bellinger, and M. J. Berry. 2010. "The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation." *Antioxid Redox Signal* 12 (7):809-18. doi: 10.1089/ars.2009.2883.
- Reich, H. J., and R. J. Hondal. 2016. "Why Nature Chose Selenium." *ACS Chem Biol* 11 (4):821-41. doi: 10.1021/acscchembio.6b00031.
- Ren, X., L. Zou, J. Lu, and A. Holmgren. 2018. "Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic." *Free Radic Biol Med* 127:238-247. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.081.
- Renard, H. F., and E. Boucrot. 2021. "Unconventional endocytic mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* 71:120-129. doi: 10.1016/j.ceb.2021.03.001.
- Riediger, T. 2012. "The receptive function of hypothalamic and brainstem centres to hormonal and nutrient signals affecting energy balance." *Proc Nutr Soc* 71 (4):463-77. doi: 10.1017/S0029665112000778.
- Roboti, P., and S. High. 2012a. "Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase." *J Cell Sci* 125 (Pt 1):220-32. doi: 10.1242/jcs.094599.
- Roboti, P., and S. High. 2012b. "The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation." *J Cell Sci* 125 (Pt 14):3474-84. doi: 10.1242/jcs.103952.
- Rocca, C., L. Boukhzar, M. C. Granieri, I. Alsharif, R. Mazza, B. Lefranc, B. Tota, J. Leprince, M. C. Cerra, Y. Anouar, and T. Angelone. 2018. "A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress." *Acta Physiol (Oxf)* 223 (4):e13067. doi: 10.1111/apha.13067.
- Romanelli-Cedrez, L., I. Carrera, L. Otero, A. Miranda-Vizueté, M. Mariotti, M. J. Alkema, and G. Salinas. 2017. "Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*." *Free Radic Biol Med* 108:174-182. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.021.
- Ron, D., and P. Walter. 2007. "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (7):519-29. doi: 10.1038/nrm2199.



- Ropelle, E. R., M. B. Flores, D. E. Cintra, G. Z. Rocha, J. R. Pauli, J. Morari, C. T. de Souza, J. C. Moraes, P. O. Prada, D. Guadagnini, R. M. Marin, A. G. Oliveira, T. M. Augusto, H. F. Carvalho, L. A. Velloso, M. J. Saad, and J. B. Carvalheira. 2010. "IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition." *PLoS Biol* 8 (8). doi: 10.1371/journal.pbio.1000465.
- Rosenberg, N., R. Mor-Cohen, V. H. Sheptovitsky, O. Romanenco, O. Hess, and J. Lahav. 2019. "Integrin-mediated cell adhesion requires extracellular disulfide exchange regulated by protein disulfide isomerase." *Exp Cell Res* 381 (1):77-85. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.04.017.
- Ross, W. N. 2012. "Understanding calcium waves and sparks in central neurons." *Nat Rev Neurosci* 13 (3):157-68. doi: 10.1038/nrn3168.
- Rubio-Tomas, T., A. Rueda-Robles, J. Plaza-Diaz, and A. I. Alvarez-Mercado. 2022. "Nutrition and cellular senescence in obesity-related disorders." *J Nutr Biochem* 99:108861. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108861.
- Saito, Y., and K. Takahashi. 2002. "Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein." *Eur J Biochem* 269 (22):5746-51. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03298.x.
- Sakono, M., A. Seko, Y. Takeda, and Y. Ito. 2014. "PDI family protein ERp29 forms 1:1 complex with lectin chaperone calreticulin." *Biochem Biophys Res Commun* 452 (1):27-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.041.
- Sakurai, A., M. Nishimoto, S. Himeno, N. Imura, M. Tsujimoto, M. Kunimoto, and S. Hara. 2005. "Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2." *J Cell Physiol* 203 (3):529-37. doi: 10.1002/jcp.20246.
- Samtleben, S., J. Jaepel, C. Fecher, T. Andreska, M. Rehberg, and R. Blum. 2013. "Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED)." *J Vis Exp* (75):e50317. doi: 10.3791/50317.
- Sandalova, T., L. Zhong, Y. Lindqvist, A. Holmgren, and G. Schneider. 2001. "Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17):9533-8. doi: 10.1073/pnas.171178698.
- Santesmasses, D., M. Mariotti, and V. N. Gladyshev. 2019. "Tolerance to selenoprotein loss differs between human and mouse." *Mol Biol Evol*. doi: 10.1093/molbev/msz218.
- Santesmasses, D., M. Mariotti, and V. N. Gladyshev. 2020a. "Bioinformatics of Selenoproteins." *Antioxid Redox Signal* 33 (7):525-536. doi: 10.1089/ars.2020.8044.
- Santesmasses, D., M. Mariotti, and V. N. Gladyshev. 2020b. "Tolerance to Selenoprotein Loss Differs between Human and Mouse." *Mol Biol Evol* 37 (2):341-354. doi: 10.1093/molbev/msz218.
- Santolini, J., S. A. Wootton, A. A. Jackson, and M. Feelisch. 2019. "The Redox architecture of physiological function." *Curr Opin Physiol* 9:34-47. doi: 10.1016/j.cophys.2019.04.009.
- Santos, C. X., L. Y. Tanaka, J. Wosniak, and F. R. Laurindo. 2009. "Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase." *Antioxid Redox Signal* 11 (10):2409-27. doi: 10.1089/ARS.2009.2625.
- Santulli, G., D. Lewis, A. des Georges, A. R. Marks, and J. Frank. 2018. "Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease." *Subcell Biochem* 87:329-352. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_11.
- Sasaki, N., Y. Itakura, and M. Toyoda. 2015. "Ganglioside GM1 Contributes to the State of Insulin Resistance in Senescent Human Arterial Endothelial Cells." *J Biol Chem* 290 (42):25475-86. doi: 10.1074/jbc.M115.684274.
- Sasuclark, A. R., V. S. Khadka, and M. W. Pitts. 2019. "Cell-Type Specific Analysis of Selenium-Related Genes in Brain." *Antioxidants (Basel)* 8 (5). doi: 10.3390/antiox8050120.
- Sato, C., and K. Kitajima. 2019. "Sialic Acids in Neurology." *Adv Carbohydr Chem Biochem* 76:1-64. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.003.

- Schneeberger, M., M. O. Dietrich, D. Sebastian, M. Imbernon, C. Castano, A. Garcia, Y. Esteban, A. Gonzalez-Franquesa, I. C. Rodriguez, A. Bortolozzi, P. M. Garcia-Roves, R. Gomis, R. Nogueiras, T. L. Horvath, A. Zorzano, and M. Claret. 2013. "Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance." *Cell* 155 (1):172-87. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.003.
- Schoenmakers, E., M. Agostini, C. Mitchell, N. Schoenmakers, L. Papp, O. Rajanayagam, R. Padidela, L. Ceron-Gutierrez, R. Doffinger, C. Prevosto, J. Luan, S. Montano, J. Lu, M. Castanet, N. Clemons, M. Groeneveld, P. Castets, M. Karbaschi, S. Aitken, A. Dixon, J. Williams, I. Campi, M. Blount, H. Burton, F. Muntoni, D. O'Donovan, A. Dean, A. Warren, C. Brierley, D. Baguley, P. Guicheney, R. Fitzgerald, A. Coles, H. Gaston, P. Todd, A. Holmgren, K. K. Khanna, M. Cooke, R. Semple, D. Halsall, N. Wareham, J. Schwabe, L. Grasso, P. Beck-Peccoz, A. Ogunko, M. Dattani, M. Gurnell, and K. Chatterjee. 2010. "Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans." *J Clin Invest* 120 (12):4220-35. doi: 10.1172/JCI43653.
- Schomburg, L., and U. Schweizer. 2009. "Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium." *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1453-62. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.015.
- Schrauzer, G. N. 2000. "Anticarcinogenic effects of selenium." *Cell Mol Life Sci* 57 (13-14):1864-73. doi: 10.1007/PL00000668.
- Schroder, M., and R. J. Kaufman. 2005. "ER stress and the unfolded protein response." *Mutat Res* 569 (1-2):29-63. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- Schubert, U., L. C. Anton, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 2000. "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." *Nature* 404 (6779):770-4. doi: 10.1038/35008096.
- Schweizer, U., S. Bohleber, W. Zhao, and N. Fradejas-Villar. 2021. "The Neurobiology of Selenium: Looking Back and to the Future." *Front Neurosci* 15:652099. doi: 10.3389/fnins.2021.652099.
- Semjonous, N. M., K. L. Smith, J. R. Parkinson, D. J. Gunner, Y. L. Liu, K. G. Murphy, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and C. J. Small. 2009. "Coordinated changes in energy intake and expenditure following hypothalamic administration of neuropeptides involved in energy balance." *Int J Obes (Lond)* 33 (7):775-85. doi: 10.1038/ijo.2009.96.
- Sengupta, A., B. A. Carlson, V. M. Labunskyy, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2009. "Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells." *Biochem Cell Biol* 87 (6):953-61. doi: 10.1139/o09-064.
- Seong, J., J. Y. Kang, J. S. Sun, and K. W. Kim. 2019. "Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review." *Arch Pharm Res* 42 (5):383-392. doi: 10.1007/s12272-019-01138-9.
- Serrao, V. H. B., I. R. Silva, M. T. A. da Silva, J. F. Scortecci, A. de Freitas Fernandes, and O. H. Thiemann. 2018. "The unique tRNA(Sec) and its role in selenocysteine biosynthesis." *Amino Acids* 50 (9):1145-1167. doi: 10.1007/s00726-018-2595-6.
- Shao, Z. Q., X. Zhang, H. H. Fan, X. S. Wang, H. M. Wu, L. Zhang, W. H. Cheng, and J. H. Zhu. 2019. "Selenoprotein T Promotes Proliferation and G1-to-S Transition in SK-N-SH Cells: Implications in Parkinson's Disease." *J Nutr* 149 (12):2110-2119. doi: 10.1093/jn/nxz199.
- Sharp, A. H., F. C. Nucifora, Jr., O. Blondel, C. A. Sheppard, C. Zhang, S. H. Snyder, J. T. Russell, D. K. Ryugo, and C. A. Ross. 1999. "Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in neurons and glia in brain." *J Comp Neurol* 406 (2):207-20.
- Shchedrina, V. A., R. A. Everley, Y. Zhang, S. P. Gygi, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2011. "Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis." *J Biol Chem* 286 (50):42937-48. doi: 10.1074/jbc.M111.310920.
- Shchedrina, V. A., Y. Zhang, V. M. Labunskyy, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2010. "Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins." *Antioxid Redox Signal* 12 (7):839-49. doi: 10.1089/ars.2009.2865.

- Shenkman, M., E. Ron, R. Yehuda, R. Benyair, I. Khalaila, and G. Z. Lederkremer. 2018. "Mannosidase activity of EDEM1 and EDEM2 depends on an unfolded state of their glycoprotein substrates." *Commun Biol* 1:172. doi: 10.1038/s42003-018-0174-8.
- Shrimal, S., N. A. Cherepanova, and R. Gilmore. 2015. "Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum." *Semin Cell Dev Biol* 41:71-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.005.
- Shrimal, S., N. A. Cherepanova, and R. Gilmore. 2017. "DC2 and KCP2 mediate the interaction between the oligosaccharyltransferase and the ER translocon." *J Cell Biol* 216 (11):3625-3638. doi: 10.1083/jcb.201702159.
- Smith, A. C., A. J. Mears, R. Bunker, A. Ahmed, M. MacKenzie, J. A. Schwartzentruber, C. L. Beaulieu, E. Ferretti, Forge Canada Consortium, J. Majewski, D. E. Bulman, F. C. Celik, K. M. Boycott, and G. E. Graham. 2014. "Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia." *J Med Genet* 51 (7):470-4. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102218.
- Soares Moretti, A. I., and F. R. Martins Laurindo. 2017. "Protein disulfide isomerases: Redox connections in and out of the endoplasmic reticulum." *Arch Biochem Biophys* 617:106-119. doi: 10.1016/j.abb.2016.11.007.
- Soerensen, J., C. Jakupoglu, H. Beck, H. Forster, J. Schmidt, W. Schmahl, U. Schweizer, M. Conrad, and M. Brielmeier. 2008. "The role of thioredoxin reductases in brain development." *PLoS One* 3 (3):e1813. doi: 10.1371/journal.pone.0001813.
- Sohn, J. W. 2015. "Network of hypothalamic neurons that control appetite." *BMB Rep* 48 (4):229-33. doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.272.
- Solovyev, N. D. 2015. "Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling." *J Inorg Biochem* 153:1-12. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.09.003.
- Solovyev, N., E. Drobyshev, G. Bjorklund, Y. Dubrovskii, R. Lysiuk, and M. P. Rayman. 2018. "Selenium, selenoprotein P, and Alzheimer's disease: is there a link?" *Free Radic Biol Med* 127:124-133. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.030.
- Solovyev, N., E. Drobyshev, B. Blume, and B. Michalke. 2021. "Selenium at the Neural Barriers: A Review." *Front Neurosci* 15:630016. doi: 10.3389/fnins.2021.630016.
- Spillane, M., A. Ketschek, T. T. Merianda, J. L. Twiss, and G. Gallo. 2013. "Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis." *Cell Rep* 5 (6):1564-75. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.022.
- Stanley, P. 2007. "A method to the madness of N-glycan complexity?" *Cell* 129 (1):27-9. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.022.
- Stefani, M., and C. M. Dobson. 2003. "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution." *J Mol Med (Berl)* 81 (11):678-99. doi: 10.1007/s00109-003-0464-5.
- Steinbrenner, H., and H. Sies. 2013. "Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system." *Arch Biochem Biophys* 536 (2):152-7. doi: 10.1016/j.abb.2013.02.021.
- Stevens, F. J., and Y. Argon. 1999. "Protein folding in the ER." *Semin Cell Dev Biol* 10 (5):443-54. doi: 10.1006/scdb.1999.0315.
- Stockwell, B. R., J. P. Friedmann Angeli, H. Bayir, A. I. Bush, M. Conrad, S. J. Dixon, S. Fulda, S. Gascon, S. K. Hatzios, V. E. Kagan, K. Noel, X. Jiang, A. Linkermann, M. E. Murphy, M. Overholtzer, A. Oyagi, G. C. Pagnussat, J. Park, Q. Ran, C. S. Rosenfeld, K. Salnikow, D. Tang, F. M. Torti, S. V. Torti, S. Toyokuni, K. A. Woerpel, and D. D. Zhang. 2017. "Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease." *Cell* 171 (2):273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
- Su, D., S. V. Novoselov, Q. A. Sun, M. E. Moustafa, Y. Zhou, R. Oko, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2005. "Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond

- formation and sperm maturation." *J Biol Chem* 280 (28):26491-8. doi: 10.1074/jbc.M503638200.
- Sun, J., L. Xu, J. P. Eu, J. S. Stamler, and G. Meissner. 2001. "Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel." *J Biol Chem* 276 (19):15625-30. doi: 10.1074/jbc.M100083200.
- Sun, Q. A., and V. N. Gladyshev. 2002. "Redox regulation of cell signaling by thioredoxin reductases." *Methods Enzymol* 347:451-61. doi: 10.1016/s0076-6879(02)47045-0.
- Sunde, R. A., and A. M. Raines. 2011. "Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents." *Adv Nutr* 2 (2):138-50. doi: 10.3945/an.110.000240.
- Suyama, S., and T. Yada. 2018. "New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation." *J Physiol Sci* 68 (6):717-722. doi: 10.1007/s12576-018-0622-8.
- Szabadkai, G., K. Bianchi, P. Varnai, D. De Stefani, M. R. Wieckowski, D. Cavagna, A. I. Nagy, T. Balla, and R. Rizzuto. 2006. "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels." *J Cell Biol* 175 (6):901-11. doi: 10.1083/jcb.200608073.
- Takeda, K., S. Y. Qin, N. Matsumoto, and K. Yamamoto. 2014. "Association of malectin with ribophorin I is crucial for attenuation of misfolded glycoprotein secretion." *Biochem Biophys Res Commun* 454 (3):436-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.102.
- Tamura, T., and T. C. Stadtman. 1996. "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (3):1006-11. doi: 10.1073/pnas.93.3.1006.
- Tang-Christensen, M., N. Vrang, S. Ortmann, M. Bidlingmaier, T. L. Horvath, and M. Tschop. 2004. "Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats." *Endocrinology* 145 (10):4645-52. doi: 10.1210/en.2004-0529.
- Tanguy, Y., A. Falluel-Morel, S. Arthaud, L. Boukhar, D. L. Manecka, A. Chagraoui, G. Prevost, S. Elias, I. Dorval-Coiffec, J. Lesage, D. Vieau, I. Lihmann, B. Jegou, and Y. Anouar. 2011. "The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes." *Endocrinology* 152 (11):4322-35. doi: 10.1210/en.2011-1246.
- Tavender, T. J., and N. J. Bulleid. 2010. "Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced during disulphide formation." *J Cell Sci* 123 (Pt 15):2672-9. doi: 10.1242/jcs.067843.
- Taylor, E. W., J. A. Ruzicka, L. Premadasa, and L. Zhao. 2016. "Cellular Selenoprotein mRNA Tethering via Antisense Interactions with Ebola and HIV-1 mRNAs May Impact Host Selenium Biochemistry." *Curr Top Med Chem* 16 (13):1530-5. doi: 10.2174/1568026615666150915121633.
- Thaler, J. P., S. J. Guyenet, M. D. Dorfman, B. E. Wisse, and M. W. Schwartz. 2013. "Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis?" *Diabetes* 62 (8):2629-34. doi: 10.2337/db12-1605.
- Tooze, J., and S. A. Tooze. 1986. "Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells." *J Cell Biol* 103 (3):839-50. doi: 10.1083/jcb.103.3.839.
- Touat-Hamici, Z., Y. Legrain, A. L. Bulteau, and L. Chavatte. 2014. "Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress." *J Biol Chem* 289 (21):14750-61. doi: 10.1074/jbc.M114.551994.
- Tsuji, P. A., D. Santesmasses, B. J. Lee, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2021. "Historical Roles of Selenium and Selenoproteins in Health and Development: The Good, the Bad and the Ugly." *Int J Mol Sci* 23 (1). doi: 10.3390/ijms23010005.
- Urra, H., E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, and C. Hetz. 2013. "When ER stress reaches a dead end." *Biochim Biophys Acta* 1833 (12):3507-3517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.

- Ushioda, R., A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. I. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, and K. Nagata. 2016. "Redox-assisted regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (41):E6055-E6063. doi: 10.1073/pnas.1605818113.
- Valentine, W. M., K. E. Hill, L. M. Austin, H. L. Valentine, D. Goldowitz, and R. F. Burk. 2005. "Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p." *Toxicol Pathol* 33 (5):570-6. doi: 10.1080/01926230500243045.
- van den Pol, A. N., Y. Yao, L. Y. Fu, K. Foo, H. Huang, R. Coppari, B. B. Lowell, and C. Broberger. 2009. "Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons." *J Neurosci* 29 (14):4622-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3249-08.2009.
- van den Top, M., K. Lee, A. D. Whyment, A. M. Blanks, and D. Spanswick. 2004. "Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus." *Nat Neurosci* 7 (5):493-4. doi: 10.1038/nn1226.
- van Geest, M., and J. S. Lolkema. 2000. "Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals." *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (1):13-33. doi: 10.1128/MMBR.64.1.13-33.2000.
- Vanderheyden, V., B. Devogelaere, L. Missiaen, H. De Smedt, G. Bultynck, and J. B. Parys. 2009. "Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by reversible phosphorylation and dephosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1793 (6):959-70. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.12.003.
- Vanier, G., P. L. Lucas, C. Loutelier-Bourhis, J. Vanier, C. Plasson, M. L. Walet-Balieu, P. C. Tchi-Song, I. Remy-Jouet, V. Richard, S. Bernard, A. Driouich, C. Afonso, P. Lerouge, E. Mathieu-Rivet, and M. Bardor. 2017. "Heterologous expression of the N-acetylglucosaminyltransferase I dictates a reinvestigation of the N-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Sci Rep* 7 (1):10156. doi: 10.1038/s41598-017-10698-z.
- Varki, A. 2017. "Biological roles of glycans." *Glycobiology* 27 (1):3-49. doi: 10.1093/glycob/cww086.
- Varvel, N. H., S. A. Grathwohl, F. Baumann, C. Liebig, A. Bosch, B. Brawek, D. R. Thal, I. F. Charo, F. L. Heppner, A. Aguzzi, O. Garaschuk, R. M. Ransohoff, and M. Jucker. 2012. "Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (44):18150-5. doi: 10.1073/pnas.1210150109.
- Veres, Z., I. Y. Kim, T. D. Scholz, and T. C. Stadtman. 1994. "Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction." *J Biol Chem* 269 (14):10597-603.
- Vinceti, M., T. Filippini, S. Cilloni, and C. M. Crespi. 2017. "The Epidemiology of Selenium and Human Cancer." *Adv Cancer Res* 136:1-48. doi: 10.1016/bs.acr.2017.07.001.
- Viswanath, V., Y. Wu, R. Boonplueang, S. Chen, F. F. Stevenson, F. Yantiri, L. Yang, M. F. Beal, and J. K. Andersen. 2001. "Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease." *J Neurosci* 21 (24):9519-28.
- Wahlman, J., G. N. DeMartino, W. R. Skach, N. J. Bulleid, J. L. Brodsky, and A. E. Johnson. 2007. "Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system." *Cell* 129 (5):943-55. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.046.
- Walder, K., L. Kantham, J. S. McMillan, J. Trevaskis, L. Kerr, A. De Silva, T. Sunderland, N. Godde, Y. Gao, N. Bishara, K. Windmill, J. Tenne-Brown, G. Augert, P. Z. Zimmet, and G. R. Collier. 2002. "Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?" *Diabetes* 51 (6):1859-66. doi: 10.2337/diabetes.51.6.1859.
- Walter, P., and D. Ron. 2011. "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science* 334 (6059):1081-6. doi: 10.1126/science.1209038.
- Wang, C., J. Yu, L. Huo, L. Wang, W. Feng, and C. C. Wang. 2012. "Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'." *J Biol Chem* 287 (2):1139-49. doi: 10.1074/jbc.M111.303149.

- Wang, D. Y., C. Abbasi, S. El-Rass, J. Y. Li, F. Dawood, K. Naito, P. Sharma, N. Bousette, S. Singh, P. H. Backx, B. Cox, X. Y. Wen, P. P. Liu, and A. O. Gramolini. 2014. "Endoplasmic reticulum resident protein 44 (ERp44) deficiency in mice and zebrafish leads to cardiac developmental and functional defects." *J Am Heart Assoc* 3 (5):e001018. doi: 10.1161/JAHA.114.001018.
- Wang, M., and R. J. Kaufman. 2016. "Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease." *Nature* 529 (7586):326-35. doi: 10.1038/nature17041.
- Welply, J. K., P. Shenbagamurthi, W. J. Lennarz, and F. Naider. 1983. "Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides." *J Biol Chem* 258 (19):11856-63.
- Whitley, P., I. M. Nilsson, and G. von Heijne. 1996. "A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain." *J Biol Chem* 271 (11):6241-4. doi: 10.1074/jbc.271.11.6241.
- Wieteska, L., S. Shahidi, and A. Zhuravleva. 2017. "Allosteric fine-tuning of the conformational equilibrium poises the chaperone BiP for post-translational regulation." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.29430.
- Wild, R., J. Kowal, J. Eyring, E. M. Ngwa, M. Aebi, and K. P. Locher. 2018. "Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation." *Science* 359 (6375):545-550. doi: 10.1126/science.aar5140.
- Williams, K. W., T. Liu, X. Kong, M. Fukuda, Y. Deng, E. D. Berglund, Z. Deng, Y. Gao, T. Liu, J. W. Sohn, L. Jia, T. Fujikawa, D. Kohno, M. M. Scott, S. Lee, C. E. Lee, K. Sun, Y. Chang, P. E. Scherer, and J. K. Elmquist. 2014. "Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis." *Cell Metab* 20 (3):471-82. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.002.
- Williams, K. W., L. O. Margatho, C. E. Lee, M. Choi, S. Lee, M. M. Scott, C. F. Elias, and J. K. Elmquist. 2010. "Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons." *J Neurosci* 30 (7):2472-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010.
- Wit, C. B., and P. R. Hiesinger. 2022. "Neuronal filopodia: From stochastic dynamics to robustness of brain morphogenesis." *Semin Cell Dev Biol*. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.03.038.
- Wong, C. O., K. Chen, Y. Q. Lin, Y. Chao, L. Duraine, Z. Lu, W. H. Yoon, J. M. Sullivan, G. T. Broadhead, C. J. Sumner, T. E. Lloyd, G. T. Macleod, H. J. Bellen, and K. Venkatachalam. 2014. "A TRPV channel in *Drosophila* motor neurons regulates presynaptic resting Ca<sup>2+</sup> levels, synapse growth, and synaptic transmission." *Neuron* 84 (4):764-77. doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.030.
- Woods, J. A., K. R. Wilund, S. A. Martin, and B. M. Kistler. 2012. "Exercise, inflammation and aging." *Aging Dis* 3 (1):130-40.
- Wright, F. A., C. G. Bonzerato, D. A. Sliter, and R. J. H. Wojcikiewicz. 2018. "The erlin2 T65I mutation inhibits erlin1/2 complex-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and phosphatidylinositol 3-phosphate binding." *J Biol Chem* 293 (40):15706-15714. doi: 10.1074/jbc.RA118.004547.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J. C. Reed. 2005. "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." *J Clin Invest* 115 (10):2656-64. doi: 10.1172/JCI26373.
- Xu, X. M., B. A. Carlson, H. Mix, Y. Zhang, K. Saira, R. S. Glass, M. J. Berry, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2007. "Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes." *PLoS Biol* 5 (1):e4. doi: 10.1371/journal.pbio.0050004.
- Yang, Y., D. Atasoy, H. H. Su, and S. M. Sternson. 2011. "Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop." *Cell* 146 (6):992-1003. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.039.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan, and U. Hochgeschwender. 1999. "Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin." *Nat Med* 5 (9):1066-70. doi: 10.1038/12506.

- Ye, Y., Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, and T. A. Rapoport. 2004. "A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol." *Nature* 429 (6994):841-7. doi: 10.1038/nature02656.
- Yim, S. H., R. A. Everley, F. A. Schildberg, S. G. Lee, A. Orsi, Z. R. Barbati, K. Karatepe, D. E. Fomenko, P. A. Tsuji, H. R. Luo, S. P. Gygi, R. Sitia, A. H. Sharpe, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2018. "Role of Selenof as a Gatekeeper of Secreted Disulfide-Rich Glycoproteins." *Cell Rep* 23 (5):1387-1398. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.009.
- Yu, S. S., L. L. Men, J. L. Wu, L. W. Huang, Q. Xing, J. J. Yao, Y. B. Wang, G. R. Song, H. S. Guo, G. H. Sun, Y. H. Zhang, H. Li, and J. L. Du. 2016. "The source of circulating selenoprotein S and its association with type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis: a preliminary study." *Cardiovasc Diabetol* 15:70. doi: 10.1186/s12933-016-0388-3.
- Yuan, J., S. Palioura, J. C. Salazar, D. Su, P. O'Donoghue, M. J. Hohn, A. M. Cardoso, W. B. Whitman, and D. Soll. 2006. "RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (50):18923-7. doi: 10.1073/pnas.0609703104.
- Zapun, A., S. M. Petrescu, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. 1997. "Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin." *Cell* 88 (1):29-38. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81855-3.
- Zeng, J., S. Du, J. Zhou, and K. Huang. 2008. "Role of SelS in lipopolysaccharide-induced inflammatory response in hepatoma HepG2 cells." *Arch Biochem Biophys* 478 (1):1-6. doi: 10.1016/j.abb.2008.07.016.
- Zhan, C., J. Zhou, Q. Feng, J. E. Zhang, S. Lin, J. Bao, P. Wu, and M. Luo. 2013. "Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively." *J Neurosci* 33 (8):3624-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013.
- Zhang, J. X., I. Braakman, K. E. Matlack, and A. Helenius. 1997. "Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations." *Mol Biol Cell* 8 (10):1943-54. doi: 10.1091/mbc.8.10.1943.
- Zhang, L., M. S. Bijker, and H. Herzog. 2011. "The neuropeptide Y system: pathophysiological and therapeutic implications in obesity and cancer." *Pharmacol Ther* 131 (1):91-113. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.011.
- Zhang, L., D. Hernandez-Sanchez, and H. Herzog. 2019. "Regulation of Feeding-Related Behaviors by Arcuate Neuropeptide Y Neurons." *Endocrinology* 160 (6):1411-1420. doi: 10.1210/en.2019-00056.
- Zhang, N., W. Jing, J. Cheng, W. Cui, Y. Mu, K. Li, and X. Lei. 2011. "Molecular characterization and NF-kappaB-regulated transcription of selenoprotein S from the Bama mini-pig." *Mol Biol Rep* 38 (7):4281-6. doi: 10.1007/s11033-010-0551-y.
- Zhang, Y., Y. Zhou, U. Schweizer, N. E. Savaskan, D. Hua, J. Kipnis, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 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 (4):2427-38. doi: 10.1074/jbc.M707951200.
- Zinoni, F., J. Heider, and A. Bock. 1990. "Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (12):4660-4. doi: 10.1073/pnas.87.12.4660.
- Zito, E., E. P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T. A. Neubert, and D. Ron. 2010. "Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin." *Mol Cell* 40 (5):787-97. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.010.

# Annexe I

## Matériels et méthodes

### Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire mHypoA-POMC a été achetée auprès de Cedarlane Laboratories Limited, la lignée cellulaire HEK-293T auprès de l'ATCC (ACS-4500™) et les cellules PC12 ont été achetées auprès de la European collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK). Pour toutes les expériences, les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Gibco), complété par 10 % de sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % d'air à 37 °C. Les cellules mhypoA-POMC ont été cultivées dans des plaques à six puits ou dans des plaques de culture de 10 cm et transfectées transitoirement à 70 % de confluence avec le réactif Lipofectamine™ LTX et le réactif PLUS™ (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les cellules HEK 293T ont été transfectées à l'aide de polyéthylèneimine (PEIpro, Polyplus) pour la production de lentivirus. Le stress du RE a été induit par 1 µg/mL de tunicamycine pendant 24 h dans le milieu de culture cellulaire 24 h après transfection afin d'inhiber la *N*-glycosylation. L'hydrazide Alexa Fluor 594 (Thermofisher) a été incubé à 2 µM dans le milieu cellulaire pendant 30, 60 ou 120 minutes, à 37°C, puis lavé dans du PBS avant observation. Les cellules ont été traitées à la leptine et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24 h à 100 nM et 100 µM, respectivement.

### Plasmides et constructions

L'ADNc de la SELENOT de souris dépourvues de la séquence SECIS a été amplifié à partir de cellules AtT20 en utilisant des amorces sens et antisens ([Tableau 1](#)) et cloné dans un vecteur pGEM-T (Promega, Charbonnières, France). Un TAG HA a été introduit en amont du codon stop de la SELENOT à l'aide du QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies, Les Ulis, France). Quatre mutants dans le centre redox ont été produits, 2 (C57VS/C60 et C57VS/S60) en utilisant le kit de mutagenèse dirigée QuikChange® II XL et 2 (S57VS/S60 et S57VS/C60) ont été produits par synthèse d'ADN (Eurofins Genomics). Les



mutants ont ensuite été clonés dans le vecteur pLVET-IRES-GFP (Addgene #107139). La séquence nucléotidique de toutes les constructions a été vérifiée par séquençage de l'ADN.

Pour introduire des sites de *N*-glycosylation à différents sites de la SELENOT, la mutagenèse dirigée sur la construction SELENOT étiquetée HA a été réalisée à l'aide du kit de mutagenèse dirigée QuikChange II XL et des amorces appropriées. Cinq mutants de *N*-glycosylation différents ont été produits (ASN32, ASN53, ASN122, ASN147 et ASN194).

### Invalidation de la SELENOT par l'approche CRISPR-Cas9

L'invalidation du gène *selenot* a été réalisée en utilisant l'approche NHEJ (*non homologous end joining*) de CRISPR-Cas9. Deux guides ciblant le gène *selenot* (Guide #3 : 5'-GGGCGGCGTGCCCAAGA-3' ; Guide #4 : 5'-TTAATAGGCTTAATTGT -3') ont été conçues à l'aide de l'outil CRISPR Design hébergé par le Massachusetts Institute of Technology (<http://crispr.mit.edu>) afin de minimiser les effets hors cible potentiels. Les guides ont été insérés dans le vecteur TLCV2 (Addgene #87360) digéré avec l'enzyme de restriction BsmBI (New England Biolabs).

Les lentivirus ont été produits par transfection transitoire des vecteurs TLCV2-sgRNA, pCMV-dR8.2 (Addgene #8455) et pMD2.G (Addgene #12259) dans les cellules HEK293T à l'aide du PEIpro (Polyplus) selon les instructions du fabricant. Les surnageants contenant les virus ont été recueillis à 48 h. La transduction des cellules mhypoA-POMC avec les virus a été réalisée en présence de polybrène (8 µg/mL, Sigma) pendant 24 h, suivie d'une sélection à la puromycine (Life Technologies) pendant 48 h après l'infection. L'induction de l'expression de la Cas9 a été réalisée 2 semaines après l'infection par l'ajout de 0,5 µg/ml de doxycycline pendant 24 heures. L'isolement des cellules GFP positives a été réalisé par FACS, suivi de l'ensemencement des cellules dans des boîtes de 96 puits, à raison d'une seule cellule par puits. L'ADN génomique de chaque clone a été isolé à l'aide de NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). L'amplification de la séquence mutée a été réalisée par PCR à l'aide de l'ADN polymérase haute-fidélité Phusion® (NEB) en utilisant des amorces encadrant la région de la SELENOT mutée avec chaque sgRNA (Tableau 1). La séquence nucléotidique des clones a été vérifiée par séquençage de l'ADN.

## Western blot

Les protéines des cellules mHypoA-POMC ont été extraites avec un tampon de lyse (Cell Signalling) contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM de NaCl, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM d'EGTA, 1% de Triton, 2,5 mM de pyrophosphate de sodium, 1 mM de  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et 1  $\mu$ g/ml de leupeptine complété par un inhibiteur de protéase (Thermo Scientific Pierce). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France), séparées par SDS-PAGE et transférées sur des feuilles PVDF (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquées pendant 1 h à température ambiante dans une solution PBS-lait 5 % (sans matières grasses). Les blots PVDF ont ensuite été incubés pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires (Tableau 2). Ensuite, ils ont été incubés pendant 1 h avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (1:5000) puis lavés avant révélation. Les bandes immunoréactives ont été visualisées par détection de l'activité peroxydase par chimioluminescence (substrat Western ECL clair, Bio-Rad). L'analyse quantitative de l'immunoréactivité a été réalisée avec le système d'illumination Bio-Rad ChemiDoc en utilisant le logiciel Image Lab (Bio-Rad).

## Immunopurification des complexes piégés avec la SELENOT-HA

Des cellules mHypoA-POMC ont été transfectées dans des plaques de culture de 10 cm avec les 4 mutants SELENOT de souris marqués avec un tag HA (C57VS/C60, C57VS/S60, S57VS/S60, S57VS/C60). Chaque plaque a été soumise à un traitement oxydant pendant 10 min en utilisant du PBS contenant 20 mM de N-éthyl maléimide (NEM) et 1 mM de 2,2'-Dithiodipyridine. Les cellules ont ensuite été lysées dans 0,3 % de Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,4, 20 mM NEM et des inhibiteurs de protéases. Le lysat a été incubé avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-HA (Pierce) pendant une nuit et les protéines éluées dans du tampon Laemmli. Dix pour cent du matériel élué a été immunoblotté avec un anticorps anti-HA (Cell Signalling) après migration SDS-PAGE en condition réductrice et non réductrice (avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol).

## Prélèvement et préparation protéomique

Les protéines immunoprécipitées ont été mélangées avec du tampon Laemmli 3X (0,312 M Tris-HCL pH 6,8, 50 % p/v Glycérol, 10 % p/v SDS, 0,25 % bleu de bromophénol) et chauffées à 100 °C pendant 10 minutes. Les échantillons ont été chargés sur un gel de bis-acrylamide à 7 %. L'électrophorèse a été réalisée à 10 °C pendant environ 3 heures en utilisant un ampérage constant de 20 mA dans un tampon Tris-Glycine (14 % Glycine, 3 % Tris base, 2 % SDS). Les gels ont été lavés deux fois dans de l'eau désionisée et incubés 30 secondes dans la solution de bleu de Coomassie R-250 sous agitation. La bande de protéines juste au-dessus du front de migration a été coupée et conservée dans un mélange d'éthanol à 30 % et d'acide acétique à 10 %. Après plusieurs étapes de lavage, les bandes de protéines excisées ont été dénaturées par du chlorhydrate de Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine 5 mM (TCEP, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 100 mM à 56 °C pendant 1 heure. Ensuite, les résidus de cystéine réduits ont été bloqués à l'aide d'iodoacétamide 55 mM (Sigma) à température ambiante pendant 20 min (dans l'obscurité) avant d'effectuer une digestion par la trypsine en gel selon les instructions du fabricant (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les peptides ont été extraits une fois avec de l'acide formique 1%, deux fois avec de l'acétonitrile 100%/5% d'acide formique (v/v) et les fractions combinées ont été séchées à l'aide d'un concentrateur sous vide.

