



HAL
open science

Caractérisation des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase chez les souris sauvages et invalidées pour la SELENOT : imagerie tridimensionnelle et analyse comportementale

David Godefroy

► To cite this version:

David Godefroy. Caractérisation des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase chez les souris sauvages et invalidées pour la SELENOT : imagerie tridimensionnelle et analyse comportementale. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR050 . tel-04033792

HAL Id: tel-04033792

<https://theses.hal.science/tel-04033792>

Submitted on 17 Mar 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

Caractérisation des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase chez les souris sauvages et invalidées pour la SELENOT : imagerie tridimensionnelle et analyse comportementale

Présentée et soutenue par
DAVID GODEFROY

**Thèse soutenue le 25/11/2022
devant le jury composé de**

| | | |
|--------------------|---|--------------------|
| M. HERVE TOSTIVINT | PROFESSEUR DES UNIVERSITES, SORBONNE UNIVERSITE | Rapporteur du jury |
| MME ROMINA DANGELO | INGENIEUR, UNIVERSITE TOULOUSE 3 PAUL SABATIER | Membre du jury |
| MME MARIE PICOT | MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie | Membre du jury |
| M. WILLIAM ROSTENE | DIRECTEUR DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE | Président du jury |
| M. YOUSSEF ANOUAR | DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |

Thèse dirigée par YOUSSEF ANOUAR (Neuroendocrine EndOcrine and GeRminal Differentiation and Communication)



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

Caractérisation des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase chez les souris sauvages et invalidées pour la SELENOT : imagerie tridimensionnelle et analyse comportementale

Présentée et soutenue par
DAVID GODEFROY

Thèse soutenue le 25/11/2022
devant le jury composé de

| | | |
|---------------------|---|--------------------|
| M. WILLIAM ROSTENE | DIRECTEUR DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE | Rapporteur |
| M. HERVE TOSTIVINT | PROFESSEUR DES UNIVERSITES, SORBONNE UNIVERSITE | Rapporteur |
| MME ROMINA D'ANGELO | INGENIEUR, UNIVERSITE TOULOUSE 3 PAUL SABATIER | Examinatrice |
| MME MARIE PICOT | MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE | Examinatrice |
| M. YOUSSEF ANOUAR | DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE | Directeur de thèse |

Thèse dirigée par **YOUSSEF ANOUAR (Neuroendocrine Endocrine and Germlinal Differentiation and Communication)**

Remerciements

Je remercie tout d'abord les institutions françaises, en particulier l'université de Rouen Normandie, qui permettent à leurs agents titulaires de la fonction publique de valoriser leur travail, de continuer à apprendre, de progresser, de se former afin d'évoluer professionnellement et personnellement.

Ce travail de recherche n'aurait pu se faire sans la contribution du Dr Youssef Anouar qui m'a accueilli dans l'unité et a ensuite accepté d'encadrer cette recherche au sein de son équipe. Son savoir-faire et ses connaissances, en particulier dans le domaine des sélénoprotéines associés à mes compétences en imagerie ont conduit à la réalisation de ce travail de recherche et à l'aboutissement de celui-ci à travers la publication de deux articles scientifiques. Merci de m'avoir accompagné dans ce projet de recherche scientifique et de m'avoir aidé à acquérir les compétences qui m'aideront dans mon avenir professionnel.

Merci aux membres et anciens membres de l'équipe Plasticité et Physiopathologie Neuroendocrine, le Dr Christophe Dubessy, la Pr Maité Montéro, la Dr Lydie Jeandel, le Dr Anthony Falluel-Morel, la Dr Loubna Boukzar, M. Ben Yamine Mallouki, la Dr Emmanuelle Carpentier, la Dr Isabelle Lihrmann-Bisson, Mme Dorthe Cartier, le Dr David Alexandre, le Dr Lucas Grumolato et tous les autres de m'avoir aidé, de m'avoir fait avancer dans mon projet en m'écoutant lors de mes présentations, en ayant des critiques constructives qui ont permis cette recherche et en apportant un autre regard sur ce qui avait pu être réalisé. Toutes vos remarques, vos connaissances et compétences ont été essentielles et m'ont permis d'avancer dans ce projet.

La recherche ne se faisant jamais seule, les collaborations sont primordiales pour résoudre des problématiques difficiles. Pour cela, je tiens à remercier le Dr Yves Tillet de l'université de Tours qui, en nous donnant le matériel nécessaire, nous a permis de répondre à certaines de nos interrogations. Mais aussi le Dr Lee Eiden du NIH, pour sa contribution et son aide précieuse lors de l'écriture du premier article scientifique.

Les plateformes offrent des outils précieux pour faire avancer des travaux de recherche. Pour réussir mon projet, j'ai pu m'appuyer sur les différentes structures de soutien à la recherche de l'université de Rouen. En particulier, le Service des Ressources Biologiques où nos animaux sont hébergés et maintenus dans des conditions répondant aux critères de bien-être animal si importantes pour une recherche de qualité. Merci au Dr Arnaud Arabo, Mme Julie Maucotel, M. Dominique Palfrène et M. David Thomas pour tout ce travail au quotidien et tous vos conseils qui nous permettent à tous d'avoir des animaux hébergés en bonne santé

pour une recherche de qualité. Merci aux Dr Jean Luc Do Rego et Dr Jean Claude Do Rego qui dirigent le Service Commun d'Analyse Comportementale, aidés par Tiphaine Henry et Severine Nobis, votre accueil au sein de votre service et votre aide pour réaliser les nombreux tests et analyses comportementales effectués avec notre modèle de souris ont été si importants. Je remercie également le personnel de la Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie, le Dr Ludovic Galas, M. Damien Schapman, la Dr Magalie Bernard et M. Alexis Lebon qui m'ont permis d'avoir le matériel nécessaire pour l'acquisition de nos images et l'analyse de nos données.

L'évaluation d'un travail de recherche passe par une évaluation par les pairs. Pour cela je remercie tout particulièrement les membres rapporteurs, le Dr William Rostène et le Pr Hervé Tostivint, d'avoir accepté d'examiner mes recherches, d'avoir pris le temps de lire et de critiquer ce travail.

Je remercie également tous mes collègues de l'unité INSERM UI239 de m'avoir suivi et soutenu dans cette aventure, le directeur Pr Hervé Lefebvre, le co-directeur le Dr Jérôme Leprince de notre unité et Mme Catherine Beau qui dans la dernière ligne droite de l'écriture de ce manuscrit a su me tenir à la page.

Durant ma carrière, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes, au sein des différents laboratoires dans lesquels j'ai travaillé, dans le centre de recherche de Saint Antoine, à l'université de Calgary, à l'Institut De la Vision, avec les membres du groupe de travail « transparisation ». Toutes ces rencontres m'ont permis d'échanger, de partager, de rigoler. Vous m'avez aidé à grandir dans ce métier je vous en remercie.

Mon parcours m'amenant aujourd'hui à la réalisation de cette recherche n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille. Mes parents, Agnès et Denis qui ont fait tant de sacrifices pour que je puisse étudier dans les meilleures conditions possibles. Aujourd'hui ma compagne, Véronique qui m'a suivi, poussé et soutenu jusqu'au bout de cette folle aventure, merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu m'apportes. Et mes deux filles, Violette et Clémentine qui m'amènent tout le bonheur dont je peux rêver, bonheur si important et essentiel pour réaliser tous les projets de la vie, dont celui-ci.

A tous mes amis qui m'entourent depuis si longtemps et qui me permettent d'être ce que je suis.

Enfin, merci à vous de lire ce manuscrit de thèse qui je l'espère vous permettra de comprendre et d'apprécier le travail fait durant ces quatre années.

*Progress in science depends on new techniques, new
discoveries and new ideas, probably in that order*

Sydney Brenner (1927-2019)

The Nobel prize of physiology or medicine 2002

Avant-propos

Les fonctions du système nerveux sont complexes et se divisent en deux catégories à travers : *i*) celles impliquant le cerveau limbique, siège des émotions, qui joue un rôle primordial dans divers comportements comme la peur, le plaisir, la mémoire, l'agressivité et qui est défini comme étant la frontière entre la vie végétative et la vie cognitive, et *ii*) celles impliquant le cerveau cognitif qui gère les fonctions liées à la connaissance tels que le langage, l'apprentissage, le raisonnement, la perception, l'attention, etc.... Le système nerveux central (SNC) est constitué de cellules spécifiques : les neurones et les cellules gliales. Les neurones représentent les cellules fonctionnelles du système nerveux, elles ont pour rôle la transmission du message nerveux. Ces cellules ont la capacité de modifier leur potentiel de membrane de manière transitoire et réversible, et peuvent générer tout au long de leurs axones un potentiel d'action permettant le transport d'un codage sous forme de signaux électriques. La libération au niveau de leurs synapses de molécules spécifiques, les neurotransmetteurs et/ou neuromodulateurs, permettent la communication entre deux cellules nerveuses, d'autres types de molécules, les neurohormones, sont libérées dans le sang et vont agir à distance sur des organes cibles. Les cellules gliales sont définies comme étant des cellules « supports » des neurones, longtemps considérées comme secondaires, il est aujourd'hui établi que ces cellules sont essentielles au bon fonctionnement du SNC. Les cellules gliales sont divisées en plusieurs populations cellulaires : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales. La communication entre ces différents acteurs passe par les neurotransmetteurs ; ceux-ci sont des composés chimiques libérés essentiellement par les neurones qui agissent le plus souvent sur les neurones post-synaptiques. Les neurones sont classés en fonction du neurotransmetteur libéré, existe : 1) les neurones synthétisant les neurotransmetteurs monoamines (à partir d'un acide aminé) tels que les catécholamines (CA), la sérotonine et l'histamine, 2) certains acides aminés comme l'acide aspartique, la glycine, l'acide glutamique (GABA et glutamate 3) d'autres molécules chimiques tels que l'acétylcholine, l'adénosine, l'anandamide, 4) les peptides. Tous ces neurotransmetteurs ont un effet soit excitateur, soit inhibiteur sur le neurone post-synaptique. La multitude des fonctions gérées, de types cellulaires impliqués, de molécules utilisées dans la communication, et ceci sur l'ensemble de l'organisme, font du SNC un réseau de communication extrêmement complexe.

Tout au long de la vie de l'organisme, le SNC va subir des altérations et des agressions auxquelles il doit s'adapter et s'en protéger pour continuer à jouer correctement son rôle

biologique. En effet, les toxiques, les infections, les traumatismes, les modifications génétiques, le vieillissement, les cycles biologiques liés au sexe de l'animal sont des perturbations qui altèrent les fonctionnalités du SNC. Pour répondre à toutes, ou partie, de ces modifications, les cellules biologiques, dont les cellules nerveuses, possèdent un arsenal de mécanismes de défense robuste visant à rééquilibrer en permanence les balances biologiques pour assurer les fonctions cellulaires. Au cours de l'évolution de nombreuses protéines se sont spécialisées dans ces rôles de protection, de contrôle, de rééquilibrage, et parmi celles-ci les sélénoprotéines qui forment une famille de protéines spécifiques, impliquées dans de nombreux processus biologiques visant à optimiser certains processus cellulaires. Les sélénoprotéines sont des protéines possédant dans leurs chaînes d'acides aminés au moins un acide aminé sélénié, la sélénométhionine ou la sélénocystéine, rendant très efficace la ou les fonctions du centre actif de la protéine de par les propriétés physico-chimiques du sélénium. Les études des sélénoprotéines ont montré leurs implications dans divers processus biologiques, comme dans les fonctions métaboliques (métabolismes des hormones thyroïdiennes), dans le transport et le stockage du sélénium, dans la synthèse des sélénoprotéines, dans le contrôle conformationnel des protéines, dans les processus redox, dans des fonctions antioxydantes. Malgré des connaissances de plus en plus importantes et précises, aujourd'hui une partie des fonctions de certaines sélénoprotéines restent à découvrir ou à approfondir. Pour ce faire, des modèles d'animaux génétiquement modifiés présentant une délétion ou une surexpression de tel ou tel sélénoprotéine permettent de constater les conséquences et les modifications phénotypiques engendrées. En effet, les modèles animaux peuvent présenter de nombreuses altérations comportementales (hyperactivité, problème métabolique, anxiété, etc...) mais également être plus sensibles au développement de certaines maladies.

Dans les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse, une approche technique originale a été utilisée pour permettre de caractériser le système catécholaminergique des souris KO SELENOT conditionnelles présentant une délétion spécifique de cette sélénoprotéine dans les cellules du SNC. Avoir une vision anatomique globalisée du SNC, en particulier des cellules catécholaminergiques, est possible via une approche d'imagerie novatrice qu'est l'imagerie tridimensionnelle. En effet, ce type d'imagerie révolutionne la compréhension du point de vue anatomique et histologique et permet une nouvelle vision, une nouvelle caractérisation et une compréhension dans son ensemble du système biologique choisi.

Résumé

Les sélénoprotéines sont des protéines contenant dans leur chaîne d'acides aminés au moins un atome de sélénium. Ces protéines retrouvées dans la quasi-totalité des espèces vivantes ont de multiples fonctions biologiques. En effet, elles entrent dans la voie métabolique des hormones thyroïdiennes, ce sont des enzymes antioxydantes, des enzymes essentielles pour le repliement protéique, elles participent au transport du sélénium dans l'organisme, elles sont impliquées dans la synthèse de protéines et elles ont un rôle dans la signalisation redox, mais pour une partie d'entre elles les fonctions ne sont encore que partiellement élucidées. Des travaux antérieurs menés dans notre équipe ont décrit quelques fonctions d'une sélénoprotéine en particulier, la SELENOT. Cette sélénoprotéine localisée dans le RE stabilise le complexe OST, complexe impliqué dans la N-glycosylation des protéines. De plus, des activités antioxydantes et régulatrices de l'homéostasie redox suggèrent un rôle protecteur de cette sélénoprotéine. Des résultats corroborant cette hypothèse ont permis de vérifier ce rôle neuroprotecteur de la SELENOT. En effet, en utilisant un modèle de neurotoxicité, il a été montré que la SELENOT protège les cellules dopaminergiques. Cette SELENOT semble avoir un rôle important dans le maintien et la survie des cellules de type catécholaminergique.

Les cellules catécholaminergiques sont des neurones exprimant des catécholamines (CA). Les CA sont des neurotransmetteurs et hormones appartenant au groupe des monoamines dont font partie la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline qui ont de multiples fonctions biologiques, avec une localisation et une distribution dans le SNC variant suivant les espèces. Une nomenclature neuroanatomique particulière pour cette catégorie de neurones a été créée afin de décrire les différents rôles biologiques des groupes de cellules CA. En plus du lien entre la région neuroanatomique et le rôle biologique, chaque CA est impliquée dans différentes fonctions. En effet, l'adrénaline régule la glycémie, la fréquence cardiaque et la tension artérielle, la noradrénaline a des rôles dans les fonctions d'apprentissage, du sommeil, des émotions et de l'attention, et enfin la dopamine surnommée *l'hormone du plaisir* est décrite pour ses fonctions motrices, dans les mécanismes de l'attention et de la récompense. Le système catécholaminergique est donc un système très complexe, qui se compose de neurones dont l'état basal du stress oxydant semble être plus important que dans d'autres types de neurones. Cet état de stress serait lié au métabolisme des CA et à leur voie de dégradation rendant les neurones catécholaminergiques plus sensibles. Cette sensibilité expliquerait le rôle fondamental de la SELENOT pour la survie de cette famille de neurones.

Pour mieux comprendre les implications de cette SELENOT dans le SNC, un modèle de souris KO SELENOT conditionnel a été créé dans notre laboratoire. Ce modèle dont la SELENOT est invalidée uniquement dans les cellules nerveuses présente à l'âge adulte des phénotypes comportementaux altérés suggérant une possible perturbation du système catécholaminergique. En effet, ces souris KO SELENOT présentent une hyperactivité, ont des troubles de la reproduction et de prise de poids, et présentent des comportements d'anxiété. Au vu de ces observations phénotypiques, nous avons entrepris la caractérisation du système catécholaminergique dans le SNC de ces souris KO SELENOT.

Afin de caractériser le système catécholaminergique des souris KO SELENOT conditionnelles, nous avons : 1) utilisé une approche d'imagerie novatrice, l'imagerie tridimensionnelle permettant d'avoir une vision globalisée de l'organe et du type cellulaire étudiés, et 2) réalisé une analyse du comportement. Une charte méthodologique a permis dans un premier temps de créer un atlas tridimensionnel du système catécholaminergique, et cette approche méthodologique a ensuite été utilisée pour caractériser certains groupes de neurones CA chez la souris KO SELENOT conditionnelle. Les résultats montrent dans certains groupes des altérations de la distribution des neurones catécholaminergiques pouvant être corrélées avec des déficits comportementaux.

Summary

Selenoproteins are proteins containing at least one selenium atom in their amino acid chain. These proteins found in almost all living species have multiple biological functions. Indeed, they enter the metabolic pathway of thyroid hormones, they are antioxidant enzymes, enzymes essential for protein folding, they participate in the transport of selenium in the body, they are involved in the synthesis of proteins, they have a role in redox signaling, but for some of them the functions are still only partially understood. Previous work carried out in our team described some of the functions of a particular selenoprotein, SELENOT. This selenoprotein located in the ER allows the stabilization of the OST complex which catalyzes N-glycosylation. In addition, the antioxidant and regulatory functions of redox homeostasis suggest a protective role for this selenoprotein. Results corroborating this hypothesis made it possible to verify this neuroprotective role of SELENOT. In a model of neurotoxicity, it was shown that SELENOT protects dopaminergic cells. This SELENOT seems to have an important role in the maintenance and survival of cells of catecholaminergic phenotype.

Catecholaminergic cells are neurons expressing catecholamines (CA). CA are part of the neurotransmitters and hormones belonging to the group of monoamines, including dopamine, noradrenaline and adrenaline which have multiple biological functions, with localization and distribution in the CNS varying according to the species. A particular neuroanatomical nomenclature for this category of neurons has been developed in order to describe the different biological roles of different groups of cells. In addition to the link between neuroanatomical region and biological role, each CA is involved in different biological functions. Indeed, adrenaline regulates blood sugar, heart rate and blood pressure, noradrenaline plays a role in the functions learning, sleep, emotions and attention, and finally, dopamine nicknamed the *pleasure hormone* is described for its motor functions and its role in attention and reward. The catecholaminergic system is a very complex system, which consists of neurons whose basal state of oxidative stress seems to be greater than for other types of neurons. This state of stress would be linked to CA metabolism and their degradation pathway, making catecholaminergic neurons more sensitive. This sensitivity would explain the fundamental role of SELENOT for the survival of this family of neurons.

In order to better understand the implications of this SELENOT in the CNS, a conditional SELENOT KO mouse model was generated in our laboratory. This model, in which the SELENOT gene is disrupted only in nerve cells, exhibits altered behavioral phenotypes in adulthood, suggesting a possible disturbance of the CA system. Indeed, these KO SELENOT

mice show hyperactivity, they have reproductive and weight gain deficits, and anxiety behavior. In view of these phenotypic observations, we undertook the characterization of the CA system in the CNS of this KO SELENOT mice.