## Analyse NanoLC-ESI-MS/MS

Avant de procéder à l'analyse LC-MS, tous les échantillons de peptides ont été remis en suspension dans 10 µL d'acétonitrile à 3 % (v/v) et d'acide formique à 0,1 % (v/v). 1 µL de chaque échantillon a ensuite été analysé sur le spectromètre de masse Orbitrap Eclipse Tribrid (Thermo Scientific, Les Ulis, France) équipé d'une source nanoESI. Les peptides ont été chargés sur une colonne d'enrichissement (Acclaim C18 PepMap100 (2 cm x 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å, Thermo Scientific) et séparés sur une colonne Acclaim PepMap RSLC (50 cm x 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å, Thermo Scientific) avec un débit de 300 µL.min<sup>-1</sup>. La phase mobile était composée de H<sub>2</sub>O/0,1 % d'acide formique (tampon A) et d'acétonitrile/H<sub>2</sub>O/0,1 % d'acide formique (80/20) (tampon B). La durée du gradient d'élution était de 60 min, avec différentes étapes : 0-34 min, 2,5-31 % B ; 34-39 min, 31-50 % B ; 39-40 min, 50-100 % B ; 40-50 min, 100 % B ; 50,1-60 min, 6 % B. La température de la colonne a été réglée à 40°C. Les paramètres d'acquisition du spectromètre de masse étaient les suivants : Temps d'injection de 30 ms maximum, tension

capillaire de 1,6 kV, température capillaire de 275 °C, balayage complet MS m/z @ 375-1800 avec une résolution de 120 000 en MS et 15 000 en MS/MS. Les 20 ions les plus intenses (Top 20) ont été sélectionnés puis fragmentés avec l'azote comme gaz de collision (énergie de collision fixée à 30%). Tous les spectres obtenus ont été exportés au format "brut" qui ont été utilisés pour l'analyse des données.

## Analyse des données protéomiques

Le logiciel Progenesis LC-MS (Nonlinear dynamics, version 4.1) a été utilisé pour une approche peptidique sans marqueur comme décrit précédemment (Freret *et al.* 2013). L'alignement automatique a été réglé pour effectuer des comparaisons deux à deux entre les échantillons afin d'aligner les séries LC-MS pour tenir compte des dérives du temps de rétention. Un score d'alignement minimum de 80 % était requis pour la suite de l'analyse. Après l'alignement, l'analyse statistique a été effectuée avec des calculs d'analyse de variance à sens unique (ANOVA). Pour mettre en évidence les peptides exprimés de manière différentielle entre les groupes, une valeur  $p$  Anova  $\leq 0,05$  était requise. La liste de pics contenant les peptides différentiellement exprimés a ensuite été utilisée pour l'identification à l'aide de Mascot (Matrix Science, version 2.6.0, Boston, MA) avec les paramètres suivants : spécificité de l'enzyme, trypsine ; un clivage manqué autorisé ; modifications variables, carbamidométhylation (C) ; oxydation (M), pyroglu de E et Q ; tolérance de masse du précurseur monoisotopique : 5 ppm ; tolérance de masse du produit : 0,02 Da par rapport à la base de données SwissProt\_2017\_11 et à la taxonomie *Mus musculus* (souris domestique). Une correspondance positive était considérée lorsqu'elle était classée parmi les premières positions et présentait un score avec un seuil significatif de  $p < 0,05$  et avec un taux de fausses découvertes (FRD) inférieur à 1. Les résultats de la recherche Mascot ont été réimportés dans Progenesis pour l'expression différentielle et seules les protéines avec une  $p$ -value Anova  $\leq 0,05$  et identifiées. La qualité des données a été vérifiée par une analyse en composantes principales (PCA).

## Immunohistochimie

L'immunocytochimie a été réalisée sur des cellules mhypoA-POMC cultivées dans des plaques 24 puits pendant 48 h et fixées dans du PFA à 4 %. Une étape de saturation (1 h à température ambiante) a été réalisée avec 1 % de sérum d'âne dilué dans une solution PBS

contenant 1 % de BSA et 0,3 % de Triton X-100, avant une incubation d'une nuit avec les anticorps primaires à 4°C. Une description détaillée des anticorps primaires est fournie dans le tableau 2. Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) comprennent un anticorps de chèvre anti-lapin (1:300), un anticorps de chèvre anti-hamster (1:300), un anticorps de chèvre anti-souris (1:300). Les lectines ConA et EBL couplées à un Alexa Fluor ont été incubées pendant 20 minutes (1 :200) à température ambiante de même que la phalloïdine et la toxine cholérique (1:500). Les noyaux ont ensuite été colorés avec 1 µg/ml de 4',6-diamino-2-phénylindole (DAPI ; Sigma-Aldrich) dans du PBS pendant 2 minutes. Les coupes de tissus et les cellules ont été examinées avec un microscope confocal à balayage laser vertical Leica SP8 équipé du système Acousto-Optico Beam Splitter (Leica) sur la plateforme d'imagerie cellulaire de Normandie (PRIMACEN, Rouen).

### Analyse des *N*-glycomes

Des extraits protéiques (10 mg) obtenus à partir des *mhypoA*-POMC WT et KO ont été dissous dans 9 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM pH 8 et 1 mL de tampon dénaturant contenant 0,2 % de SDS et 100 mM de β-mercaptoéthanol. Les échantillons ont été chauffés pendant 10 min à 100°C pour dénaturer les protéines. Après refroidissement, la digestion a été réalisée avec 10 unités de PNGase F (SIGMA) pendant 24 à 48h à 37°C sous agitation à 150 rpm. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 5 minutes pour inactiver l'enzyme. La fétuine a été utilisée comme contrôle pour cette expérience (1,5 mg a été traité comme décrit précédemment). Finalement, les protéines déglycosylées ont été précipitées par l'ajout de 4 volumes d'éthanol pendant une nuit à -20°C. Après précipitation, les échantillons ont été centrifugés 15 min à 4°C à 10 000 g et les surnageants contenant les *N*-glycanes libérés ont été récupérés et placés dans des tubes en verre pour laisser évaporer la solution à l'aide d'un évaporateur sous flux gazeux. Ensuite, les *N*-glycanes libres ont été perméthylés comme décrit précédemment (Vanier *et al.* 2017), en augmentant le temps d'incubation à plusieurs heures. Les *N*-glycanes perméthylés ont été purifiés à l'aide de colonnes C18 (Hypersep™ C18 Cartridges, 200 mg, 3 mL, ThermoFisher). Tout d'abord, les colonnes ont été conditionnées par des lavages successifs avec 5 mL de méthanol, 5 mL d'eau, 5 mL d'acétonitrile et 5 mL d'eau. Les échantillons perméthylés ont été remis en suspension dans 200 µL d'une solution de méthanol/eau 50/50 (v/v) et ont été passés sur la colonne. Des éluions successives avec 2 mL de 15 % (v/v), 35 % (v/v), 50 % (v/v) et 75 % d'acétonitrile (v/v) ont été effectuées. Les *N*-glycanes perméthylés ont été récupérés dans les fractions de 50 % et de 75 % d'acétonitrile,

respectivement. Les échantillons résultants ont été séchés dans un SpeedVac® ThermoFisher SPD111 V avant d'être analysés par spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice et ionisation en temps de vol (MALDI-TOF MS) comme indiqué précédemment dans (Lucas *et al.* 2018). Pour cette analyse, un spectromètre de masse à temps de vol UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) équipé d'un laser Nd : YAG (longueur d'onde 355-nm), 2 kHz smartbeam™-II a été utilisé.

Les échantillons ont été préparés pour l'analyse sous forme de mélange avec de l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) utilisé comme matrice. Cette matrice a été dissoute à 20 mg/mL dans une solution à 80 % de méthanol. Les *N*-glycanes perméthylés ont été solubilisés dans une solution d'acétonitrile/0,1 % d'acide trifluoroacétique 70/30 v/v. Les échantillons et la matrice ont été étalés dans un rapport de 1/1 v/v. Ces spectres ont été enregistrés en mode positif du réflecteur avec une accumulation de 10 000 coups minimum avec le logiciel FlexControl 3.4. Les spectres ont été acquis en utilisant une gamme de masse *m/z* 900-4,500 et analysés avec le logiciel FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics). Sur la base du rapport *m/z* et du rapport de la littérature concernant les voies de *N*-glycosylation, chaque ion a été associé à une structure de *N*-glycane qui a été dessinée selon la nomenclature internationale récemment mise à jour.

## Dosage de l' $\alpha$ -MSH

Les concentrations d' $\alpha$ -MSH ont été déterminées à l'aide du kit  $\alpha$ -MSH (humain, rat, souris) -EIA (Phoenix, Strasbourg, France) conformément aux instructions du fabricant. En bref, les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM sans sérum pendant 24 h. La teneur en  $\alpha$ -MSH a été mesurée après lyse des cellules. L' $\alpha$ -MSH totale a été normalisée par la concentration en protéines de la cellule.

Primers		
PCR		
mSelT	F	5'- ggatccATGAGGCTCTTGCTGCTTCTGCTGGT -3'
	R	5'- GAATTCCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA-3'
Sg3	F	5'- GAGCAGTTCGTGGCTAGGTTTT-3'
	R	5'- GTAATCACCCTGGAACCTGAG-3'
Sg4	F	5'-ACACATAGCATCTTTCTGCTAGTCTTCAA -3'
	R	5'- CTTATTTTCTTGCCCCACTGCCAGATGCT-3'
Site-directed mutagenesis		
C57VS/ C60	F	5'- AAGTTTCAGATTTGTGTATCCTGTGGGTACAGGCGGGTGTTTG -3'
	R	5'- CAAACACCCGCTGTACCCACAGGATACACAAATCTGAAACTT -3'
C57VS/ S60	F	5'GCCACGGGGCCGCTGCTCAAGTTCAGATTTGTGTATCCTCAGGGTACAGGCGGGTGTTTGA GGAGT -3'
	R	5'- ACTCCTCAAACACCCGCTGTACCCTGAGGATACACAAATCTGGAACCTGAGCAGCG GCCCCGTGGC-3'
ASN32	F	5'GGCGGTGGTCCGCGAGCGAGGCCTCTGCCACTACAAAGACGATGACGACAAGAACCTGGGC GGCGTGCCAGCAAG-3'
	R	5'CTTGCTGGGCACGCCGCCAGGTTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGGCAGAGGCCTCGC TGCGGACCACCGCC 3'
ASN53	F	5'TACGCCACCGGGCCGCTGCTCAAGTTCAGAACTCGACCATTGTGTATCCTGTGGGTACCGG -3'
	R	5'CCGGTACCCACAGGATACACAAATGGTCGAGTCTGGAACCTGAGCAGCGGCCCGGTGGCGT A -3'
ASN122	F	5'-AGATCCTTTTGCTTTTTTCGGCATGCAAACTCGACCGCTCCTAGCATCTGGCAG TGGGGCCAAGAAAATAAGGTTT -3'
	R	5'-AAACCTTATTTTCTTGCCCCACTGCCAGATGCTAGGAGCGGTGAGTTTTGCAT GCCGAAAAAGCAAAAGGATCT -3'
ASN147	F	5'-TTATGCATGTATGATGGTTTTCTCCTGAGCAACATGactGAGAACCAGTGTATGTCA ACAGGTGCATTTGA -3'
	R	5'-TCAAATGCACCTGTTGACATACACTGGTTCTCagtCATGTTGCTCAGGAAGAAAAC CATCATACATGCATAA -3'
ASN194	F	5'-TGTTCAAATTCTTGACAATGAAATGAAACTCAATGTGACTATGGATTCAATCCCACAT CATCGATCA -3'
	R	5'TGATCGATGATGTGGGATTGAATCCATAGTCACATTGAGTTTCATTTCAATTGTCAAGAATTTGAA CA-3'
HA-TAG	F	5'-GGATTCAATCCCACATCATCGATCA TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAGCCCTACCTATCAGCACTG-3'
	R	5' CAGTGCTGATAGGTAGGGCTAAGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA TGATCGATGATGTGGGATTGAATCC-3'

Tableau 1. Liste des primers

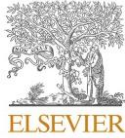
Antibody	Dilution used for IHC	Dilution used for western blot
Rabbit Anti Selt, Labmade		1 :500
Mouse Anti-Polysialic Acid-NCAM Antibody, clone 2-2B, Sigma, MAB5324	1 :400	1 :1000
Mouse Ncam syalylé antibody, DSHB, 5A5	2-5 µg/ml	0,2-0,5 µg/ml
Mouse NCAM1 antibody [RNL-1], Abcam, ab9018	1:200	
Mouse Anti-α-Tubulin, Sigma-Aldrich, T6199		1:1000
Mouse GAPDH loading control antibody (GA1R), Invitrogen, MA5-15738		1:1000
Rabbit HA-Tag antibody, Cell Signalling, 3724		1:1000
Goat POMC antibody, Novus Biologicals, NB100-1533	1:250	1:1000
Rabbit Kdel antibody, Origene, TA309410	1:200	1:500
Mouse Contactin2 antibody, DSHB , 3.1C12	1:8	0.2-0.5 ug/ml.
Mouse IP3R-I/II/III (B-2) antibody, Santa Cruz, sc- 377518	1:100	1:1000
Rabbit IP3RI antibody, abcam, ab264281	1:200	1:2000
Rabbit Anti α-MSH, Labmade	1:250	

**Tableau 2. Liste des anticorps**



# Annexe II

Redox Biology 55 (2022) 102412



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/redox](http://www.elsevier.com/locate/redox)



## Emerging roles of ER-resident selenoproteins in brain physiology and physiopathology

Cédric Jehan<sup>a,b</sup>, Dorthe Cartier<sup>a,b</sup>, Christine Bucharles<sup>a,b</sup>, Youssef Anouar<sup>a,b</sup>,  
Isabelle Lihmann<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Rouen-Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuroendocrine, Endocrine and Germinal Differentiation and Communication Laboratory, Mont-Saint-Aignan Cedex, France

<sup>b</sup> Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Selenium  
Thiol redox switch  
ER protein Folding  
Calcium mobilization  
Brain pathologies

### ABSTRACT

The brain has a very high oxygen consumption rate and is particularly sensitive to oxidative stress. It is also the last organ to suffer from a loss of selenium (Se) in case of deficiency. Se is a crucial trace element present in the form of selenocysteine, the 21st proteinogenic amino acid present in selenoproteins, an essential protein family in the brain that participates in redox signaling. Among the most abundant selenoproteins in the brain are glutathione peroxidase 4 (GPX4), which reduces lipid peroxides and prevents ferroptosis, and selenoproteins W, I, F, K, M, O and T. Remarkably, more than half of them are proteins present in the ER and recent studies have shown their involvement in the maintenance of ER homeostasis, glycoprotein folding and quality control, redox balance, ER stress response signaling pathways and  $Ca^{2+}$  homeostasis. However, their molecular functions remain mostly undetermined. The ER is a highly specialized organelle in neurons that maintains the physical continuity of axons over long distances through its continuous distribution from the cell body to the nerve terminals. Alteration of this continuity can lead to degeneration of distal axons and subsequent neuronal death. Elucidation of the function of ER-resident selenoproteins in neuronal pathophysiology may therefore become a new perspective for understanding the pathophysiology of neurological diseases. Here we summarize what is currently known about each of their molecular functions and their impact on the nervous system during development and stress.

### 1. Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is an extensive membrane organelle that plays a crucial role in the adaptation of eukaryotic cells to internal and external environmental changes, and in their viability. Remarkably in neurons, the ER forms a continuous structure that follows the shape of the cell, and has been called "a neuron within a neuron" [1,2]. Its integrity is essential to maintain the physical continuity of axons over long distances and to prevent degeneration of distal axons. Within the cell body, in connexion with the nuclear envelope, is the rough ER, characterized by its sheet-like morphology and the presence of ribosomes attached to the ER membrane. The dendritic and axonal ER is mainly formed by a network of interconnected tubules, sometimes with sheets or cisternae. The tubules are lipid synthesis regions and the cisternae, with their larger lumen, have a greater capacity to store

calcium [3].

The main function of the granular (rough) ER is to participate in the synthesis and maturation of proteins destined to secretion, or exposed at the membrane surface. Most proteins entering the ER are N-glycosylated by the oligosaccharyltransferase (OST) at the translocon exit. The resulting N-glycan undergoes successive glucose and mannose addition/trimming steps establishing a sugar-based code [4,5]. This code conditions the access of newly synthesized proteins to a complex process that mobilizes dozens of proteins, including chaperones, disulfide isomerases, glucosidases and glucosyl transferases, and contributes to fold them up to the native form while ensuring their quality control [6–8]. Only proteins which are properly folded leave the ER and continue their maturation in the Golgi complex. However, a fraction of them (~10%) is resistant to folding and is degraded through the ER-associated protein degradation (ERAD) pathways. The accumulation of inactive or chemically aggressive proteins in the ER lumen leads to a cellular state

\* Corresponding author. Rouen-Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuroendocrine, Endocrine and Germinal Differentiation and Communication Laboratory, Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

E-mail address: [isabelle.lihmann@univ-rouen.fr](mailto:isabelle.lihmann@univ-rouen.fr) (I. Lihmann).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102412>

Received 3 May 2022; Received in revised form 5 July 2022; Accepted 14 July 2022

Available online 19 July 2022

2213-2317/© 2022 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations	
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
AD	Alzheimer's disease
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
APP	Amyloid precursor protein
ATF6	Activating Transcription Factor 6
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
BiP, HSP70, GRP78	Immunoglobulin Binding Protein
Cav1.1	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit
CHOP	C/EBP homologous protein
CRAC	Ca <sup>2+</sup> release-activated Ca <sup>2+</sup> channel
CRF	Corticotropin-releasing hormone
Derlin1	Degradation in endoplasmic reticulum protein 1
DHHC6	Palmitoyltransferase
Dio2/D2	Type 2 iodothyronine deiodinase
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated protein degradation
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO1	Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1
ERSE	ER stress response element
Gal-1	Galectin-1
GHQ	General Health Questionnaire
GPX4	Glutathione peroxidase 4
IP3	Inositol trisphosphate
IP3R	Inositol trisphosphate receptor
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
KCP2	Keratinocyte-associated Protein 2
KO	Knock-out
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
Nes-Cre/SelTfl/fl	Brain conditional SELENOT-deficient mice
NFTs	Neurofibrillary tangles
OST	Oligosaccharyltransferase
OST48	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein Glycosyltransferase 48 kDa subunit
p97, VCP	Valosin containing protein
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PD	Parkinson's disease
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PDI	Protein disulphide isomerase
RDH11	Retinol dehydrogenase 11
ROS	Reactive oxygen species
RyR1	Ryanodine receptor 1
Se	Selenium
SEC, U	Selenocysteine
SELENOF, Sep15, 15-kDa selenoprotein	Selenoprotein F
SELENOK, SelK	Selenoprotein K
SELENOM, SelM	Selenoprotein M
SELENOS, Sels, SEPS1	Selenoprotein S
SelT, SELENOT	Selenoprotein T
SEPN1, SELENON, SelN	Selenoprotein N
SERCA1	ER sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases
SPUR	Selenoprotein S positive UGA recoding
STIM	Stromal interacting molecule
STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A
T3	3,5,3'-triiodothyronine
T4	3,5,3',5'-tetraiodothyronine
TXN	Thioredoxin
UGGT	UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase
UPR	Unfolded protein response
VIMP	Valosin interacting protein

referred to as ER stress, which is the signal for activation of the unfolded protein response (UPR) to restore ER homeostasis. However, this cell-rescue pathway can fail and turn into a cell-death pathway (Box 1). Exacerbated ER stress and UPR activation are molecular pathophysiological hallmarks of many neurodegenerative diseases [3,9–11], although ER stress signaling pathways are also important in nervous system physiology, during development and aging [12,13]. Many studies have been conducted to reduce cellular stress and restore proteostasis as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases [14–16].

The brain is particularly dependent on Se because of its high rate of oxygen consumption and increased sensitivity to oxidative stress [17]. This is why it is the last organ to suffer from the loss of Se in case of

deficiency [18,19]. In rats, it has been shown that Se levels decrease by 29% in all brain regions analyzed during Se deficiency, compared to more than 98% in the liver and 92% in the kidneys [20], a result partly corroborated in chickens [21]. In the rat brain, the highest Se levels were detected in the anatomical regions containing the most grey matter, with the Se content decreasing in the following order: cerebellum > cortex > medulla oblongata [22]. The hippocampus, certain layers of the cerebellum, brainstem and ventricles were the preferential sites of Se supply in the brain of Se-deficient rats [20]. Se protects against oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and inflammation. This trace element has also been shown to promote neurotransmission by maintaining redox balance [23]. After the initial study by Weber et al. demonstrating the alleviation of intractable seizures in children with a low level of

### Box 1

#### The unfolded protein response

In order to prevent ER stress, eukaryotes have evolved a complex homeostatic mechanism known as the unfolded protein response (UPR), which is divided into adaptive UPR and pro-apoptotic UPR [39–43]. The UPR is a set of tightly interconnected signaling pathways activated by a triad of transmembrane proteins, namely protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6), all of which possess a regulatory domain in the ER lumen. Under normal conditions, this domain is bound to the chaperone protein immunoglobulin binding protein (BiP/GRP78/HSP70). However, the amount of BiP available in the ER lumen is inversely proportional to the protein load. As protein load increases, BiP dissociates from these transmembrane proteins, leading to their dimerization (PERK, IRE1) or cleavage (ATF6), and self-activation. Stimulation of UPR leads to inhibition of global protein translation, increased chaperone activity, enhanced ERAD mediated protein degradation, COPII-mediated secretion and ER-phagy, and activation of antioxidant defence mechanisms, with the primary goal of reducing the accumulation and aggregation of misfolded proteins in the ER lumen. If UPR is not sufficient to restore protein homeostasis, and ER stress worsens, then key regulators of UPR trigger the cascade of apoptotic death signals [39–42,44–46].

glutathione peroxidase (GPX) [24], many studies have suggested a correlation of low selenium (Se) status with seizures, Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), dementia, cognitive decline [23,25,26] and neurodevelopmental disorders [27]. Se levels in the brain decreased by 40% [28], and a decrease in Se plasma levels was also observed in patients with epilepsy and PD, which was associated with impaired function of GPX [26]. Se has also been used as a therapeutic agent with contrasting results. Hence, Se has been discussed for decades in relation to AD, with absence of conclusive results [29]. It has been used as an adjunct to therapy in a multiple sclerosis mouse model, and has been proposed as preventive and therapeutic measures in distinct clinical forms of this disease [30]. Another strategy was tested successfully to facilitate Se transport by using a cargo peptide to enhance GPX4 synthesis during a ferroptosis neurodegeneration process [31] and stroke [32] in mice. Some benefit of higher selenium status on the risk of prostate, lung, colorectal, and bladder cancer has also been described, but the results of these trials have been contrasting as well.

Although Se supplementation in the brain has shown some therapeutic potential, the exact roles of Se in alleviating neuronal deficits are still unclear. Se is mainly present in cells as the 21st amino acid selenocysteine (Sec, U) in a set of proteins collectively called selenoproteins, which are one of the primary lines of defense against oxidative stress. Sec is a structural homologue of cysteine (Cys) in which the sulphur atom is substituted by a Se atom. Sec is more reactive than Cys to reactive oxygen species (ROS), thanks to its Se atom giving it both a higher nucleophilic power and a lower pKa [33,34]. Se would be more resistant to overoxidation to selenone than S to sulfone, and would have the ability to be reduced to selenide more rapidly than S [34]. These physico-chemical properties give all selenoproteins a more or less established antioxidant role. Some of them, notably thioredoxin reductases, are essential for the regulation of redox homeostasis [35]. It should be noted that Se can also be introduced into proteins in the form of selenomethionine, notably in some plants and bacteria [36]. Remarkably one third of these proteins are located in the ER where they regulate proteostasis, ER and redox stresses and Ca<sup>2+</sup> flux. In this review, we discuss the current state of knowledge regarding the role of ER resident selenoproteins and their involvement in nervous system physiology and disease [23,37,38]. Given their involvement in regulating oxidative, ER and inflammatory stress, a greater understanding of the role of these ER-resident selenoproteins may offer novel insights into the pathophysiology of neurological diseases.

## 2. Selenoproteins in the brain

During the atypical synthesis of selenoproteins, the Sec residue is synthesized on its own tRNA, the [Ser]Sec tRNA which is encoded by the *Trsp* gene, and incorporated in an unconventional manner during translation. Briefly, the selenoprotein transcripts contain in their 3' untranslated region a 60 nucleotide RNA sequence that adopts a stem-loop structure designated as the selenocysteine insertion sequence (SECIS) element. The latter recruits a protein complex including SBP2 (SECIS binding protein 2), eEFSec (eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific), which together with other factors allows the specific decoding of an UGA stop codon into a Sec codon during the elongation step of protein translation. Twenty-five human selenoproteins, compared to twenty four in mouse, were identified in a bioinformatics screen based on the presence of the SECIS element in the 3' untranslated region of the mRNAs [47]. All of them have in their sequence a single Sec residue, except SELENOP, which contains up to ten of these residues in humans, and which is produced in the liver and secreted in the plasma to supply the different tissues of the body with Se. Remarkably, a SEC-specific mass spectrometry-based approach has recently identified five putative candidate selenoproteins lacking the SECIS sequence in their mRNAs, suggesting that more such selenoproteins may be discovered in the future [48].

Selenoproteins are mainly present in neurons although Se is mainly

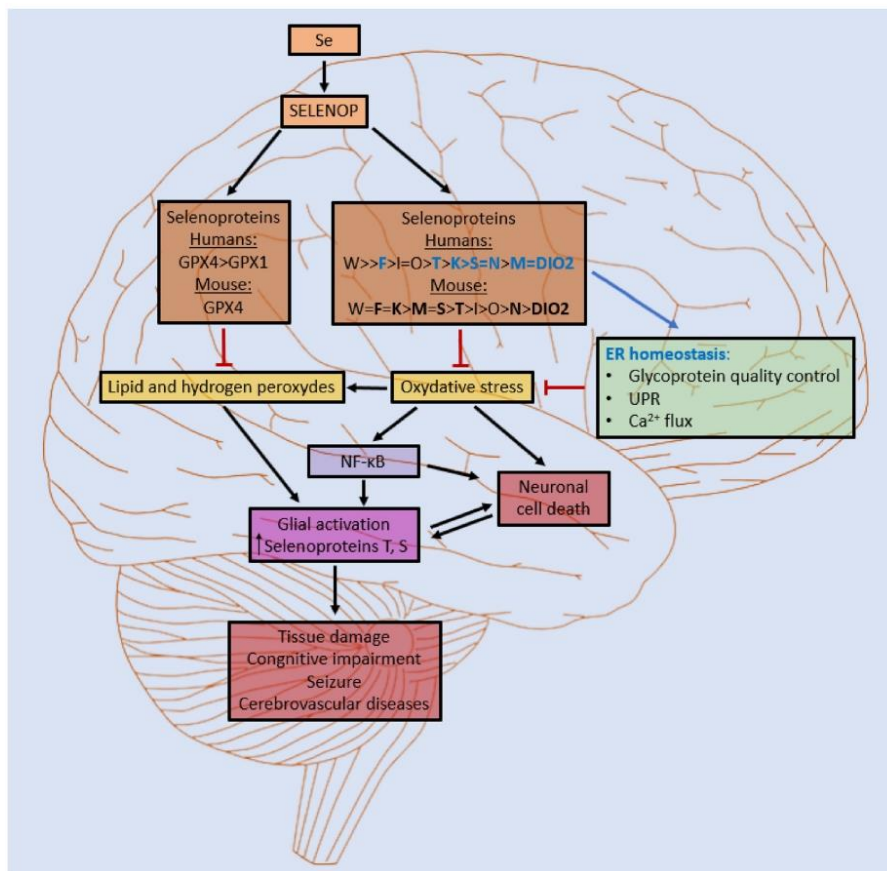
distributed in the brain as selenoprotein P (SELENOP, SelP) through glial cells. Circulating SELENOP in blood and cerebrospinal fluid is taken up by LRP8-positive cells [49,50] at the blood-brain barrier and in the choroid plexus, resynthesized in nearby astrocytes, and released to supply Se to LRP8-positive neurons [51]. It is also possible that Se enters the brain as selenosugar [49] or as selenite salt using anion transporters present in the blood-brain barrier [52], in which case it may be neurotoxic [53]. Thus, mice invalidated for SELENOP show severe neurological dysfunctions during weaning which are largely avoided with Se supplementation [54]. SELENOP and selenoproteins are required for the functionality of parvalbumin-expressing interneurons which are highly metabolic active and sensitive to oxidative stress [59–61]. Se can also be sequestered by selenium binding protein 1 in astrocytes, which negatively regulates the production of SELENOP. A significant fraction of Se (20%) supplied by SELENOP is incorporated into the brain as GPX [22], but the majority of the selenoproteins are expressed in this organ in humans and mouse [51,55]. Six members of the selenoprotein family are highly enriched in the mouse brain, in particular SELENOP, GPX4, selenoprotein K (SelK, SELENOK), selenoprotein M (SelM, SELENOM), selenoprotein W (SelW, SELENOW) and selenoprotein F (Sep15/SELENOF) [18]. In humans, the most represented are SELENOF, SELENOW, GPX4, SELENOI, SELENOO and SELENOT. Some of them are essential for the organism such as TRXR1, SELENOI and SELENOT, and GPX4 only in mouse [56]. (Fig. 1) GPX4 has probably been the most studied in the brain. This mitochondrial antioxidant enzyme plays a protective role against oxidative stress, which has the effect of limiting neurodegeneration and ferroptosis [57,58].

Conditional inactivation of GPX4 in forebrain neurons after development leads to cognitive decline and hippocampal neurodegeneration in mice [62]. Human neonates with sedan-type spondylometaphyseal dysplasia with inactivating nonsense mutations in the GPX4 gene have been observed [63]. They show massive brain atrophy and usually die soon after birth, so human foetuses with GPX4 mutations progress further in their development compared to mice with the null mutation. Conditional ablation of TRXR1 in neural precursors leads to cerebellar hypoplasia, ataxia and tremor in mice [64] while its removal in neurons leads to neurodegeneration and aging [56], suggesting a key function in the processes of migration via Bergmann glia or granule cell generation [64]. Ethanolamine phosphotransferase 1 (EPT1/SELENOI), whose gene deletion is also lethal at the embryonic stage, is an enzyme involved in phospholipid biosynthesis that is important for myelination [65,66]. It is probably through SELENOI that the Se deficiency caused by the absence of SELENOP could alter the formation of the myelin sheath in the brainstem [67]. The latest selenoprotein shown to play an essential role in the brain is SELENOT [68,69].

Of the twenty-five selenoproteins present in humans, seven are ER-resident selenoproteins but their molecular functions in the brain are poorly documented. In recent years, numerous studies have been conducted to elucidate the role of these selenoproteins in the regulation of ER homeostasis. There is emerging evidence that implicates them in the regulation of ER stress responses, ER redox status (Box 2), and Ca<sup>2+</sup> signaling (Box 3). These ER-resident selenoproteins include the 15-kDa selenoprotein F, type 2 iodothyronine deiodinase (Dio2) and selenoproteins S, N, K, M and T [70]. It has recently been shown that selenoprotein I is also localized in the ER among other cellular compartments [71], but we will review here only the literature dedicated to the seven selenoproteins whose localization is restricted to the ER. In this review we discuss the contribution of ER selenoproteins in brain function, in the order of their expression level, from highest to lowest abundance [51, 72].

## 3. SELENOF (15-kDa selenoprotein; Sep15)

The 15-kDa selenoprotein is a soluble enzyme located in the ER lumen, which is involved in posttranslational protein folding. In the mouse fibroblast cell line NIH 3T3, it has been shown that SELENOF



**Fig. 1.** Neuroprotective roles of selenoproteins in the brain

The brain has a high concentration of unsaturated fatty acids and weak antioxidant defense mechanisms, making it susceptible to oxidative stress. Selenoproteins are major components of the antioxidant defense strategy in the brain. Se enters the brain primarily as SELENOP, which enables the expression of other selenoproteins by providing Se as Sec [18,38,184]. The major selenoproteins expressed in the brain are listed according to their expression levels in human and mouse brain [51,72]. GPX1 and 4 reduce lipid and hydrogen peroxides [185]. Most other selenoproteins have antioxidant action as well. Those residing in the ER (bold, blue) participate in the maintenance of ER proteostasis and  $Ca^{2+}$  homeostasis. Upon protein overload, the UPR is activated, leading to activation of PDI and increased production of ROS, further exacerbating oxidative stress. When cellular production of ROS overwhelms its antioxidant capacity, it leads to a state of oxidative stress, which in turn contributes to activate the NF $\kappa$ B signaling pathways, neuronal cell death and glial reactivity [186,187]. Whereas selenoprotein expression is prominent in neurons and barely detectable in astrocytes, brain injury results in strong upregulation of SELENOS and SELENOT, specifically in reactive astrocytes in mice [69,129]. Oxidative stress and ER stress contributes to the pathogenesis of several human neurological diseases. In this scenario, Se deficiency further increases sensitivity to oxidative stress, and sensitizes to neurodegeneration [54,188]. [54,188]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

interacts with glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), a soluble enzyme which acts as a folding sensor and evaluate the folded status of glycoproteins. UGGT transfers a glucose monomer to the terminal mannose of the A branch of the oligomannose Man3GlcNAc2 chain on misfolded glycoproteins that can in this form enter the quality control process [73]. If at the end of this process, the glycoprotein is not correctly folded, this last glucose is removed by glucosidase II (GII) and reformed by UGGT, then, the folding process starts again until the protein reaches the wright native conformation. Otherwise, misfolded proteins enter a specific degradation process called ERAD (ER-associated protein degradation) [44]. SELENOF interacts with UGGT via a

conserved cysteine-rich domain present in its N-terminal moiety, an interaction which is also essential for SELENOF retention in the ER [74]. SELENOF has a thioredoxin (TXN)-like domain containing a redox active CXU motif, suggesting a thiol oxidoreductase function for this protein. It has been proposed that the SELENOF uncommon CXU redox motif could be involved in the reduction, isomerization or oxidation of disulfide bonds of glycoprotein substrates of UGGT [75].

SELENOF expression is abundant in secretory tissues such as prostate, liver, kidney, testis, and brain. In particular, SELENOF gene expression is elevated in neurons in olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex, and cerebellar cortex [18]. Only few studies have

**Box 2**

ER redox homeostasis is highly regulated

One characteristic feature of the ER environment is its more oxidative environment compared to the cytosol [81], thus providing the adequate milieu for oxidative folding of secretory and membrane proteins. Glutathione (GSH) is one of the major components that maintain the redox environment in all cellular compartments of both prokaryotic and eukaryotic cells. However, GSH is only synthesized in the cytosol [82]. The ryanodine receptor (RyR) calcium release channel and protein channel Sec61p have been shown *in vitro* to passively transport GSH across the ER [83,84]. In the ER, thiol groups in GSH and nascent secretory or membrane proteins (PSH) react with oxidized protein disulphide isomerase PDI<sub>ox</sub> to generate PSSP, GSSG, and reduced PDI (PDI<sub>red</sub>). PDI has to be re-oxidized, and this is achieved by the flavoproteins Ero1 (ER oxidoreductin-1 $\alpha$  and  $\beta$ ) which transfer the two electrons from PDI via FAD to oxygen, thus producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All ER peroxidases Pxx4, GPX7/8 couple their H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging to PDI oxidation, thus promoting oxidative folding. Whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a toxic byproduct or is physiologically required to contribute to oxidative folding is currently a matter of debate. Meanwhile, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels have to be maintained at acceptable levels since its accumulation can inhibit the proper formation of disulfide bonds, leading to protein misfolding and UPR activation. Abundant PDIs in the ER act as electron acceptors for other oxidoreductases to provide flexibility and robustness in the ER redox environment. In summary, the process of oxidative protein folding is complex and requires multiple co-players [85–88].

**Box 3**

ER serves as an intracellular calcium storage

ER is the major Ca<sup>2+</sup> storage organelle. Ca<sup>2+</sup> plays a key function as a cytosolic second messenger that controls muscle contraction, protein secretion, mitochondrial metabolism or cell death (Tannous, Pisoni et al., 2015). Stimulations of G protein-coupled receptors (GPCRs) and receptor tyrosine kinases (RTKs) result in hydrolytic cleavage of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by phospholipase C, producing inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG). The conjoint binding of IP3 and Ca<sup>2+</sup> activates the IP3R channel receptor at the ER membrane, opening the pore and initiating the release of Ca<sup>2+</sup> from ER. Another active mechanism of Ca<sup>2+</sup> release is based on the gated channel of the RyRs receptor family, which can be inhibited by high concentrations of the ryanodine alkaloid and also opens upon binding of Ca<sup>2+</sup> ions. ER membrane can also modulate its own luminal Ca<sup>2+</sup> dynamics and generate appropriate signals to maintain balanced homeostasis through the interaction between the Stromal Interacting Molecule (STIM), an ER resident protein serving as a Ca<sup>2+</sup> sensor (Stathopoulos, Zheng et al., 2009), and ORAI a plasma membrane subunit of the Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channel (Prakriya, Feske et al., 2006). Upon depletion of the ER Ca<sup>2+</sup>, STIM molecules oligomerize to recruit and gate the ORAI channel at the junction of the ER with the plasma membrane leading to the entry of extracellular Ca<sup>2+</sup> into the cytosol (Stathopoulos & Ikura, 2013). Fueled by ATP hydrolysis, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases (SERCAs) transport cytosolic Ca<sup>2+</sup> to the ER (or sarcoplasmic reticulum), thereby restoring calcium homeostasis. The varying redox conditions of the ER govern the flow of Ca<sup>2+</sup> from the ER. This involves direct disulfide reduction in the ER Ca<sup>2+</sup> handling proteins such as IP3R and SERCA, but also the regulated interaction of ER chaperones and oxidoreductases with these proteins (Appenzeller-Herzog & Simmen, 2016). Oxidative stress results in Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptic dysfunction, impaired plasticity, neuronal demise and neurodegenerative disorders [109].

investigated the role of SELENOF in the brain. SELENOF knock-out (KO) mice carrying a targeted deletion of exon 2 of the *selenoF* gene coding for the cysteine-rich UGGT binding domain showed normal brain morphology, although SELENOF is one of the most abundant ER-resident proteins in the brain in both mice and humans [51]. However, these mice developed an early age cataract without increased oxidative stress or glucose dysregulation [76]. On the basis of their previous studies demonstrating an interaction between SELENOF and UGGT, the authors suggested that the phenotype observed is due to an improper folding of lens proteins caused by SELENOF deficiency. Dai and collaborators (2016) showed the protective effect of selenite supplementation against D-galactose-induced cataract in rats, an effect which was linked to an increase in SELENOF expression [77]. More recently, a yeast two-hybrid system which was used to identify SELENOF partners in a human fetal brain cDNA library revealed an interaction between SELENOF and retinol dehydrogenase 11 (RDH11), an enzyme involved in vitamin A metabolism. This study suggested that both SELENOF and RDH11 might reduce all-trans-retinaldehyde into all-trans-retinol (Vitamin A and its esters), but curiously SELENOF and RDH11 inhibited the enzymatic activity of each other [78]. Although these two independent teams highlighted the potential role of SELENOF in vision, it is yet unclear if cataract development and protein misfolding in lens from SELENOF KO mice results from the lack of interaction with UGGT, or a deficiency in vitamin A and its metabolites due to a lack of interaction with RDH11, or both of these processes. It is likely that due to its high level in the brain, SELENOF interacts with RDH11 which has a similar expression profile, and participates in the development,

maintenance and morphogenesis of the central nervous system through the production of retinoids [78,79]. Noteworthy, vitamin A deficiency is positively correlated with cognitive decline in the elderly population [79,80]. Additional studies on SELENOF function in the brain may uncover its contribution to cognition.

**4. SELENOT**

SELENOT is thought to be one of the highest priorities selenoproteins, along with TrxR1, so that its expression cannot fall below a threshold level. For instance, its cellular levels are marginally impacted by Se deficiency [89]. Conversely, the levels of SELENOT mRNA in HEK293 cells are significantly up-regulated compared to that of other selenoprotein mRNAs in Se-supplemented conditions [90]. SELENOT is also the most evolutionarily conserved selenoprotein and its gene invalidation in mouse is lethal at early stages of embryogenesis, perhaps at the preimplantation stage [69]. A correspondence in intolerance to SELENOT loss-of-function between human and mouse has been reported, which is only the case also for TRXR1 [91]. However, in *C. elegans* which possesses two *selenot* gene paralogs, the double KO is viable [92]. SELENOT mRNA levels are significantly upregulated between control and Se-supplemented conditions in HEK293 cells, whereas the levels of 19 other selenoprotein mRNAs remained unaffected by the change in Se level [12]. SELENOT contains an N-terminal CVSU redox motif within a thioredoxin-fold domain that confers thiol-disulfide oxidoreductase enzymatic activity [69]. A small peptide (PSELT) designed from the redox active site is sufficient to mimic the

antioxidant effect of SELENOT in dopaminergic neurons *in vivo* and *in vitro* [93]. Meanwhile, Sec is substituted by Cys in certain organisms like *C. elegans*, among others [94]. Directed mutagenesis approaches and modeling studies support a topology in which SELENOT is inserted into the ER membrane [95–97].

SELENOT levels are high in all tissues during development, from mouse to nematodes [92,95,96]. However, they decrease drastically after birth, except in the brain, and in tissues with endocrine/secretory activity such as the pituitary, thyroid, thymus or testicle [95,96,99–102]. In the adult mouse brain, SELENOT mRNA was detected in many areas including the thalamus, the hypothalamus, midbrain, pons and the medulla [101]. SELENOT-like immunoreactivity was found to be intense in some glial cell populations, including astrocytes in the rostral migratory stream and Bergmann glial cells in the cerebellar cortex [98].

Stress strongly influences SELENOT expression. SELENOT was induced in various neuronal and neuroendocrine cell lines under exposure to oxidative, neurotoxic and ER stress [96,103]. Stress also triggered the re-expression of SELENOT in tissues where it had been switched off after birth, such as liver after hepatectomy [98] in rat, substantia nigra and striatum in mouse models of PD (in neurons and astrocytes), and striatum of PD patients [69]. Both SELENOT expression and mitochondriogenesis were induced via the AMPK/PGC-1 $\alpha$ /NRF-1 cascade during pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-induced neuroendocrine differentiation [95,103]. PACAP is thought to reprogram cellular metabolism via an AMPK-dependent pathway, which would allow cells to pass a critical metabolic checkpoint with tolerable ROS levels ensured by antioxidant enzymes such as SELENOT, in spite of increased mitochondriogenesis, and to successfully transition to neuronal-like differentiation [103].

Reduction of SELENOT levels in various endocrine, neuroendocrine and neuronal cell lines, as well as in neuroblasts in primary culture, but not in astrocytes, resulted in increased levels of ROS [68,69,96,103]. SELENOT depleted endocrine cells also developed ER stress characterized by ER enlargement. BiP, CHOP, ATF6, and ATF4 were enhanced as well as other UPR markers. A delay in the elimination of the misfolded null Hong Kong variant of human alpha1-antitrypsin, a truncated variant deriving from the deletion of a dinucleotide which leads to its accumulation in the ER [104], was also observed, indicating ERAD alteration [105]. SELENOT-depletion also abolished the increase in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] induced by PACAP in neuroendocrine cells and the redox center was essential for SELENOT-dependent Ca<sup>2+</sup> flux regulation [95]. In conditional brain SELENOT deficient mice (Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup>), in which SELENOT was depleted in immature neuroblasts, there was a loss of immature neurons by apoptotic cell death, but not of glial cells [68]. Several brain structures, including the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum, showed significant and transient growth retardation during the first postnatal week. Despite an apparent morphological compensation, SELENOT deficiency leads to a hyperactive behaviour in adulthood [68]. Three-dimensional mapping of catecholaminergic neurons in Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup> showed a significant decrease in the number of tyrosine hydroxylase-positive neurons in the area postrema, A11 cell group, and zona incerta of SELENOT-deficient females, as well as in the hypothalamus of SELENOT-deficient females and males [101]. Consistent with these data, the Nes-Cre/SELENOT<sup>fl/fl</sup> mouse line exhibited greater vulnerability of dopaminergic neurons to neurotoxin action, emphasizing the crucial role of SELENOT in protecting the catecholaminergic neuronal system [69].

A yeast two-hybrid system used to screen for SELENOT partners in a cDNA library prepared from mouse embryos showed its interaction with Keratinocyte-Associated Protein 2 (KCP2/KRTCAP2), a protein that interacts with the oligosaccharyltransferase (OST) type A complex [106,107]. Immunoprecipitation studies validated the physical interaction with KCP2 and other OST subunits, including the catalytic subunit STT3A, but not the STT3B catalytic subunit of the type B complex [96]. STT3A catalyzes the co-translational N-glycosylation of proteins

entering the ER lumen via the translocon [108]. Since SELENOT is not itself N-glycosylated [96], it likely acts as a modulator of N-glycosylation, similar to KCP2 [106,107]. Knock-out of SELENOT in AtT20 corticotrophic cells specifically altered the N-glycosylation profile of the main protein produced by these cells, proopiomelanocortin (POMC). POMC is a polypeptide precursor whose cleavage generates adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH secretion was suppressed in these cells after SELENOT depletion, which may result from altered POMC N-glycosylation, a possibility that remains to be confirmed [96]. Work is currently underway to confirm the role of SELENOT in N-glycosylation and to identify its target glycoproteins in neurons.

## 5. SELENOK

SELENOK belongs to the same protein family as SELENOS, not that they have similar sequences but because of their very similar organization. Surprisingly, it is one of the most widespread of the eukaryotic selenoproteins but its role is the most poorly understood. SELENOK is a selenoprotein with a single transmembrane domain and a C-terminal end that faces the cytosol. It contains a Sec residue in the third position from the C-terminal end supporting an antioxidant function [110,111]. However, it lacks, like SELENOS, the catalytic CXXU found in the majority of selenoenzymes. SELENOK is present as a homodimer containing an intermolecular diselenide bond. It has a domain which is rich in glycine and proline in the cytosolic tail and is necessary for the interaction with valosine ATPase-containing protein p97(VCP) and Derlin1, proteins that perform retrotranslocation of misfolded proteins into the cytosol [112]. Meanwhile, the interaction between SELENOK and p97 (VCP) is SELENOS-dependent [112]. The degradation of misfolded glycosylated proteins by the resulting ERAD complex (SELENOS-p97 (VCP)-SELENOK), combined with the antioxidant function of SELENOK and SELENOS, contribute to limit ER stress [112–114]. SELENOK deletion results in decreased Ca<sup>2+</sup> flux into macrophages, T cells and B cells. This effect results from a dysfunction of inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) due to a defect in palmitoylation which is required for its stable expression [115]. In fact, SELENOK also interacts with DHH6 (the letters represent the amino acids aspartic acid, histidine, histidine, and cysteine in the catalytic domain), a palmitic acid acyltransferase, through SH3/SH3 binding domain interactions. Palmitoylation catalyzed by DHH6/SELENOK results in the addition of palmitic acid to at least three cysteine residues in the cytosolic portion of each IP3R stabilizing its expression and/or assembly into a functional tetrameric Ca<sup>2+</sup> channel in the ER membrane [115].

SELENOK expression is ubiquitous in mammalian tissues [110]. In the brain, it is highly expressed, in particular in hippocampus and cerebral cortex [18]. SELENOK gene contains a functional ER stress response element within its promoter region and SELENOK expression can be upregulated by the accumulation of misfolded proteins in the ER [114], suggesting that SELENOK is essential for maintaining ER homeostasis. *Selenok* gene disruption results in increased levels of ER stress markers such as ER BiP, CHOP and ATF6 in N2a cells, and those of CHOP and ATF6 in the cortex and hippocampus of *selenok* KO mice [116]. *Selenok* gene knock-out also increased the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> level leading to activation of *m*-calpain/caspase-12 cascade and ER stress-induced apoptotic pathway. Neuronal apoptosis might further lead to cognitive impairments and anxiety observed in these mice [116]. In AD mice models, a disequilibrium was found between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors, as was also seen in SELENOK knock-out mice. Se-Met treatment upregulated SELENOK levels and restored the balance between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors expression in an AD mouse model [117]. Stimulating microglial cells migration and phagocytosis is of importance for reducing the risk of neurodegenerative diseases, such as AD and PD. Se supplementation (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) significantly increases the expression of SELENOK in microglial cells, leading to increased migration and phagocytosis through up-regulation of IP3 receptors, and an increase in the cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level. The enhanced

migration and phagocytosis of microglial cells by SELENOK expression through increased  $\text{Ca}^{2+}$  flux could help the microglial cells to perform clearing functions; this is especially true for A $\beta$  deposits [118].

#### 6. SELENOS, SELS, SEPS1, VIMP, TANIS

SELENOS was first identified as Tanis by differential display PCR from mRNA obtained from livers of fed and fasted rats [119]. It was also identified and later named SELENOS, SELS, SEPS1 following bioinformatics screening of mRNAs with the SECIS sequence [120]. The name of p97(VCP)-interacting protein (VIMP) was also given to this selenoprotein as will be discussed later [121]. SELENOS is predicted to cross the membrane only once with a short luminal segment and a longer (~141 amino acids) disordered cytosolic domain. The latter contains the p97/VCP interaction motif (RX5AAX2R where X denotes positions without significant conservation), a coiled-coil domain, and a region rich in glycine, proline, and positively charged amino acids (G-rich) [114,121,122]. The Sec residue is located at the second or third position from the C-terminus and confers a reductase function to SELENOS *in vitro* [123,124]. A SPUR element in the 3' UTR of SELENOS mRNA would bring SECIS into position to interact with the ribosome at the UGA-Sec codon and facilitate Sec insertion [125].

During ERAD, recruitment of p97(VCP) to the ER membrane is important for ERAD substrate degradation, and binding of SELENOS to p97(VCP) is required for this process. SELENOS also interacts with Derlins, with SELENOS serving as a link between Derlins and p97(VCP) during ERAD [121]. As mentioned before, SELENOS is required for the interaction of p97(VCP) with SELENOK, an interaction required for ERAD and cellular restoration after ER stress [112]. The *selenos* gene promoter contains an ER stress response element (ERSE), and over-expression of SELENOS limits ROS, ER stress and apoptosis in various cell lines [126–132]. Cross-linking experiments have shown that SELENOS interacts not only with p97(VCP) and Derlins but also, through its coiled-coil domains, with proteins enriched in various multiprotein complexes, suggesting that it participates in intracellular membrane transport and maintenance of protein complexes by anchoring them to the ER membrane [133]. Depletion of SELENOS caused the ER membrane to spread and disrupted the link between the ER and microtubules, indicating that SELENOS is an ER-shaping protein [134].

SELENOS is expressed ubiquitously. It is detected in the serum of some human subjects, with hepatocytes probably being the source of circulating SELENOS [135]. High expression is found in metabolically active tissues (kidney, liver, adipose tissue, blood vessels, pancreatic islets and skeletal muscle) [132,136]. Moreover, SELENOS expression is deregulated in metabolic disorders. It is overexpressed following glucose deprivation and lipopolysaccharide-induced inflammation [119,132,137]. Expression of SELENOS mRNA is positively correlated with serum amyloid A in type 2 diabetic and control subjects, supporting the hypothesis that SELENOS may be the cell-surface receptor for serum amyloid A [128,138]. Its upregulation can also lead to insulin resistance [139]. SELENOS is also a regulator of contractile function in skeletal muscle [126,140].

SELENOS is expressed throughout the brain, at higher levels in the cortex, hippocampus and cerebellum [18,129]. SELENOS immunoreactivity is primarily localized to neurons in the healthy mouse brain. However, brain injury, inflammatory stimuli and ER stressors upregulate SELENOS expression in activated astrocytes [129]. SELENOS expression in stimulated astrocytes leads to a reduction in ER stress markers such as CHOP and spliced XBP-1, as well as the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  [129]. It has been proposed that it may be relevant to astrocyte function in the context of inflammatory neuropathologies [141].

SELENOS expression is regulated by ER stress in neurons as well. AD is pathologically characterized by the deposition of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) plaques and the accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs). Furthermore, the formation of NFTs in AD is increased by ER stress

[142]. Inhibition of SELENOS expression under ER stress increases Tau phosphorylation and phosphorylated Tau aggregation [142]. Se in the form of sodium selenate reduces NFTs formation and aggregates of hyperphosphorylated tau protein in Alzheimer's disease models and in the brain of AD patients, and selenate (selenite) significantly increases SELENOS expression in neurons [143–145]. Thus, selenate may decrease Tau hyperphosphorylation by increasing SELENOS expression in AD. Ubiquitination-dependent degradation of the AD-associated C99 fragment of APP was inhibited in a SELENOS-knockdown cell model of AD, and the  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) level was significantly increased, indicating that SELENOS participates in the C99 degradation process through ERAD [146]. In the postmortem brain from AD patients, SELENOS expression correlates with NFTs, but not with A $\beta$  plaques supporting a role in the phosphorylation of tau [142].

#### 7. SELENOM

SELENOM is another luminal ER-resident oxidoreductase that is structurally homologous to SELENOF but is still to be fully characterized. SELENOM is shorter than SELENOF because it lacks the N-terminal cysteine-rich domain responsible for the binding to UGGT [75]. It includes a TNX fold in its tertiary structure, i.e. a single domain with a central five-stranded mixed  $\beta$ -sheet flanked by two  $\alpha$ -helices on each side common to thioredoxin and enzymes that catalyze disulfide bond formation [147] and isomerization, and a CXXU redox motif. These features, in addition to the measured redox potential, and the localized conformational changes observed upon thiol-disulfide exchange, rapidly indicated a disulfide exchange activity [148]. Indeed, a TXN intrinsic activity was recently demonstrated for SELENOM immunoprecipitated from mouse hypothalamic extracts [149].

The expression pattern of SELENOM in rodents is characterized by higher expression levels in brain than in other organs [18]. SELENOM is highly expressed around birth in hippocampal CA3 region and later in all the principal divisions of the hippocampus. High levels were measured in adult cerebellum, main olfactory bulb, cerebellar cortex and isocortex [150]. Overexpression of the protein in murine hippocampal HT22 cells, cerebellar astrocyte C8-D1A cells, and primary neuronal cultures resulted in a reduction in ROS levels and oxidative stress-induced apoptotic cell death, suggesting a neuroprotective function for SELENOM [151]. Several studies have been conducted to investigate the neuroprotective role of SELENOM in the pathophysiology of AD. SELENOM was identified among the genes whose expression was differentially modulated due to the over-expression of human mutant presenilin-2 in transgenic mice [152]. SELENOM levels were reduced in these mice indicating that SELENOM may play a suppressive or protective role in the pathophysiology of AD, a hypothesis confirmed by several works performed in different cellular and animal models. Thus, in the transgenic rat overexpressing human SELENOM, Se treatment and SELENOM attenuated alpha/gamma-secretase-mediated proteolysis and Tau phosphorylation to protect brain function through activation of the ERK pathway [153]. In an A $\beta$ -expressing cell model SELENOM attenuated oxidative stress-induced mitochondrial damage through inhibition of A $\beta$  oligomer formation [154]. Aggregation and cytotoxicity of A $\beta$  with transition metal ions in neuronal cells has been implicated in the progression of AD. SELENOM chelates  $\text{Zn}^{2+}$ , probably via its redox motif CXXC, and due to its metal binding capacities, SELENOM suppressed  $\text{Zn}^{2+}$ -induced A $\beta$  aggregation and thus exhibited antioxidant and neuroprotective functionality in the neuroblastoma N2A cell line [155]. Cytosolic calcium is very important in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In several cellular models (hippocampal HT22 cells, cerebellar astrocyte C8-D1A cells, and primary neuronal cultures) SELENOM decreased calcium release from ER in response to oxidative stress and reduces apoptotic cell death [151]. The anti-A $\beta$  aggregation function of SELENOM still needs to be confirmed *in vivo*, and the mechanism involved should be investigated, in particular its link to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and energy metabolism in the brain.

SELENOM was used to screen a human fetal brain cDNA library by the yeast two-hybrid system for potential partners. Galectin-1 (Gal-1), a lectin that binds  $\beta$ -galactoside and a wide array of complex carbohydrates, which is essential for the production of new neurons and the recovery from brain damage, was identified as an interacting protein [156]. The interaction between SELENOM and Gal-1 hence indicated important roles in preventing neurodegeneration. Moreover, SELENOM was found expressed in hypothalamic regions involved in leptin signaling [149], and was previously linked to energy metabolism [151]. Leptin promoted hypothalamic expression of SELENOM, and leptin-induced STAT3 phosphorylation was hampered by SELENOM deficiency. SELENOM knock-out mice had no deficits in motor coordination and cognitive function but exhibited increased weight gain, increased white adipose tissue deposition, and attenuated hypothalamic leptin sensitivity, indicating that SELENOM plays an important role in maintaining redox balance in key brain regions involved in energy metabolism [150]. NF- $\kappa$ B and ER stress pathways largely crosstalk and converge to stimulate transcriptional programs that promote antioxidant defense, cell survival and the inflammatory response in the hypothalamus [149]. Microarray studies in hypothalamic tissue and mHypoE-44 cells indicated that SELENOM promotes both TXN and NF- $\kappa$ B activity, a finding that was not surprising since TXN facilitates NF- $\kappa$ B signaling through the reduction of redox-sensitive cysteine residues in the p50/p65 heterodimer [149]. At the opposite, SELENOM deficiency in mHypoE-44 cells provoked a decrease in the leptin-activated NF- $\kappa$ B signaling pathway and enhanced vulnerability to ER stress-mediated cell death.  $Ca^{2+}$  imaging data revealed that SELENOM-deficient cells showed no visible response to leptin. It has been suggested that this may be caused by a disrupted communication between the leptin receptor and ER proteins involved in  $Ca^{2+}$  signaling, such as Inositol trisphosphate receptor (IP3R) or sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) pump [149,157]. The possible redox regulation of thiol groups by SELENOM on these ER  $Ca^{2+}$  channels and/or pumps needs to be further explored.

#### 8. Dio2 (D2)

Thyroid hormones have multiple functions during growth and development, and in metabolism regulation in adult. The type 1, 2 and 3 iodothyronine deiodinases (DIO1, DIO2, and DIO3) are transmembrane selenoproteins which remove an iodine residue from the outer or inner ring of thyroid hormones. DIO2 and DIO3 finely regulate thyroid hormone signaling during development through local activation (DIO2) or inactivation (DIO3) of thyroid hormones, and distinct expression patterns. Dio3 to Dio2 expression switches are found in many organs, including the brain, leading to amplification of the T3 signal during developmental transitions [158]. This review will focus on DIO2 which resides in the ER and more specifically catalyzes the deiodination of T4 (3,5,3',5'-tetraiodothyronine) into T3 (3,5,3'-triiodothyronine).

*dio2* mRNA expression was detected in the neonatal rat brain, in the cerebral cortex, olfactory bulb, hippocampus, caudate, thalamus, hypothalamus and cerebellum, and it was observed more particularly in certain population of glial cells (astrocytes and tanycytes lining the third ventricle) [159]. In contrast, *dio2* mRNA expression is absent in most regions of the adult mouse brain [18], with a few exceptions, since DIO2-producing glial cells were observed in the arcuate nucleus of the hypothalamus, in direct apposition with neurons co-expressing neuropeptide Y and agouti-related protein [160]. Altogether, these observations support a model whereby separation of T3-producing glial cells and T3-responding neurons provides a paracrine-like form of control [159]. Fasting increased DIO2 activity and local thyroid hormone production in the arcuate nucleus supporting a function in the central regulation of food intake [160]. In addition, DIO2 expression peaks in the retina at juvenile stages, suggesting that it may be important in amplifying T3 content during retinal maturation, but this has not been confirmed in DIO2 KO mice, which exhibited a very mild neurological

phenotype [161].

Today, research on DIO2 mainly focuses on psychiatric and depressive disorders. Yet, the relationship between hypo/hyperthyroidism and depression is not clearly established despite the large number of studies [162,163]. Hence, *dio2* gene is linked with bipolar disorder in Asian population [164] and activity of DIO2 in the brain may be a determinant of well-being and neurocognitive function according to the answers given to the General Health Questionnaire (GHQ) score [165]. Thr92Ala is a well-studied polymorphism present in 12–36% of the population that leads to ER stress and hypothyroidism [166]. It has been postulated that the Thr92Ala substitution may result in the instability of a loop into the DIO2 protein that affects the process of ubiquitination, slowing down DIO2 turnover and targeting to the proteasome, and leading to its detrimental accumulation in the ER. The contribution of DIO2 polymorphisms to the etiology of recurrent depressive disorders could be related to the DIO2 increased activity and subsequently to thyroid hormone levels in the brain [167].

This polymorphism has also been investigated in AD. Thr92AlaD2 DIO2 accumulates in neurons and escapes from the ER to the Golgi apparatus, which exhibits a perturbed morphology. Human temporal lobe samples from subjects carrying the Thr92AlaD2 DIO2 mutation exhibit transcriptional alterations in processes associated with neurodegenerative diseases, such as A $\beta$  processing [168]. The altered Golgi trafficking of APP processing has been implicated in development of AD, because A $\beta$  peptide accumulation causes Golgi structural defects that further affects APP trafficking and processing [169]. Finally, population study has shown that the Thr92AlaD2 polymorphism is associated with development of AD in African American but not European American populations, supporting the hypothesis that Thr92AlaD2 might represent one factor contributing to ethnic discrepancies in incident AD [170].

#### 9. SELENON (SEPN1; SeIN)

SELENON is a 62 kDa type II transmembrane glycoprotein which senses ER calcium fluctuations by binding this ion through a luminal EF-hand domain. It responds to diminished luminal calcium levels by changing its oligomeric state, turning on its redox activity towards its partner, the SERCA pump, and many other interactors. Its interaction with SERCA leads to a reduction of the luminal cysteines of this  $Ca^{2+}$  pump, which are hyperoxidized by ERO1-generated peroxides (Boxes 2 and 3). SELENON function becomes essential in the case of a hyperoxidized ER elicited by over-expressing ERO1, as indicated by the failure of myoblasts to grow under these conditions in the absence of SELENON [171]. SELENON-depleted cells are also clearly defective in ER calcium re-uptake [172]. Single amino acid substitutions in the EF-hand domain of SELENON impaired its calcium-binding properties and calcium-dependent structural changes, which suggests a key role of the EF-hand domain in SELENON function.

SELENON loss of function leads to a congenital myopathy associated with insulin resistance (SEPN1-related myopathy). Identification of 65 SELENON mutations, including a pathogenic copy number variation, unveiled exon 1 as the main mutational hotspot [173]. Muscles of patients with SELENON variants contain lower amounts of key proteins involved in calcium regulation and skeletal muscle excitation-contraction coupling like RyR1, Cav1.1 and SERCA1 [174]. Absence of SELENON in myoblast primary cultures from patients with null SELENON mutations is associated with abnormal susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, causing cell death [175]. Unlike in humans, limb muscles are protected from disease when at rest in SELENON deficient mice, but an inappropriate response to ER stress triggers dysfunction in highly active muscles of these mice [176]. *chop* gene ablation in SELENON KO mice precludes diaphragm dysfunction, the prolonged limb muscle relaxation after fatigue, and restores  $Ca^{2+}$  uptake by attenuating the induction of ERO1. Altogether, these observations indicate that SELENON would be a part of an ER stress-activated



antioxidant response that, upon failure, results in a CHOP- and ERO1-dependent maladaptive response leading to oxidation and inhibition of SERCA2 in highly active muscles [176]. SELENON also protects skeletal muscle from saturated fatty acid-induced ER stress and insulin resistance, indicating that all environmental factors causing ER stress in skeletal muscle (such as a high-fat diet) could affect the pathological phenotype of SEPNI-related myopathy [177].

The *selenon* gene is expressed in the mouse brain, with a higher rate in olfactory areas, hippocampus and both the cerebral and cerebellar cortexes [18]. Meanwhile, the role of SELENON in the central nervous system is largely unexplored. No patient with SELENON-related myopathy showed intellectual disability or CNS involvement [173], which may discourage further research into possible central functions of SELENON.

## 10. Conclusion

It is clear today that selenoproteins not only protect cells and organisms against oxidative stress, but that each of them has specific molecular functions and partners, in connection with their structure and

localization, and in relation with a role in redox and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and protein folding/degradation (Fig. 2). Up to now, their molecular functions are particularly difficult to study for many reasons: acting as oxidoreductases, they establish transient redox boundaries that are difficult to capture, and conversely their overexpression can lead to nonspecific redox interactions. Furthermore, it is obvious that their molecular partners may be different depending on the cell type, developmental stage, or stress versus resting conditions. Furthermore, the recombinant proteins produced are most often Cys variants, as Sec isoforms are difficult to express in mammalian cells. High oxidative stress has been identified as a key factor in the onset and development of several neuropsychiatric disorders. To date, apart from Se supplementation, few studies have investigated selenoprotein-based treatments for neurological disorders. Several recent ones have recently reported the use of selenoprotein-derived peptides with promising results in brain disorders. The selenopeptide, PSELT, composed of 10 amino acids with a Sec redox center, is protective in a rat model of peripheral nerve neurodegeneration and a MPTP mouse model of PD, but also in a rat model of cardiac ischemia-reperfusion [93,178–180]. Transcriptomic analysis revealed that gene regulation by PSELT after MPP + treatment of

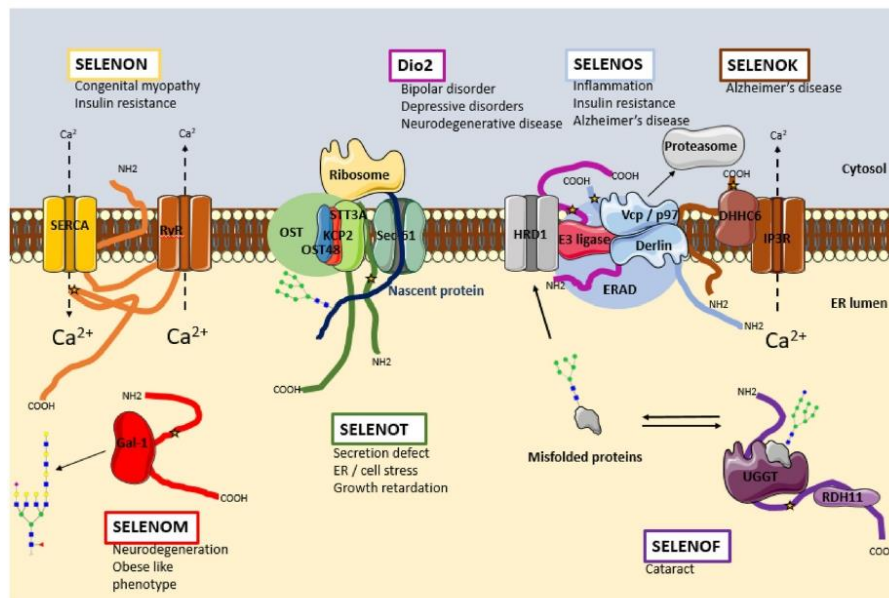


Fig. 2. Schematic summary of the different functions performed by the seven ER-resident selenoproteins.

Pathologies and cellular dysfunctions associated with each of them are indicated. SELENON is activated by low ER calcium level. This leads to its interaction with SERCA pump and its activation. Its loss of function leads to hypersensitivity to ERO1, defect in  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake, and to a disease called SEPNI-related myopathy associated with insulin resistance. SELENOM reduces ROS level in cell culture and is able to interact with Gal1, a lectin with higher affinity for galactose, preventing neurodegeneration and promoting neuroprotection in the brain. Deletion of SELENOM leads to obesity without cognitive impairment. SELENOT deletion from neuronal precursor leads to brain growth retardation associated to high ROS levels, and increased vulnerability to neurodegeneration. It interacts with the OST complex and modulates *N*-glycosylation. Its inhibition leads to secretion defects and ER stress in endocrine cells. Dio2 catalyzes the deiodination of T4 (3,5,3',5'-tetraiodothyronine) into T3 (3,5,3'-triiodothyronine). DIO2 in the brain may be a determinant of well-being and neurocognitive function. The Thr92Ala mutation, a well-studied polymorphism present in 12–36% of the population, leads to ER stress and hypothyroidism. This mutation is presumably responsible of a decrease of DIO2 through ubiquitination by E3 ubiquitin ligase and degradation by the proteasome. SELENOS inhibition increase Tau aggregation. It is involved in C99 degradation through its interaction with ERAD complex involved in clearing of misfolded glycoproteins, and its expression correlates with NFTs from post-mortem human brain. SELENOS upregulation can also lead to insulin resistance. SELENOK interacts with SELENOS and ERAD, limiting ER stress. It also interacts with DHH6, a protein responsible for IP3R palmitoylation, a necessary step for its stabilization. It is believed that this link with  $\text{Ca}^{2+}$  regulation supports microglial migration and  $\text{A}\beta$  deposit clearance in AD. SELENOF is a partner of UGGT, a folding sensor of the ER transferring a glucose residue to the A branch of oligomannoses from misfolded glycoproteins to make it join the quality control process. If the protein isn't correctly folded after a few cycles, it will join the ERAD pathway. SELENOF deletion in animal leads to an early age cataract. This could be due to an increase of misfolded protein or to the lack of interaction with RDH11, a protein involved in vitamin A metabolism.

neuroblastoma cells is positively correlated with that after resveratrol treatment. A second selenopeptide, Tat SelPep, has been derived from SELENOP. Tat SelPep contains two Sec residues, crosses the mouse blood-brain barrier, and protects against ferroptosis and cell death by stimulating GPX4 expression after stroke [32]. These peptides may be more specific than selenium supplementation [181] or intravenous hydroselenide injection [182], with fewer side effects. A better understanding of their mechanism could lead to the development of useful therapeutic tools specifically targeting  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins and protein quality control or degradation, similar to chaperone therapies [183].

#### Declaration of competing interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by Inserm and Rouen Normandie University. CJ was supported by a fellowship co-funded by the Normandie region and ComUE Normandie University.