In order to characterize the CA system of conditional SELENOT KO mice, we have: 1) used an innovative imaging approach, three-dimensional imaging allowing to have a globalized view of the organ and the type of cell studied, and 2) carried out behavioral analysis. A methodological flowchart initially designed made it possible to generate a three-dimensional atlas of the CA system, and this methodological approach was then used to characterize certain groups of CA neurons in conditional SELENOT knockout mice. The results showed alterations in the distribution of catecholaminergic neurons in certain groups of the CA system which might be correlated with behavioral alterations.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Nomenclature, abréviations et acronymes | 11 |
| Liste des figures..... | 13 |
| Production scientifique | 15 |
| Introduction..... | 17 |
| Chapitre I : Le sélénium et les sélénoprotéines..... | 19 |
| I. Le sélénium | 19 |
| 1. La découverte du sélénium, ses dangers et son importance | 19 |
| 2. Caractéristiques chimiques et biochimiques | 20 |
| 3. Absorption et assimilation du sélénium dans l'organisme | 20 |
| 4. Les principales formes biologiques | 22 |
| a. Les sélénobases..... | 22 |
| b. Les acides aminés séléniés | 23 |
| c. La sélénométhionine | 24 |
| d. La sélénocystéine..... | 24 |
| II. Les sélénoprotéines..... | 24 |
| 1. La biosynthèse particulière des sélénoprotéines | 25 |
| a. L'ARNt [ser]sec..... | 25 |
| b. Le séléosome..... | 25 |
| c. Le rôle de l'élément SECIS..... | 26 |
| d. Le sélénoprotéome..... | 26 |
| 2. Localisations et fonctions des sélénoprotéines | 29 |
| a. Dans l'espace extracellulaire : GPX3, SELENOP..... | 30 |
| b. Dans la membrane plasmique : DIO1, DIO3, SELENOI, SELENOW..... | 31 |
| c. Dans le cytoplasme : GPX1, GPX2, GPX4, GPX6, TXRND1, TXRND3, MSRB1, SEPHS2, SELENOV, SELENOW | 33 |
| d. Dans la mitochondrie : GPX4, TXRND2, SELENOO..... | 35 |
| e. Dans le réticulum endoplasmique : DIO2, SELENOF, SELENOM, SELENOK, SELENOS, SELENON, SELENOT | 36 |
| f. Dans le noyau : GPX4, SELENOH, MSRB1 | 38 |
| 3. Focus sur la SELENOT..... | 39 |
| a. Sa découverte..... | 39 |
| b. Distribution tissulaire de la SELENOT chez l'animal et les conséquences de l'inactivation de son gène..... | 43 |
| c. Ses mécanismes fonctionnels connus | 45 |
| d. Son rôle neuroprotecteur..... | 48 |
| Chapitre II : Le système catécholaminergique..... | 50 |
| I. L'enzyme tyrosine hydroxylase point de départ de la synthèse des catécholamines .. | 50 |
| 1. La dopamine..... | 51 |
| 2. La noradrénaline | 57 |
| 3. L'adrénaline..... | 58 |
| II. Tyrosine hydroxylase : du gène à la protéine..... | 59 |
| 1. Le gène de la tyrosine hydroxylase..... | 59 |

| | |
|--|------------|
| 2. L'ARNm de la tyrosine hydroxylase | 59 |
| 3. La protéine tyrosine hydroxylase..... | 60 |
| III. Localisation des catécholamines dans le SNC : de l'embryon au stade adulte..... | 61 |
| IV. Les divers rôles physiologiques des catécholamines..... | 63 |
| 1. Le mésencéphale | 63 |
| a. L'area postrema (AP)..... | 63 |
| b. L'A5, le locus coeruleus (LC-A6) et l'A7 | 64 |
| 2. Le diencéphale | 64 |
| a. La substance grise périaqueducule (PAG-A10dc) | 64 |
| c. Regroupement cellulaire A11 | 66 |
| 3. Le télencéphale | 67 |
| a. La zona incerta (ZI-A13) | 67 |
| b. L'hypothalamus (Hyp-A12-A14-A15)..... | 67 |
| Chapitre III : L'imagerie tridimensionnelle : une nouvelle approche d'imagerie dans la recherche biologique | 68 |
| I. L'immunomarquage in toto..... | 68 |
| 1. L'accessibilité des protéines d'intérêt | 68 |
| 2. Le stade de développement influence l'immunomarquage in toto..... | 70 |
| II. La « transparisation » | 71 |
| 1. Pourquoi un échantillon n'est pas transparent et comment le rendre transparent | 71 |
| 2. Les familles de protocoles de « transparisation » et les critères de sélections | 73 |
| 3. La « transparisation » par solvants organiques | 74 |
| 4. Quelques caractéristiques de différents protocoles de « transparisation » par solvants organiques | 75 |
| 5. Les multiples domaines d'application de l'imagerie tridimensionnelle | 77 |
| III. Microscopie pour échantillons « transparisés » : la feuille de lumière un outil particulièrement adapté | 79 |
| IV. L'imagerie tridimensionnelle, sa visualisation et ses analyses..... | 81 |
| Objectifs de thèse..... | 83 |
| Résultats..... | 85 |
| Premier article : | 87 |
| Three-dimensional mapping of tyrosine hydroxylase in the transparent brain and adrenal of prenatal and pre-weaning mice : Comprehensive methodological flowchart and quantitative aspects of 3D mapping..... | 87 |
| Deuxième article : | 101 |
| SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study | 101 |
| Résultats non publiés : | 121 |
| Impact de la SELENOT sur divers comportements chez la souris..... | 121 |
| Discussion..... | 133 |
| Conclusion et perspectives | 151 |
| Références bibliographiques..... | 157 |

Nomenclature, abréviations et acronymes

| <i>Abréviations</i> | <i>Significations</i> |
|-----------------------------------|---|
| μM | micro-molaire |
| 3D | trois dimensions |
| 3DISCO | 3 Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs |
| Ad | adrénaline |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ADNc | acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AMPc | adénosyl monophosphate cyclique |
| AP-A2 | cellules catécholaminergiques de l'area postrema |
| ApoER2 | apolipoprotéine E récepteur 2 |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ARNt | acide ribonucléique de transfert |
| ATP | adénosine triphosphate |
| CA | catécholamines |
| Ca²⁺ | calcium |
| CNRS | centre national de la recherche scientifique |
| CRISPR | clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| DA | dopamine |
| DAT | transporteur de dopamine |
| DIO | iodothyronine déiodinase |
| DMSe | diméthylsélénide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| E... | jour de vie embryonnaire ... |
| ERAD | Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation |
| FAD | flavine adénine dinucléotide |
| GABA | acide γ-aminobutyrique |
| GFP | green Fluorescent Protein |
| GPX | glutathion peroxydases |
| H₂O | eau |
| H₂O₂ | peroxyde d'hydrogène |
| HSe⁻ | sélénide d'hydrogène |
| Hyp-A12-A14-A15 | cellules catécholaminergiques de l'hypothalamus |
| iDISCO+ | immunostaining-dimensional imaging of solvent-cleared organs plus |
| INSERM | institut national de la santé et de la recherche médicale |
| KDa | kilo dalton |
| KO | knockout |
| LC-A6 | cellules catécholaminergiques du locus coeruleus |

| | |
|------------------|--|
| LPS | lipopolysaccharide |
| MfB | medial forebrain bundle |
| Mse | méthylsélénide |
| NA | noradrénaline |
| NADPH | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NET | transporteur de noradrénaline |
| OST | complexe oligosaccharyltransférase |
| PACAP | pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide |
| PAG-A10dc | cellules catécholaminergiques de la substance grise périaqueducule |
| PC12 | phéochromocytome de la médullosurrénale de rat |
| RCPG | récepteurs couplés aux protéines G |
| RE | réticulum endoplasmique |
| ROS | espèces réactives de l'oxygène |
| RRF-A8 | cellules catécholaminergiques de la Retrorubral field |
| Sec | sélénocystéine |
| SECIS | selenocysteine insertion sequence |
| SELENOT | sélénoprotéine T |
| SeMet | sélénométhionine |
| Ser | sérine |
| SN-A9 | cellules catécholaminergiques de la substance noire |
| SNC | système nerveux central |
| SPIM : | selective plane illumination |
| TH | tyrosine hydroxylase |
| TMSe | triméthylsélénide |
| TXNRD | thiorédoxine réductases |
| VMAT | vesicular monoamine transporter |
| VTA-A10 | cellules catécholaminergiques de l'aire tegmentale ventrale |
| WT | wild type |
| ZI-A13 | cellules catécholaminergiques de la zona incerta |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Les voies d'assimilation du Se dans l'organisme | 22 |
| Figure 2 : Les sélénobases | 23 |
| Figure 3 : Les acides aminés sélénés | 23 |
| Figure 4 : Schéma des différentes étapes de la biosynthèse des sélénoprotéines | 28 |
| Figure 5 : Les fonctions biologiques connues des 25 sélénoprotéines | 29 |
| Figure 6 : Localisation des 25 sélénoprotéines | 30 |
| Figure 7 : Schéma de la réduction du peroxyde d'hydrogène en H ₂ O par le glutathion peroxydase contenant la sélénocystéine | 31 |
| Figure 8 : Cascade métabolique des hormones thyroïdiennes | 32 |
| Figure 9 : Chaîne des réactions enzymatiques du système thiorédoxine | 34 |
| Figure 10 : Représentation schématique du gène, de l'ARNm et de la protéine de la SELENOT | 40 |
| Figure 11 : le complexe oligosaccharyltransférase (OST) | 41 |
| Figure 12 : Activation de l'expression de la SELENOT | 42 |
| Figure 13 : Rôles métaboliques de la SELENOT | 43 |
| Figure 14 : Représentation génétique des modèles de souris knockout SELENOT | 45 |
| Figure 15 : Cascade de la biosynthèse des catécholamines | 51 |
| Figure 16 : Schéma d'une synapse de cellule catécholaminergique | 53 |
| Figure 17 : Les récepteurs dopaminergiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui fixent la dopamine | 55 |
| Figure 18 : Voies de dégradation de la dopamine | 56 |
| Figure 19 : Les récepteurs adrénérgiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui fixent la noradrénaline et l'adrénaline | 58 |
| Figure 20 : Gène de la TH | 59 |
| Figure 21 : Protéine TH | 61 |
| Figure 22 : Distribution des groupes neuronaux des cellules catécholaminergiques du SNC de souris | 63 |
| Figure 23 : Organigramme méthodologique pour l'imagerie 3D | 71 |
| Figure 24 : Principe de la « transparisation » | 72 |
| Table 1 : Spécificités des familles de protocole de « transparisation » | 74 |
| Figure 25 : Photographie de grenouilles « transparisées » | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figure 26 : Frise historique des différentes publications de « transparisation » par solvants organiques | 76 |
| Figure 27 : Exemples des différentes applications possibles avec l'imagerie tridimensionnelle | 78 |
| Figure 28 : Photographie du microscope à feuille de lumière développé par Zsigmondy et Siedentopf | 80 |
| Figure 29 : Vue latérale d'une feuille de lumière | 81 |
| Table 2 : Représentation des corrélations possibles entre les zones anatomiques du système catécholaminergique du SNC affectées et les phénotypes comportementaux chez les souris mâles et femelles KO SELENOT conditionnelles | 148 |

Production scientifique

Mon expertise et mes compétences développées durant ces années de thèse m'ont permis d'être associé à plusieurs articles de recherche.

Mes connaissances sur les fonctions des sélénoprotéines, en particulier le rôle que peut avoir la SELENOT dans la protection des neurones dopaminergiques par ses fonctions antioxydantes m'ont permis d'être associé à la publication d'Alsharif I et al. (2020). De plus, mon expertise en microscopie tridimensionnelle développée durant cette thèse m'a amené à participer à plusieurs études dont les questions biologiques avaient besoin de cette approche d'imagerie pour trouver des réponses aux questions biologiques. L'observation 3D a été réalisée sur différents organes tels que le pancréas, le cœur et l'œil. Les résultats obtenus font l'objet de publications dans différents journaux (El-Mehdi et al., 2020; Houssari et al., 2020; Heron et al., 2022; Dumanoir et al., 2022). Avec cette expertise dans le domaine de la microscopie tridimensionnelle, je transmets mes connaissances en tant qu'enseignant pour le master d'imagerie de l'université de Rouen, mais également comme formateur dans le cadre de formations professionnelles de l'INSERM et du CNRS.

Articles publiés

- El-Mehdi M, Takhlidjt S, Khiaf F, Prévost G, Do Rego JL, Do Rego JC, Benani A, Nedelec E, Godefroy D, Arabo A, Lefranc B, Leprince J, Anouar Y, Chartrel N, Picot M. 2020. Glucose homeostasis is impaired in mice deficient in the neuropeptide 26RFa (QRFP). *BMJ Open Diabetes Res Care* **8**: 1-12.
- Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, Godefroy D, Schapman D, Hemanthakumar KA, Bizou M, Henry JP, Renet S, Riou G, Rondeaux J, Anouar Y, Adriouch S, Fraineau S, Alitalo K, Richard V, Mulder P, Brakenhielm E. 2020. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery after Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 1722–1737.
- Alsharif I, Boukhzar L, Lefranc B, Godefroy D, Aury-Landas J, Rego JL do, Rego JC do, Naudet F, Arabo A, Chagraoui A, Maltête D, Benazzouz A, Baugé C, Leprince J, Elkahoun AG, Eiden LE, Anouar Y. 2021. Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol* **4**: 2-17
- Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lemarcis T, Lebon A, Godefroy D, Schapman D, Henri O, Riou G, Nicol L, Henry JP, Valet M, Pieronne-Deperrois M, Ouvrard-Pascaud

A, Hägerling, R, Chiavelli H, Michel JB, Mulder P, Fraineau S, Richard V, Tardif V, Brakenhielm E. 2022. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* **00**: 1-14

Dumanoir M, Leroy A, Burel D, Laquerrière A, Janin F, Lebon A, Valet M, Godefroy D, Przegralk L, Lecointre M, Picaud S, Marret S, Marguet F, Gonzalez B, Brasse-Lagnel C. In utero alcohol exposure impairs retinal angiogenesis and the microvessel-associated positioning of calretinin interneurons. *eNeuron* 2022 in press

Enseignement

Masters imagerie photonique et endocrinologie/neuroendocrinologie (10h/ an) : *3D imaging, new tool for fundamental research*

Formation

. Formateur et organisateur d'une Actions Nationales de Formation du CNRS, Paris Necker en 2019 : *Techniques de transparenisation, acquisitions en microscopie photonique et analyse 3D d'échantillons clarifiés*

. Formateur CNRS entreprise à Paris Sorbonne université en 2019 : *Clarification pour l'imagerie 3D*

. Formateur Atelier INSERM de Paris Saclay en 2022 : *Transparenisation optique : échantillons, imagerie 3D et analyse*

Introduction

Chapitre I : Le sélénium et les sélénoprotéines

I. Le sélénium

1. La découverte du sélénium, ses dangers et son importance

En 1817, le physico-chimiste suédois Jons Jacob Berzelius découvre le sélénium suite à ses recherches sur les causes d'une maladie « mystérieuse » touchant des ouvriers d'une usine de fabrication d'acide sulfurique (Hatfield, 2001). Le sélénium est découvert dans la même période que le tellure, ces deux éléments possèdent des propriétés chimiques semblables et sont associés dans la matière boueuse des chambres de plomb de l'usine responsable de cette maladie « mystérieuse ». En référence à l'appellation du tellure qui tire son nom de *tellus*, terre en latin, le chercheur suédois décidera de baptiser sa découverte du nom de la déesse grecque de la lune, Séléné, ainsi tel la Terre et la Lune, le tellure et le sélénium seront liés.

Le sélénium fut considéré pendant des années comme un élément toxique pour l'homme et les animaux. Cette considération pour le sélénium vient d'un fait historique étonnant. Lors de son célèbre voyage en Chine, Marco Polo sera une victime indirecte du sélénium. Les chevaux qui le conduisaient dans l'ouest du pays en 1295 furent touchés par un mal étrange puisque, en quelques semaines, ceux-ci perdirent leurs sabots empêchant tout déplacement et les conduisirent vers une mort certaine. Cette fatalité était la conséquence de la non adaptation de ces chevaux au territoire traversé, une plante toxique l'astragale en était la cause. L'astragale qui était consommé par ces animaux concentre fortement le sélénium, le rendant toxique. Pour un homme adulte, la consommation journalière préconisée de sélénium est entre 50 et 200 µg, son taux total dans l'organisme se situant entre 6 et 12 mg (Christine et al., 1995) et un apport journalier au-delà de 450 µg/jour est considéré comme toxique. En effet, passer ce seuil l'excès de sélénium peut entraîner une sélénose. La sélénose chronique peut conduire à des symptômes tels que des lésions cutanées, des ongles et des cheveux cassants, mais les conséquences peuvent être plus graves avec des déficiences neurologiques entraînant des paralysies ou encore des démarches mal assurées. L'apport de sélénium par voie orale a des conséquences néfastes, comme les nausées, les vomissements, la diarrhée, pouvant aller jusqu'à des complications cardiovasculaires dégénératives (Hamilton, 2004; Lenz and Lens, 2009; Roman et al., 2014).

Malgré son effet toxique à forte dose, le sélénium n'en reste pas moins un élément essentiel pour la santé humaine. En 1935, dans la province du Keshan en Chine, des hommes présentaient des troubles physiologiques importants tels que des cardiomyopathies et des

problèmes ostéoarticulaires. Les études menées suite à ces observations ont montré que ces troubles étaient dus à des déficiences en sélénium dans les organismes (Liu et al., 2021). Ces maladies, à savoir les cardiomyopathies et la maladie des gros os, portent respectivement les noms de maladie de Keshan (Xia et al., 1967) et maladie Kashin-Beck (Li et al., 2020) en référence aux provinces où ont été décrits ces troubles. Des études montrent que de faibles taux de sélénium entraînent d'autres pathologies touchant le système hépatique et pancréatique, pouvant conduire à de l'anémie, du diabète, des rétinopathies, des cataractes et de l'infertilité, et augmentent les risques d'apparitions de cancer (Sharma et al., 2018).

Cet oligo-élément se trouve dans de nombreux aliments d'origine végétale ou animale et son apport est essentiel même si aujourd'hui des débats existent sur les formes sous lesquelles l'apport doit être fait, en l'occurrence sur sa complémentation nutritionnelle.

2. Caractéristiques chimiques et biochimiques

Le sélénium ayant pour numéro atomique 34 et comme symbole Se, est le troisième élément du groupe 16 (groupe des chalcogènes), il a une masse atomique égale à 78,69. Cet élément présente une analogie avec le soufre et le tellure. Dans certaines molécules, du fait de ces propriétés proches de celles du soufre, le sélénium remplace ce dernier.

3. Absorption et assimilation du sélénium dans l'organisme

L'assimilation du sélénium peut se faire par tous les organismes sous différentes formes inorganiques tels le sélénite (SeO_3^{2-}) et sélérate (SeO_4^{2-}) (Fig. 1-A) (Roman et al., 2014).

À l'exception de la forme sélénite, les formes organiques et inorganiques du sélénium sont très bien absorbées. Cette absorption se fait préférentiellement dans la partie inférieure de l'intestin grêle (Fig. 1-B). Suite à l'absorption, le sélénium peut être orienté dans l'organisme en suivant 3 voies différentes, vers la voie de détoxification de l'organisme et l'expulsion du sélénium, vers la voie de production des sélénoprotéines, ou encore vers l'apport de sélénium par la voie systémique (Lönnerdal et al., 2017) : 1) La voie de détoxification ou excrétion (Fig. 1-C), vise à évacuer le sélénium de l'organisme par le système respiratoire, des fèces ou encore l'urine. Dans cette voie, le méthylsélénide (MSe) passe à la forme diméthylsélénide (DMSe) pour être évacué par les voies respiratoires ou fèces. La cascade de méthylation produit à partir du DMSe le TMSé (triméthylsélénide), puis le TMSé rejoint la voie d'excrétion des sucres-sélénide avant excrétion par l'urine. Les sucres-sélénides sont obtenus à partir du sélénide d'hydrogène (HSe^-), mais aussi du MSe. Le MSe provient des formes végétales gamma-

glutamyl-Se-méthyl-sélénocystéine (GGSeMCys), méthylsélénocystéine (SeMCys) directement absorbées au niveau de l'intestin, du sélénométhionine (SeMet) et également de la forme HSe^- . 2) La forme HSe^- est une forme indispensable pour l'utilisation du sélénium par l'organisme (Fig. 1-D). Le HSe^- provient de deux voies de production possibles à partir de : sélénite ; via la réduction du SeO_3^{2-} grâce au système thiorédoxine, utilisant la thiorédoxine, NADPH et la thiorédoxine réductase, ou de GS-Se-GS, via la synthèse par réaction non enzymatique du groupement thiol du GSH (gluthation réduit) avec le SeO_3^{2-} pour donner la forme GS-Se-GS, ceci pouvant se faire avant le passage de la barrière intestinale ce qui augmente la quantité d'absorption de sélénium car la forme sélénite représentant 60% d'absorption (Gammelgaard et al., 2012; Roman et al., 2014)). La forme GS-Se-GS étant ensuite réduite via la glutathione réductase en forme HSe^- . L'apport de la forme sélénite provient également, après absorption passive du sélénate (SeO_4^{2-}) au niveau de l'intestin, de la réduction de la forme SeO_4^{2-} en forme SeO_3^- via l'ATP sulfurylase par un analogue du 3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate (Se-PAPS) non identifié. La forme HSe^- du sélénium peut rejoindre la voie d'excrétion du sélénium ou servir de point de départ dans la biosynthèse des sélénoprotéines. 3) La dernière voie d'assimilation du sélénium est la voie de distribution systémique (Fig. 1-E), ceci étant possible par l'incorporation de façon non spécifique de la sélénométhionine en place de la méthionine dans des protéines comme l'albumine par exemple, devenant la SeAlb. Un autre apport systémique de sélénium se fait avec la SELENOP qui est une sélénoprotéine circulante qui sert de réserve de sélénium pour la synthèse des différentes sélénoprotéines dans différents tissus.

Ces trois voies d'assimilation font suite au transport à travers la barrière intestinale (Fig. 1-A) des sélénoaminoacides et des dérivés organiques du sélénium comme la Sec, la SeMet, le SeMCys. Ce transport est décrit comme un transport actif dans le modèle d'oocytes de xénope. Il a été montré que les transporteurs d'acides aminés b^0 , dans le modèle de cellules intestinales Caco-2 et rénales OK, ainsi que le transporteur rBAT dans les cellules Caco-2 ont une affinité pour la sélénométhionine. La sélénocystéine ayant une affinité pour les systèmes b^0 et rBAT (Nickel et al., 2009).

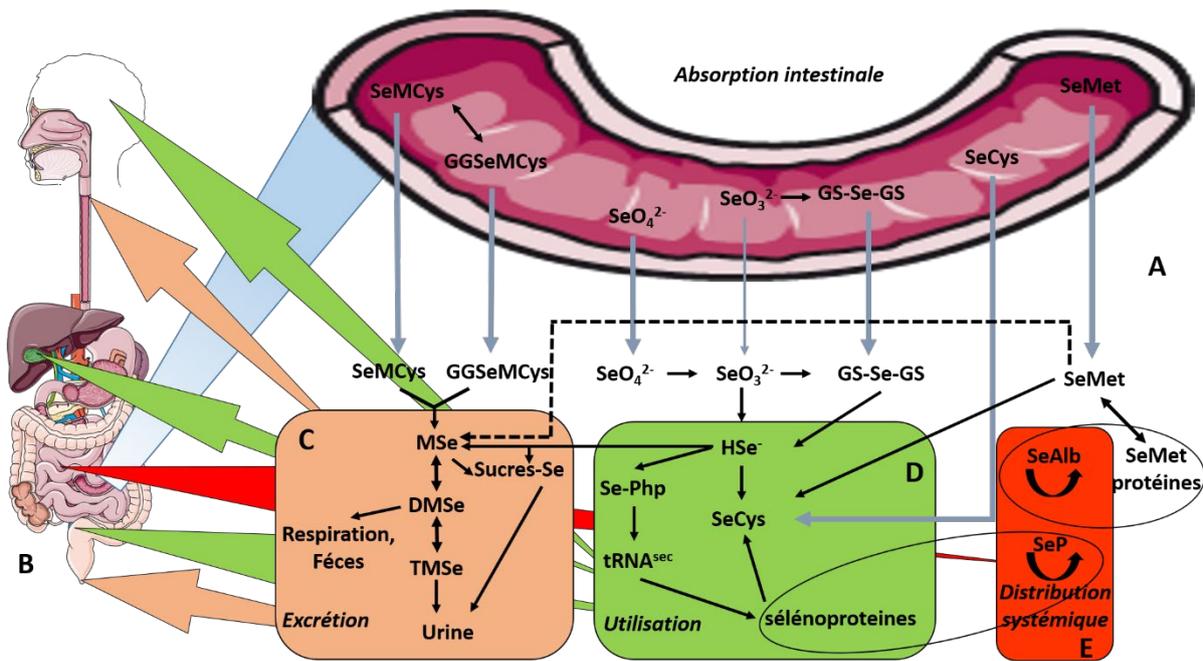


Figure 1 : Les voies d'assimilation du Se dans l'organisme. (A) l'absorption du Se au niveau de l'intestin peut se faire sous différentes formes, organiques ou inorganiques. (B) le passage du Se se fait plus particulièrement dans la partie inférieure de l'intestin. Suite à son absorption, le Se est orienté vers 3 voies : (C) la détoxification ou excrétion, (D) la production de sélénoprotéines et (E) le stockage du Se. *Inspiré de Lönnerdal et al., 2017.*

4. Les principales formes biologiques

a. Les sélénobases

Un article par Turner and Stadtman (Turner and Stadtman, 1973) rappelle la découverte du sélénium comme constituant de l'ARNt dans les espèces *C. stkländii*, *M. yannielli* (Chen et al., 1982) et *E. coli* (Wittwer, 1983). La sélénobase, 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine se trouve dans l'anticodon des ARNt glutamate et lysine. Cette sélénobase est l'analogue de la base 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine, le sélénium remplaçant l'atome de soufre (Fig. 2). La position de cette sélénobase en position 34 des anticodons est importante pour l'aminocyclation de ces ARNt (Chen et al., 1982).

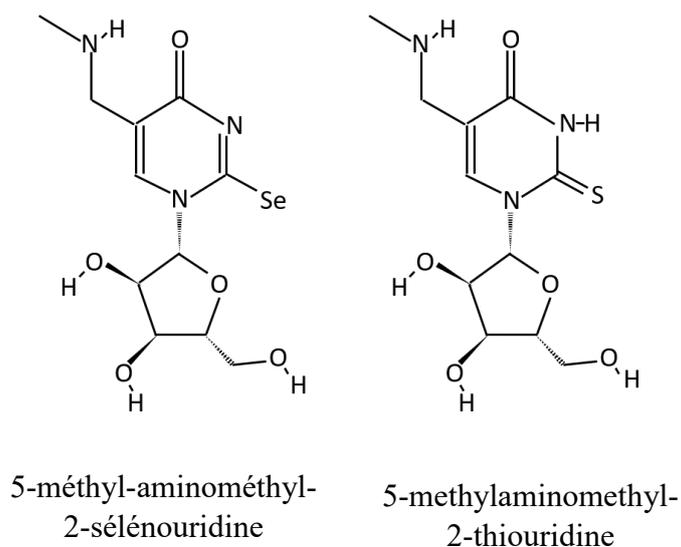


Figure 2 : Les sélénobases. Représentations de la base 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine et de la sélénobase 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine montrant l'importante analogie entre ces deux composés.

b. Les acides aminés séléniés

Deux acides aminés possédant du sélénium ont été identifiés dans l'ensemble du monde vivant, la sélénométhionine et la sélénocysteine. Ces deux acides aminés se retrouvent dans les protéines à sélénium (chapitre I page 22). Des analogies entre les formes sulfurées et les formes séléniées de ces acides aminés sont facilement identifiables (Fig. 3).

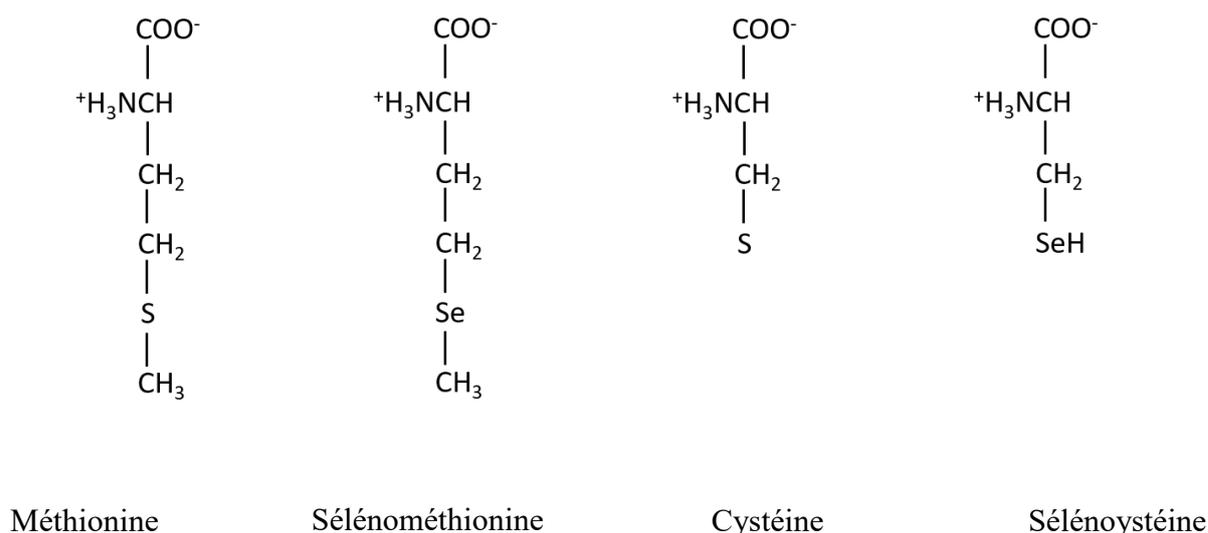


Figure 3 : Les acides aminés séléniés. Représentations montrant les analogies entre les formes sulfurées et les formes séléniées des acides aminés méthionine et sélénométhionine, ainsi que cystéine et sélénocystéine.

c. La sélénométhionine

La SeMet (Fig. 3) représente le principal apport de sélénium dans l'organisme, ceci est dû au fait que le sélénium végétal est à 90% sous forme de sélénométhionine dans les protéines des plantes (Hatfield, 2001). La SeMet remplace la méthionine dans les protéines de façon aléatoire, ceci étant directement lié à la proportion de SeMet disponible (Schrauzer, 2000). Cet apport important en fait le réservoir principal de sélénium pour l'organisme, la SeMet passant facilement la barrière digestive, elle peut être soit dégradée en MSe par la cysthathionine γ -lyase pour ensuite suivre la voie de détoxification (chapitre I page 20) soit représenter un apport de SeCys via une réaction de trans-séléation pour la synthèse des sélénoprotéines (Roman et al., 2014).

d. La sélélocystéine

La biosynthèse et l'incorporation de la Sec (Fig. 3) dans les protéines furent découvertes par August Böck (Yoshizawa and Böck, 2009) dans le modèle bactérien. Cette découverte a posé les bases de la compréhension des mécanismes d'insertion de cette base dans les protéines chez les archaebactéries et les eucaryotes (Hatfield, 2001). La Sec, considérée comme le 21^{ème} acide aminé, possède de par ses propriétés physico-chimiques des avantages catalytiques importants. Ces avantages catalytiques pouvant expliquer le rôle fondamental du sélénium dans le monde du vivant, en particulier via les activités biologiques améliorées des protéines ayant souvent des rôles dans les mécanismes d'oxydo-réduction (Kohrle et al., 2000).

II. Les sélénoprotéines

Les sélénoprotéines sont des protéines qui dans leur composition possèdent au moins un atome de sélénium. Mis à part chez les levures où elles sont absentes ou les plantes supérieures où elles sont rares, les sélénoprotéines se trouvent dans la quasi-totalité des organismes. Certains virus comme le poxvirus *Molluscum contagiosum* (Taylor et al., 1997) possède le code génétique d'une glutathion peroxydase, et de nombreuses études ont montré la présence de sélénoprotéines chez les procaryotes (Kryukov and Gladyshev, 2004), les eucaryotes inférieurs (Buettner et al., 1999), les insectes (Alsina et al., 1998) ou encore chez les mammifères (Kryukov et al., 2003). Les premières sélénoprotéines furent découvertes chez les eubactéries, comme la formiate déshydrogénase ou la sélénoprotéine A du système glycine réductase (Andreesen and Ljungdahl, 1973; Turner and Stadtman, 1973), mais également chez les

mammifères avec la glutathion peroxydase (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1980). La Sec est la forme principale retrouvée dans les protéines à sélénium (Cone et al., 1976; Forstrom et al., 1978), son mécanisme d'insertion particulier est décrit ci-dessous.

1. La biosynthèse particulière des sélénoprotéines

La biosynthèse des protéines à sélénium se fait par l'incorporation d'acides aminés possédant cet atome Se (Fig. 4-A). Le sélénium est disponible sous formes inorganiques ou organiques (Fig. 4-B). Deux d'acides aminés naturels en contiennent, la SeMet et la Sec (Fig. 4-C). La SeMet est incorporée dans les protéines via le codon de la méthionine, cette incorporation est directement liée à la proportion SeMet/Met présent dans l'alimentation (Robinson et al., 1978). La Sec, 21^{ème} acide aminé, a un mode d'insertion beaucoup plus complexe via un codon stop.

a. L'ARNt^{[ser]sec}

L'ARNt^{[ser]sec} est dans un premier temps aminoacylé avec une sérine via la seryl-tRNA synthase (SerS). Ensuite, la phosphoseryl-tRNA kinase (PSTK) phosphoryle le groupement hydroxyle de la sérine et forme la phosphosérine. La sélénocystéine synthase (SecS) catalyse la biosynthèse de la sélénocystéyl-tRNA^{sec} (ARNt^{[ser]sec}) en transférant le sélénophosphate H₂SePO₃⁻ sur la phosphosérine. La sélénophosphate transférée est obtenue suite à la phosphorylation de la sélélide via la sélénophosphate synthase 2 (SEPHS2) (Fig. 4-D) (Allmang et al., 2009).

b. Le séléosome

L'ARNt^{[ser]sec} ainsi synthétisé va s'associer à plusieurs protéines tels que le Sec-specific eukaryotic elongation factor (eEFSEC), la SECIS binding protein 2 (SBP2) et la translocation protein (SECp43) pour former le séléosome (Fig. 4-E). Il a été montré une interaction protéine-ARN entre la SECp43 et l'ARNt^{[ser]sec}. Divers rôles de cette protéine SECp43 sont suggérés 1) la méthylation de l'ARNt^{[ser]sec} avant la synthèse de sélénoprotéines 2) son rôle dans l'assemblage avec eEFSEC et SBP2 (Oudouhou et al., 2017), et 3) SECp43 permettrait la translocation du séléosome dans le noyau (Xu et al., 2005).