#### References

- [1] Z. Ozturk, C.J. O'Kane, J.J. Perez-Moreno, Axonal endoplasmic reticulum dynamics and its roles in neurodegeneration, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 48.
- [2] M.J. Berridge, Neuronal calcium signaling, *Neuron* 21 (1998) 13–26.
- [3] D.S. Schwarz, M.D. Blower, The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 73 (2016) 79–94.
- [4] J. Hosoki, R. Ushioda, K. Nagata, Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation, *J. Biochem.* 147 (2010) 19–25.
- [5] Y. Harada, Y. Ohkawa, K. Maeda, N. Tanguchi, Glycan quality control in and out of the endoplasmic reticulum of mammalian cells, *FEBS J.* (2021), <https://doi.org/10.1111/febs.16185>.
- [6] A. Helenius, M. Aebi, Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 1019–1049.
- [7] J.J. Caramelo, A.J. Parodi, Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10221–10225.
- [8] C. Patel, H. Saad, M. Shenkman, G.Z. Lederkremer, Oxidoreductases in glycoprotein glycosylation, folding, and ERAD, *Cells* 9 (2020).
- [9] C.A. Ross, M.A. Polier, Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat. Med.* 10 (Suppl) (2004) S10–S17.
- [10] C. Hetz, B. Mollereau, Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (2014) 233–249.
- [11] S. Hashimoto, T.C. Saido, Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease, *Open Biol.* 8 (2018).
- [12] R.C. Taylor, A. Dillin, XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity, *Cell* 153 (2013) 1435–1447.
- [13] A.E. Frailes, M.G. Metcalf, S.U. Tronnes, R. Bar-Ziv, J. Durieux, H.K. Gildea, N. Kandahari, S. Monshietehadi, A. Dillin, Four glial cells regulate ER stress resistance and longevity via neuropeptide signaling in *C. elegans*, *Science* 367 (2020) 436–440.
- [14] A. Marino Gammazza, C.C. Bavisotto, R. Barone, E.C. de Macario, A.J. Macario, Alzheimer's disease and molecular chaperones: current knowledge and the future of chaperonotherapy, *Curr. Pharmaceut. Des.* 22 (2016) 4040–4049.
- [15] K. Yadav, A. Yadav, P. Vashista, V.P. Pandey, U.N. Dwivedi, Protein misfolding diseases and therapeutic approaches, *Curr. Protein Pept. Sci.* 20 (2019) 1226–1245.
- [16] B. Boland, W.H. Yu, O. Corti, B. Mollereau, A. Henriques, E. Bezdard, G. M. Pastores, D.C. Rubinsztein, R.A. Nixon, M.R. Duchen, G.R. Mallucci, G. Kroemer, B. Levine, E.L. Eskelinen, F. Mochel, M. Spedding, C. Louis, O. R. Martin, M.J. Millan, Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018) 660–688.
- [17] H. Steinbrenner, H. Sies, Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system, *Arch. Biochem. Biophys.* 536 (2013) 152–157.
- [18] Y. Zhang, Y. Zhou, U. Schweizer, N.E. Savaskan, D. Hua, J. Kipnis, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, 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 (2008) 2427–2438.
- [19] M.W. Pitts, C.N. Byrns, A.N. Ogsawa-Wong, P. Kremer, M.J. Berry, Selenoproteins in nervous system development and function, *Biol. Trace Elem. Res.* 161 (2014) 231–245.
- [20] M. Kuhbacher, J. Bartel, B. Hoppe, D. Alber, G. Bukalis, A.U. Brauer, D. Behne, A. Kyriakopoulos, The brain selenoproteome: priorities in the hierarchy and different levels of selenium homeostasis in the brain of selenium-deficient rats, *J. Neurochem.* 110 (2009) 133–142.
- [21] J.L. Li, H.X. Li, X.J. Gao, J.L. Zhang, S. Li, S.W. Xu, Z.X. Tang, Priority in selenium homeostasis involves regulation of SepSecS transcription in the chicken brain, *PLoS One* 7 (2012), e35761.
- [22] J.R. Prohaska, H.E. Ganther, Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain, *J. Neurochem.* 27 (1976) 1379–1387.
- [23] N.D. Solov'yev, Importance of selenium and selenoprotein for brain function: from antioxidant protection to neuronal signalling, *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 1–12.
- [24] G.F. Weber, P. Maertens, X.Z. Meng, C.E. Pippenger, Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures, *Lancet* 337 (1991) 1443–1444.
- [25] M.P. Rayman, Selenium and human health, *Lancet* 379 (2012) 1256–1268.
- [26] R. Pillai, J.H. Uyehara-Lock, F.P. Bellingier, Selenium and selenoprotein function in brain disorders, *IUBMB Life* 66 (2014) 229–239.
- [27] M.A. Ajmone-Cat, R. De Simone, A.M. Tartaglione, A. Di Biase, R. Di Benedetto, M. D'Archivio, R. Vari, L. Ricceri, F. Aureli, F. Inconpi, A. Raggi, F. Cubadda, S. J. Fairweather-Tait, G. Calamandrei, L. Minghetti, Critical role of maternal selenium nutrition in neurodevelopment: effects on offspring behavior and neuroinflammatory profile, *Nutrients* 14 (2022).
- [28] S.R. Varikasuvu, V.S. Prasad, J. Kothapalli, M. Manne, Brain selenium in Alzheimer's disease (BRAIN SEAD study): a systematic review and meta-analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 189 (2019) 361–369.
- [29] N. Solov'yev, E. Drobyshev, G. Bjorklund, Y. Dubrovskii, R. Lysiuk, M.P. Rayman, Selenium, selenoprotein P, and Alzheimer's disease: is there a link? *Free Radic. Biol. Med.* 127 (2018) 124–133.
- [30] J. de Toledo, T.F.C. Fraga-Silva, P.A. Borim, L.R.C. de Oliveira, E.D.S. Oliveira, L. L. Perico, C.A. Hiruma-Lima, A.A.L. de Souza, C.A.F. de Oliveira, P.M. Padilha, M. F. Pinatto-Botelho, A.A. Dos Santos, A. Sartori, S.F.G. Zorzella-Pezavento, Organic selenium reaches the central nervous system and downmodulates local inflammation: a complementary therapy for multiple sclerosis? *Front. Immunol.* 11 (2020), 571844.
- [31] M. Conrad, B. Proneth, Selenium: tracing another essential element of ferroptotic cell death, *Cell Chem. Biol.* 27 (2020) 409–419.
- [32] I. Alim, J.T. Caulfield, Y. Chen, V. Swarup, D.H. Geschwind, E. Ivanova, J. Seravalli, Y. Ai, L.H. Sansing, E.J. Ste Marie, R.J. Hondal, S. Mukherjee, J. W. Cave, B.T. Sagdullaev, S.S. Karuppagounder, R.R. Ratan, Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke, *Cell* 177 (2019) 1262–1279 e1225.
- [33] E.S. Arner, Selenoproteins—What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 1296–1303.
- [34] H.J. Reich, R.J. Hondal, Why nature chose selenium, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 821–841.
- [35] C.W. Barrett, S.P. Short, C.S. Williams, Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 607–616.
- [36] G.N. Schrauzer, Anticarcinogenic effects of selenium, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1864–1873.
- [37] R.F. Burk, K.E. Hill, Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1441–1447.
- [38] A. Nakayama, K.E. Hill, L.M. Austin, A.K. Motley, R.F. Burk, All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium, *J. Nutr.* 137 (2007) 690–693.
- [39] L. Plate, R.L. Wiseman, Regulating secretory proteostasis through the unfolded protein response: from function to therapy, *Trends Cell Biol.* 27 (2017) 722–737.
- [40] C. Hetz, K. Zhang, R.J. Kaufman, Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 421–438.
- [41] S.J. Marciniak, D. Ron, Endoplasmic reticulum stress signaling in disease, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 1133–1149.
- [42] C. Hetz, Adapting the proteostasis capacity to sustain brain healthspan, *Cell* 184 (2021) 1545–1560.
- [43] M. Wang, R.J. Kaufman, Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease, *Nature* 529 (2016) 326–335.
- [44] X. Wu, T.A. Rapoport, Mechanistic insights into ER-associated protein degradation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 53 (2018) 22–28.
- [45] A. Subramanian, A. Capalbo, N.R. Iyengar, R. Rizzo, A. di Campli, R. Di Martino, M. Lo Monte, A.R. Beccari, A. Yerudkar, C. Del Vecchio, L. Glielmo, G. Turacchio, M. Pirozzi, S.G. Kim, P. Henklein, J. Cancino, S. Parashuraman, D. Diviani, F. Fanelli, M. Sallase, A. Luini, Auto-regulation of secretory flux by sensing and responding to the folded cargo protein load in the endoplasmic reticulum, *Cell* 176 (2019) 1461–1476 e1423.
- [46] Y. Cui, S. Parashar, M. Zahoor, P.G. Needham, M. Mari, M. Zhu, S. Chen, H.C. Ho, F. Reggiori, H. Farhan, J.L. Brodsky, S. Ferro-Novick, A COPII subunit acts with an autophagy receptor to target endoplasmic reticulum for degradation, *Science* 365 (2019) 53–60.
- [47] G.V. Kryukov, V.M. Kryukov, V.N. Gladyshev, New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33898–33907.
- [48] L. Guo, W. Yang, Q. Huang, J. Qiang, J.R. Hart, W. Wang, J. Hu, J. Zhu, N. Liu, Y. Zhang, Selenocysteine-specific mass spectrometry reveals tissue-distinct selenoproteomes and candidate selenoproteins, *Cell Chem. Biol.* 25 (2018) 1380–1388 e1384.
- [49] R.F. Burk, K.E. Hill, Regulation of selenium metabolism and transport, *Annu. Rev. Nutr.* 35 (2015) 109–134.
- [50] N. Solov'yev, E. Drobyshev, B. Blume, B. Michalko, Selenium at the neural barriers: a review, *Front. Neurosci.* 15 (2021), 630016.

- [51] A.R. Sasuclark, V.S. Khadka, M.W. Pitts, Cell-type specific analysis of selenium-related genes in brain, *Antioxidants* 8 (2019).
- [52] P. Campos-Bedolla, F.R. Walter, S. Veszelka, M.A. Deli, Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system, *Arch. Med. Res.* 45 (2014) 610–638.
- [53] M. Vinceti, T. Filippini, S. Cilloni, C.M. Crespi, The epidemiology of selenium and human cancer, *Adv. Cancer Res.* 136 (2017) 1–48.
- [54] K.E. Hill, J. Zhou, W.J. McMahan, A.K. Motley, R.F. Burk, Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene, *J. Nutr.* 134 (2004) 157–161.
- [55] X. Zhang, R.P. Liu, W.H. Cheng, J.H. Zhu, Prioritized brain selenium retention and selenoprotein expression: nutritional insights into Parkinson's disease, *Mech. Ageing Dev.* 180 (2019) 89–96.
- [56] U. Schweizer, S. Bohleber, W. Zhao, N. Fradejas-Villar, The neurobiology of selenium: looking back and to the future, *Front. Neurosci.* 15 (2021), 652099.
- [57] J.P. Friedmann Angeli, D.V. Krysko, M. Conrad, Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion, *Nat. Rev. Cancer* 19 (2019) 405–414.
- [58] B.R. Stockwell, J.P. Friedmann Angeli, H. Bayir, A.I. Bush, M. Conrad, S.J. Dixon, S. Fuida, S. Gascon, S.K. Hatzios, V.E. Kagan, K. Noel, X. Jiang, A. Linkermann, M. E. Murphy, M. Overholzer, A. Oyagi, G.C. Pagnussat, J. Park, Q. Ran, C. S. Rosenfeld, K. Salnikow, D. Tang, F.M. Torti, S.V. Torti, S. Toyokuni, K. A. Woerpel, D.D. Zhang, Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease, *Cell* 171 (2017) 273–285.
- [59] E.K. Wirth, M. Conrad, J. Winterer, C. Wozny, B.A. Carlson, S. Roth, D. Schmitz, G.W. Bornkamm, V. Coppola, L. Tessarollo, L. Schomburg, J. Kohrle, D. L. Hatfield, U. Schweizer, Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration, *Faseb. J.* 24 (2010) 844–852.
- [60] M.W. Pitts, P.M. Kremer, A.C. Hashimoto, D.J. Torres, C.N. Byrns, C.S. Williams, M.K. Berry, Competition between the brain and testes under selenium-compromised conditions: insight into sex differences in selenium metabolism and risk of neurodevelopmental disease, *J. Neurosci.* 35 (2015) 15326–15338.
- [61] M.W. Pitts, A.V. Raman, A.C. Hashimoto, C. Todorovic, R.A. Nichols, M.J. Berry, Deletion of selenoprotein P results in impaired function of parvalbumin interneurons and alterations in fear learning and sensorimotor gating, *Neuroscience* 208 (2012) 58–68.
- [62] W.S. Hambright, R.S. Fonseca, L. Chen, R. Na, Q. Ran, Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration, *Redox Biol.* 12 (2017) 8–17.
- [63] A.C. Smith, A.J. Mears, R. Bunker, A. Ahmed, M. MacKenzie, J. A. Schwartzentruber, C.L. Beaulieu, E. Ferretti, F.C. Consortium, J. Majewski, D. E. Bulman, F.C. Celik, K.M. Boycott, G.E. Graham, Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia, *J. Med. Genet.* 51 (2014) 470–474.
- [64] J. Soerensen, C. Jakupoglu, H. Beck, H. Forster, J. Schmidt, W. Schmahl, U. Schweizer, M. Conrad, M. Brielmeier, The role of thioredoxin reductases in brain development, *PLoS One* 3 (2008), e1813.
- [65] Y. Horibata, O. Elpeleg, A. Eran, Y. Hirabayashi, D. Savitzki, G. Tal, H. Mandel, H. Sugimoto, EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans, *J. Lipid Res.* 59 (2018) 1015–1026.
- [66] V.N. Gladyshev, E.S. Armer, M.J. Berry, R. Brigelius-Flohe, E.A. Bruford, R. F. Burk, B.A. Carlson, S. Castellano, L. Chavatte, M. Conrad, P.R. Copeland, A. M. Diamond, D.M. Driscoll, A. Ferreira, L. Flohe, F.R. Green, R. Guigo, D. E. Handy, D.L. Hatfield, J. Heskeith, P.R. Hoffmann, A. Holmgren, R.J. Hondal, M. T. Howard, K. Huang, H.Y. Kim, I.Y. Kim, J. Kohrle, A. Krol, G.V. Kryukov, B. J. Lee, B.C. Lee, X.G. Lei, Q. Liu, A. Lescure, A.V. Lobanov, J. Loscalzo, M. Maiorino, M. Mariotti, K. Sandeep Prabhu, M.P. Rayman, S. Rozovsky, G. Salinas, E.E. Schmidt, L. Schomburg, U. Schweizer, M. Simonovic, R.A. Sunde, P.A. Tsuji, S. Tweedie, F. Ursini, P.D. Whanger, Y. Zhang, Selenoprotein gene nomenclature, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 24036–24040.
- [67] W.M. Valentine, K.E. Hill, L.M. Austin, H.L. Valentine, D. Goldowitz, R.F. Burk, Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p, *Toxicol. Pathol.* 33 (2005) 570–576.
- [68] M.T. Castex, A. Arabo, M. Benard, V. Roy, V. Le Joncour, G. Prevost, J.J. Bonnet, Y. Anouar, A. Falluel-Morel, Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 5818–5832.
- [69] L. Boukhar, A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. El Hajji, J.J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihmann, Y. Anouar, Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease, *Antioxidants Redox Signal.* 24 (2016) 557–574.
- [70] V.A. Shchedrina, Y. Zhang, V.M. Labunsky, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins, *Antioxidants Redox Signal.* 12 (2010) 839–849.
- [71] E.G. Varlamova, M.V. Goltyshev, V.I. Novoselov, E.E. Fesenko, Cloning, intracellular localization, and expression of the mammalian selenocysteine-containing protein SELENOI (SelI) in tumor cell lines, *Dokl. Biochem. Biophys.* 476 (2017) 320–322.
- [72] Z.H. Zhang, G.L. Song, Roles of selenoproteins in brain function and the potential mechanism of selenium in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.* 15 (2021), 646518.
- [73] V.M. Labunsky, M.H. Yoo, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, A thioredoxin-like selenoprotein, is involved in the unfolded protein response and differentially regulated by adaptive and acute ER stresses, *Biochemistry* 48 (2009) 8458–8465. Sep15.
- [74] K.V. Korotkov, E. Kumaraswamy, Y. Zhou, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15330–15336.
- [75] V.M. Labunsky, A.D. Ferguson, D.E. Fomenko, Y. Chelliah, D.L. Hatfield, V. N. Gladyshev, A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, *J. Biol. Chem.* 80 (2005) 37839–37845.
- [76] M.V. Kasaikina, D.E. Fomenko, V.M. Labunsky, S.A. Lachke, W. Qiu, J. A. Moncaster, J. Zhang, M.W. Wojnarowicz Jr., S.K. Natarajan, M. Malinowski, U. Schweizer, P.A. Tsuji, B.A. Carlson, R.L. Maas, M.F. Lou, L.E. Goldstein, D. L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Roles of the 15-kDa selenoprotein (Sep15) in redox homeostasis and cataract development revealed by the analysis of Sep 15 knockout mice, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33203–33212.
- [77] J. Dai, J. Zhou, H. Liu, K. Huang, Selenite and esbelen supplementation attenuates D-galactose-induced oxidative stress and increases expression of SELR and SEPI5 in rat lens, *J. Biol. Inorg. Chem.* 21 (2016) 1037–1046.
- [78] J. Tian, J. Liu, J. Li, J. Zheng, L. Chen, Y. Wang, Q. Liu, J. Ni, The interaction of selenoprotein F (SELENOF) with retinol dehydrogenase 11 (RDH11) implied a role of SELENOF in vitamin A metabolism, *Nutr. Metab.* 15 (2018) 7.
- [79] M. Maden, Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 755–765.
- [80] J. Zeng, L. Chen, Z. Wang, Q. Chen, Z. Fan, H. Jiang, Y. Wu, L. Ren, J. Chen, T. Li, W. Song, Marginal vitamin A deficiency facilitates Alzheimer's pathogenesis, *Acta Neuropathol.* 133 (2017) 967–982.
- [81] B.M. Dixon, S.H. Heath, R. Kim, J.H. Suh, T.M. Hagen, Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation, *Antioxidants Redox Signal.* 10 (2008) 963–972.
- [82] A. Delaunay-Moisan, A. Ponsoero, M.B. Toledano, Reexamining the function of glutathione in oxidative protein folding and secretion, *Antioxidants Redox Signal.* 27 (2017) 1178–1199.
- [83] G. Banhegyi, M. Csala, G. Nagy, V. Sorrentino, R. Fulceri, A. Benedetti, Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1, *Biochem. J.* 376 (2003) 807–812.
- [84] A.J. Ponsoero, A. Igbaria, M.A. Darch, S. Miled, C.E. Outten, J.R. Winther, G. Palais, B. D'Autreaux, A. Delaunay-Moisan, M.B. Toledano, Endoplasmic reticulum transport of glutathione by Sec61 is regulated by Ero1 and bip, *Mol. Cell* 67 (2017) 962–973 e965.
- [85] T.J. Tavender, N.J. Bulleid, Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced during disulphide formation, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 2672–2679.
- [86] E. Zito, E.P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T.A. Neubert, D. Ron, Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin, *Mol. Cell* 40 (2010) 787–797.
- [87] V.D. Nguyen, M.J. Saarinen, A.R. Karala, A.K. Lappi, L. Wang, I.B. Raykhel, H. I. Alanen, K.E. Salo, C.C. Wang, L.W. Ruddock, Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation, *J. Mol. Biol.* 406 (2011) 503–515.
- [88] E. Margittai, P. Low, I. Stiller, A. Greco, J.M. Garcia-Manteiga, N. Pengo, A. Benedetti, R. Sitia, G. Banhegyi, Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2) in the endoplasmic reticulum promotes in vivo disulfide bond formation, *Antioxidants Redox Signal.* 16 (2012) 1088–1099.
- [89] R.A. Sunde, Selenium regulation of selenoprotein enzyme activity and transcripts in a pilot study with Founder strains from the Collaborative Cross, *PLoS One* 13 (2018), e0191449.
- [90] Z. Touat-Hamici, Y. Legrain, A.L. Bulteau, L. Chavatte, Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 14750–14761.
- [91] D. Santesmasses, M. Mariotti, V.N. Gladyshev, Tolerance to selenoprotein loss differs between human and mouse, *Mol. Biol. Evol.* 37 (2019) 341–354.
- [92] L. Romanelli-Cedrez, I. Carrera, L. Otero, A. Miranda-Vizuet, M. Mariotti, M. J. Alkema, G. Salinas, Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*, *Free Radic. Biol. Med.* 108 (2017) 174–182.
- [93] I. Alsharif, L. Boukhar, B. Lefranc, D. Godefroy, J. Aury-Landas, J.D. Rego, J. D. Rego, F. Naudet, A. Arabo, A. Chagraoui, D. Maltete, A. Benazzou, C. Bauge, J. Leprince, A.G. Elkhalou, L.E. Eiden, Y. Anouar, Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models, *Redox Biol.* 40 (2021), 101839.
- [94] H. Pothion, C. Jehan, H. Tostivint, D. Cartier, C. Bucharles, A. Falluel-Morel, L. Boukhar, Y. Anouar, I. Lihmann, Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis, *Antioxidants Redox Signal.* 33 (2020) 1257–1275.
- [95] L. Grumolato, H. Ghzili, M. Montero-Hadjjadj, S. Gasman, J. Lesage, Y. Tanguy, L. Galas, D. Ait-Ali, J. Leprince, N.C. Guerineau, A.G. Elkhalou, A. Fournier, D. Vieau, H. Vaudry, Y. Anouar, Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion, *Faseb. J.* 22 (2008) 1756–1768.
- [96] A. Hamieh, D. Cartier, H. Abid, A. Calas, C. Burel, C. Bucharles, C. Jehan, L. Grumolato, M. Landry, P. Lerouge, Y. Anouar, I. Lihmann, Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion, *EMBO Rep.* 18 (2017) 1935–1946.
- [97] J. Liu, S. Rozovsky, Membrane-bound selenoproteins, *Antioxidants Redox Signal.* 23 (2015) 795–813.

- [98] Y. Tanguy, A. Falluel-Morel, S. Arthaud, L. Boukharz, D.L. Manecka, A. Chagraoui, G. Prevost, S. Elias, I. Dorval-Coffice, J. Lesage, D. Vieau, I. Lihmann, B. Jegou, Y. Anouar, The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes, *Endocrinology* 152 (2011) 4322–4335.
- [99] A. Dikity, S.V. Novoselov, D.E. Fomenko, A. Sengupta, B.A. Carlson, R.L. Cerny, K. Ginalski, N.V. Grishin, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family, *Biochemistry* 46 (2007) 6871–6882.
- [100] G. Prevost, A. Arabo, L. Jian, E. Quelenec, D. Cartier, S. Hassan, A. Falluel-Morel, Y. Tanguy, S. Gargani, I. Lihmann, J. Kerr-Conte, H. Lefebvre, F. Pattou, Y. Anouar, The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance, *Endocrinology* 154 (2013) 3796–3806.
- [101] D. Godefroy, L. Boukharz, B.Y. Mallouki, E. Carpentier, C. Dubessy, F. Chigr, Y. Tillet, Y. Anouar, **SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study**, *Neuroendocrinology* (2022), <https://doi.org/10.1159/000522091>.
- [102] Y. Anouar, I. Lihmann, A. Falluel-Morel, L. Boukharz, Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection, *Free Radic. Biol. Med.* 127 (2018) 145–152.
- [103] H. Abid, D. Cartier, A. Hamieh, A.M. Francois-Bellan, C. Bucharles, H. Pothion, D. L. Manecka, J. Leprince, S. Adriouch, O. Boyer, Y. Anouar, I. Lihmann, AMPK activation of PGC-1 $\alpha$ /NRF-1-dependent SELENOT gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress, *Mol. Neurobiol.* 56 (2019) 4086–4101.
- [104] R.N. Sifers, S. Brashears-Macatee, V.J. Kidd, H. Muensch, S.L. Woo, A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7330–7335.
- [105] J. Han, S.H. Back, J. Hur, Y.H. Lin, R. Gildersleeve, J. Shan, C.L. Yuan, D. Krokowski, S. Wang, M. Hatzoglou, M.S. Kilberg, M.A. Sartor, R.J. Kaufman, ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 481–490.
- [106] P. Roboti, S. High, Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 220–232.
- [107] P. Roboti, S. High, The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 3474–3484.
- [108] S. Shirmal, N.A. Cherepanova, R. Gilmore, Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum, *Semin. Cell Dev. Biol.* 41 (2015) 71–78.
- [109] G. Zundorf, G. Reiser, Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection, *Antioxidants Redox Signal.* 14 (2011) 1275–1288.
- [110] C. Lu, F. Qiu, H. Zhou, Y. Peng, W. Hao, J. Xu, J. Yuan, S. Wang, B. Qiang, C. Xu, X. Peng, Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5189–5197.
- [111] A. Roseler, J.H. Prieto, R. Iozzi, B. Hecker, R.H. Schirmer, S. Kulzer, J. Przyborski, S. Rahlf, K. Becker, Insight into the selenoproteome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Antioxidants Redox Signal.* 17 (2012) 534–543.
- [112] J.H. Lee, K.J. Park, J.K. Jang, Y.H. Jeon, K.Y. Ko, J.H. Kwon, S.R. Lee, I.Y. Kim, Selenoprotein S-dependent selenoprotein K binding to p97(VCP) protein is essential for endoplasmic reticulum-associated degradation, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 29941–29952.
- [113] J. Liu, Z. Zhang, S. Rozovsky, Selenoprotein K form an intermolecular diselenide bond with unusually high redox potential, *FEBS Lett.* 588 (2014) 3311–3321.
- [114] V.A. Shchedrina, R.A. Everley, Y. Zhang, S.P. Gygi, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 42937–42948.
- [115] G.J. Fredericks, F.W. Hoffmann, A.H. Rose, H.J. Osterheld, F.M. Hess, F. Mercier, P.R. Hoffmann, Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 16478–16483.
- [116] S.Z. Jia, X.W. Xu, Z.H. Zhang, C. Chen, Y.B. Chen, S.L. Huang, Q. Liu, P. R. Hoffmann, G.L. Song, Selenoprotein K deficiency-induced apoptosis: a role for calpain and the ERS pathway, *Redox Biol.* 47 (2021), 102154.
- [117] Z.H. Zhang, C. Chen, S.Z. Jia, X.C. Cao, M. Liu, J. Tian, P.R. Hoffmann, H.X. Xu, J. Z. Ni, G.L. Song, Selenum Restores Synaptic Deficits by Modulating NMDA Receptors and Selenoprotein K in an Alzheimer's Disease Model, *Antioxid. Redox Signal.* (2020).
- [118] X.L. Meng, C.L. Chen, Y.Y. Liu, S.J. Su, J.M. Gou, F.N. Huan, D. Wang, H.S. Liu, S. B. Ben, J. Lu, Selenoprotein SELENOK enhances the migration and phagocytosis of microglial cells by increasing the cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level resulted from the up-regulation of IP3R, *Neuroscience* 406 (2019) 38–49.
- [119] K. Walder, L. Kantham, J.S. McMillan, J. Trevasaki, L. Kerr, A. De Silva, T. Sunderland, N. Godde, Y. Gao, N. Bishara, K. Windmill, J. Tenne-Brown, G. Augert, P.Z. Zimmet, G.R. Collier, Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes* 51 (2002) 1859–1866.
- [120] G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov, O. Zelhtab, R. Guigo, V.N. Gladyshev, Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300 (2003) 1439–1443.
- [121] Y. Ye, Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, T.A. Rapoport, A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol, *Nature* 429 (2004) 841–847.
- [122] C. Stäpf, E. Cartwright, M. Bycroft, K. Hofmann, A. Buchberger, The general definition of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM) delineates a new family of p97 cofactors, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38670–38678.
- [123] L.C. Christensen, N.W. Jensen, A. Vala, J. Kamaraukaitė, L. Johansson, J. R. Winther, K. Hofmann, K. Teilum, L. Ellgaard, The human selenoprotein VCP-interacting membrane protein (VIMP) is non-globular and harbors a reductase function in an intrinsically disordered region, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26388–26399.
- [124] J. Liu, F. Li, S. Rozovsky, The intrinsically disordered membrane protein selenoprotein S is a reductase in vitro, *Biochemistry* 52 (2013) 3051–3061.
- [125] E.M. Cockman, V. Narayan, B. Willard, S.P. Shetty, P.R. Copeland, D.M. Driscoll, Identification of the selenoprotein S positive UGA recoding (SPUR) element and its position-dependent activity, *RNA Biol.* 16 (2019) 1682–1696.
- [126] A.B. Addinsall, S.D. Martin, F. Collier, X.A. Conlan, V.C. Foletta, N. Stupka, Differential regulation of cellular stress responses by the endoplasmic reticulum-resident Selenoprotein S (Sepl1) in proliferating myoblasts versus myotubes, *Phys. Rep.* 6 (2018), e13926.
- [127] B. Speckmann, K. Gerloff, L. Simms, I. Oancea, W. Shi, M.A. McGuckin, G. Radford-Smith, K.K. Khanna, Selenoprotein S is a marker but not a regulator of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 67 (2014) 265–277.
- [128] J.L. Du, C.K. Sun, B. Lu, L.L. Men, J.J. Yao, L.J. An, G.R. Song, Association of Sels mRNA expression in omental adipose tissue with HOMA-IR and serum amyloid A in patients with type 2 diabetes mellitus, *Chin. Med. J.* 121 (2008) 1165–1168.
- [129] N. Fradejas, C. Serrano-Perez Mdel, P. Tranque, S. Calvo, Selenoprotein S expression in reactive astrocytes following brain injury, *Glia* 59 (2011) 959–972.
- [130] C.Y. Kim, K.H. Kim, Dexamethasone-induced selenoprotein S degradation is required for adipogenesis, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2069–2082.
- [131] K.H. Kim, Y. Gao, K. Walder, G.R. Collier, J. Skeeton, A.H. Kissebah, SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 127–132.
- [132] Y. Gao, H.C. Feng, K. Walder, K. Bolton, T. Sunderland, N. Bishara, M. Quick, L. Kantham, G.R. Collier, Regulation of the selenoprotein Sels by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - Sels is a novel glucose-regulated protein, *FEBS Lett.* 563 (2004) 185–190.
- [133] A.A. Turanov, V.A. Shchedrina, R.A. Everley, A.V. Lobanov, S.H. Yim, S. M. Marino, S.P. Gygi, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoprotein S is involved in maintenance and transport of multiprotein complexes, *Biochem. J.* 462 (2014) 555–565.
- [134] C. Noda, H. Kimura, K. Arasaki, M. Matsuhashita, A. Yamamoto, Y. Wakana, H. Inoue, M. Tagaya, Valosin-containing protein-interacting membrane protein (VIMP) links the endoplasmic reticulum with microtubules in concert with cytoskeleton-linking membrane protein (CLIMP)-63, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24304–24313.
- [135] M. Gharipour, M. Behmanesh, M. Salehi, G. Vaseghi, P. Nezafati, M. Dianatkah, E. Khosravi, M. Hosseini, M. Sadeghi, Association of selenoprotein S expression and its variants with metabolic syndrome in subjects with cardiovascular disease, *Arch. Med. Res.* 51 (2020) 535–541.
- [136] S.S. Yu, L.L. Men, J.L. Wu, L.W. Huang, Q. Xing, J.J. Yao, Y.B. Wang, G.R. Song, H.S. Guo, G.H. Sun, Y.H. Zhang, H. Li, J.L. Du, The source of circulating selenoprotein S and its association with type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis: a preliminary study, *Cardiovasc. Diabetol.* 15 (2016) 70.
- [137] J. Zeng, S. Du, J. Zhou, K. Huang, Role of Sels in lipopolysaccharide-induced inflammatory response in hepatoma HepG2 cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 478 (2008) 1–6.
- [138] H.K. Karlsson, H. Tsuchida, S. Lake, H.A. Koistinen, A. Krook, Relationship between serum amyloid A level and Tanis/Sels mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue from healthy and type 2 diabetic subjects, *Diabetes* 53 (2004) 1424–1428.
- [139] J. Liu, H. Tang, L. Niu, Y. Xu, Upregulation of Tanis mRNA expression in the liver is associated with insulin resistance in rats, *Tohoku J. Exp. Med.* 219 (2009) 307–310.
- [140] C.R. Wright, G.L. Allsopp, A.B. Addinsall, N.L. McRae, S. Andrikopoulos, N. Stupka, A reduction in selenoprotein S amplifies the inflammatory profile of fast-twitch skeletal muscle in the mdx dystrophic mouse, *Mediat. Inflamm.* (2017), 7043429, 2017.
- [141] J.E. Curran, J.B. Jowett, K.S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D.M. Abel Azim, G. Cai, M.C. Mahaney, A.G. Comuzie, T.D. Dyer, K.R. Walder, P. Zimmet, J.W. MacCluer, G.R. Collier, A.H. Kissebah, J. Blangero, Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response, *Nat. Genet.* 37 (2005) 1234–1241.
- [142] R.H. Rueli, D.J. Torres, A.S. Dewing, A.C. Kiyohara, S.M. Barayuga, M. T. Bellinger, J.H. Uyebara-Lock, L.R. White, P.I. Moreira, M.J. Berry, G. Perry, F. P. Bellinger, Selenoprotein S reduces endoplasmic reticulum stress-induced phosphorylation of tau: potential role in selenate mitigation of tau pathology, *J. Alzheimers Dis.* 55 (2017) 749–762.
- [143] J. van Erpel, Y.D. Ke, X. Liu, F. Delerue, J.J. Kril, J. Gotz, L.M. Ittner, Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 13888–13893.
- [144] N.M. Corcoran, D. Martin, B. Hutter-Paier, M. Windisch, T. Nguyen, L. Nheu, L. E. Sundstrom, A.J. Costello, C.M. Hovens, Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model, *J. Clin. Neurosci.* 17 (2010) 1025–1033.

- [145] E.E. Congdon, E.M. Sigurdsson, Tau-targeting therapies for Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurol.* 14 (2018) 399–415.
- [146] J.K. Jang, K.J. Park, J.H. Lee, K.Y. Ko, S. Kang, I.Y. Kim, Selenoprotein S is required for clearance of C99 through endoplasmic reticulum-associated degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486 (2017) 444–450.
- [147] J.L. Martin, Thioredoxin—a fold for all reasons, *Structure* 3 (1995) 245–250.
- [148] A.D. Ferguson, V.M. Labunskyy, D.E. Fomenko, D. Arac, Y. Chelliah, C. A. Amezcua, J. Rizo, V.N. Gladyshev, J. Deisenhofer, NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3536–3543.
- [149] T. Gong, A.C. Hashimoto, A.R. Sasuclark, V.S. Khadka, A. Gurary, M.W. Pitts, Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant activity, *Antioxidants Redox Signal.* 35 (2019) 775–787.
- [150] M.W. Pitts, M.A. Reeves, A.C. Hashimoto, A. Ogawa, P. Kremer, L.A. Seale, M. J. Berry, Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 26121–26134.
- [151] M.A. Reeves, F.P. Bellinger, M.J. Berry, The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation, *Antioxidants Redox Signal.* 12 (2010) 809–818.
- [152] D.Y. Hwang, J.S. Cho, J.H. Oh, S.B. Shim, S.W. Jee, S.H. Lee, S.J. Seo, S.K. Lee, S. H. Lee, Y.K. Kim, Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2 (N141): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.* 30 (2005) 1009–1019.
- [153] S.Y. Yim, K.R. Chae, S.B. Shim, J.T. Hong, J.Y. Park, C.Y. Lee, H.J. Son, Y. Y. Sheen, D.Y. Hwang, ERK activation induced by selenium treatment significantly downregulates beta/gamma-secretase activity and Tau phosphorylation in the transgenic rat overexpressing human selenoprotein M, *Int. J. Mol. Med.* 24 (2009) 91–96.
- [154] P. Chen, R.R. Wang, X.J. Ma, Q. Liu, J.Z. Ni, Different forms of selenoprotein M differentially affect Aβ aggregation and ROS generation, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 4385–4399.
- [155] X. Du, H. Li, Z. Wang, S. Qiu, Q. Liu, J. Ni, Selenoprotein P and selenoprotein M block Zn<sup>2+</sup>-mediated Aβ2 aggregation and toxicity, *Metalloomics* 5 (2013) 861–870.
- [156] X. Qiao, J. Tian, P. Chen, C. Wang, J. Ni, Q. Liu, Galectin-1 is an interactive protein of selenoprotein M in the brain, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 2233–2245.
- [157] C. Appenzeller-Herzog, T. Simmen, ER-luminal thiol/selenol-mediated regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 452–459.
- [158] A. Hernandez, M.E. Martinez, L. Ng, D. Forrest, Thyroid hormone deiodinases: dynamic switches in developmental transitions, *Endocrinology* 162 (2021).
- [159] A. Guadano-Ferraz, M.J. Obregon, D.L. St Germain, J. Bernal, The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 10391–10396.
- [160] A. Coppola, Z.W. Liu, Z.B. Andrews, E. Paradis, M.C. Roy, J.M. Friedman, D. Ricquier, D. Richard, T.L. Horvath, X.B. Gao, S. Diano, A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2, *Cell Metabol.* 5 (2007) 21–33.
- [161] V.A. Galton, E.T. Wood, E.A. St Germain, C.A. Withrow, G. Aldrich, G.M. St Germain, A.S. Clark, D.L. St Germain, Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development, *Endocrinology* 148 (2007) 3080–3088.
- [162] C.M. Dayan, V. Panicker, Hypothyroidism and depression, *Eur. Thyroid J.* 2 (2013) 168–179.
- [163] A. Costache, A.L. Riza, M. Popescu, M.E. Dinca, D.G. Glavan, I.M. Vladu, M. Ioana, I. Udristoiu, TSH and T4 levels in a cohort of depressive patients, *Curr. Health Sci. J.* 46 (2020) 117–122.
- [164] B. He, J. Li, G. Wang, W. Ju, Y. Lu, Y. Shi, L. He, N. Zhong, Association of genetic polymorphisms in the type II deiodinase gene with bipolar disorder in a subset of Chinese population, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33 (2009) 986–990.
- [165] V. Panicker, P. Saravanan, B. Vaidya, J. Evans, A.T. Hattersley, T.M. Frayling, C. M. Dayan, Common variation in the DIO2 gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 1623–1629.
- [166] S. Jo, T.L. Fonseca, B. Bocco, G.W. Fernandes, E.A. McAninch, A.P. Bolin, R.R. Da Conceicao, J.P. Werneck-de-Castro, D.L. Ignacio, P. Egri, D. Nemeth, C. Fekete, M. M. Bernardi, V.D. Leitch, N.S. Mannan, K.F. Curry, N.C. Butterfield, J.H. D. Bassett, G.R. Williams, B. Gereben, M.O. Ribeiro, A.C. Bianco, Type 2 deiodinase polymorphism causes ER stress and hypothyroidism in the brain, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) 230–245.
- [167] E. Galecka, M. Talarowska, A. Orzechowska, P. Gorski, M. Bienkiewicz, J. Szmajna, Association of the DIO2 gene single nucleotide polymorphisms with recurrent depressive disorder, *Acta Biochim. Pol.* 62 (2015) 297–302.
- [168] E.A. McAninch, S. Jo, N.Z. Preate, E. Farkas, P. Mohacsik, C. Fekete, P. Egri, B. Gereben, Y. Li, Y. Deng, M.E. Patti, C. Zevenbergen, R.P. Peeters, D.C. Mash, A. C. Bianco, Prevalent polymorphism in thyroid hormone-activating enzyme leaves a genetic fingerprint that underlies associated clinical syndromes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 920–933.
- [169] G. Joshi, Y. Wang, Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease, *Bioessays* 37 (2015) 240–247.
- [170] E.A. McAninch, K.B. Rajan, D.A. Evans, S. Jo, L. Chaker, R.P. Peeters, D. A. Bennett, D.C. Mash, A.C. Bianco, A common DIO2 polymorphism and alzheimer disease dementia in african and European Americans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103 (2018) 1818–1826.
- [171] M. Marino, T. Stoilova, C. Giorgi, A. Bachi, A. Cattaneo, A. Auricchio, P. Pinton, E. Zito, SEPN1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 1843–1855.
- [172] A. Chernorudskiy, E. Varone, S.F. Colombo, S. Fumagalli, A. Cagnotto, A. Cattaneo, M. Briens, M. Baltzinger, L. Kuhn, A. Bachi, A. Berardi, M. Salmona, G. Musco, N. Borgese, A. Lescure, E. Zito, 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 (2020) 21288–21298.
- [173] R.N. Villar-Quiles, M. von der Hagen, C. Metny, V. Gonzalez, S. Donkervoort, E. Bertini, C. Castiglioni, D. Chaigne, J. Colomer, M.L. Cuadrado, M. de Visser, I. Desguerre, B. Eymard, N. Goemans, A. Kaindl, E. Lagrue, J. Lutschg, E. Malfatti, M. Mayer, L. Merlini, D. Orlikowski, U. Reuner, M.A. Salih, B. Schlotter-Weigel, M. Stoetter, V. Straub, H. Topaloglu, J.A. Urtizberea, A. van der Kooij, E. Wilchowski, N.B. Romero, M. Fardeau, C.G. Bonnemant, B. Estournet, P. Richard, S. Quijano-Roy, U. Schara, A. Ferreira, The clinical, histologic, and genotypic spectrum of SEPN1-related myopathy: a case series, *Neurology* 95 (2020) e1512–e1527.
- [174] C. Bachmann, F. Noreen, N.C. Voermans, P.L. Schar, J. Vissing, J.M. Fock, S. Bulik, B. Kusters, S.A. Moore, A.H. Beggs, K.D. Mathews, M. Meyer, C.A. Genetti, G. Meola, R. Cardani, E. Mathews, H. Jungbluth, F. Muntioni, F. Zorzato, S. Treves, Aberrant regulation of epigenetic modifiers contributes to the pathogenesis in patients with selenoprotein N-related myopathies, *Hum. Mutat.* 40 (2019) 962–974.
- [175] S. Arbogast, M. Beuvin, B. Fraysse, H. Zhou, F. Muntioni, A. Ferreira, Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment, *Ann. Neurol.* 65 (2009) 677–686.
- [176] D. Pozzer, E. Varone, A. Chernorudskiy, S. Schiarea, S. Missirolti, C. Giorgi, P. Pinton, M. Canato, E. Germinario, L. Nogara, B. Blaauw, E. Zito, A maladaptive ER stress response triggers dysfunction in highly active muscles of mice with SELENON loss, *Redox Biol.* 20 (2019) 354–366.
- [177] E. Varone, D. Pozzer, S. Di Modica, A. Chernorudskiy, L. Nogara, M. Baraldo, M. Cinquanta, S. Fumagalli, R.N. Villar-Quiles, M.G. De Simoni, B. Blaauw, A. Ferreira, E. Zito, SELENON (SEPN1) protects skeletal muscle from saturated fatty acid-induced ER stress and insulin resistance, *Redox Biol.* 24 (2019), 101176.
- [178] C. Rocca, L. Boukhzar, M.C. Granieri, I. Alsharif, R. Mazza, B. Lefranc, B. Tota, J. Leprince, M.C. Cerra, Y. Anouar, T. Angelone, A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress, *Acta Physiol.* 223 (2018), e13067.
- [179] H. Pothion, I. Lihmann, C. Duclos, G. Riou, D. Cartier, L. Boukhzar, B. Lefranc, J. Leprince, N. Guerout, J.P. Marie, Y. Anouar, The SELENOT mimetic PSELT promotes nerve regeneration by increasing axonal myelination in a facial nerve injury model in female rats, *J. Neurosci. Res.* 100 (2022) 1721–1731.
- [180] C. Rocca, A. De Bartolo, M.C. Granieri, V. Rago, D. Amelio, F. Falbo, R. Malivindi, R. Mazza, M.C. Cerra, L. Boukhzar, B. Lefranc, J. Leprince, Y. Anouar, T. Angelone, The antioxidant selenoprotein T mimetic, PSELT, induces preconditioning-like myocardial protection by relieving endoplasmic-reticulum stress, *Antioxidants* 11 (2022).
- [181] Y. Wang, L. Jiang, Y. Li, X. Luo, J. He, Excessive selenium supplementation induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in chicken spleen, *Biol. Trace Elem. Res.* 172 (2016) 481–487.
- [182] K. Samra, M. Kuganesan, W. Smith, A. Kleyman, R. Tidswell, N. Arulkumar, M. Singer, A. Dyson, The pharmacology and therapeutic utility of sodium hydroselenide, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021).
- [183] Y. Suzuki, Emerging novel concept of chaperone therapies for protein misfolding diseases, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 90 (2014) 145–162.
- [184] R.F. Burk, K.E. Hill, A.K. Motley, L.M. Austin, B.K. Norsworthy, Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1789–1793.
- [185] K. Buday, M. Conrad, Emerging roles for non-selenium containing ER-resident glutathione peroxidases in cell signaling and disease, *Biol. Chem.* 402 (2021) 271–287.
- [186] K. Lingappan, NF-kappaB in oxidative stress, *Curr. Opin. Toxicol.* 7 (2018) 81–86.
- [187] I. Palazzo, L.J. Todd, T.V. Hoang, T.A. Reh, S. Blackshaw, A.J. Fischer, NFkB-signaling promotes glial reactivity and suppresses Muller glia-mediated neuron regeneration in the mammalian retina, *Glia* 70 (2022) 1380–1401.
- [188] W.M. Valentine, T.W. Abel, K.E. Hill, L.M. Austin, R.F. Burk, Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 68–77.

# Annexe III

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING  
Volume 33, Number 17, 2020  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/ars.2019.7931



FORUM REVIEW ARTICLE

## Selenoprotein T: An Essential Oxidoreductase Serving as a Guardian of Endoplasmic Reticulum Homeostasis

Hugo Pothion,<sup>1,2</sup> Cédric Jehan,<sup>1,2</sup> Hervé Tostivint,<sup>3</sup> Dorthe Cartier,<sup>1,2</sup> Christine Bucharles,<sup>1,2</sup> Anthony Falluel-Morel,<sup>1,2</sup> Loubna Boukhzar,<sup>1,2</sup> Youssef Anouar,<sup>1,2,\*</sup> and Isabelle Lihmann<sup>1,2,\*</sup>

### Abstract

**Significance:** Selenoproteins incorporate the essential nutrient selenium into their polypeptide chain. Seven members of this family reside in the endoplasmic reticulum (ER), the exact function of most of which is poorly understood. Especially, how ER-resident selenoproteins control the ER redox and ionic environment is largely unknown. Since alteration of ER function is observed in many diseases, the elucidation of the role of selenoproteins could enhance our understanding of the mechanisms involved in ER homeostasis.

**Recent Advances:** Among selenoproteins, selenoprotein T (SELENOT) is remarkable as the most evolutionarily conserved and the only ER-resident selenoprotein whose gene knockout in mouse is lethal. Recent data indicate that SELENOT contributes to ER homeostasis: reduced expression of SELENOT in transgenic cell and animal models promotes accumulation of reactive oxygen and nitrogen species, depletion of calcium stores, activation of the unfolded protein response and impaired hormone secretion.

**Critical Issues:** SELENOT is anchored to the ER membrane and associated with the oligosaccharyltransferase complex, suggesting that it regulates the early steps of *N*-glycosylation. Furthermore, it exerts a selenosulfide oxidoreductase activity carried by its thioredoxin-like domain. However, the physiological role of the redox activity of SELENOT is not fully understood. Likewise, the nature of its redox partners needs to be further characterized.

**Future Directions:** Given the impact of ER stress in pathologies such as neurodegenerative, cardiovascular, metabolic and immune diseases, understanding the role of SELENOT and developing derived therapeutic tools such as selenopeptides to improve ER proteostasis and prevent ER stress could contribute to a better management of these diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 33, 1257–1275.

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

### Introduction and Scope

**R**EACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) are radical or molecular species derived from molecular oxygen. Under physiological conditions, ROS are generated during aerobic respiration as a by-product of the mitochondrial electron transport chain. The incomplete reduction of oxygen to superoxide anions ( $O_2^-$ ) is the first step of ROS formation (106, 135). The forms of ROS that are relevant in the biological systems comprise free radicals such as  $O_2^-$  and hydroxyl

radical ( $OH^\bullet$ ), and also nonradical forms able to generate free radicals such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

Although mitochondria are the main site of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  production, the endoplasmic reticulum (ER) may be the most significant ROS producer in some cell types, in addition to peroxisomes. Importantly, the ER forms membrane contact sites with mitochondria (mitochondria-associated membrane [MAM]) where redox-sensitive proteins are enriched. The latter include redox-sensitive calcium ( $Ca^{2+}$ )-handling proteins regulating ER–mitochondria  $Ca^{2+}$  flux and, consequently,

<sup>1</sup>Rouen-Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

<sup>2</sup>Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France.

<sup>3</sup>Physiologie moléculaire et Adaptation, UMR 7221 CNRS and Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

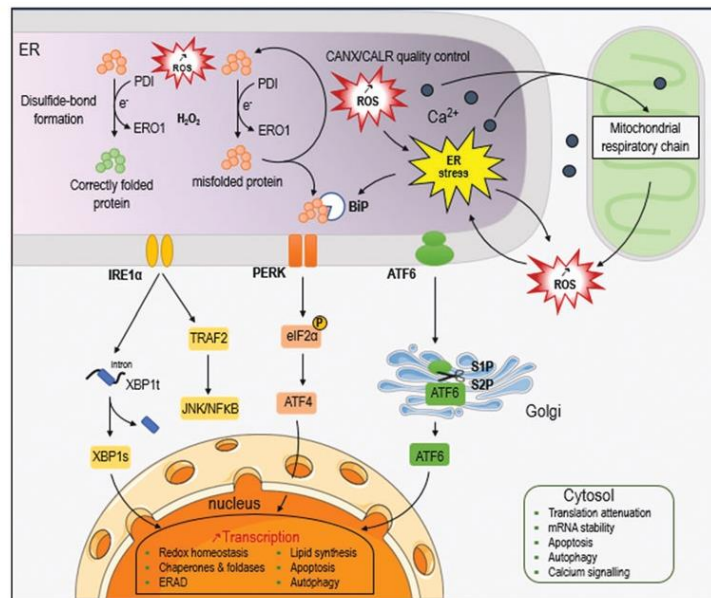
\*These authors contributed equally to this article.

redox-dependent mitochondrial metabolism. ROS rapidly diffuse across membranes through aquaporins and specific channels, and the ER has emerged as the most important contributor (60%) to cytosolic ROS in certain conditions (133).

The ER is involved in the synthesis of lipids, membrane proteins, and proteins destined for secretion, which represent up to one-third of total cellular proteins. It is also the main organelle participating in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. In the ER, disulfide bonds formation is catalyzed by protein disulfide isomerases (PDIs), which act to stabilize the tertiary and quaternary structures of proteins. Two electrons are exchanged between a cysteine (Cys) residue of a substrate and PDI. Then, to restore PDI and start another cycle, two electrons are transferred from PDI to ER oxidoreductin 1 (ERO1), resulting in  $\text{H}_2\text{O}_2$  production (Fig. 1) (103, 122). One PDI, designated ERp57, mediates protein folding by promoting the formation of disulfide bonds in its newly synthesized glycoprotein substrates thanks to its interaction with the ER lectins calnexin (CANX) and calreticulin (CALR).

The CANX/CALR cycle ensures the folding and the quality control sorting of folded glycoproteins from terminally misfolded glycoproteins destined to degradation (22, 62). When the ER protein-folding capacity is overwhelmed, cells have to minimize the effects of oxidative damage resulting from ERO1 activity. To restore ER homeostasis, cells activate an evolutionarily conserved signal transduction pathway called UPR (unfolded protein response), consisting in three mechanistically distinct branches, namely serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$  (IRE1), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6), whose main purpose is to repress protein translation, to increase protein folding, and to enhance misfolded protein degradation *via* the ER-associated protein degradation (ERAD) pathway (Fig. 1) (45, 46, 127).

In conditions that alter ER functions, principally overwhelmed protein-folding capacity and oxidative stress, *N*-glycan synthesis inhibition (23), and  $\text{Ca}^{2+}$  depletion, cells undergo a condition termed ER stress. If ER stress is not resolved, accumulation of unfolded proteins and increased



**FIG. 1. Redox signaling and UPR.** Protein folding requires disulfide-bond formation, which involves PDI enzyme and leads to its reduction. PDI activity restoration by ERO1 generates ROS through  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation. If a protein is properly folded, it is secreted to its final destination. Otherwise, the quality control system mediated by the lectins CANX and CALR affects the misfolded protein to a new folding/isomerization cycle, increasing the  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels or it is retrotranslocated into the cytosol where it will be degraded. Elevation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and ROS induces the exit of  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER cisternae to the cytosol.  $\text{Ca}^{2+}$  penetrates into mitochondria where it stimulates the respiratory chain and generates ROS. Reciprocally, mitochondrial ROS could increase ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the ER, promoting protein misfolding and ER stress. To alleviate improperly folded protein load, cell activates several signaling pathways collectively described as UPR. The UPR modifies the gene expression of chaperones to promote protein folding and lipid synthesis, and upregulates ERAD genes to eliminate misfolded proteins or genes involved in redox homeostasis.  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium; CALR, calreticulin; CANX, calnexin; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated protein degradation; ERO1, ER oxidoreductin 1;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydrogen peroxide; PDI, protein disulfide isomerase; ROS, reactive oxygen species; UPR, unfolded protein response. Color images are available online.

oxidative folding further enhance the production of ROS first in the ER, and then in the whole cell, thus irreversibly damaging biomolecules (25, 51, 103) and ultimately leading to ER stress-mediated apoptotic cell death.

Although low ROS production is essential to maintain physiological functions (proliferation, signal transduction, host defense, gene expression), high levels of ROS are toxic for the cell (20, 41, 44, 51, 91, 93). Consequently, ROS production, diffusion, and transorganellar transport are highly regulated. Most organelles are equipped with their own defense system. Among the most important are catalase and Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, SOD1) in peroxisomes, manganese superoxide dismutase (Mn-SOD, SOD2), and glutathione peroxidases (GPx)1 and GPx4 in the mitochondria, and peroxiredoxin 4 (PRX4), GPx7 and GPx8 in the ER (133). Both PRXs and GPxs protect the organism from oxidative damage through the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O.

It is worth noting that certain GPx (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, and GPx6) contain the essential nutrient selenium (Se) and belong to the selenoprotein family. Cytosolic GPx1 was the first identified selenoprotein. Other important members of this family include TrxR1 and TrxR2, which constitute with NADPH and thioredoxin a major disulfide reductase system that controls cellular redox status (57, 60). Selenoproteins incorporate Se in the form of one or more selenocysteine (Sec, the 21st amino acid) which, compared with Cys, has a slightly higher nucleophilicity, making it very efficiently targeted by electrophiles, and providing a higher resistance to irreversible inactivation by overoxidation (10, 50, 99).

During atypical selenoprotein synthesis, the Sec residue is synthesized on its own tRNA, the tRNA[Ser]Sec encoded by the *Trsp* gene, and incorporated in an unconventional manner during translation. Selenoprotein transcripts harbor in their 3'-untranslated region a SECIS (selenocysteine insertion sequence) element, which is a 60-nucleotide-length RNA sequence that adopts a stem-loop structure. The SECIS element recruits a protein complex composed of SBP2 (SECIS binding protein 2), eEFSec (eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific), and other factors with the purpose to site specifically deliver the Sec-tRNA<sub>Sec</sub> at defined stop UGA codons in selenoprotein mRNA, thus incorporating Sec into the protein elongating chain (Fig. 2) (113).

The number of genes coding for selenoproteins in eukaryotes is highly variable: 2 in worms, 3 in fruit flies, 24 in rodents, 25 in humans, and >30 in fish (17, 57, 70, 74). Nevertheless, selenoproteins are not present in all forms of life (10). This is the case in higher plants, some fungal species, certain insects and yeast. In these organisms, Cys variants of some selenoproteins are found (70, 73). There is a possibility that these organisms never made selenoproteins, or alternatively that they have lost the Sec insertion machinery during evolution. Less costly energetically, Cys-containing protein orthologs would thus be maintained in certain genomes (in *Drosophila* for instance) in place of the Sec-containing forms.

Inasmuch as Se is essential for life, the significance of selenoproteins for human health is increasingly recognized through the identification of patients with mutations in genes involved in the selenoprotein biosynthetic pathway (111). Mutations in selenocysteinyl-tRNA(Sec) synthase (SEP-SECS) lead to neurodevelopmental disorders, and diseases associated with SBP2 alteration are characterized by impaired metabolism and action of thyroid hormones, bone

growth and maturation deficits, azoospermia and other defects related to nervous system development or muscle, inner ear, skin and immune system function.

Mutations in individual selenoproteins are also associated with diseases, including selenoprotein N (SEPN1, SELN, SELENON)-related myopathy, GPx4-related Sedagathian-type spondylometaphyseal chondrodysplasia characterized by respiratory failure and bone defects, TrxR2-related dilated cardiomyopathy, and familial glucocorticoid deficiency (60, 107, 108, 116, 134). Se deficiency or excess is also associated with health risk in humans (94), although long-term Se deficiency could be viewed as a mimic of calorie restriction, a condition known to increase life span (131).

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

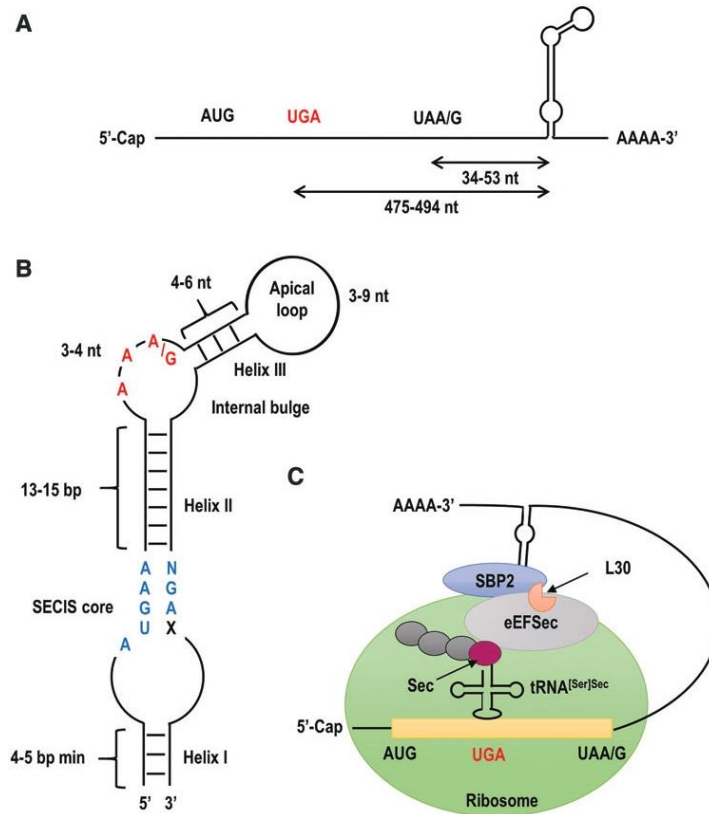
### ER-Resident Selenoproteins

Seven selenoproteins have been shown to reside in the ER. The luminal ones include selenoprotein F (SEP15, SELENOF) and selenoprotein M (SEPM, SELM, SELENOM). Others are associated with the membrane. The best characterized of them is type 2 iodothyronine deiodinase (DIO2), which catalyzes the conversion of prohormone thyroxine (3,5,3',5'-tetraiodothyronine, T4) to the bioactive thyroid hormone (3,5,3'-triiodothyronine, T3). The others are selenoprotein K (SELK, SELENOK), SELENON, selenoprotein S (SELS, VIMP, SEPS, SELENOS), and SELENOT.

All of them are indisputably important to maintain ER homeostasis (67, 88, 99), and their function is just beginning to be understood. Several of them have a role in the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. For instance, SELENOK is associated through Src-homology 3 (SH3)/SH3 interactions with DHHC6 (single letter symbols representing Asp-His-His-Cys amino acid sequence), which is an ER membrane enzyme catalyzing protein palmitoylation. SELENOK possibly serves as a cofactor, stabilizing the acyl-DHHC6 intermediate and reducing hydrolyzation of the thioester bond until transfer of the palmitoyl group on the target protein can occur (29). It has been shown that the DHHC6/SELENOK complex is required for the palmitoylation of certain proteins such as the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R), an essential step for the activation of this Ca<sup>2+</sup> channel (30, 126).

The ryanodine receptor (RyR), another Ca<sup>2+</sup> channel present in the sarcoplasmic reticulum, is a "redox sensor" regulated by a number of associated proteins, including SELENON, with which it is physically associated, at least in zebrafish (54). SELENON is also associated with the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) pump, reducing its luminal Cys that are hyperoxidized by ERO1-generated peroxides (71). This oxidoreductase is considered as a prominent MAM-localized regulator of ER-mitochondria crosstalk, limiting Ca<sup>2+</sup> efflux from the ER to mitochondria through the activation of SERCA by a reduction of its oxidation state (65, 71, 133). Mutations in SELENON gene lead to myopathies (18, 54, 87),





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

although its precise contribution to muscle development is not yet understood.

SELENOM also influences  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, but in contrast to SELENON and SELENOK the underlying molecular mechanism is totally unknown. It has probably a major role in energy metabolism since its gene knockout (KO) in mouse leads to an obese phenotype (89, 95).

Other ER selenoproteins, such as SELENOF, SELENOK, and SELENOS, are involved in the folding and quality control of glycoproteins. SELENOF, which is ancestrally linked to SELENOM, directly participates in protein quality control through its binding to UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), an enzyme that specifically

reglycosylates unfolded proteins to be recognized by CALR for recycling to the ER (132). SELENOS, in association with SELENOK, participates in the protein quality control process *via* its interaction with valosin-containing protein, an ATPase present at the ER membrane, which is associated with the ERAD complex (64).

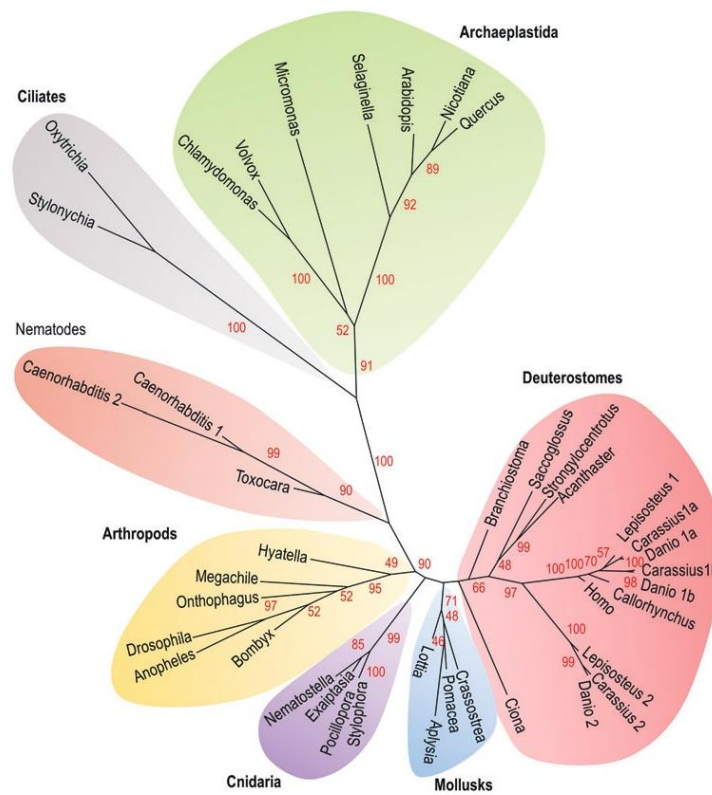
Finally, compelling data on SELENOT, that is, sequence data, genetic information, in particular phenotypes of KO animals, subcellular location, and functional studies, also indicate a vital function in relation with its presence in the ER. The rest of this review will be focused on SELENOT for which major breakthroughs have been recently achieved.

### SELENOT, an Essential Gene Conserved Across Organisms

SELENOT was initially identified *in silico* using the computer program SECISearch, based on the recognition of the SECIS element and thermodynamic characteristics (59). Different Sec- and Cys-containing SELENOT orthologs have now been identified in numerous eukaryotes, including plantae, metazoans, and some protists such as ciliates (Fig. 3 and Supplementary Data) (72), but not in yeast and bacteria where apparently no homolog exists. The Cys substitution is present in the two *Caenorhabditis elegans* SELENOT isoforms (SelT1.1 and SelT1.2), in several insects (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila willistoni*, and *Culex quinquefasciatus*), land plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa japonica*, and *Zea mays*), and in Kinetoplastida (*Trypanosoma* and *Leishmania*) (69, 79).

Based on our phylogenetical analysis, it is noteworthy that in certain groups such as arthropods and archaeplastida, the most basal species (e.g., *Hyatella* and *Chlamydomonas*, respectively) have a SELENOT-like isoform with a Sec in the redox center, while in the others (e.g., *Arabidopsis* and *Drosophila*, respectively), the Sec residue has been substituted by a Cys residue. These data strongly suggest that Sec to Cys substitution would be a recent acquisition, in these groups at least. They also show that SELENOT exists in the form of Sec or Cys variants, and that the Cys isoforms appear as closely evolutionary related to Sec-containing SELENOT.

The SELENOT gene family has been strongly shaped during evolution. In humans, the gene is localized on chromosome 3 at position 3q25. It includes six exons with the Sec-encoding TGA codon in exon 2, the TAG stop codon in exon 5, and the SECIS element in exon 6 (8, 38, 79). Two processed pseudogenes, *SELENOTP1* (ENSG00000233846)

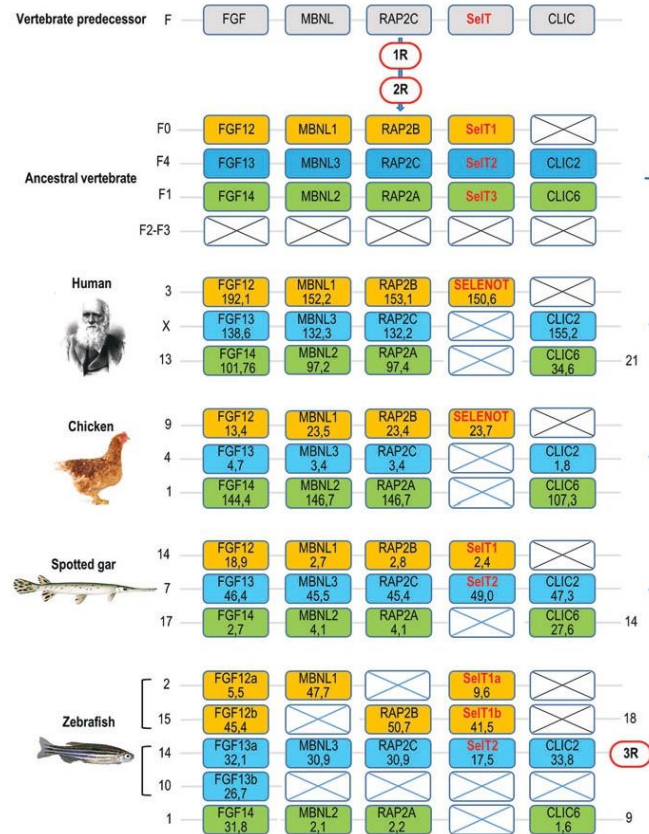


**FIG. 3. Phylogenetic tree of SELENOT based on maximum-likelihood method.** Protein sequences from 41 representative species of eukaryotes were aligned with MUSCLE (28). The unrooted phylogenetic tree was constructed by Seaview using the PhyML algorithm (35). The best amino acid substitution model for the alignment was determined to be LG+I+G+F using ProtTest (2) on the University of Vigo server. The robustness of the tree was assessed by the bootstrap procedure with 1000 replications. Bootstrap values <40 have been removed. The sequences and their accession numbers are given in Supplementary Data. The alignment on which the tree was constructed is displayed in Supplementary Figure S1. SELENOT, selenoprotein T. Color images are available online.

and *SELENOP2* (ENST00000603971.1), are also present in the human genome at positions 9p24 and 5q23, respectively. Interestingly, *SELENOP1* is a nearly complete copy of the mRNA transcribed from the functional *SELENOT* gene, including the SECIS sequence, thus raising the interesting possibility that it might be functional. Like in humans, most species possess a single *SELENOT* gene, although with exceptions. Nematodes for instance possess a single *SELENOT* gene, but as mentioned above, some taxa may have up to two (*C. elegans*) or three (*Caenorhabditis brenneri*) copies of the *SELENOT* gene (100). Likewise, three *SELENOT*-related genes, called *SelT1a*, *SelT1b*, and *SelT2*, are present in some

teleost species such as zebrafish (58) and goldfish (21), while two *SELENOT* genes, *SelT1* and *SelT2*, are present in spotted gar, a nonteleost ray-finned fish.

Up to now, the phylogenetic status of the different *SELENOT*-related genes (*SelT1a*, *SelT1b*, and *SelT2*) found in ray-finned fish was unknown. As shown in Figure 4, synteny analysis shows that all these genes belong to the same paralogon; that is, a set of paralogous chromosomal regions derived from a common ancestral region. According to Nakatani *et al.* (83), this paralogon was already present in the last common vertebrate ancestor and was probably generated in 2R, the two whole-genome duplication events that took



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

place early during the vertebrate history. From these data, we can speculate that up to three SELENOT-related genes could have been present in the vertebrate ancestor. Among these three genes, only two, *SelT1* and *SelT2*, are still present in bony fish, and one, *SelT1*, in tetrapods, including human. Synteny analysis also suggests that the two copies of *SelT1*, *SelT1a*, and *SelT1b*, present in zebrafish and goldfish, arose through 3R, the teleost fish-specific genome doubling.

The conservation of gene sequence during evolution is indicative of strong functional constraints leading to a very selective pressure, which is stronger when genes are essential. According to gene prediction and phylogenetic reconstruction methods, SELENOT, selenoprotein, and nonselenoprotein orthologs included, is the most conserved selenoprotein in vertebrates, with 95% amino acid identity between mammalian and chicken SELENOT for instance. There is also an impressive identity across all mammals even at the nucleotide sequence level, thus supporting an essential function (27, 72, 79). This seems indeed to be the case since SELENOT gene disruption is embryonic-lethal in mouse. No alive embryo could be found in the uterus of pregnant mice at the earliest embryonic stage analyzed; that is, embryonic day 8 (14). However, the precise stage of pregnancy at which embryos die, that is, before or after implantation, is not known yet and remains to be determined.

In humans, the dispensability of selenoprotein genes has recently been assessed by quantifying the natural occurrence of loss-of-function (LoF) variants. The intolerance of LoF between human and mice for the SELENOT gene is matching, indicating that SELENOT may be essential in humans as in mice. These findings do not support the possibility that SELENOP1 pseudogene would be functional in humans. It should be noted that at least three other mammalian selenoproteins, namely TrxR1, TrxR2, and GPx4, are also essential in mice. Among these, only TrxR1 seems essential in humans as SELENOT (102).

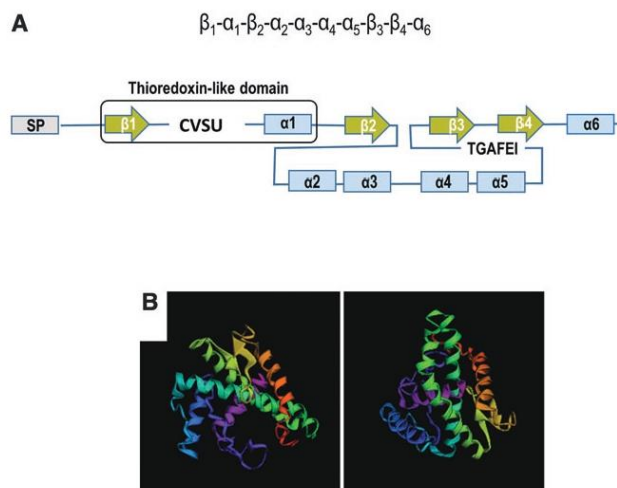
Further emphasizing the functional importance of SELENOT, its cellular levels are marginally impacted by Se defi-

ciency (86, 118). In addition, gene inactivation of SELENOP, which transports Se throughout the body for its use in the synthesis of other selenoproteins, has a moderate impact on SELENOT expression, except in the testis. Finally, the levels of SELENOT mRNA are significantly upregulated between control and Se-supplemented conditions in HEK293 cells, whereas the levels of 19 other selenoprotein mRNAs remained insensitive to Se-level variation (121). Taken together, these data show that in the hierarchy of selenoprotein production, SELENOT is among the highest priority selenoproteins, along with TrxR1, and that SELENOT expression cannot drop below a critical threshold.

#### SELENOT, an Oxidoreductase Associated with the ER Membrane

Based on its structure, SELENOT is expected to be a selenosulfide/disulfide oxidoreductase, like all selenoproteins that have been functionally characterized. In addition to a 19-amino acid *N*-terminal signal peptide, it possesses six  $\alpha$ -helices and four  $\beta$ -sheets with the  $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\beta_2$ - $\alpha_2$ - $\alpha_3$ - $\alpha_4$ - $\beta_3$ - $\beta_4$ - $\alpha_5$  typical arrangement (Fig. 5) (8, 27, 79). The *N*-terminal redox motif, Cys-Val-Ser-Sec/Cys (CVSU/C) in most species, is located in a loop between the  $\beta_1$ -sheet and the  $\alpha_1$ -helix, thus forming a typical domain characteristic of the thioredoxin-fold proteins. By analogy to other thioredoxin-fold proteins such as thioredoxins, glutaredoxins, and PDI, the redox center is presumed to confer to SELENOT an oxidoreductase activity. Using an assay based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) with NADPH, a TrxR-like activity of recombinant SELENOT was shown, which depends on Cys/Sec residues of the thioredoxin-like fold (14), although such activity remains to be established in a more physiological context.

In contrast to many other thioredoxin-fold proteins, an additional feature of SELENOT is a conserved tGXFEI (Thr-Gly-X-Phe-Glu-Ile, X is any amino acid, conserved residues in capital letters, residues most often observed in the indicated



**FIG. 5. SELENOT protein structure.** (A) SELENOT from *Rattus norvegicus* secondary structure. The CXXU redox motif and conserved TGXFEI signature of thioredoxin-type selenoproteins (redoxins) are indicated. (B) Two 3D models of SELENOT predicted by the QUARK server (130a).  $\alpha$ ,  $\alpha$ -helix;  $\beta$ ,  $\beta$ -sheet; Rdx, redox. Color images are available online.

position in small letters) stretch of amino acids in the C terminus, which is also present in selenoprotein W (SELENOW), selenoprotein V (SELENOV), selenoprotein H (SELENOH) and Rdx12, in mammals (27). This motif and the thioredoxin-fold domain constitute the genetic signature of a new family of thioredoxin-type selenoproteins named redoxins (Rdx), as defined by Dikij *et al.* (27). In this family, SELENOT is the only member localized in the ER.

The ER localization of SELENOT has been established in plant, invertebrate, and vertebrate species: in *A. thaliana*, a classical model of higher plants, the SELENOT-like protein with the Sec/Cys substitution was identified in the ER fractions by mass spectrometry (85); in *C. elegans*, the two SELENOT isoforms also carrying the Sec/Cys substitution were detected in the ER by immunofluorescence (100); in a nonmammalian vertebrate, the goldfish *Carassius auratus*, genuine SELENOT was characterized in the cardiac sarcoplasmic reticulum (76); in mammals, SELENOT was found to be colocalized with several ER proteins, including an ER-targeted green fluorescent protein (GFP), the ER-resident protein BiP, which is also referred to as 78-kDa glucose-regulated protein, and keratinocyte-associated protein 2 (KCP2) (38, 40, 92, 96, 120).

How does SELENOT achieve its localization in the ER is still an open question. Intriguingly, a SELENOT lacking the N terminus exhibited a cytoplasmic localization that did not virtually differ from that of the full-length protein (27, 38), suggesting that other sequences are required for the targeting of SELENOT to the ER. Some membrane proteins may be addressed to the ER by their membrane domains (6, 12). Accordingly, SELENOT, unlike the structurally close SELENOW, harbors two hydrophobic amino acid stretches at positions 87–102 and 125–144, inserted between  $\beta_2$  and  $\beta_3$  sheets, which could allow a membrane insertion (27, 38, 79). Modeling studies suggest that the first hydrophobic segment likely contains one long amphipathic helix, which forms extensive contacts with the lipid bilayer, probably promoting monotopic attachment (Fig. 6) (67). A recombinant SELENOT devoid of the 87–102 hydrophobic region is no more confined to the ER, suggesting that at least this domain is required for ER localization (38).

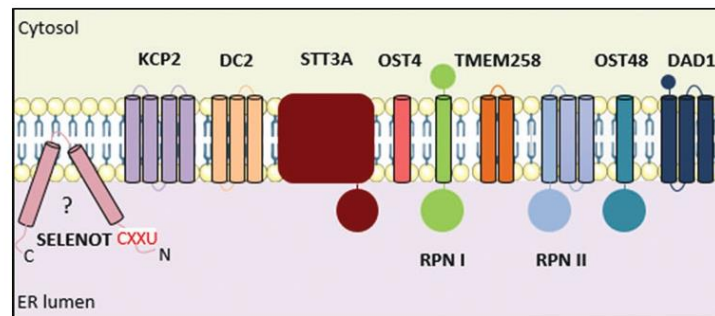
Other observations reinforce the idea that SELENOT is anchored to the ER membrane. SELENOT is detected in microsomal fractions prepared from mouse endocrine cells, although it is technically challenging to find it systematically (40). In addition, immunogold staining data show a proximity of SELENOT signal with the ER membrane in rat anterior pituitary cells (40). Interestingly, a proportion of SELENOT is also observed in the cytoplasm with this approach, supporting the possibility of a partial cleavage of the signal peptide and a possible distribution of the protein between the ER and the cytosol.