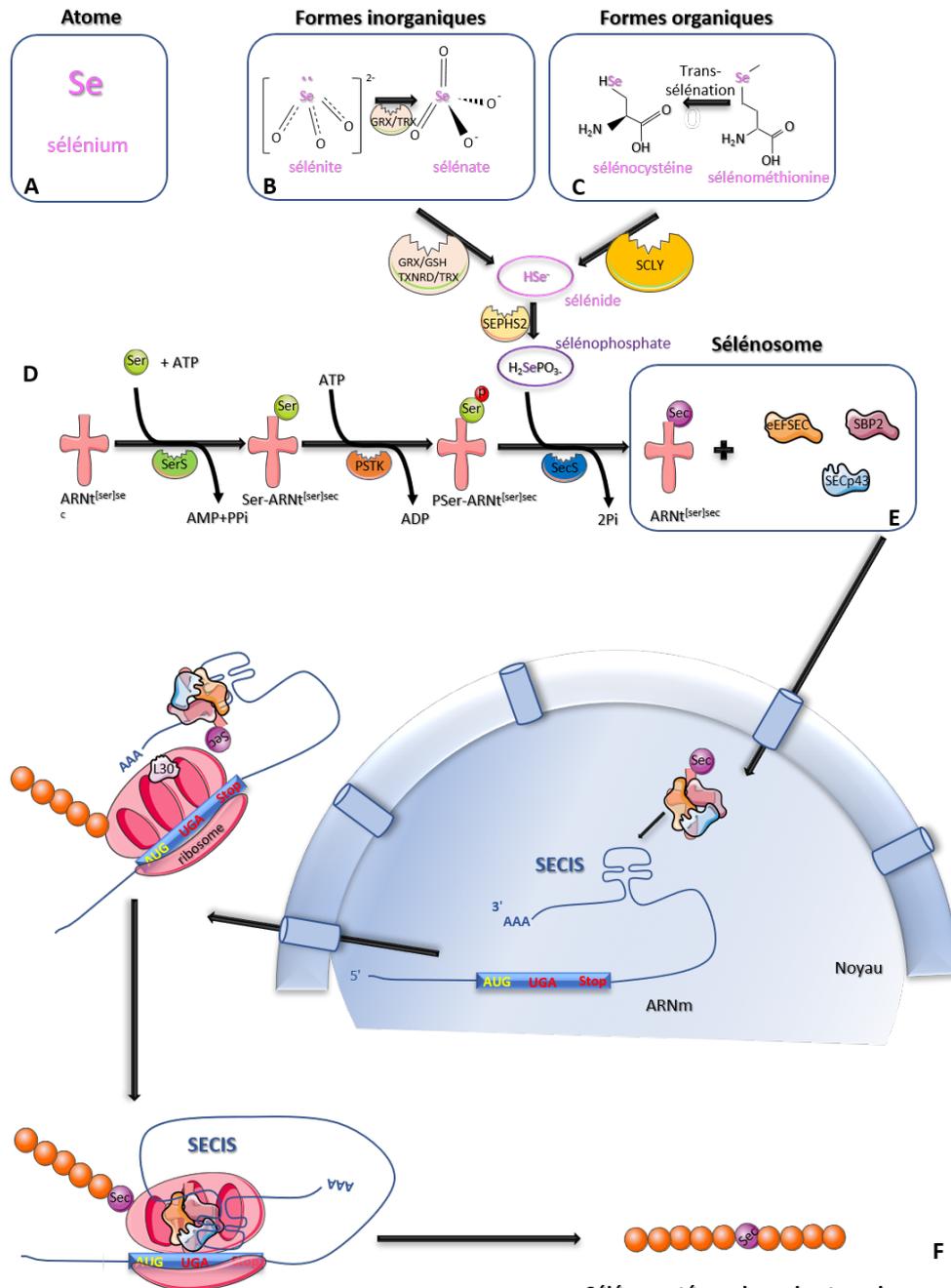
c. Le rôle de l'élément SECIS

Les ARNm des sélénoprotéines ont dans leur région 3'-terminale une structure particulière appelée élément SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence). Le SECIS, d'une longueur d'une soixantaine de nucléotides se caractérise par sa forme en « tige-boucle ». Cette architecture particulière va permettre de traduire le codon UGA, normalement codon stop, en sélénocystéine afin d'insérer cette dernière dans la séquence d'acides aminés pour former une sélénoprotéine (Berry et al., 1991; Low and Berry, 1996). Le complexe protéique associé à l'ARNt^{[ser]sec} formant le sélénosome est fondamental pour l'incorporation du 21^{ème} acide aminé dans les protéines à sélénium. En effet, le SBP2 de ce complexe est un élément central pour la synthèse des sélénoprotéines, car se compose de domaines riches en lysine (K-rich domain) permettant sa liaison au domaine SECIS mais également à la sous unité ribosomale 60S (Takeuchi et al., 2009; Kossinova et al., 2014). De plus, cette protéine va recruter le complexe eEFSEC-ARNt^{[ser]sec} (Fagegaltier et al., 2000). La formation du complexe eEFSEC-ARNt^{[ser]sec} se fait via un domaine particulier de l'eEFSEC. Sa structure, chez l'humain, en forme de calice se compose de 4 domaines, les 3 domaines terminaux possèdent les sites fonctionnels majeurs de cette protéine et ont un repliement de type EF-Tu, alors que le domaine 4 va se lier à l'ARNt^{[ser]sec} et aussi à la SBP2. Ce domaine 4 va avoir une activité GTPase qui joue un rôle essentiel pour la libération de l'ARNt^{[ser]sec} du ribosome (Simonović and Puppala, 2018). La protéine ribosomique L30 va en se liant à l'élément SECIS déplacer le SBP2 et contribue à la libération du complexe eEFSEC-ARNt^{[ser]sec} (Chavatte et al., 2005) (Fig. 4-F). Ainsi, le 21^{ème} acide aminé, la sélénocystéine, est inséré dans la protéine pour former une sélénoprotéine.

d. Le sélénoprotéome

Les sélénoprotéines sont retrouvées quasiment dans l'ensemble des espèces du vivant (Hatfield et al., 2014) et leur identification a été réalisée via deux approches : l'identification par expérimentation biochimique (Gladyshev et al., 1998) ou l'identification par une approche bioinformatique ayant permis l'identification de 25 gènes codant pour les sélénoprotéines humaines composant le sélénoprotéome décrit ci-dessous (Kryukov et al., 2003) (Fig. 4-G). Les sélénoprotéines ont des fonctions diverses, notamment des fonctions d'homéostasie redox, mais aussi des fonctions enzymatiques. Afin de limiter les ambiguïtés concernant les différentes appellations pour des mêmes sélénoprotéines, une nomenclature a été validée par le HUGO Gene Nomenclature Committee en 2016 pour uniformiser ces appellations. Les sélénoprotéines

avec des fonctions enzymatiques connues sont désignées par l'acronyme désignant cette fonction et le numéro qui lui est associé. Cette nomenclature s'applique aux thiorédoxine réductases : TXNRD1,...,3, les glutathion peroxydases (GPX1,...,4,6), les iodothyronine déiodinases (DIO1,...,3), la méthionine sulfoxide réductase B1 (MSRB1) et la sélénophosphate synthétase 2 (SEPHS2). Pour les sélénoprotéines dont les fonctions sont moins, voire pas connues, le symbole SELENO a été choisi comme racine commune, suivi de la lettre désignant la sélénoprotéine. Ainsi, une homogénéisation des appellations des sélénoprotéines est reconnue par la communauté scientifique. Sont regroupées dans cette nomenclature les sélénoprotéines suivantes, dont les noms historiques se trouvent entre parenthèses, SELENOF (sélénoprotéine F, 15-kDa sélénoprotéine, SEP15), SELENOH (sélénoprotéine H, SELH, C11or f31), SELENOI (sélénoprotéine I, SELI, EPT1), SELENOK (sélénoprotéine K, SELK), SELENOM (sélénoprotéine M, SELM), SELENON (sélénoprotéine N, SEPN1, SELN), SELENOO (sélénoprotéine O, SELO), SELENOP (sélénoprotéine P, SeP, SEPP1, SELP), SELENOS (sélénoprotéine S, SELS, SEPS1, VIMP), SELENOT(sélénoprotéine T, SELT), SELENOV(sélénoprotéine V, SELV) et SELENOW (sélénoprotéine W, SELW, SEPW1) (Gladyshev et al., 2016).



Abbreviations :

| | |
|---|--|
| : glutathione réductase/ thioredoxine | : séryl-ARNt synthétase |
| : glutathione réductase/ glutathione thioredoxine réductase/ thioredoxine | : phosphoséryl-ARN kinase |
| : sélénocystéine lyase | : sélénocystéine synthase |
| : sélénophosphate synthétase 2 | : Sec-specific eukaryotic elongation factor |
| : sérine | : SECIS binding protein 2 |
| : phosphosérine | : translocation protéine |
| : sélénocystéine | : protéine L30 |
| | SECIS : SélénoCystéine Insertion Sequence |

Sélénoprotéome humain et murin

| Symbole : | Nom : |
|-----------------|-------------------------------------|
| GPX1, ..., 4, 6 | Glutathione peroxydase 1, ..., 4, 6 |
| TXNRD1, ..., 2 | Thioredoxine réductase 1, ..., 2 |
| TXNRD3 | Thioredoxine-glutathion réductase |
| DIO1, ..., 3 | Iodothyronine désiodase 1, ..., 3 |
| MSRB1 | Méthionine sulfoxyde réductase B1 |
| SEPHS2 | Sélénophosphate synthétase 2 |
| SELENOF | Sélénoprotéine F |
| SELENOH | Sélénoprotéine H |
| SELENOI | Sélénoprotéine I |
| SELENOK | Sélénoprotéine K |
| SELENO M | Sélénoprotéine M |
| SELENO N | Sélénoprotéine N |
| SELENO O | Sélénoprotéine O |
| SELENO P | Sélénoprotéine P |
| SELENO S | Sélénoprotéine S |
| SELENO T | Sélénoprotéine T |
| SELENO V | Sélénoprotéine V |
| SELENO W | Sélénoprotéine W |

Figure 4 : Schéma des différentes étapes de la biosynthèse des sélénoprotéines. (A) l'atome de sélénium (Se) est l'élément essentiel qui caractérise les sélénoprotéines. Le Se est disponible sous différentes formes, inorganiques (B) ou organiques (C) et va être intégré à l'ARNt^{[ser]sec} (D). L'association de l'ARNt^{[ser]sec} avec les protéines, eEFSEC, SBP2 et SECp43 va former le sélénosome, complexe qui sera transloqué dans le noyau et pourra se lier à l'élément SECIS, élément spécifique de l'ARNm des sélénoprotéines, afin d'incorporer l'acide aminé sélénié lors de la traduction de la sélénoprotéine (F). 25 sélénoprotéines sont identifiées et composent le sélénoprotéome humain (G).

2. Localisations et fonctions des sélénoprotéines

Les sélénoprotéines sont des protéines ayant différentes fonctions : enzymatiques, oxydo-réductrices, de stockage et de transport du sélénium, dans le métabolisme hormonal, dans le contrôle qualité des protéines et dans la régulation du calcium intracellulaire. Malgré une recherche importante sur ces protéines, les fonctions de certaines sélénoprotéines restent inconnues (Fig. 5).

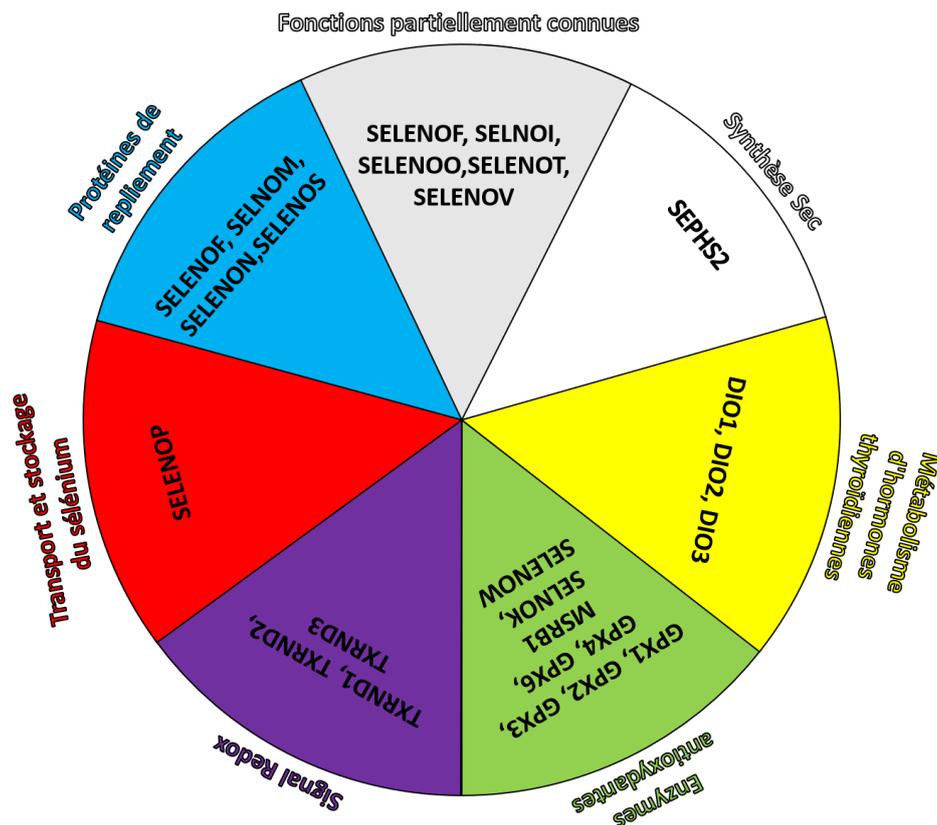


Figure 5 : Les fonctions biologiques connues des 25 sélénoprotéines. Diverses fonctions ont été caractérisées et permettent une classification par fonction des différentes sélénoprotéines représentée dans ce graphique circulaire.

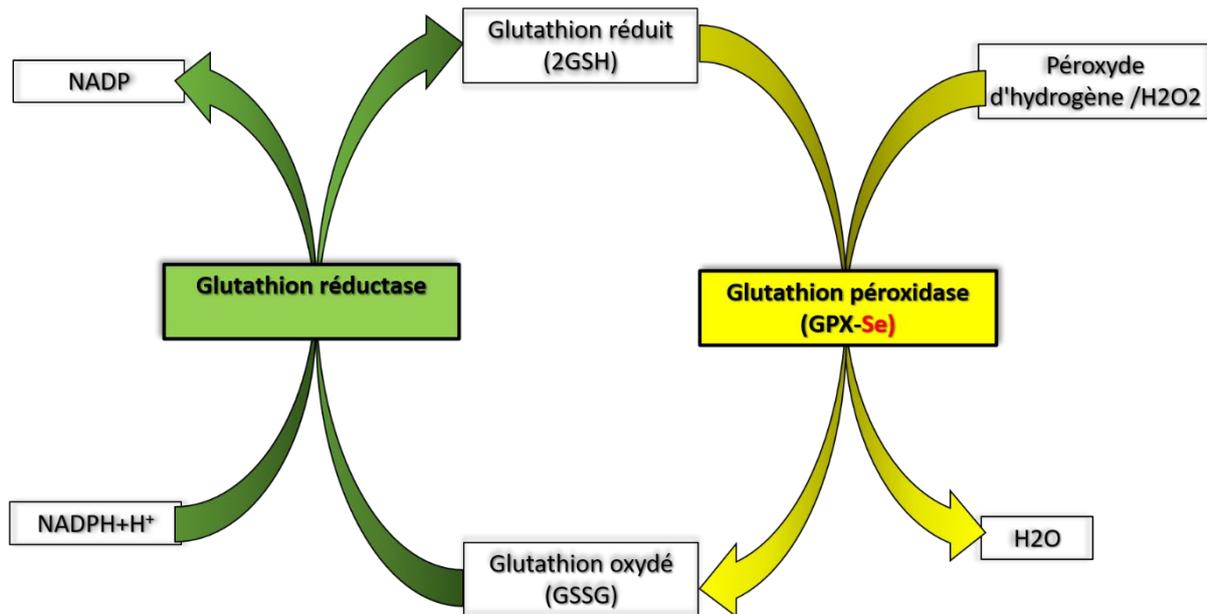


Figure 7 : Schéma de la réduction du peroxyde d'hydrogène en H₂O par le glutathion peroxydase contenant la sélénocystéine. Cette réaction de réduction va produire du glutathion oxydé (GSSG) qui pourra être réduit par la glutathion réductase afin de produire du glutathion réduit en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite, NADPH+H⁺ et sera retrouvé sous forme oxydée, NAP⁺.

- La SELENOP est la sélénoprotéine la plus abondante du plasma. Synthétisée dans le foie, elle est ensuite sécrétée pour constituer la majeure partie des réserves de sélénium de l'organisme. Plus de 65 % des réserves de sélénium de l'organisme seraient sous forme de SELENOP, ce qui lui confère un rôle majeur dans le stockage et le transport du sélénium (Motsenbocker and Tappel, 1982; Saito and Takahashi, 2002). Cette sélénoprotéine est une glycoprotéine qui a la particularité de contenir plusieurs résidus Sec, jusqu'à 10 chez l'humain, ce qui conforte son rôle de réserve de sélénium (Burk and Hill, 1994). Sa liaison avec les récepteurs de lipoprotéines ApoER2 facilite son absorption dans le testicule, le cerveau, et dans les tubes proximaux du rein ; ApoER2 permet également sa rétention dans le cerveau (Burk and Hill, 2009).

b. Dans la membrane plasmique : DIO1, DIO3, SELENOI, SELENOW

- La DIO1 est une enzyme de la famille des iodothyronine déiodinases (Itoh et al., 2010), enzymes impliquées dans l'activation ou l'inactivation des hormones thyroïdiennes (Darras, 2021). La DIO1 est une protéine homodimérique pouvant désioder par réduction la prohormone thyroxine (T4) en 3,5,3'-triiodothyronine (T3) ou en 3,3',5-triiodothyronine (rT3). Elle convertit également la T3 en 3,3-diiodothyronine (T2) (Fig 8). Cette protéine fut la

première iodothyronine déiodinase découverte en 1990 par Behne (Behne et al., 1990), et son expression est détectée dans différents organes comme le cerveau, les ovaires, la glande pituitaire, le foie, le rein et la thyroïde (St. Germain et al., 2005).

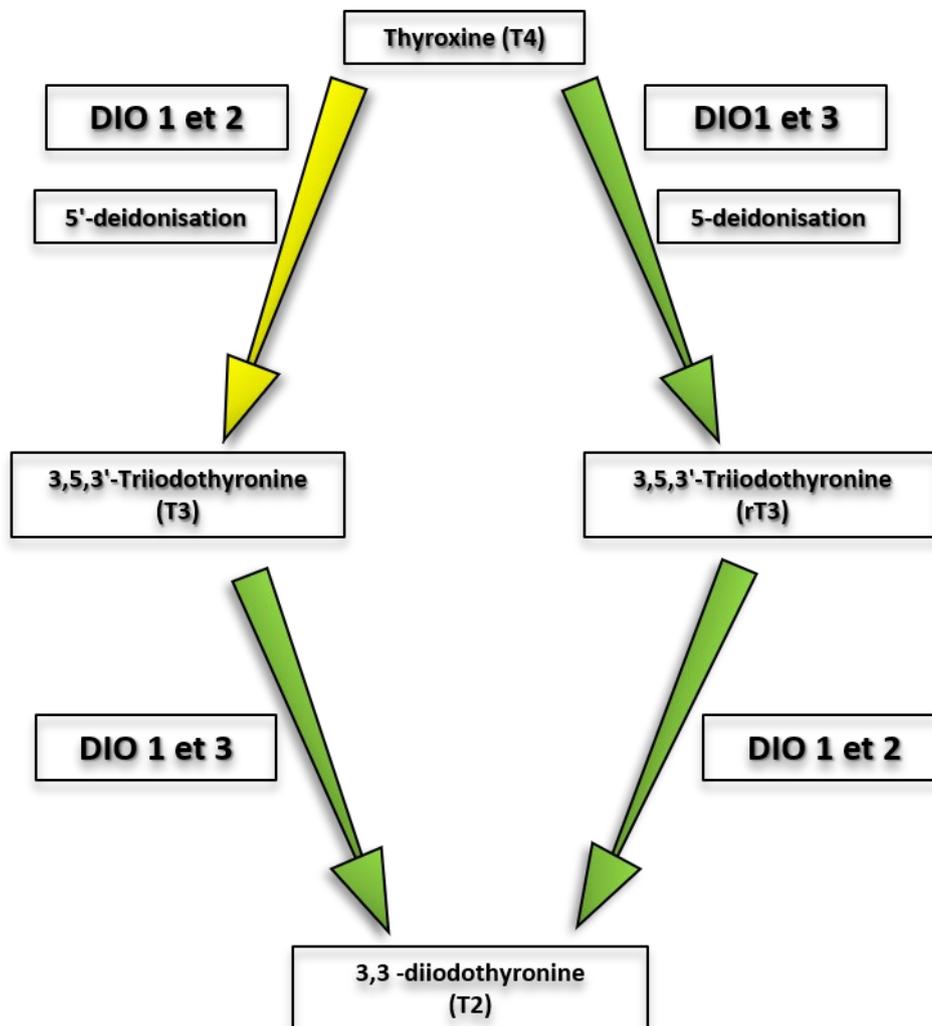


Figure 8 : Cascade métabolique des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes sont catalysées par les déiodinases 1, 2 et 3. Les sélénoprotéines DIO ont pour fonction d'activer ou d'inactiver les hormones thyroïdiennes.