Several mechanisms might participate in SELENOT retention at the level of the membrane, including static retention and protein–protein interactions with other resident proteins (82, 125). An important issue is whether SELENOT leaves the ER, since SELENOT does not display the Lys-Asp-Glu-Leu tetrapeptide necessary for ER retention. This question cannot be answered yet based on the currently available data. Indeed, SELENOT has been described in the Golgi apparatus in one report (27), but SELENOT was not found in secretory granules by immunogold staining (40).

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

#### SELENOT Serves to Maintain ER Redox Homeostasis

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



**FIG. 6. Subunit composition of the eukaryotic A type-OST complex.** STT3A is the catalytic subunit of this complex, which also comprises six accessory subunits in common with the STT3-B complex, including RPN1, RPN2, OST48, DAD1, TMEM258, and OST4. KCP2 and DC2 are specific subunits of the STT3A complex. SELENOT is presented as a putative monotopic protein. DAD1, defender against cell death 1; KCP2, keratinocyte-associated protein 2; OST, oligosaccharyl-transferase; OST4, OST 4-kDa subunit; OST48, OST 48-kDa subunit; RPN1, ribophorin 1; RPN2, ribophorin 2; TMEM258, transmembrane protein 258. Modified from Braunger *et al.* (15). Color images are available online.

Consistent with UPR activation (Fig. 1), oxidative stress and decreased cell survival were reported after SELENOT gene knockdown in dopaminergic neurons, in cortical neuroblasts, and in PC12 cells, indicating that oxidative stress could not be resolved despite UPR activation, at least in these cells (3, 14, 19). Also consistent with SELENOT redox function, its depletion in murine fibroblasts enhances the expression of several oxidoreductase genes, including Cbr3 (carbonyl reductase 3) a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family of proteins (112).

In brain conditional SELENOT-deficient mice (*Nes-Cre/Sel1<sup>fl/fl</sup>*), oxidative stress was detected in SELENOT-depleted immature neuroblasts, resulting in the loss of immature neurons but not glial cells, through apoptotic cell death (19). In addition, disruption of the SELENOT gene in these mice provoked early lethality and higher vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a neurotoxin used to generate animal models of Parkinson's disease (PD). In the nigrostriatal system of these mice, a marked oxidant/nitrosative stress was observed, associated with neurodegeneration, and decreased tyrosine hydroxylase activity and dopamine levels (14). Conversely, SELENOT expression limited the oxidative stress and neurodegeneration in the nigrostriatal pathway of wild-type mice after treatment with MPTP or rotenone, another neurotoxin used to model PD. Likewise, SELENOT also protects the heart against oxidative stress and ischemia, after an ischemic-reperfusion episode in rat (98).

Some Cys residues present in Ca<sup>2+</sup>-handling proteins are located in the ER lumen, regulating in a redox-dependent manner the activity of RyR, IP3R, and SERCA (9). The crosstalk between Ca<sup>2+</sup> and redox signaling is an important process, which determines the amount of Ca<sup>2+</sup> available in the cytoplasm and the mitochondria, and consequently the cell fate. Indeed, preventing IP3R-dependent Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMKII) activation in the cytosol is sufficient to prevent the activation of proapoptotic pathways (45, 119).

SELENOT gene silencing in PC12 cells, in addition to disturbing the redox homeostasis, actually alters Ca<sup>2+</sup> flux, and in these conditions, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-induced increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is abolished. This has also been demonstrated in rat primary gastric smooth muscle cells in which SELENOT knockdown reduces their Ca<sup>2+</sup> content, myosin light chain kinase activity, and the subsequent 20 kDa myosin light chain phosphorylation, two key elements in smooth muscle contraction (66). Noteworthy, the redox center in SELENOT is necessary to preserve Ca<sup>2+</sup> homeostasis, although its precise contribution to the regulation of Ca<sup>2+</sup> flux has not yet been elucidated (38).

Unlike ERp57 and SELENON, which modulate SERCA activity, SELENOT ablation did not result in SERCA pump inhibition in PC12 cells (38), and the possibility that SELENOT interacts with IP3R, like ERO1, is not excluded (9). Alternatively, oxidative stress and UPR activation in SELENOT-deficient cells may be sufficient to promote Ca<sup>2+</sup> leakage through the translocon (124).

#### SELENOT Plays a Role in N-Glycosylation

To identify SELENOT partners and better understand the mechanisms underlying the function of SELENOT in ER

homeostasis, a modified split-ubiquitin system for *in vivo* detection of interactions between transmembrane proteins in yeast has been used (40). Among the subset of putative candidates identified was KCP2, an ER-resident transmembrane protein described as a subunit of the oligosaccharyl-transferase (OST) complex (96, 97).

OST catalyzes the transfer "en bloc" of the high-mannose oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2 (Glc, glucose; Man, mannose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine) from the ER membrane onto Asn residues of a specific *N*-glycosylation acceptor sequence (Asn-X-Ser/Thr/Cys) in a neosynthesized polypeptide (4). Mammalian OST is a hetero-oligomeric complex, which exists in two paralogous forms containing either the catalytic subunit STT3A or STT3B (Fig. 6). The STT3A isoform is stably integrated into the translocon and catalyzes cotranslational *N*-glycosylation, while the STT3B complex acts post-translationally as a proofreader for sites missed by STT3A (15, 101, 114, 115). Importantly, KCP2 is a specific subunit of the STT3A complex.

Coimmunoprecipitation experiments have shown that native SELENOT does interact with KCP2, as well as with STT3A and OST48, a common subunit of the STT3A- and B-types OST complexes, but not with STT3B, suggesting that KCP2 likely provides the binding site of SELENOT to the STT3A complex (115). The levels of STT3A, OST48, and KCP2 are significantly reduced in a corticotrope cell line depleted in SELENOT, thus implicating SELENOT in the stability of the OST complex or its binding to the ribosome. Consistently, the association with the translocon is disrupted in the STT3A complex devoid of KCP2 or DC2, another specific subunit of the STT3A complex, which interacts with KCP2 (115).

It is not yet established how SELENOT interacts with the STT3A complex. The seleno/disulfide oxidoreductase activity may be required for SELENOT/STT3A interaction. Indeed, redox interactions have been demonstrated between ER SELENOF and UGGT, and cytosolic SELENOW, which is distantly related to SELENOT, with 14-3-3 protein. In the latter case, the interaction with SELENOW interrupts 14-3-3 binding to Rictor, thus leading to the activation of the mTORC2/Akt pathway (1, 27, 53).

SELENOT itself is not *N*-glycosylated (40). This excludes the possibility that it physically interacts with the STT3A complex as a substrate, but rather as a modulator of *N*-glycosylation in the same way as KCP2 (97). Consistent with this hypothesis, SELENOT levels, like those of STT3A and KCP2, and to a lesser extent STT3B, are higher in professionally secreting cells and tissues (13, 96).

SELENOT gene silencing in endocrine cells leads to an alteration of *N*-glycan occupancy on specific substrates, including proopiomelanocortin (POMC), a 235-amino acid prohormone precursor harboring two *N*-glycosylation sites at positions 91 and 152, and a modified GFP engineered to detect impaired *N*-glycosylation (40). The issue of substrate specificity of SELENOT is not solved yet, but it is quite remarkable that SELENOT expression coincides with that of a number of glycosylated hormones or polypeptide precursors with disulfide bonds such as POMC, somatostatin, FSH, TSH, and insulin (40, 92, 120). This observation has led us to speculate that SELENOT, owing to its oxidoreductase activity, might ensure the redox quality control of glycoproteins with disulfide bonds, like the other oxidoreductases TUSC3/N33 (tumor suppressor candidate 3) and MAGT1/IAP

(magnesium transporter protein 1) in the STT3B-type OST (78), and their orthologs OST3/OST6 in the yeast OST complex (109). These oxidoreductases form transient mixed disulfide complexes with a set of substrates to slow glycoprotein folding and increase glycosylation efficiency.

Since OST3/6, MagT1/IAP, or TUSC33/N33 have no homolog in the STT3A complexes, it is tempting to speculate that SELENOT can exert the same function in the STT3A complex, provided that the SELENOT *N*-terminal redox CVSU motif faces the ER lumen (Fig. 6) (24). Remarkably, SELENOT, along with other factors of the glycoprotein quality control cycle (CANX, for instance), was detected in haploid genetic screens designed to identify factors involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) deacylation (68). This step, which is *N*-glycan dependent, enables GPI-anchored proteins (GPI-APs) to be transported from the ER to the Golgi and to be anchored to the plasma membrane. This finding suggests that GPI-APs are, in addition to glyco hormones, other SELENOT targets. GPI-APs group comprises ~150 proteins, involved in diverse biological processes such as immune recognition, cell adhesion, and vertebrate organ development, a number of processes where SELENOT has also been implicated (19, 100, 112).

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

#### SELENOT Couples Metabolic Activity with Differentiation and Secretion

Initially, SELENOT was characterized as a gene overexpressed in PC12 cells exposed to PACAP (38), a model of neuroendocrine differentiation. When SELENOT gene expression was silenced, PACAP-induced neuriteogenesis was inhibited, and this was associated with oxidative stress and decreased cell viability. PACAP-induced SELENOT gene expression was found to rely in part on the activation of the canonical cAMP/protein kinase A (PKA) pathway and to be Ca<sup>2+</sup> dependent (38), which fits well with the trophic effects of the neuropeptide and its known transduction pathways in neuroendocrine cells. However, when the SELENOT gene promoter was characterized, additional signaling components impacting SELENOT expression were highlighted (3).

Using comparative bioinformatic analysis, several binding sites for nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) could be identified in the SELENOT promoter, which are conserved in evolutionary distant species (from human to chicken). Chromatin immunoprecipitation experiments and promoter studies revealed that NRF-1 governs both basal and PACAP-induced SELENOT gene expression. NRF-1 is a basic region-leucine

zipper transcription factor that activates the expression of nuclear genes essential for mitochondrial biogenesis and function, and some key metabolic genes regulating cellular growth (104, 105).

In line with these activities, NRF-1-dependent SELENOT expression was found to rely in part on the upstream activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key kinase that acts as a fuel gauge regulating energy metabolism by switching on catabolic pathways while switching off anabolic pathways and stimulating mitochondrial biogenesis (42, 43). This cascade was also dependent on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ), which is a transcriptional coactivator of NRF-1 and CREB, and which links external physiological stimuli to the regulation of mitochondrial biogenesis (130).

Altogether, these observations indicate that PACAP reprograms cell metabolism *via* the activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$ /NRF-1 cascade and the concomitant stimulation of SELENOT expression. Such a signaling cascade could allow cells to cross a critical metabolic checkpoint (32) with a tight control of ER and oxidative stress, and to proceed successfully toward differentiation. Of note, PACAP also stimulates catecholamine secretion from PC12 cells, a process that may also require SELENOT as previously reported, linking SELENOT effects in secretion and differentiation (38, 40, 92). Overall, these observations suggest that SELENOT exerts a pivotal role in cell metabolism that could impinge various cellular functions.

Responsible for the correct folding, secretion, and membrane insertion of proteins representing a third of the proteome in eukaryotic cells, the ER is crucial to achieve the extensive protein synthesis required to undergo normal development and maintenance of tissue homeostasis (47, 61, 110). ER structure is modified to adapt lipid and protein synthesis and Ca<sup>2+</sup> storage.

SELENOT is in fact widely and abundantly expressed during this period, in line with its role in cell metabolism and ER proteostasis (100, 120). The SELENOT mRNA is detected at embryonic day 7 in rat embryo and placenta (38). A strong expression is observed at embryonic day 20 in many developing organs (brain, thymus, liver, kidney, testis, adrenal), whereas other organs like the gastrointestinal tract or the skeletal muscle showed a less intense expression (38, 120). In the developing brain, a strong SELENOT signal is found in neural progenitors located in the subventricular zone, the intermediate zone, and the cortical plate, and in neurons of the external germinative layer of the cerebellar cortex (120). This pattern is conserved during evolution, since in *C. elegans* the SelT.1 isoform is expressed throughout development in most cells from prebean embryonic stages at the epidermal enclosure stage to the adult stage (100).

When the SELENOT gene was specifically disrupted in neural precursors (mutant *Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup>* mice), several brain structures including the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum showed a significant growth retardation during the first postnatal week (19). Their volume reduction was associated with an increase in neuroblast death by apoptosis, which could be linked to an elevation of ROS levels. Despite a morphological compensation in adulthood, mutant mice exhibit hyperactive and anxiety-like behaviors, raising the possibility that SELENOT is also required for neural network maturation. Disturbances in ontogenesis are also observed in pancreatic islets of SELENOT-insKO mice, as morphometric analyses showed that the islets were smaller

and their number increased in mutant mice compared with controls (92).

In line with these developmental abnormalities, some data support a crucial role of SELENOT in adhesion processes. Hence, cell adhesion is impaired in murine fibroblasts with decreased SELENOT levels (112), and HEK293 cells depleted in SELENOT have a deficit in the maturation of GPI-APs, a class of proteins comprising adhesion molecules such as semaphorins, ephrins, and neural cell adhesion molecule 1 (56, 123). These processes being fundamental during implantation and placentation, they may explain the embryonic lethality observed as early as embryonic day 8 in SELENOT-KO mice and which may occur earlier (14).

As mentioned above, SELENOT expression at adulthood is restricted to different endocrine cell types. It is highly abundant in the spermatogenic and the testosterone-producing Leydig cells of the testis (120), in lactotrope, gonadotrope, thyrotrope, corticotrope, and somatotrope cells of the pituitary (40), or in  $\beta$  and  $\delta$  cells of the pancreas (92), suggesting its implication in major functions, including growth, reproduction, and energy metabolism.

Endocrine cells are devoted to the regulation of body homeostasis, and selenoproteins such as SELENOT could play a key role in this vital process. For instance, the hypothalamo-pituitary axis is responsible for the neuroendocrine adaptation to the stress response. This response is characterized by the hypothalamic release of corticotropin-releasing factor (CRF), which binds to CRF receptors on the anterior pituitary gland and stimulates adrenocorticotropic hormone (ACTH) secretion.

CRF was able to stimulate SELENOT expression in pituitary corticotrope tumor cells (AtT20) (40). In addition, CRF-induced ACTH secretion was abolished after SELENOT gene knockdown, indicating that SELENOT is essential to adapt secretion to environmental cues. Supporting this idea, SELENOT levels are not homogeneous between pituitary cells of the same population, which may be related to their distinct secretory status, a phenomenon well described for different endocrine cell types (36, 37, 81). In the periphery, SELENOT was detected in  $\beta$ -pancreatic cells, and it has been shown that glucose tolerance after an oral administration is altered in conditional  $\beta$ -pancreatic cell SELENOT-KO mice, suggesting that SELENOT is essential to adapt insulin production/secretion to changing glucose levels (92). Further supporting a role in  $\beta$  cell function, SELENOT was also able to potentiate PACAP-induced insulin secretion.

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

#### SELENOT Promotes Cell Survival in Pathophysiological Stressful Conditions

SELENOT expression has been shown to be upregulated after exposure to a number of noxious pathophysiological signals, including oxidative stress, ER stress, inflammation, heavy metal, and neurotoxin exposure.

*In vitro* exposure to oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or ER stress (tunicamycin or dithiothreitol) inducers leads to an increase in SELENOT levels, and cells in which SELENOT levels have been reduced experimentally were less resistant to all these stressors (3, 14, 19, 40). SELENOT was hardly detected in the normal brain, but its expression increased in the rodent brain in hypoxic conditions (49) and in neurons and astrocytes of the nigrostriatal pathway in the mouse MPTP model of PD (14). These observations are consistent with data obtained in humans; that is, SELENOT overexpression in the caudate putamen of *postmortem* PD patients (14). When *Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup>* mice were exposed to MPTP, the neurotoxin effect resulted in the death of the majority of KO animals within 2h after injection, in contrast to wild-type animals, which survived normally in these conditions (14).

Likewise, SELENOT expression was undetectable in the adult heart, but cardiac SELENOT expression was induced after ischemic injury (98, 99). SELENOT levels increased in liver and spleen in fish (*C. auratus*) after exposure to different stressors, such as cadmium or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (21). Increased SELENOT expression was also observed in spleen and thymus during lipopolysaccharide-induced inflammatory response in pig (117). Furthermore, SELENOT was upregulated in the mouse liver during its regeneration after hepatectomy (120).

It should be mentioned that SELENOT mRNA levels may vary oppositely according to the nature of the stress. For example, isoproterenol and T3 both induce cardiac hypertrophy, but SELENOT levels are either down- or upregulated by these agents, respectively (48). Likewise, in cancer cells, SELENOT is overexpressed in the hepatocarcinoma HepG2 and Huh7 cell lines (39, 136), while it is reduced in paracarcinoma and in gastric cancer, compared with controls (63).

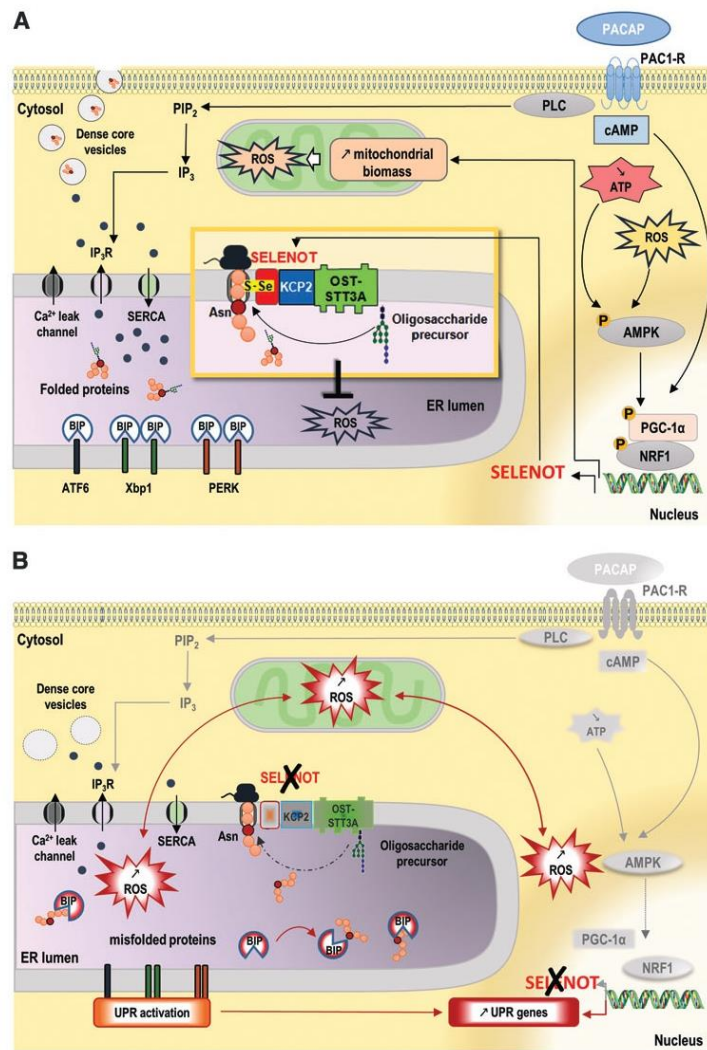
Hence, these studies point to an important role of SELENOT in pathophysiological stressful situations. Together with the high SELENOT expression in endocrine cells, which have to face a physiological stress during sustained secretion, these observations highlight the role of SELENOT in the ER, allowing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

#### Conclusions and Future Directions

The ER is the principal subcellular compartment involved in the quality control and folding of secretory and membrane proteins. Protein folding in the ER is a complex and error-prone process. When misfolded proteins accumulate in the ER, ROS increase and Ca<sup>2+</sup> leaks from the ER, thus compromising cell viability if the stress is not resolved (20, 22, 25, 41, 91, 129). ER stress actually contributes to the etiology of many human diseases. For instance, the accumulation of misfolded and aggregated proteins is a common characteristic of neurodegenerative diseases (106). It is also the hallmark of cancer, diabetes, metabolic syndromes, cardiovascular and inflammatory/immune diseases, many diseases for which the restoration of ER homeostasis is proposed as a new potential therapeutic target (31, 34, 55, 77, 128). Because UPR activation is inextricably linked to the maintenance of ER and cell homeostasis, finding UPR biomarkers and targets is a major therapeutic issue (7).

Major breakthroughs have recently been made on the function of SELENOT, showing that it is essential to life and to cope with cellular stress situations, making it one of the most important selenoproteins. Even if the precise function of





**FIG. 7. Scenario proposed to explain how SELENOT preserves ER homeostasis after exposure to physiological and pathophysiological stresses. (A)** SELENOT is associated with the STT3A-type OST complex in the ER membrane, where it could assist folding of certain glycoproteins. It is induced by physiological (PACAP, low ATP) or harmful (oxidative stress, heavy metal, inflammation) signals *via* activation of PKA and AMPK, to preserve ER-folding homeostasis. Correctly folded proteins are addressed to their final destination through the secretory pathway. **(B)** In SELENOT-deficient cells, the oligosaccharide precursor is not transferred to a number of glycoproteins. Accumulation of misfolded proteins triggers the UPR and the transcriptional expression of UPR target genes. An insufficient UPR response leads to a major impairment of redox and  $Ca^{2+}$  homeostasis,  $Ca^{2+}$  leaks from the ER lumen after IP<sub>3</sub>R oxidation, oxidative stress develops due to protein overload, leading to mitochondrial dysfunction and ultimately causing cell death. AMPK, AMP-activated protein kinase; Asn, asparagine; ATF6, activating transcription factor 6; BiP/GRP78, heat shock 70 kDa protein 5; cAMP, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate; IP<sub>3</sub>R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; NRF-1, nuclear respiratory factor 1; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PAC1R, PACAP type 1 receptor; PERK, eukaryotic translation initiation factor 2- $\alpha$  kinase 3; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ ; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; S, sulfur; Se, selenium; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase; Xbp1, X-box binding protein 1. Color images are available online.

this selenoprotein remains to be further investigated, recent data identified SELENOT as an ER-resident protein and a partner of KCP2, a subunit of the STT3A-type OST complex involved in cotranslational *N*-glycosylation. Through its involvement in *N*-glycosylation, a process that is essential for glycoprotein quality control system, it is very likely that SELENOT plays a crucial role to maintain ER homeostasis when cellular metabolic activity increases, such as in secreting or in differentiating cells, to ultimately ensure that its protein-folding capacity is not overwhelmed (Fig. 7A, B).

Owing to the important biological functions of oligosaccharides in glycoproteins, incorrect synthesis of these compounds results in diverse human diseases with up to 100 inherited disorders, named congenital disorders of glycosylation (CDG) (52). SELENOT could be a candidate gene in these diseases, but the possibility of a genetic alteration in SELENOT has not yet been documented, neither in these diseases nor in any other pathology, while mutations or polymorphisms in two other ER-resident selenoproteins, SELENON and SELENOS, are associated with human pathophysiological conditions, such as myopathies and inflammation, respectively (26, 87). The increase in SELENOT expression found in the caudate putamen of PD patients and in different pathophysiological animal models also suggests that SELENOT could be a new biomarker of these disorders (14).

Mainly expressed during embryogenesis, SELENOT contributes to the development of many organs, including the brain and the pancreas. The studies performed with the mutant *Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup>* mice provide valuable clues regarding the role of SELENOT during neurogenesis. Indeed, the volume reduction of several brain structures (neocortex, cerebellum, and hippocampus) observed during the first postnatal week and the hyperactive behavior observed in this mutant at adulthood indicate that SELENOT is also critical for the formation of functional neural circuits.

The recent finding of SELENOT requirement for the *N*-glycan-dependent maturation of GPI-anchored protein is highly relevant in this regard. Indeed, it is now well established that a subset of GPI-APs, as cell adhesion molecules, have an impact on brain development and function through their involvement in neurogenesis and synaptogenesis (75, 84). Also, a number of neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorder, are associated with mutations of several GPI-APs, including contactin-4, -5, -6 (90) and Ntm (16). Further studies are warranted to confirm in *Nes-Cre/SelT<sup>fl/fl</sup>* model the influence of SELENOT on GPI synthesis.

Altogether, these observations suggest that SELENOT participates in various physiological processes, including hormone/peptide secretion, growth, neuroprotection/regeneration and inflammation, or pathological conditions such as cancer, which are associated with an increase in energy demand and stress. In particular, altered *N*-glycosylation and ER stress, which are observed in the hypothalamus and pancreas, may lead to metabolic perturbations, and *in fine*, to obesity, diabetes, and the metabolic syndrome, as recently reported for the ER-resident SELENOM-deficient mice (33).

A better understanding of the mechanisms linking ER selenoproteins and protein folding and redox homeostasis regulation might lead to the development of novel therapeutic targets for different human diseases.

In support of this notion, it is interesting to note that a SELENOT-derived peptide, SELENOT43–52 (PSELT), en-

compassing the Sec-containing redox motif, inhibits oxidative and nitrosative stress and exerts a potent pharmacological postconditioning protective effect in the heart after ischemic injury (98). PSELT-dependent cardioprotection is accompanied by a significant increase in phosphorylated Akt, Erk-1/2, and Gsk3 $\alpha$ - $\beta$  and a reduction of apoptosis. Another brain-penetrant selenopeptide-TAT (SelPep), composed of a TAT peptide attached to a stretch of amino acids derived from the C terminus of SELENOP, has been designed to deliver Se into the cells. SelPep possesses a wide therapeutic window *in vitro* and *in vivo* for hemorrhagic stroke and possibly other central nervous system (CNS) and non-CNS conditions associated with ferroptotic death. It drives a TFPA2c and Sp1-dependent transcriptional response, including genes of the selenome, to counteract reactive lipids and cell death (5).

Our preliminary results indicate that PSELT could exert protective effects in various diseases, associated with cellular stress and degeneration. This opens up a new avenue in clinical research, especially for different degenerative and metabolic diseases associated with oxidative and ER stress, for which no preventive or curative therapies are currently available.

#### Funding Information

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

#### Supplementary Material

Supplementary Data  
Supplementary Table S1  
Supplementary Figure S1

#### References

1. Aachmann FL, Fomenko DE, Soragni A, Gladyshev VN, and Dikiy A. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* 282: 37036–37044, 2007.
2. Abascal F, Zardoya R, and Posada D. ProfTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105, 2005.
3. Abid H, Cartier D, Hamieh A, Francois-Bellan AM, Bucharles C, Pothion H, Manecka DL, Leprince J, Adriouch S, Boyer O, Anouar Y, and Lihrmann I. AMPK activation of PGC-1 $\alpha$ /NRF-1-dependent SELENOT gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress. *Mol Neurobiol* 56: 4086–4101, 2019.
4. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, and Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35: 74–82, 2010.
5. Alim I, Caulfield JT, Chen Y, Swarup V, Geschwind DH, Ivanova E, Seravalli J, Ai Y, Sansing LH, Ste Marie EJ, Hondal RJ, Mukherjee S, Cave JW, Sagdullaev BT, Karuppagounder SS, and Ratan RR. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke. *Cell* 177: 1262–1279, 2019.

6. Allen KN, Entova S, Ray LC, and Imperiali B. Monotopic membrane proteins join the fold. *Trends Biochem Sci* 44: 7–20, 2019.
7. Almanza A, Carlesso A, Chinthia C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, Luis A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Puschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, de Bellerocche J, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, Kozlov A, Munoz-Pinedo C, Rehm M, Chevret E, and Samali A. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* 286: 241–278, 2019.
8. Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, and Boukhzar L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* 127: 145–152, 2018.
9. Appenzeller-Herzog C and Simmen T. ER-luminal thiol/selenol-mediated regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling. *Biochem Soc Trans* 44: 452–459, 2016.
10. Amer ES. Selenoproteins—what unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* 316: 1296–1303, 2010.
11. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, and Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326–332, 2000.
12. Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1496–1500, 1980.
13. Bonkobara M, Das A, Takao J, Cruz PD, and Ariizumi K. Identification of novel genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes. *Br J Dermatol* 148: 654–664, 2003.
14. Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet JJ, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihmann I, and Anouar Y. Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 24: 557–574, 2016.
15. Braunger K, Pfeffer S, Shrimal S, Gilmore R, Berninghausen O, Mandon EC, Becker T, Forster F, and Beckmann R. Structural basis for coupling protein transport and N-glycosylation at the mammalian endoplasmic reticulum. *Science* 360: 215–219, 2018.
16. Brevik EJ, van Donkelaar MM, Weber H, Sanchez-Mora C, Jacob C, Rivero O, Kittel-Schneider S, Garcia-Martinez I, Aebi M, van Hulzen K, Cormand B, Ramos-Quiroga JA; IMAGE Consortium, Lesch KP, Reif A, Ribases M, Franke B, Posserud MB, Johansson S, Lundervold AJ, Haavik J, and Zayats T. Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 171: 733–747, 2016.
17. Castellano S. On the unique function of selenocysteine—insights from the evolution of selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1463–1470, 2009.
18. Castets P, Lescure A, Guicheney P, and Allamand V. Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J Mol Med (Berl)* 90: 1095–1107, 2012.
19. Castex MT, Arabo A, Benard M, Roy V, Le Joncour V, Prevost G, Bonnet JJ, Anouar Y, and Falluel-Morel A. Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol Neurobiol* 53: 5818–5832, 2016.
20. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Helencourt C, and Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8: 213, 2014.
21. Chen W, Zhang Z, Yan F, Jiang X, Qin S, and Dong H. Identification of three selenoprotein T paralogs in goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis in response to environmental stressors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 203: 65–75, 2017.
22. Cherepanova N, Shrimal S, and Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 41: 57–65, 2016.
23. Cherepanova NA and Gilmore R. Mammalian cells lacking either the cotranslational or posttranslocational oligosaccharyltransferase complex display substrate-dependent defects in asparagine linked glycosylation. *Sci Rep* 6: 20946, 2016.
24. Cherepanova NA, Shrimal S, and Gilmore R. Oxidoreductase activity is necessary for N-glycosylation of cysteine-proximal acceptor sites in glycoproteins. *J Cell Biol* 206: 525–539, 2014.
25. Chong WC, Shastri MD, and Eri R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious nexus implicated in Bowel Disease pathophysiology. *Int J Mol Sci* 18: pii: E771, 2017.
26. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG, Dyer TD, Walder KR, Zimmet P, MacCluer JW, Collier GR, Kissebah AH, and Blangero J. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 37: 1234–1241, 2005.
27. Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, and Gladyshev VN. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* 46: 6871–6882, 2007.
28. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113, 2004.
29. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Hondal RJ, Rozovsky S, Urschitz J, and Hoffmann PR. Selenoprotein K increases efficiency of DHHC6 catalyzed protein palmitoylation by stabilizing the acyl-DHHC6 intermediate. *Antioxidants (Basel)* 7: 4, 2017.
30. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, Osterheld HJ, Hess FM, Mercier F, and Hoffmann PR. Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16478–16483, 2014.
31. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, and Ghezzi P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 23: 1144–1170, 2015.
32. Gascon S, Murenu E, Masserdotti G, Ortega F, Russo GL, Petrik D, Deshpande A, Heinrich C, Karow M, Robertson SP, Schroeder T, Beckers J, Irmeler M, Berndt C, Angeli JP, Conrad M, Berninger B, and Gotz M. Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell* 18: 396–409, 2016.
33. Gong T, Hashimoto AC, Sasuclark AR, Khadka VS, Gurary A, and Pitts MW. Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant

- activity. *Antioxid Redox Signal* 2019. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1089/ars.2018.7594.
34. Gonzalez-Teuber V, Albert-Gasco H, Auyeung VC, Papa FR, Mallucci GR, and Hetz C. Small Molecules to improve er proteostasis in disease. *Trends Pharmacol Sci* 40: 684–695, 2019.
  35. Gouy M, Guindon S, and Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221–224, 2010.
  36. Gracia-Navarro F, Malagon MM, Castano JP, Garcia-Navarro S, Sanchez-Hormigo A, Luque RM, Peinado JR, and Delgado E. Secretory plasticity of pituitary cells: a mechanism of hormonal regulation. *Arch Physiol Biochem* 110: 106–112, 2002.
  37. Grindeland RE, Kraemer WJ, and Hymer WC. Two types of rat pituitary somatotrophs secrete growth hormone with different biological and immunological profiles. *Growth Horm IGF Res* 36: 52–56, 2017.
  38. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerneau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, and Anouar Y. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* 22: 1756–1768, 2008.
  39. Guariniello S, Di Bernardo G, Colonna G, Cammarota M, Castello G, and Costantini S. Evaluation of the seleno-transcriptome expression in two hepatocellular carcinoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst)*: 419561, 2015.
  40. Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Buchares C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, Anouar Y, and Lihmann I. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* 18: 1935–1946, 2017.
  41. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, and Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 15: 481–490, 2013.
  42. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25: 1895–1908, 2011.
  43. Hardie DG. AMPK-sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 20: 939–952, 2014.
  44. Haynes CM and Ron D. The mitochondrial UPR—protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123: 3849–3855, 2010.
  45. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 89–102, 2012.
  46. Hetz C and Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 69: 169–181, 2018.
  47. Hillary RF and FitzGerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci* 25: 48, 2018.
  48. Hoffmann FW, Hashimoto AS, Lee BC, Rose AH, Shohet RV, and Hoffmann PR. Specific antioxidant selenoproteins are induced in the heart during hypertrophy. *Arch Biochem Biophys* 512: 38–44, 2011.
  49. Ikematsu K, Tsuda R, Tsuruya S, and Nakasono I. Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display. *Forensic Sci Int* 169: 168–172, 2007.
  50. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, Roveri A, Peng X, Porto Freitas F, Seibt T, Mehr L, Aichler M, Walch A, Lamp D, Jastroch M, Miyamoto S, Wurst W, Ursini F, Arner ESJ, Fradejas-Villar N, Schweizer U, Zischka H, Friedmann Angeli JP, and Conrad M. Selenium utilization by gpx4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis. *Cell* 172: 409–422, 2018.
  51. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73–82, 2017.
  52. Jaeken J and Peanne R. What is new in CDG? *J Inher Metab Dis* 40: 569–586, 2017.
  53. Jeon YH, Ko KY, Lee JH, Park KJ, Jang JK, and Kim IY. Identification of a redox-modulatory interaction between selenoprotein W and 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1863: 10–18, 2016.
  54. Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanagan KM, Abramson JJ, Howard MT, and Grunwald DJ. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12485–12490, 2008.
  55. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, and Ohtake Y. ER stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 40: 1337–1343, 2017.
  56. Kinoshita T and Fujita M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J Lipid Res* 57: 6–24, 2016.
  57. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehntab O, Guigo R, and Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439–1443, 2003.
  58. Kryukov GV and Gladyshev VN. Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells* 5: 1049–1060, 2000.
  59. Kryukov GV, Kryukov VM, and Gladyshev VN. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* 274: 33888–33897, 1999.
  60. Labunskyy VM, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 94: 739–777, 2014.
  61. Laguesse S, Creppe C, Nedialkova DD, Prevot PP, Borgs L, Huysseune S, Franco B, Duysens G, Krusy N, Lee G, Thelen N, Thiry M, Close P, Chariot A, Malgrange B, Leidel SA, Godin JD, and Nguyen L. Dynamic unfolded protein response contributes to the control of cortical neurogenesis. *Dev Cell* 35: 553–567, 2015.
  62. Lamriben L, Graham JB, Adams BM, and Hebert DN. N-Glycan-based ER molecular chaperone and protein quality control system: the calnexin binding cycle. *Traffic* 17: 308–326, 2016.
  63. Lan X, Xing J, Gao H, Li S, Quan L, Jiang Y, Ding S, and Xue Y. Decreased expression of selenoproteins as a poor prognosticator of gastric cancer in humans. *Biol Trace Elem Res* 178: 22–28, 2017.
  64. Lee JH, Park KJ, Jang JK, Jeon YH, Ko KY, Kwon JH, Lee SR, and Kim IY. Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K binding to p97(VCP) protein is essential for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 290: 29941–29952, 2015.
  65. Lescuré A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, and Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1569–1574, 2009.