- La DIO 3 a pour fonction l'inactivation de la thyroxine, prohormone T4, en la convertissant en rT3, ou en convertissant la T3 en T2 (Fig. 8). Cette sélénoprotéine est exprimée dans le cerveau, le foie, les ovaires, le placenta, la peau et les testicules (St. Germain et al., 2005).

- La SELENOI, également nommée éthanolamine phosphotransférase, est l'enzyme qui catalyse la troisième réaction de la voie de synthèse de la phosphatidyléthanolamine, la voie Kennedy. Cette enzyme est indispensable dans la myélinisation, durant le développement neurologique et dans le maintien de l'homéostasie des phospholipides (Horibata et al., 2018).

- La SELENOW est une sélénoprotéine essentiellement cytosolique présente une faible fraction membranaire (Yeh et al., 1995). Une description plus précise de ses fonctions se trouve dans le chapitre I page 35.

c. Dans le cytoplasme : GPX1, GPX2, GPX4, GPX6, TXRND1, TXRND3, MSRB1, SEPHS2, SELENOV, SELENOW

- La GPX1 est une sélénoprotéine du cytoplasme qui fut la première des glutathion peroxydases identifiée (Rotruck et al., 1973). Protéine ubiquitaire composée de quatre sous unités identiques, cette homotétramère utilise exclusivement le GSH pour la réduction des hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Fig. 7). L'activité de la GPX1 est extrêmement sensible à la disponibilité en sélénium. En effet, lors de la déficience en sélénium la GPX1 sera la première et la plus impactée des GPX (Sunde et al., 2009). L'impact phénotypique sur des souris *GPX1*^{-/-} n'est ni létale, ni délétère. L'absence de cette protéine réduit le niveau de sélénium dans le foie, prouvant sa présence dans cet organe, sans entraîner de conséquences phénotypiques majeures et laissant penser que cette GPX joue un rôle physiologique mineur (Sunde et al., 2018).

- Le rôle de barrière de la GPX2 contre l'absorption d'hydroperoxyde au niveau du système gastro-intestinal suggère un rôle de protection essentiel de la part de cette GPX (Wingler et al., 2000). Étant retrouvée dans les cellules épithéliales du poumon (Singh et al., 2006), mais aussi dans des cellules épithéliales cancéreuses (Chiu et al., 2005), cela suppose que cette GPX serait la première ligne de défense contre le stress oxydatif. De plus, un classement reflétant le niveau d'expression des GPXs suivant la disponibilité du sélénium a été établi dans cet ordre GPX2 > GPX4 > GPX3 = GPX1 (Wingler et al., 1999). La place de la GPX2 dans ce classement laisse présager de son importance dans le système biologique.

- La GPX4 est une enzyme monomérique ubiquitaire présentant trois isoformes. Chaque isoforme étant localisée spécifiquement dans le cytosol, la mitochondrie ou le noyau. Cette GPX a comme particularité d'avoir comme substrat l'hydroperoxyde phospholipidique (Conrad et al., 2007). La GPX4 est indispensable à la survie car les souris *GPX4*^{-/-} présentent une létalité embryonnaire (Imai et al., 2003). Une surexpression de l'isoforme cytosolique de la GPX4 dans les lignées cellulaires tumorales pancréatiques entraîne une inhibition de la croissance cellulaire après transplantation (Liu et al., 2006).

- La GPX6, comme les autres membres de sa famille, joue un rôle protecteur dans le stress oxydatif. Elle est localisée chez l'embryon, dans l'épithélium olfactif (Kryukov et al.,

2003), et dans les organes reproducteurs où sa fonction semble importante dans la vitalité et la capacitation des spermatozoïdes (Y Chen et al., 2020).

- La TXNRD 1 fait partie de la famille des thiorédoxine réductases composée de 3 membres. Cette famille de protéines dimériques va limiter le stress oxydatif. En s'associant à la coenzyme flavine adénine dinucléotide, ce complexe protéique va réduire la thiorédoxine oxydée en utilisant la $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Fig. 9) (Nordberg and Arnér, 2001). La TXNRD1 est une sélénoprotéine importante, hautement placée dans le classement hiérarchique des sélénoprotéines. En effet, la surexpression de la TXNRD1 dans une lignée cellulaire entraîne une baisse des autres sélénoprotéines (Nalvarte et al., 2004). Son implication est multiple dans la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire et la protection contre les cancers. Une étude récente a montré son rôle protecteur des neurones dopaminergiques dans des modèles de la maladie de Parkinson, en interférant avec la voie p53 (Z Liu et al., 2021).

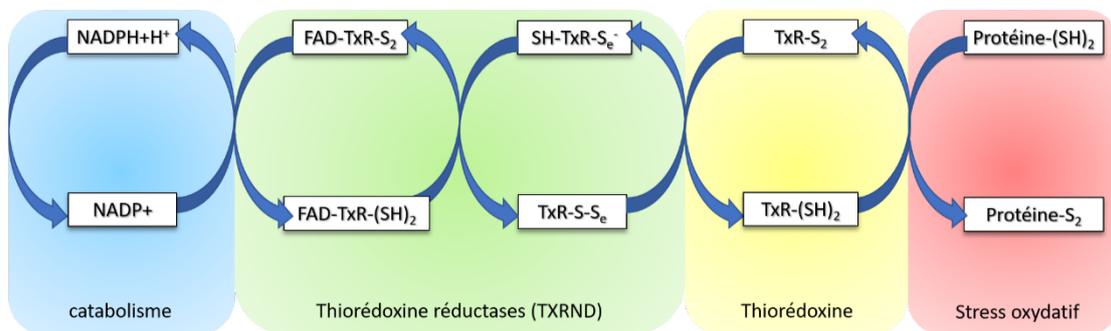


Figure 9 : Chaîne des réactions enzymatiques du système thiorédoxine. L'utilisation du substrat $\text{NADPH} + \text{H}^+$ par les thiorédoxines réductases permet la réduction des ponts disulfures du site actif de la thiorédoxine. La thiorédoxine ainsi réduite est très efficace pour la réduction des ponts disulfures des protéines, peptides et également du glutathion.

- La TXNRD3 est une thiorédoxine réductase particulière car elle possède un domaine Grx (monothiol glutarédoxine) attaché au domaine thiorédoxine réductase ; cette structure étant une clef fonctionnelle pour les réactions thiol-disulfure (Dobrovolska et al., 2012). Cette sélénoprotéine permet la formation de ponts disulfures et joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes (Su et al., 2005).

- La méthionine peut être oxydée par des espèces réactives à l'oxygène. Cette oxydation a des conséquences dramatiques sur les protéines et leurs fonctions. Cependant, la réduction de la méthionine oxydée est possible via des enzymes spécifiques, les méthionine sulfoxyde réductases, qui existent sous plusieurs isoformes conditionnant leur localisation dans les compartiments cellulaires. Dans le génome humain et murin, trois gènes de la MSRFB existent. La MSRFB1, localisée dans le cytoplasme et le noyau, est la méthionine sulfoxyde

réductase possédant la plus forte activité de réduction car elle est la seule à avoir dans sa séquence une sélénocystéine (Kim and Gladyshev, 2004).

- Chez les bactéries la sélénophosphate synthétase (SelD) génère le donneur de sélénium pour la biosynthèse de la sélénocystéine, or chez les eucaryotes deux homologues de la SelD existent, la sélénophosphate synthase 1 et 2, mais seule la 2 est une sélénoprotéine. Sur modèle cellulaire, il a été montré le rôle essentiel de la SEPHS2 pour la biosynthèse des sélénoprotéines, ce qui n'est pas le cas de la SEPHS1 (Xu et al., 2007).

- La SELENOV est décrite comme étant la moins conservée des sélénoprotéines (Chen et al., 2020). Exclusivement retrouvée chez les mammifères placentaires à l'exception du gorille, la SELENOV est présente de façon abondante dans les tubes séminifères des testicules (Kryukov et al., 2003; Chen et al., 2020). La SELENOV contenant une thiorédoxin-like a une fonction importante dans la maturation des spermatozoïdes en les protégeant du stress du RE et des lésions oxydatives induit par des pro-oxydants (X Zhang et al., 2020). Les souris déficientes en SELENOV montrent une accumulation de la masse grasse mais également une diminution de la consommation d'O₂, de la production de CO₂ et de la consommation énergétique, ceci étant la conséquence d'une interaction protéine-protéine entre la SELENOV et la O-N-Acétyleglucosamine. La SELENOV semble être un acteur important dans l'accumulation de graisse et comme activateur énergétique (Chen et al., 2020; Chen et al., 2021).

- Yeh et al ont montré en 1995 que la SELENOW est localisée dans différents tissus chez le rat dont le muscle, les testicules, le cerveau, la rate (Yeh et al., 1995). La distribution de cette sélénoprotéine dépend en fait du niveau de sélénium disponible dans l'organisme. Une déficience en sélénium entrainera une baisse de la SELENOW dans le muscle squelettique, le cœur, la peau, l'intestin, la prostate, l'œsophage, alors que son expression dans le cerveau restera préservée (Whanger, 2000). La liaison de haute affinité de la SELENOW avec le glutathion suggère une fonction antioxydante de cette sélénoprotéine (Beilstein et al., 1996) Son rôle protecteur dans des modèles de stress oxydant a été effectivement démontré en surexprimant la SELENOW dans des modèles cellules CHO et H1299 humaines (Jeong et al., 2002).

d. Dans la mitochondrie : GPX4, TXRND2, SELENOO

- La GPX4 mitochondriale possède les mêmes particularités concernant les substrats pris en charge que les autres isoformes de GPX (Conrad et al., 2007). Il a été montré

que la surexpression de cette isoforme dans les lignées tumorales pancréatiques conduit à l'inhibition de la croissance tumorale après transplantation (Trachootham et al., 2006). De plus, cette isoforme est surexprimée entre les stades embryonnaires E14.5 et E17.5 car indispensable au neurodéveloppement (Borchert et al., 2006).

- Isolée à partir d'une banque d'ADNc de surrénale humaine, la TXNRD2 présente de nombreuses homologies avec l'enzyme cytosolique TXNRD1. La TXNRD2, comme la TXNRD1, conserve le site actif CVNVGC qui catalyse de nombreuses réactions redox par son oxydation réversible et est maintenue à l'état réduit via la flavoenzyme qui utilise le pouvoir réducteur du NADPH de façon séquentielle par la paire Cys-Sec. La différence majeure réside dans la présence de 33 acides aminés en N-terminale ayant des propriétés de translocation mitochondriale (Miranda-Vizuete et al., 1999). Comme son homologue, cette thiorédoxine réductase fait partie du système thiorédoxine composé de NADPH qui joue un rôle primordial dans la défense contre le stress oxydatif qui est très présent dans la mitochondrie (Fig. 9) (Lu and Holmgren, 2014).

- Caractérisée dans les cellules de rein humain HEK 293T, le motif CxxU a été identifié dans la partie C-terminale de la protéine SELENOO. Dans ce modèle cellulaire traité par le peroxyde d'hydrogène, la SELENOO présente une oxydation réversible dans le temps. Ce résultat suggère une interaction redox avec un partenaire protéique inconnu via le résidu Sec de la sélénoprotéine (Han et al., 2014). Une hypothèse émise récemment basée sur la prédiction fonctionnelle et structurelle indique que la SELENOO aurait une fonction kinase, ce qui reste à confirmer expérimentalement (Dudkiewicz et al., 2012).

e. Dans le réticulum endoplasmique : DIO2, SELENOF, SELENOM, SELENOK, SELENOS, SELENON, SELENOT

- La DIO2 fait partie, avec la DIO1 et DIO3, de la famille des iodothyronine déiodinases. Elle est la seule DIO localisée dans la membrane du RE (Baqui et al., 2000). Cette sélénoprotéine catalyse la déiodination de l'hormone T4 en T3, et l'hormone rT3 en T2 (Fig. 8) (St. Germain et al., 2005). La production de T3 dans le SNC via la DIO2 est particulièrement importante au cours du développement, pour la régulation de la thermogénèse et pour les fonctions hypophysaires (St. Germain et al., 2005). Elle est exprimée au niveau du SNC, de la masse grasseuse, de la cochlée, du cœur, du muscle, de la glande pituitaire, du placenta, de la peau (chez l'embryon), des testicules, de la thyroïde et de l'utérus (St. Germain et al., 2005).

- La SELENOF identifiée dans les cellules T humaines (Gladyshev et al., 1998), est localisée dans la thyroïde et la prostate (Korotkov et al., 2001). Cette sélénoprotéine possède un motif hautement conservé, Cys-Gly-Sec-Lys qui suggère un centre actif redox avec une liaison séléno-sulfure entre la Sec et la Cys. L'étude de Korotkov et al. montre que cette sélénoprotéine forme un complexe avec l'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGTR), enzyme impliquée dans le contrôle qualité des protéines. De plus la localisation dans le RE suggère l'implication de la SELENOF dans la régulation du repliement des protéines (Korotkov et al., 2001). La SELENOF est fortement exprimée dans des lignées cellulaires de cancer du côlon laissant penser que ses fonctions redox accrues permettent la prolifération et la métastatisation tumorale des cellules cancéreuses. Le stade ou le grade tumoral pourrait avoir un effet sur l'activité anti ou pro tumorigène car 60% des mésothéliomes malins présentent une régulation négative de l'expression de l'ARNm de cette sélénoprotéine (Hatfield et al., 2014).

- Les caractéristiques et fonctions précises des sélénoprotéines ne sont, pour une partie d'entre elles dont la SELENOM, pas encore totalement connues. Cependant, la SELENOM présente un motif structural de type thiorédoxine, suggérant un rôle d'oxydoréductase (Liu et al., 2018). En utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*, le rôle de la SELENOM dans le métabolisme énergétique a pu être montré. En effet, la leptine favorise l'expression de la SELENOM dans l'hypothalamus. De plus, l'absence de SELENOM entraîne une altération de la phosphorylation de STAT3 induite par la leptine. Dans le modèle cellulaire mHypoE-44, la surexpression de la SELENOM améliore la sensibilité à la leptine. Ces résultats indiquent que la SELENOM est un régulateur positif de la signalisation de la leptine au niveau de l'Hyp (Gong et al., 2019).

- La SELENOK, protéine de 11 KDa, est classée dans la même famille que la SELENOS. Des recherches biochimiques ont montré une interaction entre le complexe ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation) et la SELENOK, en particulier via la Derlin-1. La SELENOK co-précipite avec des substrats glycosylés du complexe ERAD et participe à leur dégradation. Dans des modèles de stress du RE par accumulation de protéines mal conformées, le gène de la SELENOK est surexprimé. De plus, des liaisons avec des composants du complexe oligosacharyltransférase (ribophorins, OST48, STT3A) et la calnexine, protéine chaperonne ont été observées (Shchedrina et al., 2011). Enfin, la suppression de la SELENOK dans les cellules immunitaires entraîne une diminution du flux Ca^{2+} ce qui entraîne un affaiblissement de l'immunité. Cette diminution du flux de Ca^{2+} serait

la conséquence d'un défaut de palmitoylation de l'IP3R, elle-même conséquence d'une perturbation du complexe DHHC6/SELENOK (Verma et al., 2011; Fredericks et al., 2014).

- La SELENOS, comme la SELENOK, possède des propriétés redox. Ces 2 protéines ont dans leurs parties C-terminales cytoplasmiques la Sec. La SELENOS est également associée au système ERAD, en se liant aux composants p97 ATPase, derlines et SELENOK. Là où la SELENOK montre une affinité importante pour la derline-1, la SELENOS se lie préférentiellement à la derline-2, suggérant une détermination de la nature des substrats transloqués dans le canal derline par ces sélénoprotéines (Shchedrina et al., 2011).
- La SELENON, identifiée par la technique de reconnaissance de séquence *in silico* (Lescure et al., 1999), est une glycoprotéine du RE. Des mutations du gène codant pour la SELENON sont trouvées chez des patients atteints de myopathie et de dystrophie musculaire avec rigidité rachidienne (Petit et al., 2003). Des souris déficientes en SELENON présentent une résistance à l'insuline (Varone et al., 2019). Fortement exprimée dans les premiers stades du développement embryonnaire et au cours de la régénération ou prolifération cellulaire, cette sélénoprotéine est essentielle mais non vitale pour l'organisme (Petit et al., 2003). La SELENON est un acteur important dans la régulation du Ca^{2+} du RE, les variations lumineales du Ca^{2+} entraînent un changement dynamique de la sélénoprotéine améliorant l'interaction redox-dépendante avec la pompe Ca^{2+} SERCA qui agit en tant que partenaire de la SELENON, modulant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans le RE (Chernorudskiy et al., 2020).

- La SELENOT, découverte en 1999 par une approche bioinformatique basée sur la recherche de l'élément SECIS (Kryukov et al., 1999) est la sélénoprotéine étudiée dans ce projet de recherche de thèse. Une description complète est développée dans le chapitre I page 39.

f. Dans le noyau : GPX4, SELENOH, MSRB1

- L'isoforme nucléaire de la GPX4 a les mêmes substrats que les isoformes cytoplasmique et mitochondriale (Conrad et al., 2007). Les souris invalidées pour cette isoforme de cette GPX4 sont viables mais présentent un défaut de condensation de la chromatine dans les cellules germinales mâles (Conrad et al., 2005). De plus, la surexpression de la GPX4 nucléaire dans des embryons entraîne des malformations cardiaques (Borchert et al., 2006).

- Le modèle d'expression de la SELENOH est unique, cette sélénoprotéine de 14KDa n'a aucune homologie de séquence avec des protéines caractérisées dans leurs fonctions

(Novoselov et al., 2007). La SELENOH possède un motif CXXU caractéristique des protéines de type thiorédoxine ayant des fonctions redox, exprimée jusqu'au stade de développement E14.5, elle est retrouvée chez l'adulte dans la rate, le cerveau et le thymus (Novoselov et al., 2007). La SELENOH régule l'expression des gènes impliqués dans le statut redox et la défense antioxydante. En effet, cette sélénoprotéine se lie à l'ADN (Barage et al., 2018) et régule l'expression des gènes de synthèse du glutathion et des protéines de détoxification de phase II (Panee et al., 2007). Le rôle dans la tumérogénèse de la SELENOH est également décrit puisque son expression est augmentée dans le tissu tumoral où elle est impliquée dans la prolifération cellulaire (Bertz et al., 2018).

- Les fonctions de cette méthionine sulfoxide réductase sont décrites dans le chapitre I page 3. Deux isoformes de la MSRB1 ont été isolées : une isoforme de 5 KDa et une autre de 14 KDa. Les modèles de souris KO présentent des niveaux importants de malondialdéhyde, de carbonyles et de sulfoxyde de méthionine sur les protéines et de glutathion oxydé, ainsi que des niveaux réduits de thiols libres et protéiques spécifiquement dans le foie et le rein (Fomenko et al., 2009).