66. Li JP, Zhou JX, Wang Q, Gu GQ, Yang SJ, Li CY, Qiu CW, Deng GZ, and Guo MY. Se enhances MLCK activation by regulating selenoprotein T (SelT) in the gastric smooth muscle of rats. *Biol Trace Elem Res* 173: 116–125, 2016.
67. Liu J and Rozovsky S. Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* 23: 795–813, 2015.
68. Liu YS, Guo XY, Hirata T, Rong Y, Motooka D, Kitajima T, Murakami Y, Gao XD, Nakamura S, Kinoshita T, and Fujita M. N-Glycan-dependent protein folding and endoplasmic reticulum retention regulate GPI-anchor processing. *J Cell Biol* 217: 585–599, 2018.
69. Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, and Gladyshev VN. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastid-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Res* 34: 4012–4024, 2006.
70. Lobanov AV, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1424–1428, 2009.
71. Marino M, Stoilova T, Giorgi C, Bachi A, Cattaneo A, Auricchio A, Pinton P, and Zito E. SEPN1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. *Hum Mol Genet* 24: 1843–1855, 2015.
72. Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* 7: e33066, 2012.
73. Mariotti M, Salinas G, Gabaldon T, and Gladyshev VN. Utilization of selenocysteine in early-branching fungal phyla. *Nat Microbiol* 4: 759–765, 2019.
74. Martin-Romero FJ, Kryukov GV, Lobanov AV, Carlson BA, Lee BJ, Gladyshev VN, and Hatfield DL. Selenium metabolism in *Drosophila*: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem* 276: 29798–29804, 2001.
75. Maydan G, Noyman I, Har-Zahav A, Neriah ZB, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, Albin-Kaplanski A, Maya I, Magal N, Birk E, Simon AJ, Halevy A, Rechavi G, Shohat M, Straussberg R, and Basel-Vanagaite L. Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation in PIGN. *J Med Genet* 48: 383–389, 2011.
76. Mazza R, Gattuso A, Imbrogno S, Boukharz L, Leo S, Mallouki BY, Filice M, Rocca C, Angelone T, Anouar Y, and Cerra MC. Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Biol* 222(Pt 11): jeb201202, 2019.
77. Mercado G, Castillo V, Soto P, and Sidhu A. ER stress and Parkinson's disease: pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Res* 1648: 626–632, 2016.
78. Mohorko E, Owen RL, Malojcic G, Brozzo MS, Aebi M, and Glockshuber R. Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Structure* 22: 590–601, 2014.
79. Moustafa ME and Antar HA. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* 50: 736–747, 2012.
80. Muffato M, Louis A, Poisnel CE, and Roest Crollius H. Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics* 26: 1119–1121, 2010.
81. Murburg MM, Wilkinson CW, Raskind MA, Veith RC, and Dorsa DM. Evidence for two differentially regulated populations of peripheral beta-endorphin-releasing cells in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1033–1040, 1993.
82. Naismith TV, Dalal S, and Hanson PI. Interaction of torsinA with its major binding partners is impaired by the dystonia-associated DeltaGAG deletion. *J Biol Chem* 284: 27866–27874, 2009.
83. Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, and Morishita S. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res* 17: 1254–1265, 2007.
84. Ng BG and Freeze HH. Human genetic disorders involving glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors and glycosphingolipids (GSL). *J Inherit Metab Dis* 38: 171–178, 2015.
85. Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TP, Munro S, Lilley KS, and Dupree P. Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics. *Plant Physiol* 160: 1037–1051, 2012.
86. Novoselov SV, Kim HY, Hua D, Lee BC, Astle CM, Harrison DE, Friguet B, Moustafa ME, Carlson BA, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxid Redox Signal* 12: 829–838, 2010.
87. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, and Guicheney P. Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* 12: 1045–1053, 2003.
88. Pitts MW and Hoffmann PR. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium* 70: 76–86, 2018.
89. Pitts MW, Reeves MA, Hashimoto AC, Ogawa A, Kremer P, Seale LA, and Berry MJ. Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *J Biol Chem* 288: 26121–26134, 2013.
90. Poot M. A candidate gene association study further corroborates involvement of contactin genes in autism. *Mol Syndromol* 5: 229–235, 2014.
91. Preissler S and Ron D. Early events in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11: a033894, 2019.
92. Prevost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihrmann I, Kerr-Conte J, Lefebvre H, Pattou F, and Anouar Y. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154: 3796–3806, 2013.
93. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, and Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* 148: 183–193, 2016.
94. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356: 233–241, 2000.
95. Reeves MA, Bellinger FP, and Berry MJ. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid Redox Signal* 12: 809–918, 2010.
96. Roboti P and High S. Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *J Cell Sci* 125: 220–232, 2012.

97. Roboti P and High S. The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *J Cell Sci* 125: 3474–3484, 2012.
98. Rocca C, Boukhzar L, Granieri MC, Alsharif I, Mazza R, Lefranc B, Tota B, Leprince J, Cerra MC, Anouar Y, and Angelone T. A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta Physiol (Oxf)* 223: e13067, 2018.
99. Rocca C, Pasqua T, Boukhzar L, Anouar Y, and Angelone T. Progress in the emerging role of selenoproteins in cardiovascular disease: focus on endoplasmic reticulum-resident selenoproteins. *Cell Mol Life Sci* 76: 3969–3985, 2019.
100. Romanelli-Cedrez L, Carrera I, Otero L, Miranda-Vizuete A, Mariotti M, Alkema MJ, and Salinas G. Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 108: 174–182, 2017.
101. Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, and Gilmore R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136: 272–283, 2009.
102. Santesmasses D, Mariotti M, and Gladyshev VN. Tolerance to selenoprotein loss differs between human and mouse. *Mol Biol Evol* 37:341–354, 2020.
103. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, and Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11: 2409–2427, 2009.
104. Satoh J, Kawana N, and Yamamoto Y. Pathway analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regul Syst Bio* 7: 139–152, 2013.
105. Scarpulla RC, Vega RB, and Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23: 459–566, 2012.
106. Schepers W and Hoozemans JJ. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol* 130: 315–331, 2015.
107. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, Luan J, Montano S, Lu J, Castanet M, Clemons N, Groeneveld M, Castets P, Karbaschi M, Aitken S, Dixon A, Williams J, Campi I, Blount M, Burton H, Muntoni F, O'Donovan D, Dean A, Warren A, Brierley C, Baguley D, Guicheney P, Fitzgerald R, Coles A, Gaston H, Todd P, Holmgren A, Khanna KK, Cooke M, Semple R, Halsall D, Wareham N, Schwabe J, Grasso L, Beck-Peccoz P, Ogunko A, Dattani M, Gurnell M, and Chatterjee K. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 120: 4220–4235, 2010.
108. Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 8: 160–171, 2011.
109. Schulz BL, Stirmimann CU, Grimshaw JP, Brozzo MS, Fritsch F, Mohorko E, Capitani G, Glockshuber R, Grutter MG, and Aebi M. Oxidoreductase activity of oligosaccharyltransferase subunits Ost3p and Ost6p defines site-specific glycosylation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11061–11066, 2009.
110. Schwarz DS and Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73: 79–94, 2016.
111. Schweizer U and Fradejas-Villar N. Why 21? The significance of selenoproteins for human health revealed by inborn errors of metabolism. *FASEB J* 30: 3669–3681, 2016.
112. Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, and Hatfield DL. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol* 87: 953–961, 2009.
113. Shetty SP and Copeland PR. Selenocysteine incorporation: a trump card in the game of mRNA decay. *Biochimie* 114: 97–101, 2015.
114. Shibatani T, David LL, McCormack AL, Frueh K, and Skach WR. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44: 5982–5992, 2005.
115. Shrimal S, Cherepanova NA, and Gilmore R. DC2 and KCP2 mediate the interaction between the oligosaccharyltransferase and the ER translocon. *J Cell Biol* 216: 3625–3638, 2017.
116. Sponholz S, von der Hagen M, Hahn G, Seifert J, Richard P, Stoltenberg-Didinger G, Ferreiro A, and Kaindl AM. Selenoprotein N muscular dystrophy: differential diagnosis for early-onset limited mobility of the spine. *J Child Neurol* 21: 316–320, 2006.
117. Sun LH, Pi DA, Zhao L, Wang XY, Zhu LY, Qi DS, and Liu YL. Response of selenium and selenogenome in immune tissues to lps-induced inflammatory reactions in pigs. *Biol Trace Elem Res* 177: 90–96, 2017.
118. Sunde RA. Selenium regulation of selenoprotein enzyme activity and transcripts in a pilot study with Founder strains from the Collaborative Cross. *PLoS One* 13: e0191449, 2018.
119. Tabas I and Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13: 184–190, 2011.
120. Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka DL, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coffec I, Lesage J, Vieau D, Lihmann I, Jegou B, and Anouar Y. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* 152: 4322–4335, 2011.
121. Touat-Hamici Z, Legrain Y, Bulteau AL, and Chavatte L. Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 289: 14750–14761, 2014.
122. Tu BP and Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341–346, 2004.
123. Um JW and Ko J. Neural Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in synaptic specification. *Trends Cell Biol* 27: 931–945, 2017.
124. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, and Prevarskaya N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117: 4135–4142, 2004.
125. Vander Heyden AB, Naismith TV, Snapp EL, and Hanson PI. Static retention of the luminal monotopic membrane

- protein torsinA in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 30: 3217–3231, 2011.
126. Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E, Hashimoto AS, and Hoffmann PR. Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. *J Immunol* 186: 2127–2137, 2011.
127. Walter P and Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081–1086, 2011.
128. Wang M and Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529: 326–335, 2016.
129. Wang Q, Groenendyk J, and Michalak M. Glycoprotein quality control and endoplasmic reticulum stress. *Molecules* 20: 13689–13704, 2015.
130. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124, 1999.
- 130a. Xu D and Zhang Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* 80: 1715–1735, 2012.
131. Yim SH, Clish CB, and Gladyshev VN. Selenium deficiency is associated with pro-longevity mechanisms. *Cell Rep* 27: 2785–2797.e3, 2019.
132. Yim SH, Everley RA, Schildberg FA, Lee SG, Orsi A, Barbati ZR, Karatepe K, Fomenko DE, Tsuji PA, Luo HR, Gygi SP, Sitia R, Sharpe AH, Hatfield DL, and Gladyshev VN. Role of selenof as a gatekeeper of secreted disulfide-rich glycoproteins. *Cell Rep* 23: 1387–1398, 2018.
133. Yoboue ED, Sitia R, and Simmen T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis* 9: 331, 2018.
134. Yu SS and Du JL. Selenoprotein S: a therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? *Cardiovasc Diabetol* 16: 101, 2017.
135. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, and Dong W. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 4350965, 2016.
136. Zhao H, Tang J, Xu J, Cao L, Jia G, Long D, Liu G, Chen X, and Wang K. Selenoprotein genes exhibit differential expression patterns between hepatoma HepG2 and normal hepatocytes LO2 cell lines. *Biol Trace Elem Res* 167: 236–241, 2015.

Address correspondence to:  
**Dr. Isabelle Lihmann**  
 Rouen-Normandie University  
 UNIROUEN, Inserm, U1239  
 Neuronal and Neuroendocrine  
 Differentiation and Communication Laboratory  
 Mont-Saint-Aignan Cedex 76821  
 France

E-mail: isabelle.lihmann@univ-rouen.fr

Date of first submission to ARS Central, October 30, 2019; date of final revised submission, May 25, 2020; date of acceptance, May 26, 2020.

#### Abbreviations Used

1R, 2R = two basal rounds of vertebrate genome doubling  
 3R = teleost fish-specific genome doubling  
 ACTH = adrenocorticotrophic hormone  
 AMPK = AMP-activated protein kinase  
 Asn = asparagine  
 ATF6 = activating transcription factor 6  
 BiP = 78-kDa glucose-regulated protein  
 Ca<sup>2+</sup> = calcium  
 CALR = calreticulin  
 CaMKII = calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II  
 cAMP = 3',5'-cyclic adenosine monophosphate  
 CANX = calnexin  
 Cbr3 = carbonyl reductase 3  
 CDG = congenital disorders of glycosylation  
 CNS = central nervous system  
 CRF = corticotropin-releasing factor  
 CVSU = Cys-Val-Ser-Sec redox motif  
 Cys, C = cysteine  
 DAD1 = defender against cell death 1  
 DHHC6 = Asp-His-His-Cys single letter symbols  
 DIO = iodothyronine deiodinase  
 DTNB = 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid  
 eEFSec = eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific  
 ER = endoplasmic reticulum  
 ERAD = ER-associated protein degradation  
 ERO1 = ER oxidoreductin 1  
 GFP = green fluorescent protein  
 Glc = glucose  
 GlcNAc = N-acetylglucosamine  
 GPI = glycosylphosphatidylinositol  
 GPI-AP = GPI-anchored protein  
 GPx = glutathione peroxidase  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = hydrogen peroxide  
 IP3R = inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
 IRE1 = serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1  
 KCP2 = keratinocyte-associated protein 2  
 KO = knockout  
 LoF = loss of function  
 MAGT1/IAP = magnesium transporter protein 1  
 MAM = mitochondria-associated membrane  
 Man = mannose  
 MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine  
 NRF-1 = nuclear respiratory factor 1  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup> = superoxide anion  
 OH<sup>\*</sup> = hydroxyl radical  
 OST = oligosaccharyltransferase  
 OST4 = OST 4-kDa subunit  
 OST48 = OST 48-kDa subunit  
 PAC1R = PACAP type 1 receptor  
 PACAP = pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide  
 PD = Parkinson's disease  
 PDI = protein disulfide isomerase

**Abbreviations Used (Cont.)**

PERK = protein kinase RNA-like  
endoplasmic reticulum kinase  
PGC-1 $\alpha$  = peroxisome proliferator-activated  
receptor gamma coactivator  
1-alpha  
PIP2 = phosphatidylinositol-4,5-  
bisphosphate  
PKA = protein kinase A  
PLC = phospholipase C  
POMC = proopiomelanocortin  
PRX4 = peroxiredoxin 4  
PSELT = SELENOT43-52  
Rdx = thioredoxin-type selenoproteins  
ROS = reactive oxygen species  
RPN1 = ribophorin 1  
RPN2 = ribophorin 2  
RyR = ryanodine receptor  
S = sulfur  
SBP2 = SECIS binding protein  
Se = selenium  
Sec, U = selenocysteine  
SECIS = selenocysteine insertion sequence  
SELENOF, SEP15 = selenoprotein F  
SELENOH = selenoprotein H

SELENOK, SELK = selenoprotein K  
SELENOM, SEPM = selenoprotein M  
SELM  
SELENON, SEPN1 = selenoprotein N  
SELN  
SELENOS, SELS, = selenoprotein S  
VIMP, SEPS  
SELENOT, SeIT = selenoprotein T  
SELENOV = selenoprotein V  
SELENOW = selenoprotein W  
SelPep = brain-penetrant selenopeptide-Tat  
SERCA = sarco/endoplasmic reticulum  
Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SH3 = Src-homology 3  
SOD1, Cu/Zn-SOD = Cu/Zn-superoxide dismutase  
SOD2, Mn-SOD = manganese superoxide dismutase  
T3 = 3,5,3'-triiodothyronine  
T4 = 3,5,3',5'-tetraiodothyronine  
TMEM258 = transmembrane protein 258  
TrxR = thioredoxin reductase  
TUSC3/N33 = tumor suppressor candidate 3  
UGGT = UDP-glucose:glycoprotein  
glucosyltransferase  
UPR = unfolded protein response  
Xbp1 = X-box binding protein 1





## Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion

Abdallah Hamieh<sup>1,2</sup>, Dorthé Cartier<sup>1,2</sup>, Houssni Abid<sup>1,2</sup>, André Calas<sup>3</sup>, Carole Burel<sup>2,4</sup>,  
Christine Bucharles<sup>1,2</sup>, Cedric Jehan<sup>1,2</sup>, Luca Grumolato<sup>1,2</sup>, Marc Landry<sup>3</sup>, Patrice Lerouge<sup>2,4</sup>,  
Youssef Anouar<sup>1,2</sup> & Isabelle Lihmann<sup>1,2,\*</sup>

### Abstract

Selenoprotein T (SelT) is a recently characterized thioredoxin-like protein whose expression is very high during development, but is confined to endocrine tissues in adulthood where its function is unknown. We report here that SelT is required for adaptation to the stressful conditions of high hormone level production in endocrine cells. Using immunofluorescence and TEM immunogold approaches, we find that SelT is expressed at the endoplasmic reticulum membrane in all hormone-producing pituitary cell types. SelT knockdown in corticotrope cells promotes unfolded protein response (UPR) and ER stress and lowers endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) and hormone production. Using a screen in yeast for SelT-membrane protein interactions, we sort keratinocyte-associated protein 2 (KCP2), a subunit of the protein complex oligosaccharyltransferase (OST). In fact, SelT interacts not only with KCP2 but also with other subunits of the A-type OST complex which are depleted after SelT knockdown leading to POMC N-glycosylation defects. This study identifies SelT as a novel subunit of the A-type OST complex, indispensable for its integrity and for ER homeostasis, and exerting a pivotal adaptive function that allows endocrine cells to properly achieve the maturation and secretion of hormones.

**Keywords** ER stress; KCP2; N-glycosylation; oligosaccharyl transferase; pituitary

**Subject Categories** Membrane & Intracellular Transport; Physiology; Post-translational Modifications, Proteolysis & Proteomics

**DOI** 10.15252/embr.201643504 | Received 13 October 2016 | Revised 4 August 2017 | Accepted 9 August 2017 | Published online 19 September 2017

**EMBO Reports (2017) 18: 1935–1946**

### Introduction

A particular class of ER proteins named selenoproteins incorporates the essential micronutrient selenium (Se) as the 21<sup>st</sup> amino

acid selenocysteine (Sec; U) through a highly regulated mechanism requiring specific intracellular limiting factors and a dedicated tRNA (tRNA<sub>Sec</sub>) for the Sec residue [1–4]. Twenty-five selenoproteins were identified in the human genome, which localize to various cellular compartments including the ER and are involved in diverse biological processes [2–6]. Among them, glutathione peroxidases and thioredoxin reductases control redox homeostasis, while iodothyronine deiodinases are important in the activation and deactivation of thyroid hormones [4,7–9], but the role of many selenoproteins is still elusive. The absence of all selenoproteins obtained by suppression of the Trsp gene encoding the tRNA<sub>Sec</sub> results in early death of embryos due to abnormal growth of the skeleton and cartilage [10]. Moreover, selenoprotein deficiency has been associated with cerebral and cardiovascular dysfunction and cancer [11–13].

Selenoprotein T (SelT) is a thioredoxin-like enzyme with a CXXU motif, which is up-regulated during neuroendocrine cell differentiation [14,15]. It is widely expressed during development [16,17], and its genetic ablation in mice results in embryonic lethality before embryonic day (E)8 [15]. SelT gene expression is temporally tightly regulated since its levels decline in most adult tissues, except in endocrine glands such as pituitary, pancreas, testis, and thyroid where they remain elevated [16,17]. Akin to other selenoproteins such as SelN, SelM, and SelK, SelT may contribute to the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the ER [5,14,18,19].

In the present study, we sought to decipher the precise function of SelT in endocrine cells such as pituitary cells. Indeed, the anterior pituitary gland contains several hormone-producing cell types, which can markedly remodel their metabolism in response to changes in endocrine needs of the organism. It plays a major role in mammalian physiology by regulating growth, metabolism, lactation, stress, and reproduction [20]. We show here that, in endocrine cells, SelT is a novel subunit of the A-type oligosaccharyltransferase (OST) complex indispensable for its integrity, for ER homeostasis and glycoprotein hormone secretion.

<sup>1</sup> Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Rouen-Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1239, Mont-Saint-Aignan, France

<sup>2</sup> Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France

<sup>3</sup> Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>4</sup> Glyco-MEV Laboratory, Rouen-Normandie University, UNIROUEN, Mont-Saint-Aignan, France

\*Corresponding author. Tel: +(33)235 14 6626; Fax: +(33) 235 14 6946; E-mail: isabelle.lihmann@univ-rouen.fr

## Results and Discussion

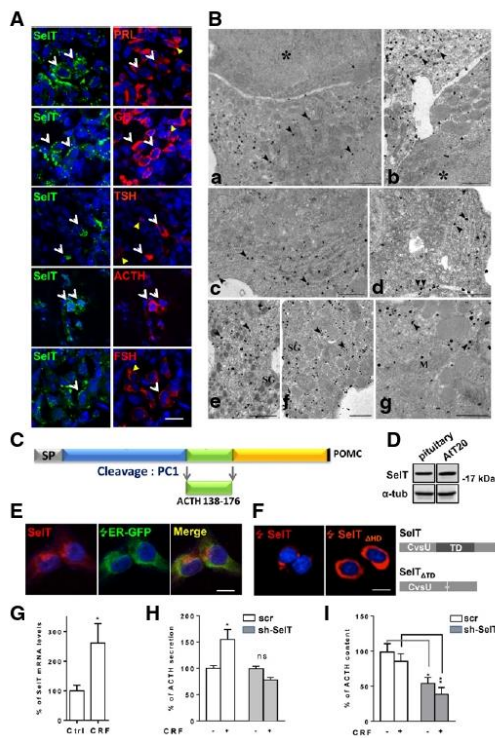
### Alteration of adrenocorticotrophic hormone secretion in SelT-deficient corticotrope cells

In line with our previous studies [16,17], SelT immunoreactivity was detected in the anterior pituitary, within all endocrine cells, including lactotrope, gonadotrope, thyrotrope, corticotrope, and somatotrope cells (Fig 1A), albeit at a great inter-cell variability also evidenced at the ultrastructural level using a high-resolution silver-amplified immunogold TEM analysis (Fig 1B<sub>a,b</sub>). SelT was observed at the ER membrane (Fig 1B<sub>c,d</sub>), and occasionally at the plasma membrane (Fig 1B<sub>d</sub>), but not in secretory granules (Fig 1B<sub>e,i</sub>) or mitochondria (Fig 1B<sub>g</sub>). In the corticotrope AtT20 cells, which produce and release in a corticotropin-releasing factor (CRF)-dependent manner the multivalent prohormone proopiomelanocortin (POMC) and its processing product adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Fig 1C), SelT protein was also readily detected (Fig 1D). Immunofluorescence images showed that SelT staining in these cells largely, although not exclusively, colocalizes with the staining of the ER (Fig 1E), consistent with our TEM data (Fig 1B) and with other results indicating the presence of SelT in ER, and also in Golgi [14,21]. The deletion of a SelT region (positions 85–103 and

125–144 of NP\_001035486.2) with two predicted (TMPRED software) transmembrane helices led to a diffuse relocation of the protein in the cytosol (Fig 1F), indicating that this domain is necessary and sufficient to retain SelT in the ER compartment. Treatment by CRF (100 nM; 24 h) increased SelT mRNA levels (2.6-fold; Fig 1G) and ACTH secretion (1.5-fold; Fig 1H) in AtT20 cells. In contrast, SelT depletion led to a reduction of basal ACTH secretion and abrogation of the CRF-induced ACTH secretion (Fig 1H), associated with a 45–55% reduction in ACTH content in control and CRF-stimulated cells (Fig 1I). Altogether, these data indicate that SelT is essential for basal- and stimulated-hormone production, in agreement with our previous work showing insulin production deficiency in SelT-insKO mice [16].

### SelT is essential to maintain ER homeostasis

In addition to hormone production defect, SelT-deficient cells also showed an ER dilatation, visualized by ER-DsRed distribution, like cells exposed to a non-permissive temperature (39°C) (Fig 2A) [22]. SelT knockdown also significantly increased CHOP (twofold) and BIP (fourfold) levels (Fig 2B), two of the best studied proteins induced by ER stress [23]. Activated UPR sensors send information to the nucleus to regulate the transcription of many genes to resolve



**Figure 1. Alteration of adrenocorticotrophic hormone secretion in SelT-deficient corticotrope cells.**

**A** Double immunostaining of pituitary sections for SelT (green) and hormones (red). Nuclei were labeled with DAPI (blue). Each hormone positive cell type expresses SelT (white arrows), but not all cells (yellow arrows) contain SelT. Scale bar, 12  $\mu$ m.

**B** TEM images of adenohypophysis showing SelT ultrastructural distribution. Sections were treated with SelT antibody and visualized with silver-enhanced, gold-labeled secondary antibodies. (a, b) Heavily labeled cells revealed by silver grains (arrowheads) are adjacent to weakly labeled ones (asterisks) characterized by distinct secretory content (arrows). (c, d) Immunopositive cells display silver grains on the ER membrane (arrowheads) and at the plasma membrane (double arrowhead in d). (e–g) Labeling (arrowheads) is restricted to cytoplasmic domains excluding secretory granules (SG) and mitochondria (M). Scale bar, 0.5  $\mu$ m.

**C** Schematic representation of POMC, which generates ACTH after cleavage by PC1 in AtT20 cells.

**D** Western blot analysis of SelT expression in mouse pituitary and pituitary corticotrope AtT20 cells.

**E** Immunohistochemical analysis of Myc-SelT (red) intracellular distribution in AtT20 cells; the ER compartment was labeled with transiently expressed ER-GFP (green). DAPI was used to stain the nuclei. Scale bar, 12  $\mu$ m.

**F** A Myc-SelT variant carrying a deletion of the hydrophobic domains (SelT $\Delta$ TD) showed relocation from the ER (left) to the cytosol (right). Scale bar, 12  $\mu$ m.

**G** qRT-PCR analysis of SelT expression in the presence of CRF (100 nM, 24 h) in scr shRNA-transduced AtT20 cells. Asterisks denote statistical significance. Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ , \* $P < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

**H** Analysis of ACTH concentration in cell culture supernatants by ACTH ELISA assay. Scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells were treated with 100 nM of CRF for 24 h. Data are expressed as percentage of control (untreated cells; set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ , \* $P < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

**I** Analysis of scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells content by ACTH ELISA assay. Data are expressed as percentage of control (untreated AtT20 cells; set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ , \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , two-way ANOVA).

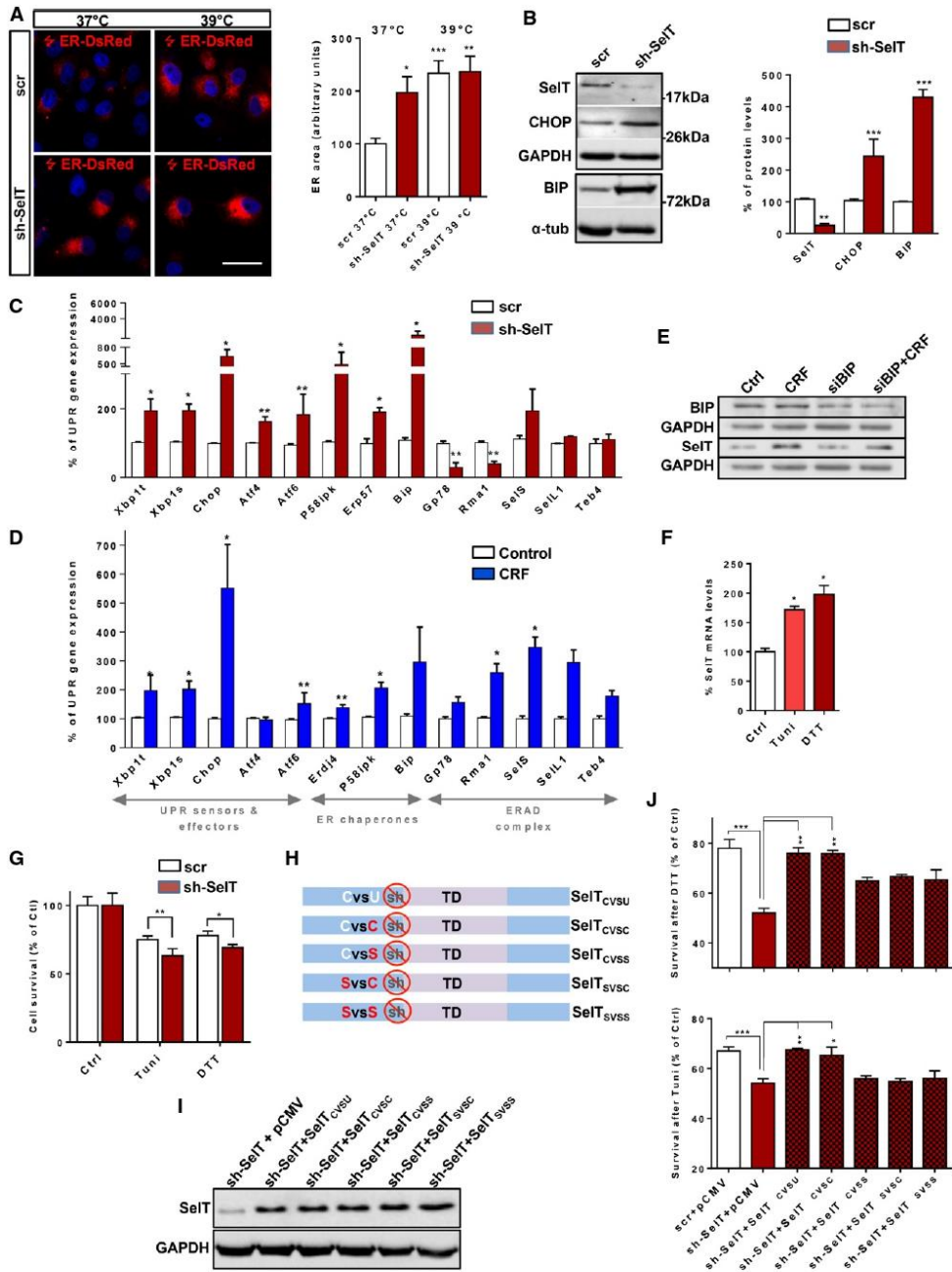


Figure 2.



**Figure 2. SelT is required for ER homeostasis.**

- A Confocal imaging of ER in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells transfected with ER-DsRed vector (red) and grown at 37 or 39°C for 16 h. Nuclei were labeled with DAPI (blue). The number of red pixels per cell, representing the ER area, was measured using the ImageJ software. Data are expressed as percentage of control (scr transfected cells grown at 37°C; set to 100). Scale bar, 25  $\mu$ m. Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ ; Mann–Whitney test).
- B Western blot analysis of ER stress markers, CHOP and BIP, in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells. GAPDH was used as an internal loading control. Relative protein levels were measured with the Image Lab software (Bio-Rad) and expressed as percentage of control (scr set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; Mann–Whitney test).
- C qRT–PCR analysis of the expression of ER stress-responsive genes in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells. Data are expressed as percentage of control (scr set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Mann–Whitney test).
- D qRT–PCR analysis of the expression of ER stress-responsive genes in scr and CRF (100 nM, 24 h)-treated scr cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 2$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Mann–Whitney test).
- E Western blot analysis of SelT and BIP expression in AtT20 cells after *Bip* knock down in basal conditions and after CRF (100 nM) treatment for 24 h.
- F qRT–PCR analysis of SelT expression in the presence of two ER stressors, Tuni (1  $\mu$ g/ml) and DTT (100  $\mu$ M) for 6 h in wild-type (scr) AtT20 cells (Ctrl set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ –5; \* $P < 0.01$ ; one-way-ANOVA).
- G Comparison of the viability of scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells treated with Tuni (1  $\mu$ g/ml) or DTT (100  $\mu$ M) for 24 h. Data are expressed as percentage of control (scr set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ; \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.01$ ; one-way-ANOVA).
- H Schematic representation of shRNA-resistant forms of SelT, native, or carrying a series of substitutions in the CSVU motif, designed to rescue the SelT shRNA effect.
- I Detection of recombinant SelT mutants in SelT shRNA-expressing AtT20 cells by Western blot analysis.
- J Viability analysis of scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells rescued with a series of mutants described in (H), in ER stress conditions using 1  $\mu$ g/ml Tuni (top panel) or 100  $\mu$ M DTT (bottom panel) for 24 h. Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; Mann–Whitney test).

Source data are available online for this figure.

protein misfolding and restore an efficient protein-folding environment. Indeed, the UPR sensor gene *Atf6* and the effector genes *ChoP* and *Atf4* were significantly activated in shSelT-treated cells. Total *Xbp1* mRNA levels were also increased by  $\sim 2$ -fold, as was the spliced form of *Xbp1* mRNA encoding the active form of XBP1. Among ER chaperones, *Bip* mRNA was tremendously increased (Fig 2C). Noteworthy, UPR activation in AtT20 cells was also observed upon CRF treatment (100 nM, 24 h) (Fig 2D), consistent with the notion that in tissues with intense secretory activity, a physiological UPR is activated to prevent ER stress [24–28]. Thus, in endocrine cells, SelT could be instrumental for the protection against ER stress generated during stimulation of hormone production.

We next investigated whether SelT expression is controlled by UPR activation, using a siRNA against *Bip/Grp78* whose suppression activates UPR signaling [29,30]. Neither basal nor CRF-induced SelT expression was altered by BIP knockdown (Fig 2E), thus ruling out this possibility. In contrast, tunicamycin (Tuni; 1  $\mu$ g/ml) and dithiothreitol (DTT; 100  $\mu$ M), two commonly used ER stressors, increased SelT mRNA levels (Tuni, 1.6-fold; DTT, twofold) after 6-h treatment (Fig 2F). Furthermore, SelT depletion caused an increase in the sensitivity to these ER stress inducers (Fig 2G) since cell viability was reduced by 25 and 20% in control cells, and by 37 and 31% in SelT-depleted cells, after 24 h treatment by Tuni or DTT, respectively. Control rescue experiments were performed by expressing various shRNA-resistant forms of SelT mRNA, some carrying mutations in the redox CXXU center, but all containing the SECIS sequence necessary to direct incorporation of the Sec residue at the stop codon (Fig 2H) and produce full-length proteins in AtT20 cells (Fig 2I). Recombinant SelT<sub>CSVU</sub> and SelT<sub>CSVSC</sub>, but not mutants with Cys or Sec disruption in the redox center, restored survival of AtT20 cells exposed to both ER stressors (Fig 2J). Of note, SelT knockdown did not alter survival of AtT20 cells in basal condition, suggesting that SelT activity is essential for adaptation to the stressful conditions of high hormone level production, but not for survival of quiescent endocrine cells. The variability of SelT levels that we observed within the same anterior pituitary cell populations may

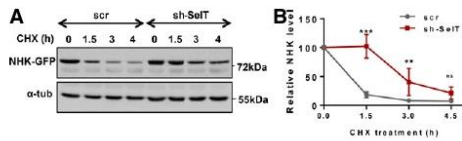
thus reflect the existence of discrete cell subpopulations which differ in their molecular signaling and secretory activity in order to finely adjust their dynamic response to the specific hormonal requirements [31,32]. Overall, these data suggest that SelT redox function is pivotal to maintain ER homeostasis and cell survival when pharmacological (Tuni, DTT) or physiological (CRF) disruption of ER folding events lead to the buildup of unfolded polypeptides in the ER lumen and thus to ER stress [33].

#### SelT-depleted cells are defective in ER-associated degradation of unfolded proteins

Although ERAD gene activation in SelT-depleted cells was expected as a consequence of IRE1 $\alpha$  and ATF6 activation [34], a drastic decrease of *Gp78* (72%) and *Rmal* (76%) gene expression was found (Fig 2C), suggesting that misfolded proteins may accumulate in the ER after SelT knockdown due to ERAD dysfunction. To address this issue, we monitored in the presence of cycloheximide the degradation of the green fluorescent protein (GFP)-tagged secretion-incompetent variant mutant of human  $\alpha 1$ -antitrypsin (Null Hong Kong mutant or NHK), which does not fold properly and is targeted for degradation by the proteasome [35]. NHK-GFP was rapidly degraded in cells transfected with the control scrambled (scr) shRNA, that is, 20% was left at 1.5 h of cycloheximide treatment and less than 10% at 3-h treatment. However, this degradation was delayed in SelT-depleted cells, where 100% was left at 1.5 h of cycloheximide treatment and 40% at 3-h treatment (Fig 3A and B), supporting the notion of a failure of ERAD to eliminate misfolded proteins in SelT-deficient corticotrope cells, although a possible proteasome deficiency could be also involved. The latter hypothesis remains to be explored.

#### SelT interacts with KCP2 and stabilizes A-type OST subunits

ER membrane is known as a privileged site to recruit proteins into complexes, and several membrane-bound selenoproteins like selenoproteins S, K, and N have been shown to be associated with



**Figure 3. SelT deficiency slows down ER-associated protein degradation.**

**A** Scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells were transiently transfected with an expression plasmid encoding the GFP-tagged Hong Kong variant of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin (NHK-GFP). AtT20 cells were pulse-chased for the indicated time and analyzed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody.  $\alpha$ -tubulin was used as an internal loading control.  
**B** Quantification of GFP-tagged NHK degradation rate in (A). Relative NHK-GFP levels were calculated by dividing the normalized GFP signals in cells after 1.5, 3, and 4.5 h of cycloheximide (CHX) treatment with that of untreated cells (untreated cells set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; two-way ANOVA test).