3. Focus sur la SELENOT

a. Sa découverte

La SELENOT a été identifiée via une approche bioinformatique visant à trouver la séquence génétique caractéristique des sélénoprotéines, l'élément SECIS (Kryukov et al., 1999). Chez l'homme, le gène de la SELENOT est localisé sur le chromosome 3 dans la région 3q25.1. L'ARNm issu de la transcription du gène se constitue de 6 exons, la séquence Sec se situant sur l'exon 2, et la séquence SECIS nécessaire à sa traduction sur l'exon 6. Une fois traduite, la SELENOT est une protéine de 195 acides aminés composée de 4 feuillets β et 6 hélices α . Entre le premier feuillet β et la première hélice α se trouve une séquence particulière, la séquence Cys-X-X-Sec (Dikiy et al., 2007) qui est un motif de type *thioredoxin-like fold* (Qi and Grishin, 2005) caractéristique d'un centre redox ayant une activité d'oxydoréductase. La SELENOT a une particularité par rapport aux autres *thioredoxin-like fold* puisque cette protéine possède 3 hélices α supplémentaires et deux domaines hydrophobes qui permettent un adressage transmembranaire (Grumolato et al., 2008; Anouar et al., 2018) ; les hélices α_1 , α_2 , α_3 et α_4 composent les domaines transmembranaires (Fig. 10).

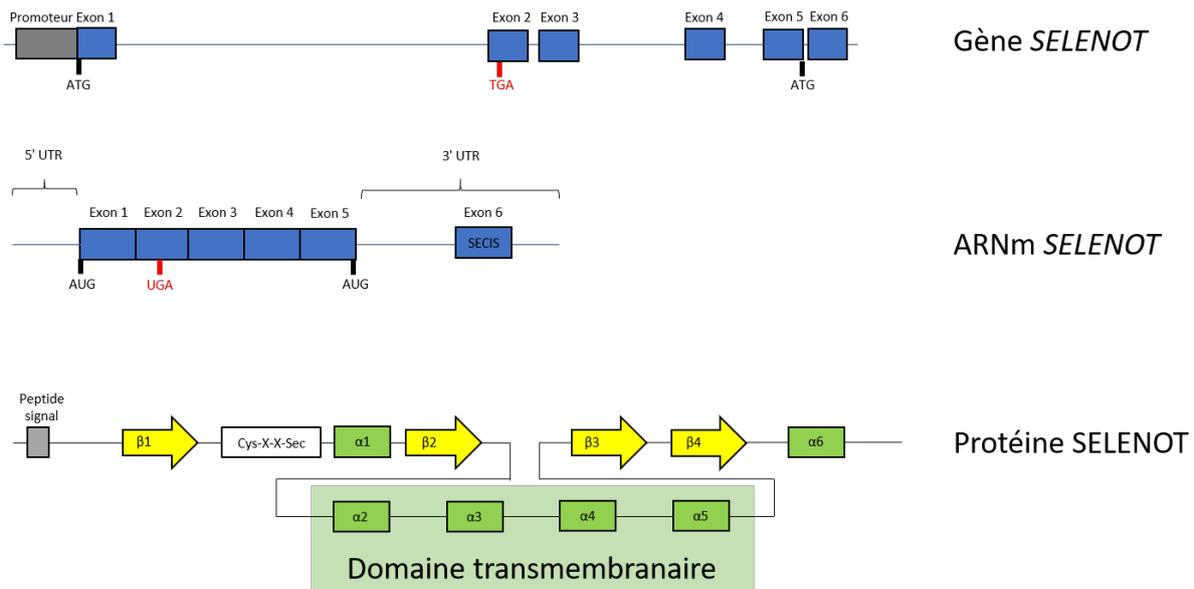


Figure 10 : Représentation schématique du gène, de l'ARNm et de la protéine de la SELENOT. Le gène de la SELENOT se compose de 6 exons, l'exon 2 comprenant la séquence Sec. La protéine, une fois traduite, présente 4 hélices α , $\alpha 2$ à $\alpha 5$, qui forment les domaines transmembranaires de cette protéine.

La séquence génétique de la SELENOT est extrêmement conservée. En effet, la comparaison des séquences chez les mammifères montre 97-100% d'homologie entre l'humain et certains mammifères, 95% d'homologie entre l'homme et le poulet, 89% d'homologie entre l'homme et la grenouille, et 60-77% d'homologie entre l'homme et le poisson zèbre (Moustafa and Antar, 2012). De plus, l'arbre de l'évolution du sélénoprotéome chez les vertébrés place la SELENOT à sa racine (Mariotti et al., 2012). Ces données suggèrent que la SELENOT joue un rôle fondamental dans le règne du vivant.

Une étude de notre équipe de recherche a montré la localisation subcellulaire de la SELENOT dans le modèle de cellules de phéochromocytomes PC12. Des immunomarquages de la SELENOT avec la GRP78 et la SgII montrent une colocalisation de la sélénoprotéine avec la GRP78, marqueur du RE, mais pas avec la SgII, marqueur des granules de sécrétion (Grumolato et al., 2008). La localisation au niveau du RE a été confirmée par des observations réalisées par microscopie électronique, ce qui a permis de détecter la présence de la SELENOT dans d'autres régions de la cellule, comme le Golgi et occasionnellement dans la membrane plasmique (Hamieh et al., 2017). Des constructions plasmidiques permettant l'expression de formes de SELENOT modifiées ont confirmé l'importance de l'extrémité N-terminale et de la région hydrophobe en position 87-102 pour l'adressage de la SELENOT dans le RE (Grumolato et al., 2008). Dans le RE, la SELENOT est associée au complexe OST. Le complexe OST ou

oligosaccharyltransférase est un complexe protéique catalysant la N-glycosylation co-traductionnelle (Mammadova-Bach et al., 2020). Les protéines STT3A, OST4, OST48, DAD1, RbpI, RbpII, TUSC1, KCP2 et la SELENOT sont les sous-unités protéiques de ce complexe (Anouar et al., 2018; Mammadova-Bach et al., 2020; Pothion et al., 2020) (Fig. 11). La SELENOT se lie à la sous-unité KCP2 et est essentielle à la stabilité du complexe OST (Hamieh et al., 2017). Sans cette stabilité, les fonctions de OST sont altérées, la N-glycosylation, le repliement des protéines, l'homéostasie du RE et la sécrétion hormonale ne sont plus correctement assurées (Hamieh et al., 2017; Anouar et al., 2018; Pothion et al., 2020).

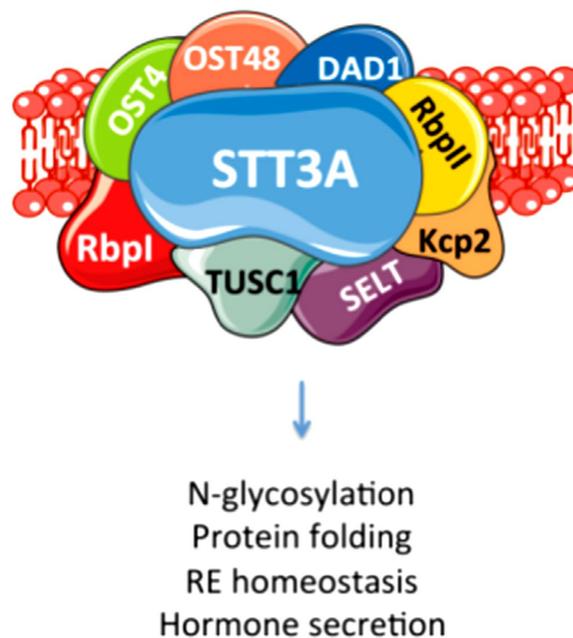


Figure 11 : le complexe oligosaccharyltransférase (OST). Insérée dans le complexe OST, la SELENOT est définie comme étant une des sous-unités de ce complexe. OST a de multiples fonctions : il régule l'homéostasie du réticulum endoplasmique, permet la N-glycosylation des protéines, contrôle le repliement des protéines et est impliqué dans la sécrétion des hormones du système endocrinien. La stabilité du complexe est assurée en partie par l'interaction de la SELENOT et de la sous-unité kcp2 (Anouar et al., 2018).

Il a été montré, à partir d'expérimentations sur le modèle de cellules PC12, que la régulation de l'expression du gène de la SELENOT pendant la différenciation cellulaire est liée à la stimulation des cellules par le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP). Le PACAP active la voie de la protéine kinase A (PKA) via l'APMc et régule l'expression de la SELENOT qui joue un rôle dans l'homéostasie du Ca^{2+} dans le RE et dans les mécanismes de sécrétion activés par le neuropeptide (Grumolato et al., 2008; Anouar et al., 2018) (Fig. 12).

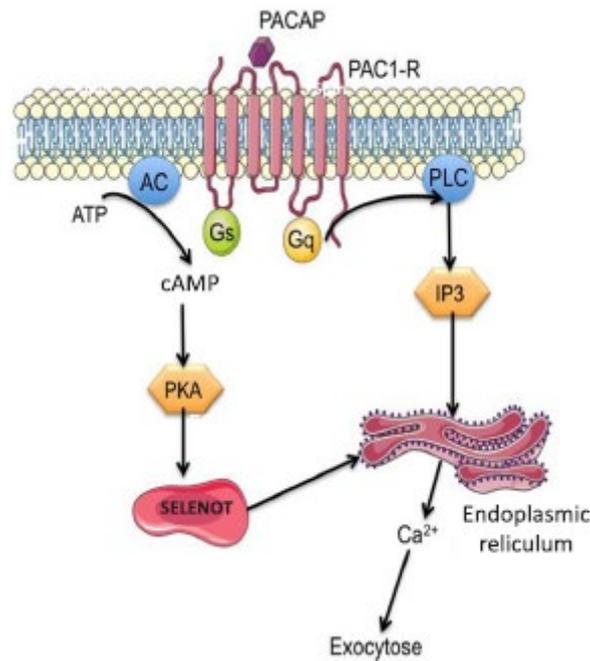


Figure 12 : Activation de l'expression de la SELENOT. La protéine kinase A (PKA) activée par l'AMPc sous l'effet du PACAP entraîne l'expression du gène de la SELENOT. La SELENOT régule les réserves du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique soit en contrôlant la pompe SERCA ou via le récepteur de l'IP3 (Anouar et al., 2018).

Au cours de la différenciation de cellules neuroendocrines, le PACAP/AMPc recrute la voie canonique, voie régulant la fonction mitochondriale. La transcription du gène de la SELENOT va être activée par une cascade de signalisation impliquant l'AMPK, LKB1 et le complexe PGC1- α /NRF-1 favorisant une survie cellulaire et une différenciation de cellules neuroendocrines (Abid et al., 2019) (Fig. 13).

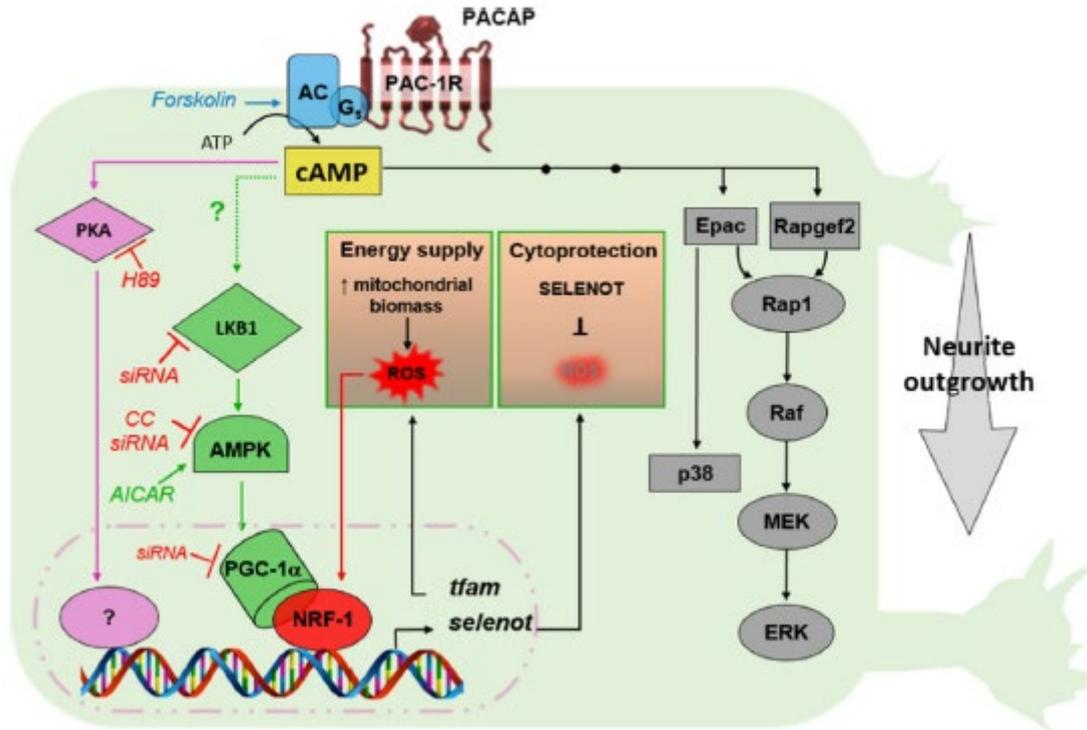


Figure 13 : Rôles métaboliques de la SELENOT. Schématisation de la cascade de signalisation représentant le lien entre les changements métaboliques et la réponse antioxydante de la SELENOT au cours de la différenciation des cellules PC12. Le récepteur du PACAP, PAC-1R, active via l'AMPc, la PKA, et les petites protéines activatrices Epac et le Rapgef2, impliqués dans la différenciation cellulaire. Une cascade APMC-dépendante aboutit à la transcription du gène de la SELENOT notamment en activant les facteurs régulateurs de la transcription PGC-1 α /NRF-1. Le complexe PGC-1 α /NRF-1 activé par la cascade de phosphorylation du LKB1 et de l'AMPK stimule la transcription de la SELENOT qui pourra ainsi jouer son rôle de protection contre les stress oxydant (Abid et al., 2019).

- b. Distribution tissulaire de la SELENOT chez l'animal et les conséquences de l'inactivation de son gène

À différents stades du développement embryonnaire du rat, l'hybridation *in situ* et l'immunomarquage montrent la présence du messager et de la protéine de la SELENOT dans plusieurs organes ayant des fonctions endocrines ou neuroendocrines. Aux stades précoces de l'embryogénèse, à E7, l'ARNm de la SELENOT est observé au niveau du cône ectoplacentaire, de l'endoderme pariétal, de l'endoderme viscéral, de l'ectoderme primaire, de l'extra-embryonnaire ectoderme, et du décidua (Grumolato et al., 2008). La SELENOT est présente tout au long de l'embryogénèse et jusqu'au stade post-natal précoce P14, dans le cerveau, le cervelet, le thymus, le foie, le muscle squelettique, la glande pituitaire, le cœur; la rate, le rein, les testicules, et le tube digestif; ensuite, aux stades adultes l'expression de la SELENOT décroît fortement mais reste visible dans le cerveau, le thymus, la glande pituitaire, la thyroïde

et les testicules (Grumolato et al., 2008; Tanguy et al., 2011). Dans le SNC, cette sélénoprotéine est exprimée dans les neurones en cours de différenciation, neurones positifs à la doublecortine, au niveau de la glie radiaire et de la glie de Bergmann (Tanguy et al., 2011). Dans le pancréas la SELENOT est colocalisée avec l'insuline dans les cellules β pancréatiques (Prevost et al., 2013).

Afin d'approfondir les connaissances et les rôles de la SELENOT sur l'organisme, des modèles d'animaux génétiquement modifiés ont été développés. Des lignées de souris dont les exons 2 et 3 du gène de la SELENOT flanqués par des sites loxP ont été croisées avec des souris CMV-Cre ou Nes-Cre pour inactiver respectivement le gène dans l'organisme ou conditionnellement dans les cellules nerveuses (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). Aucune souris portant le génotype SELENOT $^{-/-}$ homozygote viable n'a été obtenue après une inactivation globale du gène de la SELENOT. La léthalité embryonnaire totale prouve l'importance de la SELENOT pour le développement (Boukhzar et al., 2016). Cependant, un modèle de souris KO SELENOT global viable a été obtenu en délétant une partie de l'exon 2, exon essentiel à l'incorporation du sélénium dans la sélénoprotéine, par la méthode CRISPR/Cas9 (Li et al., 2021). La différence majeure entre ces 2 modèles est le nombre de bases délétées, dans le modèle LoxP 409 paires de bases sont enlevées (Castex et al., 2016), alors que dans le modèle CRISPR/Cas9 41 paires de bases seulement sont retirées en épargnant le site redox (Li et al., 2021) (Fig. 14).

Le modèle de souris KO SELENOT global non léthal et de souris KO SELENOT conditionnel aux cellules nerveuses présentent des phénotypes physiologiques et comportementaux. Le modèle de souris KO global de la SELENOT, développé grâce à la technique CRISPR/Cas9, présente une taille et un poids corporel réduits, une baisse de la glycémie à jeun ainsi qu'un taux d'insuline plus bas, un profil lipidique amélioré et une stérilité masculine (Li et al., 2021). Le modèle de souris développé par notre équipe de recherche, de mutation conditionnelle dans les cellules nerveuses, a montré une activité locomotrice augmentée (Castex et al., 2016). De plus, des comportements anxiogènes et de peur semblent être plus prononcés dans ce modèle. En effet, des tests visant à évaluer ces types de comportement ont été réalisés pour confirmer ces phénotypes. Le test de la croix surélevée, le test de l'exploration libre et le test d'enfouissement des billes montrent des résultats allant dans le sens d'une peur et anxiété accrues (résultats non publiés). Une partie sur le comportement animal des animaux KO SELENOT conditionnels est développée dans la partie résultats de cette thèse. De plus, une étude importante sur des défauts de reproduction observés suite à

l'absence de SELENOT dans les cellules nerveuses est en cours et les résultats confirment ce qui a été observé dans le modèle de KO SELENOT globale à savoir une stérilité des animaux.