Source data are available online for this figure.

protein complexes [18,36–39]. In order to identify SelT interactants, we used a modified split-ubiquitin system for *in vivo* detection of interactions between transmembrane proteins in yeast. The full-length rat SelT, in which the Sec was converted to a Cys because yeast does not have the selenoprotein synthesis machinery, was used as bait. Four clones from different colonies were sorted, all containing the full-length cDNA encoding keratinocyte-associated protein 2 (alias KCP2; Krtcap2; GID:142382643). This ER 14-kDa protein comprising 136-aa and three transmembrane spans (Fig 4A and B) was characterized from solubilized actively engaged ribosomes within the OST complex [40–42]. Noteworthy, KCP2 is abundant in active secretory tissues [43]. Co-immunoprecipitation (co-IP) experiments showed that endogenous KCP2 coprecipitates with endogenous SelT and *vice versa* in AtT20 cells (Fig 4C), supporting the specific interaction between SelT and KCP2 in these cells. The OST complex catalyzes the *en bloc* transfer of preassembled

high-mannose oligosaccharides onto asparagine residues present within the N-X-T/S motif of nascent polypeptides entering the lumen of the rough ER, a process essential for the productive folding, stability, trafficking, ligand-binding, and interaction with extracellular matrix of many secretory and membrane proteins [44–47]. Two OST isoforms exist, the A and B types, which are distinguished by the presence of STT3A or STT3B catalytic subunits [48], and have complementary roles to optimize protein N-glycosylation. The A-type catalyzes the cotranslational N-glycosylation of nascent proteins, while the B type performs the post-translational N-glycosylation of particular sequons [46]. A series of five non-catalytic subunits are also present in each complex including ribophorin I, ribophorin II, OST48, DAD1, and OST4, as well as isoform-specific subunits, that is, Tusc3, MagT1, KCP2, and DC2 [49]. Co-IP studies revealed that, in non-denaturing conditions, in addition to KCP2, SelT also associates with STT3A and OST48 but not with STT3B (Fig 4D), in line with previous data showing that KCP2 is a preferential subunit of the A-type OST complex [41,42]. SelT and KCP2 interactions were further validated by immunofluorescence data showing that SelT and KCP2 signals overlap in AtT20 cells (Fig 4E). In addition, both SelT and KCP2 were detected in microsomal membranes (Fig 4F), although SelT was not systematically present, suggesting that it may be associated with the membrane under certain conditions, or that its association with the membrane is weak [39]. A treatment with Tuni did not change the migration pattern of SelT (Fig 4G), ruling out the possibility that SelT is transiently associated with OST to be N-glycosylated.

We next tested the possibility that SelT is necessary for the assembly or the stability of the A-type OST complex, as shown previously for other subunits [40,46,50]. We found that stable expression of a SelT shRNA in AtT20 cells, which decreased SelT protein content by 76% as compared to cells expressing the scr shRNA (Fig 4H), also reduces KCP2, STT3A, OST48, but not STT3B, protein levels (Fig 4I), while their respective mRNA levels were unaffected (Fig 4J). Similarly, the levels of the  $\beta$  subunit of the ER resident Sec61 translocon, which often copurifies with OST, were

**Figure 4. SelT interacts with KCP2 and stabilizes A-type OST subunits.**

**A** ER membrane topology of KCP2 (generated with Protter <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).  
**B** Schematic representation of the four KCP2-related prey fragments found to interact with SelT in the yeast two-hybrid screen. In green, luminal domains; in orange, cytoplasmic domains.  
**C** Co-immunoprecipitation analysis of SelT and KCP2 interactions in AtT20 cells. Proteins interacting with endogenous SelT and KCP2 were immunoprecipitated with SelT and KCP2 antibodies, respectively, and analyzed by Western blot. IgG, irrelevant antibody.  
**D** Co-immunoprecipitation analysis of SelT and STT3A, STT3B, and OST48 subunit interactions in AtT20 cells. Proteins interacting with endogenous SelT, STT3A, STT3B, OST48, and KCP2 were immunoprecipitated with SelT, STT3A, STT3B, OST48, and KCP2 antibodies, respectively, and analyzed by Western blot. IgG, irrelevant antibody.  
**E** Dual immunofluorescence staining showing SelT (green) and KCP2 (red) colocalization in AtT20 cells. Scale bar, 10  $\mu$ m.  
**F** Western blot detection of SelT and KCP2 in AtT20 cell microsomal preparation. SelT and KCP2 were detected in whole AtT20 cell lysate (Ctr) and in the microsomal (Mic) fraction.  
**G** Western blot analysis of SelT expression in control AtT20 cells in the presence or absence of Tuni (1  $\mu$ g/ml). GAPDH was used as an internal loading control.  
**H** Western blot analysis of SelT expression in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells.  $\alpha$ -tubulin antibody was used as a loading control. Data are expressed as percentage of control (scr; set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; t-test).  
**I** KCP2, STT3A, OST48, STT3B, and Sec61 $\beta$  protein levels were analyzed by Western blot in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells. GAPDH was used as an internal loading control. Relative protein levels were measured with the Image Lab software (Bio-Rad) and expressed as percentage of control (scr; set to 100) (right panel). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Mann-Whitney test).  
**J** qRT-PCR analysis of KCP2, STT3A, and OST48 mRNA levels in scr and SelT shRNA-transduced AtT20 cells. Data are expressed as percentage of control (scr; set to 100). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ; Mann-Whitney test).  
**K** KCP2, SelT, STT3A, and OST48 protein levels were analyzed by Western blot in scr and KCP2 siRNA-transduced AtT20 cells.  $\alpha$ -tubulin was used as an internal loading control. Relative protein levels were measured with the Image Lab software (Bio-Rad) and expressed as percentage of control (scr; set to 100) (right panel). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ; \* $P < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

Source data are available online for this figure.

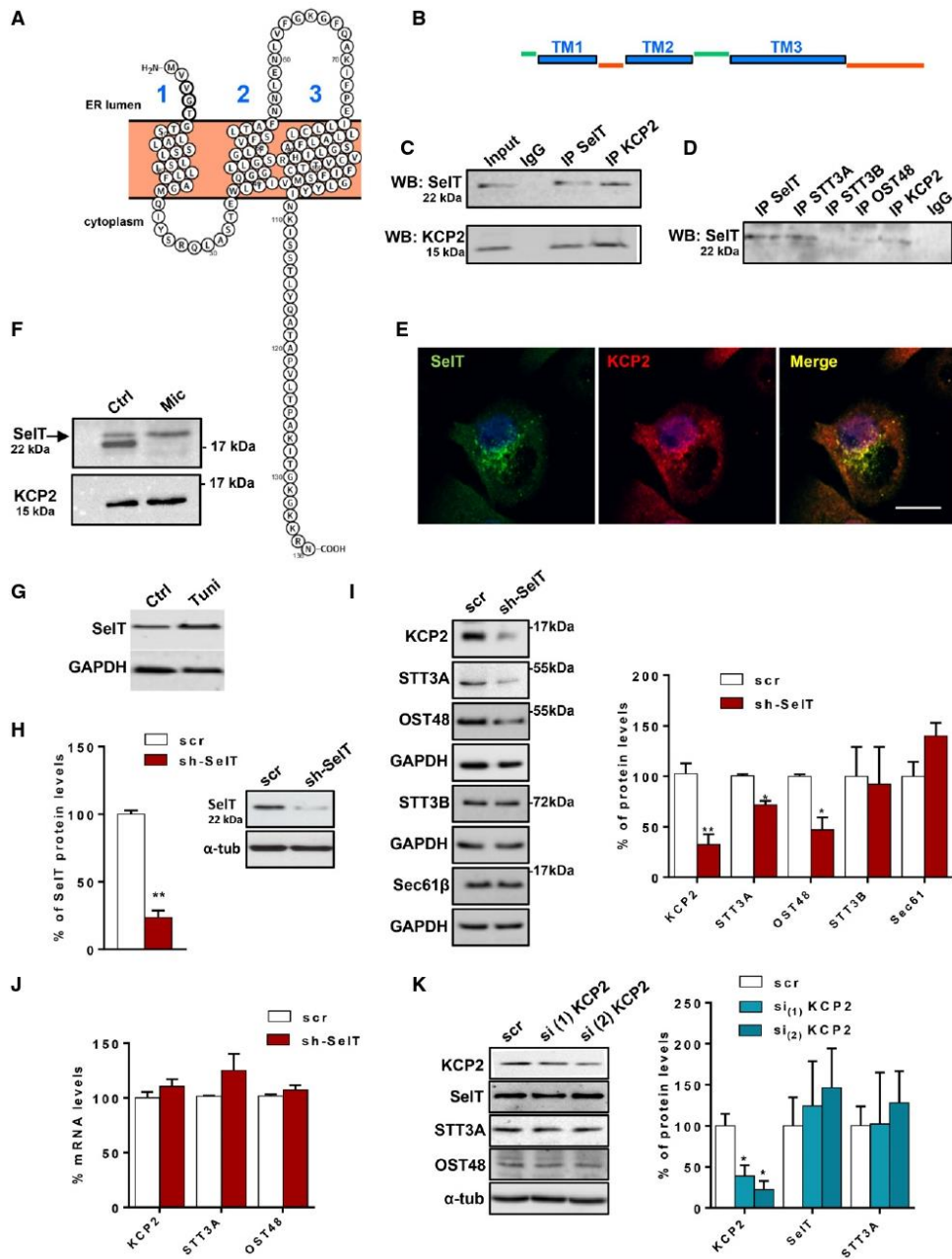
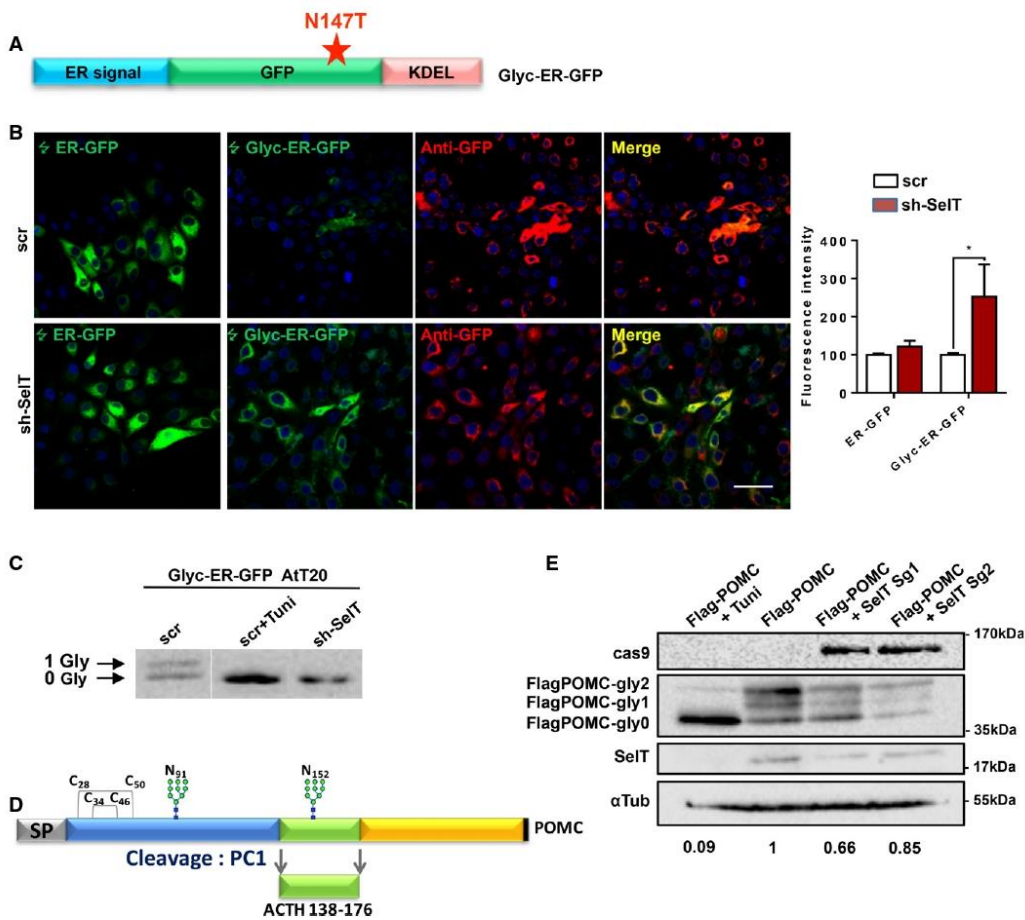


Figure 4.



**Figure 5. SeIT depletion perturbs N-glycosylation.**

**A** Schematic representation of the Glyc-ER-GFP construct. Red star: Mutation N147T inserted; ER signal: calreticulin ER signal sequence; KDEL: ER retention sequence (modified from Losfeld *et al.*, 2012).

**B** Scr and SeIT shRNA-transduced AT20 cells were transiently transfected with ER-GFP and Glyc-ER-GFP (green). Glyc-ER-GFP transfected cells were immunolabeled by anti-GFP (red). For Glyc-ER-GFP quantification, the number of green and red pixels was measured using the ImageJ software. Number of green pixels was normalized to the number of red pixels in each condition. Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bar, 50  $\mu$ m. Data are expressed as percentage of control (scr set to 100). Each value is the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ; \* $P < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

**C** Western blot analysis of expression of glycosylated or non-glycosylated GFP in scr and SeIT shRNA-transduced AT20 cells transiently transfected by Glyc-ER-GFP and treated or not with 1  $\mu$ g/ml of Tun1.

**D** Diagram of POMC precursor showing the disulfide bridges and the N-glycosylation sequons.

**E** Western blot analysis of glycoforms of exogenous Flag-POMC in AT20 cells, after SeIT gene disruption using CRISPR Cas9 technology, or in the presence of Tun1. Glycoforms in the cells invalidated for the SeIT gene by CRISPR Cas9 technology were expressed relative to the normalized signal in non-invalidated cells. Quantified values below gel lanes are for the displayed image, that is, representative of two or more experiments.

Source data are available online for this figure.

not altered upon SeIT depletion or when OST subunits are depleted [46,51] (Fig 4I). As an additional control, KCP2 deficiency did not affect SeIT or other A-type OST subunits (Fig 4K), as shown

previously [40]. Altogether, these data demonstrate that SeIT is required to maintain high levels of the A-type OST complex. Its high expression in adult tissues with high glycoprotein secretion activity

[16,17] resembles that of both KCP2 and STT3A and less that of STT3B [41,43], supporting the idea that SeIT associates with OST to contribute to its integrity preferentially in endocrine tissues when hormone demand is high. Whether the redox site, which is critical for other selenoproteins to form complexes [18,36], is also necessary for SeIT assembly with the A-type OST and/or its stabilization in endocrine cells remains to be determined.

### SeIT impacts protein N-glycosylation

Reduction of the expression of several A-type OST subunits, including KCP2, following SeIT depletion is expected to promote a reduction in protein N-glycosylation [40]. To address this issue, we first used a recently developed ER-retained GFP biomarker of N-glycosylation site occupancy whose fluorescence is lost when it is N-glycosylated, due to steric hindrance by the glycan [52] (Fig 5A). Scr and SeIT shRNA-transduced AtT20 cells were transfected with ER-GFP and Glyc-ER-GFP, and the GFP fluorescence analyzed after 48 h by confocal microscopy (Fig 5B). Transfection efficiency was assessed using an anti-GFP antibody. Glyc-ER-GFP expressed in scr shRNA-transduced cells did not glow, due to the presence of the N-glycan, but it produced a fluorescent pattern comparable to that seen with ER-GFP in SeIT shRNA-transduced cells, indicating that SeIT deficiency prevents the N-glycosylation of Glyc-ER-GFP as also shown in Fig 5C. We also explored the effect of SeIT depletion on POMC N-glycosylation. Recombinant POMC exists in three different forms, di- and mono-glycosylated and non-glycosylated due to the presence of two N-glycosylation sequons (Fig 5D). Tuni treatment prevented any N-glycosylation to yield only the non-glycosylated POMC isoform. SeIT depletion using two different SeIT guides for CRISPR Cas9-mediated SeIT gene editing led to a decrease in the ratio of glycosylated to total POMC, compared to control conditions (Fig 4E), indicating that POMC N-glycosylation is altered in cells where SeIT gene was disrupted. These results show that SeIT participate to the N-glycosylation of endogenous glycoproteins. The nature of its substrates is still unclear but several observations indicate that SeIT could specifically participate to the N-glycosylation of proteins harboring disulfide bridges. Indeed, SeIT expression persists in cells which produce glycoprotein hormones with disulfide bonds, like adult pancreatic insulin- and somatostatin-producing cells, but not in glucagon-producing cells [16], suggesting that it may participate to the N-glycosylation of acceptor sites present in cysteine-rich protein domains before disulfide bond formation, in the same way as MagT1/IAP and TUSC33/N33 present in the B-type OST complex [48].

In conclusion, our data revealed that SeIT is essential for ER homeostasis and signaling in order to ensure appropriate hormone production and secretion. They identify for the first time SeIT as a subunit of the STT3A-containing OST complex, which is necessary to maintain the integrity of this OST isoform and thereby to achieve N-glycosylation, a key process for endocrine activity [53] and whose deficiency is at the origin of a family of diseases referred to as congenital disorders of glycosylation (CDG) associated with hormonal disturbances [54]. Noteworthy, unicellular eukaryotes lack selenoproteins and selenoprotein synthesis machinery and have no KCP2 homologue that could be identified by sequence similarity. It has been proposed that the role of KCP2 in the A-type OST complex is related to the complexity of N-glycosylation in multicellular eukaryotes [41], a notion that is further supported by this

study showing the existence of a particular SeIT-containing OST devoted to N-glycosylation in endocrine cells.

## Materials and Methods

### Cell culture

Mouse corticotroph cells (AtT20), obtained from ATCC, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C. When treated with small hairpin RNA (shRNA), AtT20 cells were maintained in the same medium supplemented with 1 µg/ml of puromycin. ER stress was induced by 100 mM of DTT or 1 µg/ml Tuni for 24 h. In CRISPR Cas9 experiments, Tuni (1 µg/ml) was added in the cell culture medium 24 h after electroporation in order to inhibit N-glycosylation. For pulse-chased experiments with NHK-GFP, cycloheximide was used at 50 µg/ml.

### Plasmid constructs

Mouse SeIT cDNA comprising the SECIS sequence was amplified from AtT20 cells using forward and reverse primers (Table EV1) and cloned into a pGEM-T vector (Promega, Charbonnières, France). Site-directed mutagenesis was conducted by using the QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies, Les Ulis, France) and specific primers (Table EV1) designed to remove the SeIT shRNA recognition sequence or modify the Cys-X-X-Sec active site to Cys-X-X-Cys, Cys-X-X-Ser, Ser-X-X-Cys, and Ser-X-X-Ser. A Myc-SeIT variant was also constructed using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit to delete the transmembrane helices. Mutants were subsequently cloned in the pCMV-tag5 vector (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Nucleotide sequence of all constructs was verified by DNA sequencing.

### Immunohistochemistry

Adult mice (male) were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5. The pituitaries were removed and post-fixed in the same solution overnight at 4°C, cryoprotected in 15 and 30% of sucrose, and cut into 14-µm sections. A saturation step (1 h at room temperature) was performed with 1% normal goat serum diluted in a PBS solution containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100, prior to overnight incubation with primary antibodies at 4°C. Immunocytochemistry was carried out on AtT20 cells cultured in 12-well plates for 48 h and fixed in 4% PFA. A detailed description of primary antibodies is provided in Table EV2. Alexa-conjugated antibodies (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) including goat anti-rabbit (1:300), goat anti-guinea pig (1:300), goat anti-mouse (1:300) were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with 1 µg/ml 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) in PBS for 2 min. Tissue sections and cells were examined with a Leica SP2 upright confocal laser scanning microscope (DMRAX-UV) equipped with the Acousto-Optico Beam Splitter system (Leica) on the Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN, Rouen).



### Electron microscope immunohistochemistry

Electron microscopy studies were performed at the Bordeaux Imaging Center, a Core facility of the national infrastructure "France BioImaging" (ANR-10-INBS-04 FranceBioImaging). Adult, male Wistar rats were deeply anesthetized with pentobarbital and then intra-aortically perfused with physiological saline followed by 4% PFA and 0.25% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 15 min. Pituitary was removed and immersed in 4% PFA for an additional 2 h, then rinsed in PB overnight at 4°C. The adenohipophysis was cut in 100- $\mu$ m sagittal slices with a VT 1200S vibratome (Leica). These slices were pre-incubated in 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl and 0.05% Tween T20 (TNT) supplemented with 1% BSA and 1% glycine for 30 min at room temperature. Slices were then treated with the labmade rabbit anti-SeIT antibody diluted 1:400 in TNT buffer containing 1% BSA overnight at 4°C then rinsed three times for 10 min in the same buffer. They were incubated with anti-rabbit F(ab')<sub>2</sub> coupled with 1.4-nm gold particles (1:100; Aurion) in the same buffer for 2 h at room temperature. After rinsing and further fixation with 1% glutaraldehyde in PB for 10 min, slices were washed three times in water. Gold particles were silver-enhanced in a dark room using the HQ silver enhancement kit (Nanoprobes) for 5 min at room temperature, washed four times in water, then post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h in PB, dehydrated with ethanol, and flat-embedded in epon. After polymerization, ultra-thin sections perpendicular to the thickness of the vibratome slice were obtained with a Leica UCT ultramicrotome, eventually contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and finally observed with an H7650 Hitachi electron microscope. Control slices were submitted to the same treatment except primary antibody.

### Yeast split-ubiquitin two-hybrid analysis

Yeast split-ubiquitin two-hybrid screening was performed by Hybrigenics Services (Paris, France). The coding sequence of rat SeIT (GenBank accession number gi: 66393088) was PCR-amplified. It was cloned into pBT3-N plasmid in frame with the C-terminus of ubiquitin (Cub) coupled with the artificial transcription factor LexA-VP16 (LexA-VP16-Cub-SeIT), or into pBT3-STE in frame with the STE2 leader sequence at the N-terminus and ubiquitin (Cub) coupled with the artificial transcription factor LexA-VP16 (STE2-SeIT-Cub-N-LexA-VP16) at the C-terminus. The constructs were checked by sequencing the entire insert. Functional assays were performed to determine the best construct to use for the screen. The proper localization of the bait into the membrane was tested with known membrane proteins. The construct pBT3-STE was used as a bait to screen a dT-primed Mouse Embryo d 11 NubG-x (cDNA library constructed into pPR3-N). The prey proteins were expressed as a fusion to the N-terminal half of ubiquitin (NubG-x). Up to 59 million clones (15-fold the complexity of the library) were screened using a mating approach with NMY32ΔGal4 (mata) and HGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, mata) yeast strains as previously described (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Twenty His<sup>+</sup> colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine, and histidine and supplemented with 100 mM 3-aminotriazole to handle bait autoactivation. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' junctions. The resulting sequences were used to identify the

corresponding interacting proteins in the GenBank database (NCBI) using a fully automated procedure.

### Real-time polymerase chain reaction

Total RNA from AtT20 cells was isolated using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoert, France), and one  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using the ImPromITM Reverse-Transcription system (Promega) in the presence of random primers. Relative expression of the various genes was quantified by real-time PCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtabouef, France) and 300 nM of the appropriate primers (Table EV1) in an ABI prism 7900HT apparatus (Life Technologies, Villebon sur Yvette, France). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control for normalization, and results were expressed as 2<sup>- $\Delta$ ( $\Delta$ Ct)</sup> as described by the manufacturer.

### SeIT knockdown

SeIT silencing in AtT20 cells was carried out with a shRNA (Table EV1). A mouse SeIT shRNA oligonucleotide was designed (TATCTCCCTCAACCAATTTAT), and a scr shRNA not complementary to any mouse sequence was used as a control. SeIT and scr shRNAs were cloned into the lentiviral vector pVIRHD/EP containing a puromycin resistance gene. Constructs were verified by sequencing. In order to produce the lentivirus, HEK-293T cells were cotransfected with the lentiviral vector along with packaging (pCMV-dR8.74) and envelope (pMD2.G) plasmids. The conditioned medium containing the viral particles was collected 2, 3, and 4 days after transfection, centrifuged for 1 h at 500 g at 4°C, supplemented with 8  $\mu$ g/ml of polybrene, and added for overnight incubation to freshly plated ATt20 cells for infection. Two days after transduction, infected ATt20 cells were selected in 1  $\mu$ g/ml of puromycin. Knockdown efficiency was determined by Western blot analysis.

### CRISPR Cas9

SeIT gene inactivation was performed using Cas9-mediated genome editing via non-homologous end joining (NHEJ). Two SeIT sgRNA target sequences (Guide #1: 5'-TAAAGATGCAGTACGCCACC-3'; Guide #2: 5'-TCTTGCTGGCAGCCGCC-3') were designed using the CRISPR Design tool hosted by the Massachusetts Institute of Technology (<http://crispr.mit.edu>) to minimize potential off target effects. Oligos encoding the targeting sequence were annealed and ligated into the pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 [55] vector digested with BbsI (New England Biolabs). AtT20 (10<sup>6</sup> cells) were electroporated using the Amaxa Nucleofactor system "R" (Lonza, Basel, Switzerland) with 7.5  $\mu$ g of the CRISPR/Cas9 plasmid, or cotransfected with 5  $\mu$ g CRISPR/Cas9 plasmid and 5  $\mu$ g pFLAG-CMV-1 (Sigma Aldrich) expression vector containing the mouse POMC cDNA (positions 204-833; GenBank accession number NM\_001278584). POMC expression and SeIT expression were analyzed by Western blot 48 h after electroporation.

### Preparation of microsomes

Microsomes from AtT20 cells were prepared as described [56]. Briefly, confluent AtT20 cells cultured on two 500-cm<sup>2</sup> plates were collected, washed twice with PBS, and treated 5–10 min on ice with

an ice-cold lysis buffer composed of 10 mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) pH 7.5, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France). The lysate was transferred in a Dounce tissue grinder for a 20-stroke homogenization and centrifuged at 10,500 g for 15 min at 4°C, after addition of 5.6 ml of solution containing 0.5 M sucrose, 10 mM MOPS pH 7.5, 20 mM NaCl, 100 mM KCl, and 1 mM DTT. The supernatant was centrifuged first at 8,800 g for 20 min at 4°C and then at 100,000 g for 1 h at 4°C. After resuspension of the microsomal pellet in the same solution, another 100,000 g centrifugation for 1 h at 4°C was performed. The resulting pellet was dissociated in a solution composed of 10 mM MOPS pH 7.5, 250 mM sucrose, 10 mM NaCl, 50 mM KCl, and 0.5 mM DTT. Protein concentration was assayed using the Bradford method. Fractions of the microsomal preparation were shock frozen and stored at -80°C before use.

#### Western blot

AtT20 cells were homogenized with Cell Lysis Buffer containing 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The lysates were cleared by centrifugation at 14,000 g for 10 min at 4°C. Proteins were quantified using the Bradford method (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France), separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose sheets (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% non-fat dry milk in PBS. Nitrocellulose blots were subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Table EV2). Thereafter, blots were incubated for 1 h with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:2,000). Immunoreactive bands were visualized by detection of peroxidase activity by chemiluminescence (clarity Western ECL substrate, Bio-Rad). Quantitative analysis of immunoreactivity was performed with Bio-Rad ChemiDoc illumination system using the Image Lab software (Bio-Rad).

#### Co-immunoprecipitation

AtT20 cells were homogenized at 4°C for 10 min with lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The lysates were cleared by centrifugation at 14,000 g for 10 min at 4°C. Co-immunoprecipitations were performed by incubating 2 mg of lysate at 4°C overnight in the presence of 5 µg of a specific antibody and 25 µl of PureProteome Protein G magnetic beads (Millipore, Molsheim, France). Beads were then washed three times with PBS-Tween buffer and denatured with 1× Laemmli buffer at 95°C for 5 min. Samples were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

#### ACTH assay

Adrenocorticotrophic hormone concentrations were determined using ACTH (Rat, Mouse)-EIA kit (Phoenix, Strasbourg, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were cultured in serum-free DMEM medium with 100 nM of CRF for 24 h. Culture media were collected and used to measure secreted ACTH levels.

ACTH content was measured after cell lysis. Total ACTH was calculated by adding secreted and intracellular ACTH.

#### Cell viability

AtT20 cells were plated at a density of 10<sup>4</sup> cells per well in 96-well plates and incubated overnight. On the following day, cells were treated with ER stressors and incubated for an additional 24 h. Cell viability was measured using the CellTiter-Blue Cell Viability Assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence measurement was performed using the microplate reader Flexstation3 TECAN3 (Molecular Devices, Saint-Grégoire, France). For SeIT rescue experiments, SeIT cDNA constructs in pCMV were electroporated in stably SeIT shRNA-expressing cells using the Amaxa Nucleofactor system (Lonza, Basel, Switzerland). Viability was measured 24 h later as described above. The empty pCMV vector was used to assess the rescue specificity.

#### Data analysis

Values are given as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Western blot data are representative of a typical experiment repeated three times or more. Statistical analysis was performed by *t*-test or one and two-way ANOVA tests using the GraphPad prism software. Differences were considered significant when *P*-value was < 0.05.

**Expanded View** for this article is available online.

#### Acknowledgements

We thank Drs M. Courel (CNRS-UMR7622, Paris), G. Garrel (UMR8251, Paris), and F. Foulquier (CNRS, UMR 8576, Lille) for helpful advices and discussions; Méline Petrel and Sabrina Lacomme (Bordeaux Imaging Center, Bordeaux) for the preparation of electron microscopy samples; Drs N. Hosokawa (Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto), H. Freeze (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla), and M. Darmon (Inserm U894, Paris) for the NHK-GFP plasmid, the Gly-ER-GFP and ER-GFP constructs, and the dsRed plasmid, respectively. Anti-ACTH, anti-prolactin, anti-GH, anti-TSH, and anti-FSH antibodies were obtained from Dr A. F. Parlow, (NHPP, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA). This work was supported by Inserm (U1239), the Conseil Régional de Haute-Normandie, the Université de Rouen-Normandie, and the Interreg program TC2N.

#### Author contributions

IL and YA designed the experiments. AH, DC, HA, AC, CBur, CBuc, CJ, LG, ML, PL, YA, and IL performed the experiments and analyzed the data. AH, IL, and YA wrote the manuscript.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. Brocker MJ, Ho JM, Church GM, Soll D, O'Donoghue P (2014) Recoding the genetic code with selenocysteine. *Angew Chem Int Ed Engl* 53: 319–323
2. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9: 775–806

3. Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN (2014) Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci* 39: 112–120
4. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 94: 739–777
5. Diky A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* 46: 6871–6882
6. Kyukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439–1443
7. Hawkes WC, Alkan Z (2010) Regulation of redox signaling by selenoproteins. *Biol Trace Elem Res* 134: 235–251
8. Shchedrina VA, Zhang Y, Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2010) Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* 12: 839–849
9. Steinbrenner H, Speckmann B, Klotz LO (2016) Selenoproteins: antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch Biochem Biophys* 595: 113–119
10. Downey CM, Horton CR, Carlson BA, Parsons TE, Hatfield DL, Hallgrímsson B, Jirik FR (2009) Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, Trsp, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: a putative model for Kashin-Beck disease. *PLoS Genet* 5: e1000616
11. Rayman MP (2009) Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1533–1540
12. Shrimali RK, Irons RD, Carlson BA, Sano Y, Gladyshev VN, Park JM, Hatfield DL (2008) Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J Biol Chem* 283: 20181–20185
13. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ (2009) Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J* 422: 11–22
14. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerin NC et al (2008) Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* 22: 1756–1768
15. Boukhar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, Hajji SE, 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
16. Prevost C, Arabo A, Jian L, Quelenec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihmann I et al (2013) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154: 3796–3806
17. Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhar L, Manecka DL, Chagraoui A, Prevost C, 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
18. Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT, Grunwald DJ (2008) Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12485–12490
19. Reeves MA, Bellinger FP, Berry MJ (2010) The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid Redox Signal* 12: 809–818
20. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007) Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87: 933–963
21. Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, Hatfield DL (2009) Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol* 87: 953–961
22. Amodio G, Renna M, Paladino S, Venturi C, Tacchetti C, Moltedo O, Franceschelli S, Mallardo M, Bonatti S, Remondelli P (2009) Endoplasmic reticulum stress reduces the export from the ER and alters the architecture of post-ER compartments. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 2511–2521
23. Hiramatsu N, Joseph VT, Lin JH (2011) Monitoring and manipulating mammalian unfolded protein response. *Methods Enzymol* 491: 183–198
24. Brewer JW (2014) Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response. *Cell Mol Life Sci* 71: 1067–1079
25. Volchuk A, Ron D (2010) The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic beta-cell. *Diabetes Obes Metab* 12(Suppl 2): 48–57
26. Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 89–102
27. Gass JN, Gifford NM, Brewer JW (2002) Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem* 277: 49047–49054
28. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano F (2006) Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4: 245–254
29. Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS (2008) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 15: 1460–1471
30. Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR et al (2010) Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 17: 488–498
31. Gracia-Navarro F, Malagon MM, Castano JP, Garcia-Navarro S, Sanchez-Hormigo A, Luque RM, Peinado JR, Delgado E (2002) Secretory plasticity of pituitary cells: a mechanism of hormonal regulation. *Arch Physiol Biochem* 110: 106–112
32. Holl RW, Thorner MO, Mandell GL, Sullivan JA, Sinha YN, Leong DA (1988) Spontaneous oscillations of intracellular calcium and growth hormone secretion. *J Biol Chem* 263: 9682–9685
33. Cao SS, Kaufman RJ (2014) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal* 21: 396–413
34. Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15: 233–249
35. Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yoriyuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2: 415–422
36. Liu J, Rozovsky S (2015) Membrane-bound selenoproteins. *Antioxid Redox Signal* 23: 795–813
37. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, Osterheld HJ, Hess FM, Mercier F, Hoffmann PR (2014) Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHCG/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 16478–16483

38. Lee JH, Park KJ, Jang JK, Jeon YH, Ko KY, Kwon JH, Lee SR, Kim IY (2015) Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K binding to p97(VCP) protein is essential for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 290: 29941–29952
39. Shchedrina VA, Everley RA, Zhang Y, Gygi SP, Hatfield DL, Gladyshev VN (2011) Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* 286: 42937–42948
40. Roboti P, High S (2012) The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *J Cell Sci* 125: 3474–3484
41. Roboti P, High S (2012) Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *J Cell Sci* 125: 220–232
42. Shibatani T, David LL, McCormack AL, Frueh K, Skach WR (2005) Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry* 44: 5982–5992
43. Bonkobara M, Das A, Takao J, Cruz PD, Ariizumi K (2003) Identification of novel genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes. *Br J Dermatol* 148: 654–664
44. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 448–462
45. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35: 74–82
46. Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R (2009) Cotranslational and post-translational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136: 272–283
47. Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015) Cotranslational and post-translational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 41: 71–78
48. Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16: 47R–62R
49. Kelleher DJ, Karaoglu D, Mandon EC, Gilmore R (2003) Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol Cell* 12: 101–111
50. Dumax-Vorzet A, Roboti P, High S (2013) OST4 is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase required for efficient N-glycosylation. *J Cell Sci* 126: 2595–2606
51. Sanjay A, Fu J, Kreibich G (1998) DAD1 is required for the function and the structural integrity of the oligosaccharyltransferase complex. *J Biol Chem* 273: 26094–26099
52. Losfeld ME, Soncin F, Ng BG, Singec I, Freeze HH (2012) A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy. *FASEB J* 26: 4210–4217
53. Ikegami K, Liao XH, Hoshino Y, Ono H, Ota W, Ito Y, Nishiwaki-Ohkawa T, Sato C, Kitajima K, Iigo M et al (2014) Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Rep* 9: 801–810
54. Grunewald S (2007) Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early Hum Dev* 83: 825–830
55. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281–2308
56. Legeza B, Balazs Z, Nashev LG, Odermatt A (2013) The microsomal enzyme 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3 faces the cytoplasm and uses NADPH generated by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology* 154: 205–213



# Résumé de la thèse

La sélénoprotéine T est une protéine de type thiorédoxine qui est fortement exprimée au cours du développement et dans certains tissus sécréteur (endocrine/neuroendocrine) à l'âge adulte. Par un criblage de levure en double hybride et des expériences d'immunoprécipitation, son interaction avec le complexe oligosaccharyltransférase a été démontrée ainsi que son rôle dans la glycosylation de la proopiomélanocortine dans les cellules corticotropes. Cependant, l'importance de sa fonction redox dans ce processus n'est pas encore connue.

Nous avons utilisé un modèle cellulaire de neurones à POMC, mhypoA-POMC, obtenus à partir d'hypothalamus de souris pour générer deux lignées invalidées de manière stable pour la SELENOT par l'approche CRISPR-Cas9. Nous avons constaté dans les lignées KO une augmentation de la surface cellulaire, un aplatissement de la cellule, un étalement du RE, une perte des contacts entre le RE et la membrane plasmique, une augmentation de l'endocytose, un défaut d'extension des neurites, et une expression de la  $\beta$ -galactosidase. Cet ensemble de modifications suggère que les cellules KO pour la SELENOT sont sénescents. Nous avons aussi observé la perte spécifique de certains polysaccharides dans les cellules invalidées pour la SELENOT, en particulier les glycanes sialylés. L'étude de la topologie de la SELENOT révèle qu'elle adopte une structure en épingle à cheveux, le site catalytique CVSU émergeant dans la lumière du RE. Une approche de *thiol trapping* et de spectrométrie de masse a mis en évidence une interaction de la SELENOT avec une dizaine de partenaires redox potentiels, parmi lesquels le récepteur de l'inositol trisphosphate de type 1 (IP3R1), un canal du RE responsable de la mobilisation calcique, et ERLIN2, une protéine régulant l'expression d'IP3R1. Par ailleurs, une interaction indépendante des cystéines du centre redox avec le complexe OST (sous unités STT3A, STT3B, OST48, RPN1, RPN2, malectine) a aussi été observée.

En conclusion nous proposons que la SELENOT est impliquée dans le contrôle de l'activité d'IP3R1 en permettant sa *N*-glycosylation et/ou en modifiant l'état redox de ses cystéines régulatrices, ou éventuellement en interagissant de façon redox avec ERLIN2.

**Mots clés : sélénium ; sélénoprotéines ; réticulum endoplasmique ; calcium ; N-glycosylation ; homéostasie redox**