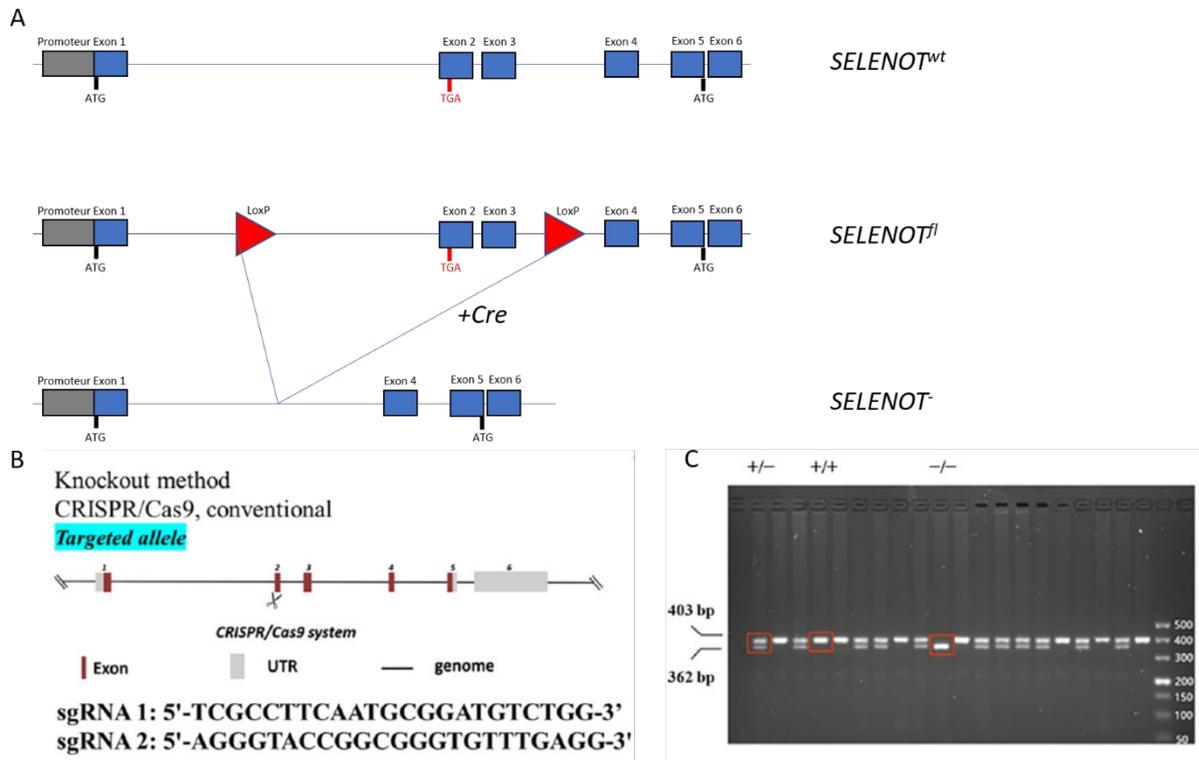


Figure 14 : Représentation génétique des modèles de souris knockout SELENOT. ((A) Le gène de la SELENOT composé de 6 exons est modifié chez les animaux flox, des sites LoxP sont insérés et encadrent les exons 2 et 3, l'exon 2 possédant le site catalytique Sec. Ces animaux génétiquement modifiés permettent d'obtenir des générations KO SELENOT en les croisant avec des animaux exprimant la recombinase Cre. La recombinase Cre induit la délétion des exons, (inspiré de Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). (B) Un autre modèle KO SELENOT global a été développé en utilisant la technique de CRISPR/Cas9. (B et C). La délétion du gène dans les cellules est réalisée en supprimant 41 paires de bases dans l'exon 2 (Li et al., 2021).

c. Ses mécanismes fonctionnels connus

Il a été montré que la SELENOT a différentes fonctions biologiques avec des implications : dans la régulation du stress oxydatif, au niveau du système immunitaire, pour la contraction musculaire, dans le métabolisme et dans les cancers.

- Le stress oxydatif est un processus biologique agressif ayant de multiples conséquences cellulaires. Ce stress pouvant être induit de différentes manières. Son équilibre et sa régulation sont primordiaux pour maintenir les fonctions biologiques des cellules. Un modèle d'intoxication par métaux lourds, comme le mercure, induisent du stress oxydatif avec un impact sur l'expression des sélénoprotéines, en l'occurrence une réduction de l'expression

de la SELENOT (Chu et al., 2020). Sur un modèle de cellules rénales *in vitro*, un traitement par la cisplatine associé à la suppression de la SELENOT entraîne une augmentation de l'apoptose cellulaire avec une augmentation de la PARP-clivé, du Bax, de la caspase-3 et du nombre de cellules TUNEL-positives. De plus, l'inhibition de la SELENOT induit une production des espèces réactives de l'oxygène, ceci étant accompagnée par la diminution de la super oxyde dismutase et de la catalase intracellulaire, et une augmentation de la malondialdéhyde et de la Nox4 (Huang et al., 2020). Ces données montrent le rôle de la SELENOT dans la régulation du stress oxydatif, en l'occurrence son rôle protecteur dans le modèle de cellules rénales.

- La SELENOT est impliquée dans les mécanismes immunitaires. En effet, il a été montré sur le modèle de cellules RAW264.7, modèle de macrophages, que la réponse immunologique après un stress par lipopolysaccharide (LPS) augmente le profil inflammatoire de ces cellules. Un prétraitement avec du sélénium induit une augmentation, de façon dose dépendante, de l'ARNm de 18 gènes codant pour des sélénoprotéines dont la SELENOT, et inverse les effets inflammatoires du LPS en régulant à la hausse 7 gènes, COX-2, ICAM-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, iNOS, MCP-1, et en augmentant l'expression de l'IFN- β et du TNF- α (Wang et al., 2018). La SELENOT va également bloquer l'expression d'ICAM-1 et de la capase-3 induite par le LPS sur les cellules endothéliales humaines (Merk et al., 2021). Dans d'autres modèles biologiques l'implication de la SELENOT a été démontrée, chez la termite le blocage de l'expression de la SELENOT entraîne, dans un modèle immunitaire activé par le champignon entomopathogène metarhizium, une activité antifongique fortement réduite avec une expression des gènes immunitaires transglutaminase et transferrine surexprimés indiquant un stop de l'immunisation active (Zhao et al., 2020). Dans le modèle du poulet, une carence en sélénium diminue l'expression de SELENOT entraînant une modification de la réponse immunitaire et de la régulation du stress oxydatif. Cette expression de la SELENOT est corrélée positivement avec l'expression de IL-2, INF- γ , SecS, et SPS1 et négativement avec IL-1R et IL-1 β (Pan et al., 2018). Cette carence en sélénium accompagnée par l'immunotoxicité induite par l'aflatoxineB1 va exacerber, dans la rate du poulet, les effets délétères du toxique en favorisant de l'inflammation, de l'apoptose et dérégulant le stress oxydatif, ceci en impliquant au moins 6 sélénoprotéines, GPX3, TXNRD1, SELENOT, SELENOU, GPX4 et SELENOS (Zhao et al., 2019).

- Une autre fonction décrite pour la SELENOT est son rôle dans la contraction des cellules musculaires. En effet, la SELENOT régule la contraction des muscles lisses, de l'estomac ou de l'utérus (Guo et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2019). La SELENOT

régule l'activation de la *myosine light chain kinase* et sa phosphorylation (Li et al., 2016). Dans le muscle cardiaque, l'expression de la SELENOT augmente à la suite d'une ischémie cardiaque. Le traitement par le peptide PSELT 43-52, contenant le site catalytique de la SELENOT, permet une protection des effets hypoxiques en modulant les voies de l'AMPc, la PKA, les canaux calciques de types L, les pompes SERCA2a et pAkt (Mazza et al., 2019). Le modèle d'ischémie/reperfusion cardiaque a permis de montrer une récupération de la contractilité et une réduction de la taille de l'infarctus après traitement par la PSELT. Cet effet s'accompagne d'une augmentation d'Akt, d'Erk1/2, de GsK3a-beta phosphorylés et une diminution de p38MAPK, une inhibition des facteurs pro-apoptotiques Bax, caspase-3 et cytochrome-c et une stimulation du facteur anti-apoptotiques Bcl-2. Les marqueurs de stress oxydatif et de stress nitrosatif sont fortement réduits dans ces conditions (Rocca et al., 2018; Rocca et al., 2019).

- Le modèle de KO SELENOT global obtenu par CRISPR/Cas9 a permis de mesurer l'expression de gènes des cellules hépatiques chez ces souris révélant le rôle potentiel de la SELENOT dans la régulation des mécanismes métaboliques des lipides et du glucose. Les différents profils d'expression protéiques observés chez ces animaux sont principalement liés au métabolisme des lipides, aux voies de signalisation PPAR *peroxisome proliferator-activated receptor*, et aux protéines de digestion et d'absorption, suggérant une association entre la SELENOT et des troubles du métabolisme liés au glucose et aux lipides (Li et al., 2021). La SELENOT, qui est fortement exprimée dans le pancréas humain et murin, joue un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose. Prevost et al. montrent dans leur étude que la SELENOT est principalement localisée dans les cellules exprimant l'insuline et la somatostatine. À partir d'un modèle de souris délété en SELENOT de façon conditionnelle aux cellules pancréatiques, les résultats présentent une altération de la tolérance au glucose, ceci sans modification de la sensibilité à l'insuline mais avec un rapport glucose/insuline significativement plus élevé, ce qui indique un déficit de production/sécrétion d'insuline dans ce modèle. Les analyses morphométriques et quantitatifs des îlots pancréatiques chez ces souris mutantes montrent une diminution de leur taille et une augmentation de leur nombre. Dans les cellules pancréatiques, la SELENOT est régulée par le PACAP, laissant supposer que la SELENOT permettrait de faciliter un mécanisme d'anticipation afin de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le neuropeptide (Prevost et al., 2013).

- Il a été montré que les sélénoprotéines sont impliquées dans les cancers. En effet, une analyse comparative entre des lignées cellulaires de mélanome d'origine humaine et des

mélanocytes humains présentent des profils d'expression modifiés pour quinze sélénoprotéines. Toutes les lignées cellulaires de mélanome analysées présentent des mutations soit du B-Raf proto-oncogène sérine/thréonine-protéine kinase, soit du *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*. De plus, ces lignées présentent une dérégulation des profils sélénoprotéiques avec une augmentation de l'expression de la SELENOT, SELENOI et TXNRD1 et une baisse de celle de la SELENOW et SELENON (Ecker et al., 2020). Dans un modèle cellulaire de cancer du sein, le hsa-miR-33-5p favorisera l'apoptose des cellules cancéreuses en ciblant la SELENOT. Ces découvertes suggèrent que la SELENOT peut représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer du sein (Zhuang et al., 2021).

d. Son rôle neuroprotecteur

Plusieurs études montrent l'importance de la SELENOT dans la protection neuronale, en particulier pour les neurones dopaminergiques. En utilisant des modèles cellulaires et des souris traitées par des neurotoxines, l'implication de cette sélénoprotéine dans le système neuroprotecteur a été démontrée. Une augmentation de l'expression de la SELENOT sous stimulation par la neurotoxine MPP⁺ a été observée dans les cellules SH-SY5Y. La modification du domaine actif de cette sélénoprotéine, en remplaçant la Sec par la Ser, entraîne une chute de la protection cellulaire. La SELENOT protège les cellules en réduisant les ROS induits par la toxicité du MPP⁺ mais également directement via la phosphorylation de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme essentielle à la production de la dopamine (DA) (Boukhar et al., 2016). Dans un modèle de cellule SK-N-SH proche des cellules SH-SY5Y, il a été montré que l'inactivation de la SELENOT augmente l'expression de marqueurs de l'apoptose, l'annexin V et caspase-3, et la proportion de cellule en phase G1/S du cycle cellulaire. Des études chez l'animal ou chez des patients post-mortem corroborent l'hypothèse de l'effet protecteur de la SELENOT dans des cellules dopaminergiques (Shao et al., 2019). Chez les souris KO SELENOT conditionnelles, la sensibilité au neurotoxique ciblant les neurones dopaminergiques est exacerbée avec des tremblements qui apparaissent très rapidement et des phases d'immobilité totales. L'absence de SELENOT entraîne une augmentation des marqueurs de stress oxydant et des déficits moteurs associés à une baisse de l'activité de la TH. Une augmentation de la SELENOT a aussi été observée au niveau du caudate putamen dans des échantillons de patients humains ayant développé la maladie de Parkinson. Ces données suggèrent un rôle crucial de cette protéine dans la neuroprotection en limitant la dégénération des neurones dopaminergiques et les déficits moteurs associés (Boukhar et al., 2016). Une

petite séquence d'acides aminés de la SELENOT semble être essentielle pour la protection des neurones dopaminergiques. En effet, le peptide PSELT, contenant la séquence CVSU montre un effet protecteur important dans les cellules et de souris modèles de la maladie de Parkinson. Le PSELT est un peptide pouvant passer les barrières lipidiques des cellules et pénétrer jusqu'au noyau pour stimuler le facteur de transcription EZH2 et induire ainsi l'effet neuroprotecteur. De plus, le PSELT diminue la production de ROS. Dans le modèle animal de la maladie de Parkinson le PSELT réduit l'expression de l' α -synucléine, de la GRP78/Bip et induit celle de sur l'H3K27me3, des gènes qui sont altérés dans la maladie de Parkinson. Le PSELT limite l'apoptose avec une baisse de la caspase-3, réduit l'expression de DJ-1, marqueur du stress oxydatif et rétablit les niveaux de la TH phosphorylée ce qui permet de garder une activation de cette enzyme.

Chapitre II : Le système catécholaminergique

I. L'enzyme tyrosine hydroxylase point de départ de la synthèse des catécholamines

En 1954, Marthe Vogt montre que la distribution de la noradrénaline (NA) n'est pas uniforme dans le cerveau et que cette distribution ne coïncide pas nécessairement avec les taux retrouvés dans le sang, suggérant un rôle de neurotransmetteur de cette molécule dans le SNC. Ensuite, il a été montré que la DA avait une toute autre distribution dans le SNC. Ces découvertes ont ouvert la voie vers les recherches sur le rôle de ces neurotransmetteurs que sont les catécholamines (CA). Les CA sont des neurotransmetteurs contenant dans leurs formules chimiques un noyau catéchol. Trois types de CA sont présentes dans le SNC, la DA, la NA et l'Adrénaline (Ad) avec des localisations neuroanatomiques différentes. Ces CA sont produites en suivant une cascade de synthèse initiée par la TH (Fig. 15), une enzyme décrite initialement comme étant le point de départ vers la synthèse de la NA (Nagatsu et al., 1964). La TH aussi appelée tyrosine-3-monooxygénase, est une enzyme homotétramérique constituée de quatre sous unités de 60 kDa qui catalyse la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA. Cette réaction enzymatique nécessite la présence de cofacteurs la (6R)-L-érythro-tétrahydrobiopterin (BH4) et le Fe^{2+} (Nakashima et al., 2009). La TH peut être utilisée comme marqueur pour l'étude et la compréhension du système catécholaminergique dans son intégralité, en particulier pour les trois neurotransmetteurs de cette famille, la DA, la NA et l'Ad.

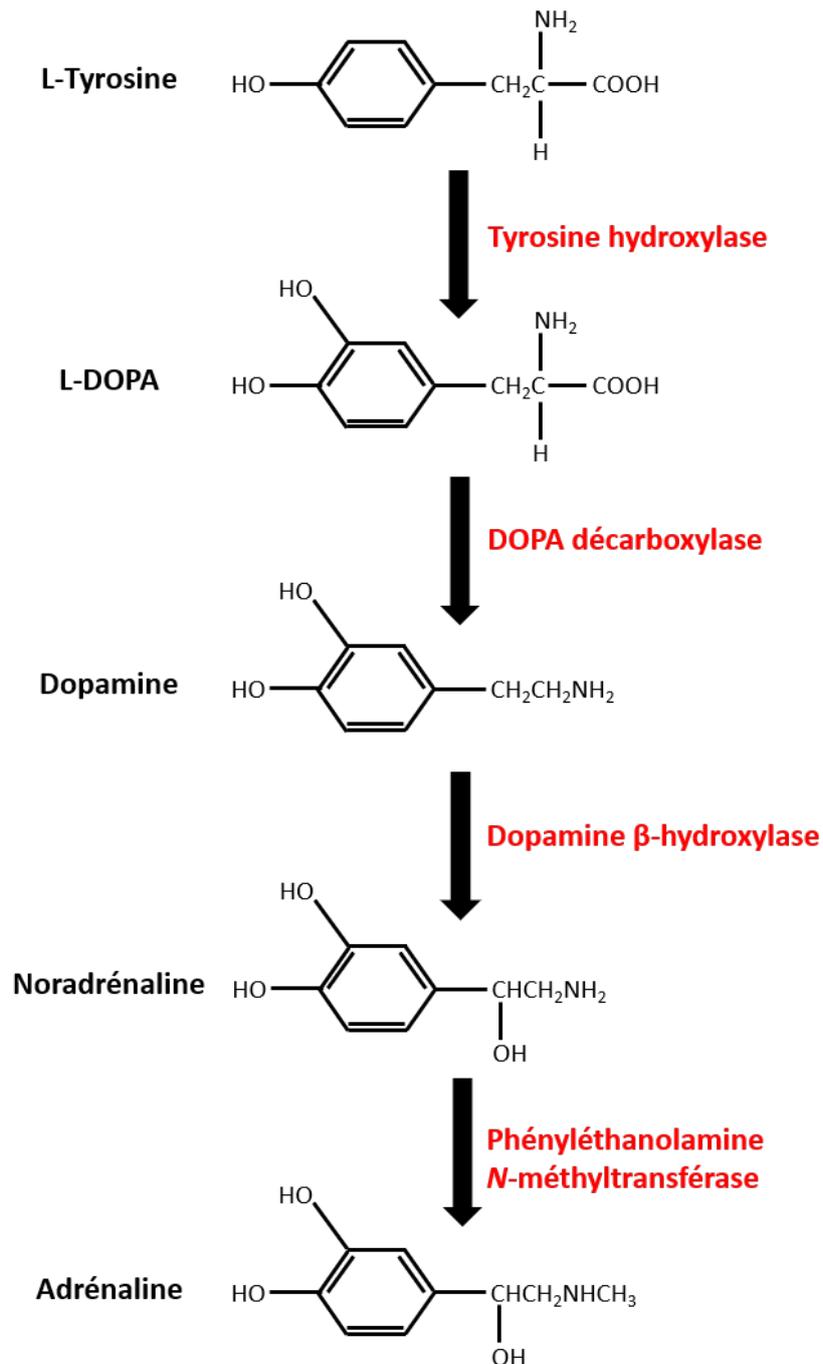
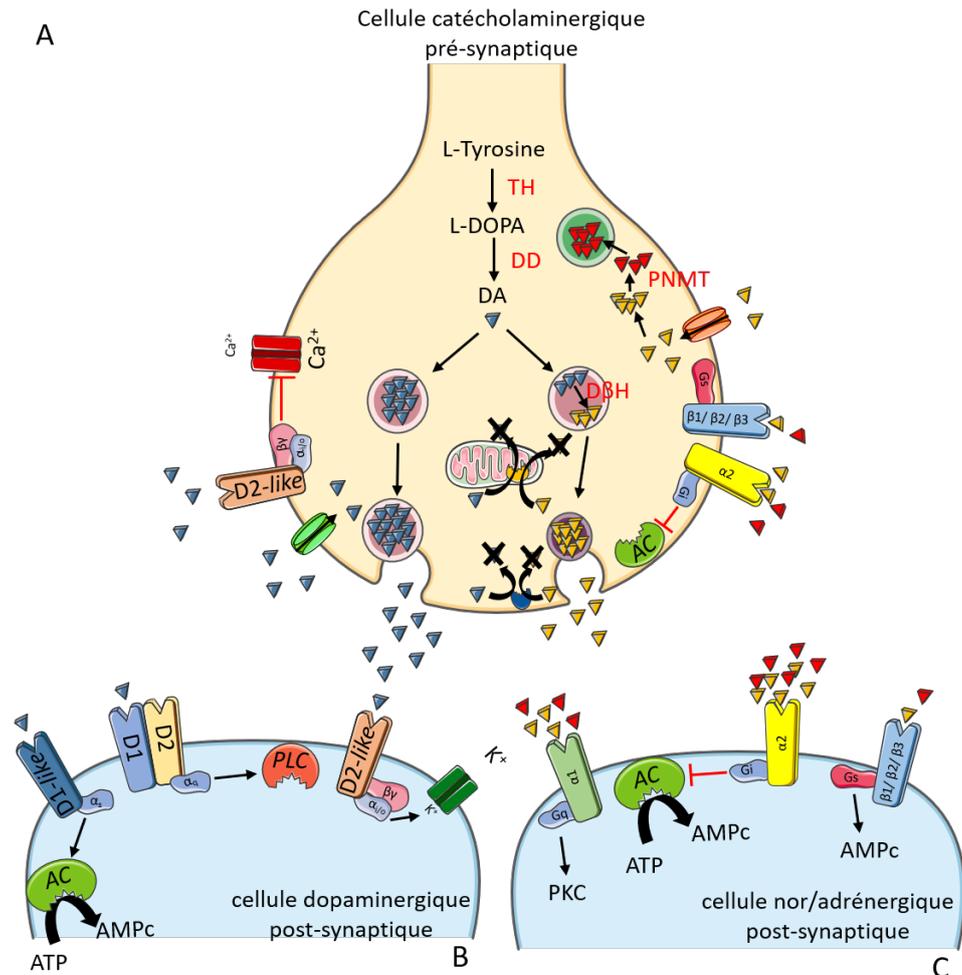


Figure 15 : Cascade de la biosynthèse des catécholamines. À partir de la L-tyrosine les différentes CA vont pouvoir être produites en suivant la chaîne de réactions enzymatiques permettant la production de la DA, NA et Ad.

1. La dopamine

Dans la cascade de biosynthèse des CA, la DA est la première synthétisée. Après conversion de la L-tyrosine en L-DOPA par la TH, cette dernière va être transformée sous l'action de la DOPA-décarboxylase en DA (Fig. 15). Au niveau du SNC, sous l'action du

vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2), la DA va intégrer les vésicules synaptiques. La DA intégrée dans les vésicules synaptiques va pouvoir être libérée au niveau de la fente synaptique et se lier aux récepteurs pré- et post-synaptiques de ce neurotransmetteur (Fig. 16 A et B), entraînant des cascades de réactions spécifiques. Une autre voie possible est la recapture pré-synaptique, soit par le transporteur de dopamine (DAT) ou le transporteur de noradrénaline (NET). Cette recapture joue un rôle de contrôle de la durée d'action de la DA, entraînant des effets biologiques spécifiques (Jones et al., 1998). Par exemple, l'absence d'expression de la DAT au niveau du noyau ZI-A13 empêche la recapture de la DA ce qui conduit à un changement des comportements d'évitement intégrés par le colliculus supérieur (Essig and Felsen, 2016).

**Légende:**

- ▼ Dopamine (DA)
- ▼ Noradrénaline (NA)
- ▼ Adrénaline (Ad)
- ✕ Catécholamines dégradées
- ☺ Monoamine oxydase (MAO)
- ☹ Catéchol-O-méthyl-transférase (COMT)
- ☪ Transporteur de dopamine (DAT)
- ☪ Transporteur de noradrénaline (NET)
- ☪ Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2) (cellules neuronales)
- ☪ Vesicular monoamine transporter 1 (VMAT-1) (cellules endocrines)

Figure 16 : Schéma d'une synapse de cellule catécholaminergique. (A) cellule pré-synaptique où la L-Tyrosine est transformée en L-DOPA sous l'action de l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) et en dopamine (DA) avec la dopamine décarboxylase (DD). La DA synthétisée est stockée dans des vésicules par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires, le *vesicular monoamine transporter 2* (VMAT-2) localisé dans les cellules neuronales et *vesicular monoamine transporter 1* (VMAT-1) localisé dans les cellules endocrines, permettent d'amener la DA vers la voie de l'exocytose ou vers la synthèse de la noradrénaline (NA) via l'enzyme dopamine- β -hydroxylase (D β H) pouvant également être libérée dans la fente synaptique. Dans certaines cellules du système nerveux périphérique la NA est convertie en adrénaline (Ad) via l'enzyme PNMT (phénylétanolamine *N*-méthyltransférase). La DA et la NA peuvent être recaptées dans la cellule pré-synaptique via les transporteurs de dopamine (DAT) ou noradrénaline (NET). Ces transporteurs jouent un rôle important dans l'activité des CA.

La DA et la NA peuvent être dégradées par 2 enzymes, la monoamine oxydase (MAO) se trouvant dans la membrane externe des mitochondries ou par la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) localisée à la membrane plasmique de la cellule. Les récepteurs des cellules post-synaptiques seront différents selon les CA qui s'y lient, en (B) les récepteurs liant la DA et en (C) les récepteurs liant la NA/A.

Les récepteurs dopaminergiques sont de cinq sous-types : D1, D2, D3, D4 et D5. Ces récepteurs métabotropiques sont regroupés en 2 classes suivant les protéines G auxquelles ils sont couplés et les voies de signalisation qu'ils activent. La classe de type *D1-like* regroupe les sous-types D1 et D5 qui activent la voie de l'adénylate cyclase via le couplage aux protéines G de types $G\alpha_s$, la classe de type *D2-like* regroupe les sous-types D2, D3 et D4 qui inhibent la voie de l'adénylate cyclase via le couplage aux protéines G de type $G\alpha_{i/o}$ et $\beta\gamma$ (Missale et al., 1998). Les voies de signalisation des deux classes de récepteurs de DA ont des finalités opposées. La classe de récepteurs *D1-like* stimule l'activité de l'adénylate cyclase qui augmente la synthèse de l'adénosyl-monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active la voie de la PKA, ce qui conduit à la phosphorylation de la *dopamine and cyclic adenosine monophosphate-regulated phosphoprotein 32 kDa* (DARPP-32). La phosphorylation de la (DARPP-32) inhibe la phosphatase 1 (PP-1) qui est elle-même inhibitrice de la voie des MAP kinases. Les récepteurs *D2-like* bloquent la synthèse de l'AMPc en inhibant l'activité de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne l'inhibition des MAP kinase par la voie de PP-1, DARPP-32 et PKA. De plus, les récepteurs *D2-like* stimulent la sortie de K^+ cytoplasmique et inhibe l'entrée de Ca^{2+} (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Parallèlement, l'hétérodimère D1/D2 couplé à la protéine $G\alpha_q$ stimule via la voie de la phospholipase C (PLC) la synthèse de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Ces métabolites vont activer la voie des MAP kinases en stimulant l'activité de la protéine kinase C (PKC) ; la PKC étant activée soit directement par le DAG ou par la libération du Ca^{2+} du RE par la voie de l'IP3 et de son récepteur IP3-R. Le Ca^{2+} libéré active la phosphatase 2B qui inhibera la phosphorylation de la DARPP-32 par la PKA (Savica and Benarroch, 2014) (Fig. 17).

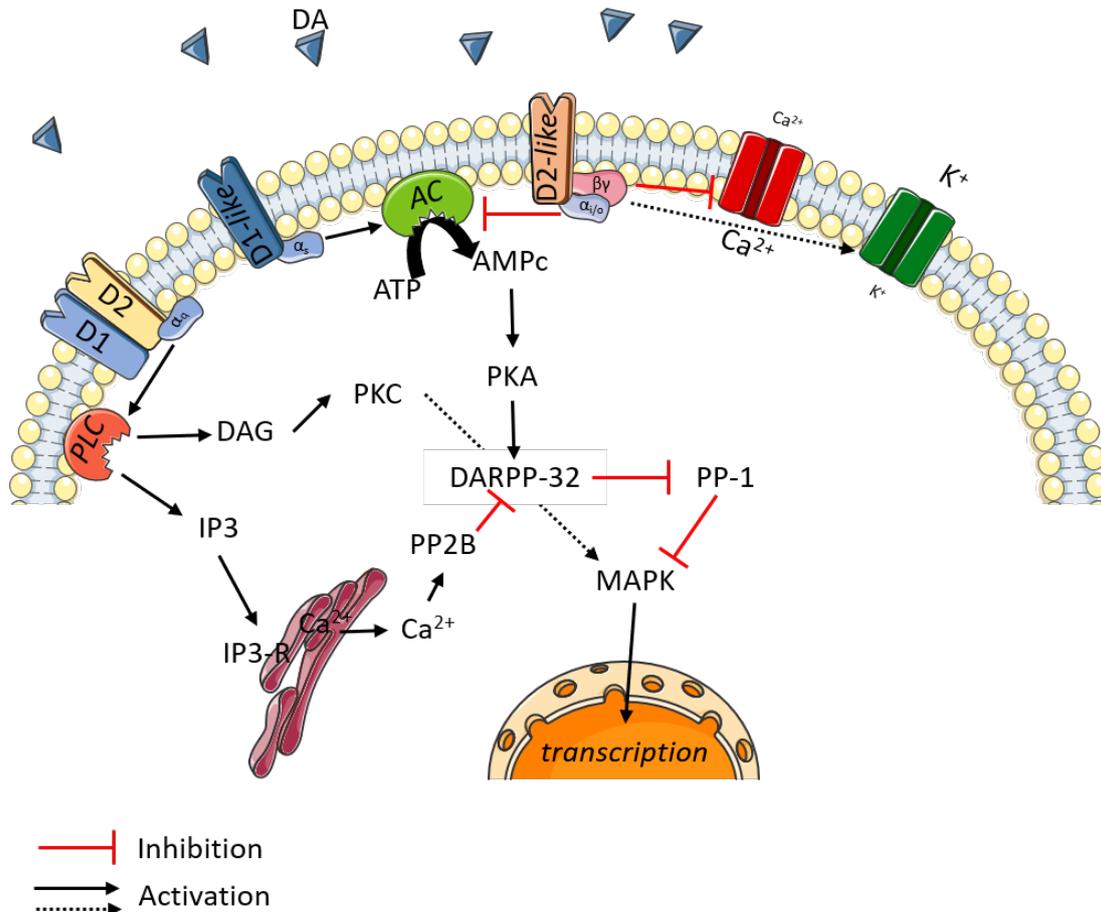


Figure 17 : Les récepteurs dopaminergiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG qui fixent la dopamine. Répartis en deux classes, les récepteurs D1 et D5 sont regroupés dans la classe D1-like, alors que les récepteurs D2, D3 et D4 sont regroupés dans la classe D2-like. Les récepteurs D1-like couplés aux protéines G de type G_{α_s} vont activer l'adénylate cyclase (AC) et produire l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'APMc va activer la protéine kinase A (PKA), protéine permettant la phosphorylation de protéines cibles. La *dopamine and cyclic adenosine monophosphate-regulated phosphoprotein 32 kDa* (DARPP-32) est une cible de la PKA, sa phosphorylation inhibe la protéine phosphatase 1 (PP-1) entraînant une levée de l'inhibition de la MAP kinase par de la PP-1, permettant la transcription des gènes cibles. Les récepteurs D2-like couplés aux protéines G de types $G_{\alpha_i/o}$ et $\beta\gamma$, les protéines $G_{\alpha_i/o}$ vont avoir l'action inverse des récepteurs D1-like car ils inhibent l'AC bloquant la synthèse de l'AMPc et la cascade de réactions qui en découle. Les protéines G de type $\beta\gamma$ vont avoir un rôle direct sur les canaux calciques et potassiques en bloquant la sortie de Ca^{2+} ou en stimulant la libération de K^+ . La dimérisation des récepteurs D1 et D2 et le couplage à la protéine G_{α_q} entraîne la production de l'IP3 et du DAG par la voie de la PLC. Le DAG stimule PKC, elle-même activant la MAPK et favorise la transcription. L'IP3 et son récepteur IP3-R présent au niveau du RE régulent la sortie du Ca^{2+} du RE, qui active la phosphatase 2B qui inhibera la phosphorylation de la DARPP-32 et bloquera son action inhibitrice sur la PP1 (inspiré de Missale et al., 1998; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Savica and Benarroch, 2014).

Deux enzymes participent à la dégradation de la DA, la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT). La MAO possède 2 isoformes, la MAO-A et la

MAO-B, qui sont localisées dans la membrane mitochondriale externe. La MAO oxyde la DA en acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC). La COMT, localisée dans la membrane plasmique, permet la dégradation de la DA en 3-méthoxytyramine (3-MT). Ces deux enzymes, la MAO et la COMT, vont respectivement transformer la 3-MT et le DOPAC en acide homovanilique (HVA) (Fig. 18).

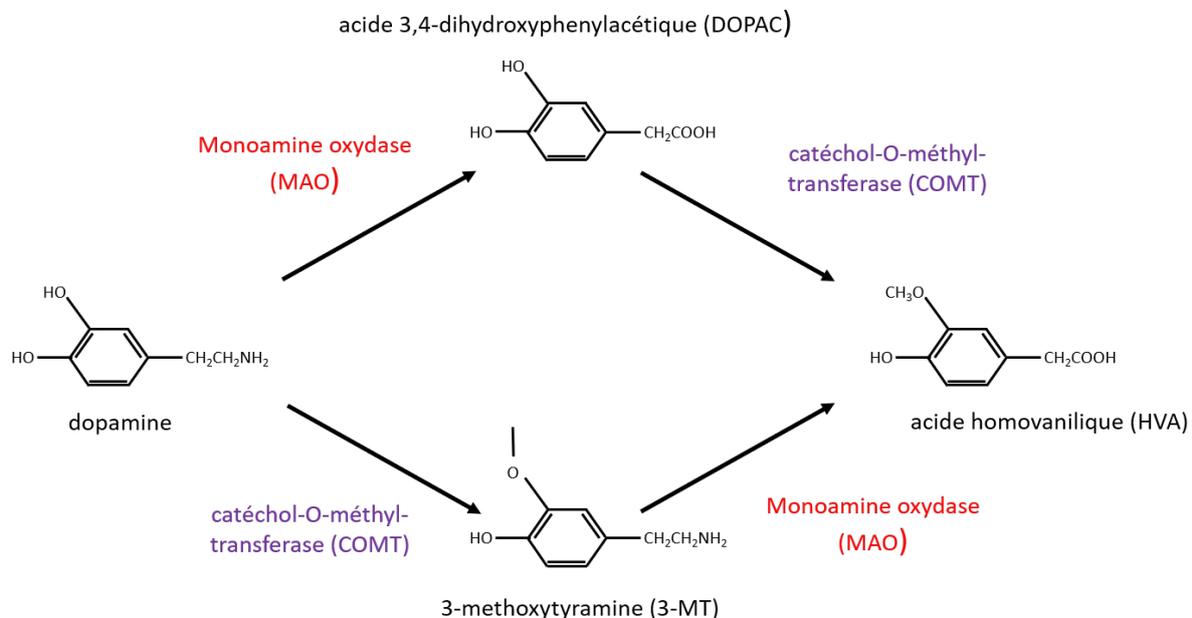


Figure 18 : Voies de dégradation de la dopamine. Les enzymes monoamine oxydase (MAO) et catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) contribuent à la dégradation de la DA en acide homovanilique (HVA).

La DA, communément appelée *molécule du plaisir*, est impliquée dans de multiples fonctions biologiques : le sommeil, le contrôle moteur, l'attention, le plaisir et la motivation, la mémoire et la cognition. Les fonctions motrices de la DA ont été étudiées à travers les multiples déficits moteurs observés chez les patients ayant développé la maladie de Parkinson et avec pour conséquences des problèmes oculaires, faciaux, de tremblements au repos et de rigidité musculaire (Hassler, 1978). Des déficits cognitifs tels que l'impulsivité, l'hyperactivité, les troubles de l'attention, le syndrome des jambes sans repos sont également liés à la perturbation du système DA (Stiasny et al., 2000; Klein et al., 2019). Ces altérations comportementales liées à la DA sont pour la plupart, des conséquences du vieillissement de l'organisme. Un aspect important dans l'activité des neurones dopaminergiques est sa sensibilité au stress oxydatif. En effet, la DA de par son catabolisme enzymatique et non enzymatique génère des espèces toxiques de type ROS. L'oxydation de la DA par la voie de dégradation impliquant l'enzyme MAO génère un spectre d'espèces toxiques allant de l' H_2O_2 , aux radicaux oxygénés en passant

par les quinones et semi-quinones (Graham et al., 1978; Halliwell, 1992), rendant ce type neuronal particulièrement sensible.

2. La noradrénaline

La NA qui tire son nom de l'Ad, et dont le préfixe « nor » signifie : dont la fonction aminée n'est pas méthylée, est la CA issue de l'hydroxylation de la DA par la dopamine- β -hydroxylase (Fig. 15). Au niveau des cellules neuronales du SNC, cette réaction d'hydroxylation est réalisée dans les vésicules synaptiques à la suite de la capture de la DA via le VMAT-2 (Fig. 16). Un autre transporteur est lui exprimé au niveau périphérique, le VMAT-1, son rôle étant la recapture de la NA au niveau du cytoplasme pour permettre la synthèse de l'Ad dans les granules de sécrétion. Tout comme la DA, la NA peut être recaptée par les transporteurs spécifiques que sont le DAT et le NET au niveau post-synaptique. La découverte et la compréhension du rôle de ces transporteurs des CA furent récompensée par la remise du prix Nobel en 1970 à Julius Axelrod, révélant l'importance de ces recherches et de la fonction de ces transporteurs. La recapture est un moyen de contrôle de l'activité de ces deux molécules comme le montrent les constantes de Michaelis (Km) qui soulignent l'affinité des transporteurs pour chacune de ces CA. Les Km du DAT et du NET pour la DA sont respectivement de 5.2 μ M et 0.24 μ M et les Km du DAT et du NET pour la NA sont respectivement de 17 μ M et de 0.58 μ M (Gu et al., 1994). Après la recapture de la NA par le NET (Fig. 16), la NA va être soit restockée dans une vésicule cellulaire, soit être dégradée en passant par la voie enzymatique utilisant la MAO.

Dans le SNC, la NA se lie à trois types de récepteurs, dits récepteurs adrénergiques α_1 , α_2 et β . Ces trois groupes de récepteurs se distinguent par leur pharmacologie et les voies de transduction qu'ils activent (Gnagy, 2012).

Les récepteurs de type α_1 sont couplés à la protéine Gq et activent la PLC, entraînant l'activation de la PKC, soit via la voie de libération du Ca^{2+} du RE ou via la voie de la DAG (Fig. 19).

Différents sous-types de ces récepteurs existent et se caractérisent notamment par leur taille et leur localisation tissulaire.

Les fonctions de la NA sont multiples, au niveau du SNC. Elle est impliquée dans la régulation de comportements tel que l'attention, la vigilance, l'éveil et les contrôles de faim et de satiété (Gu, 2002) et au niveau périphérique, par le système nerveux sympathique, elle régule le système cardio-vasculaire (Brodde et al., 2006).

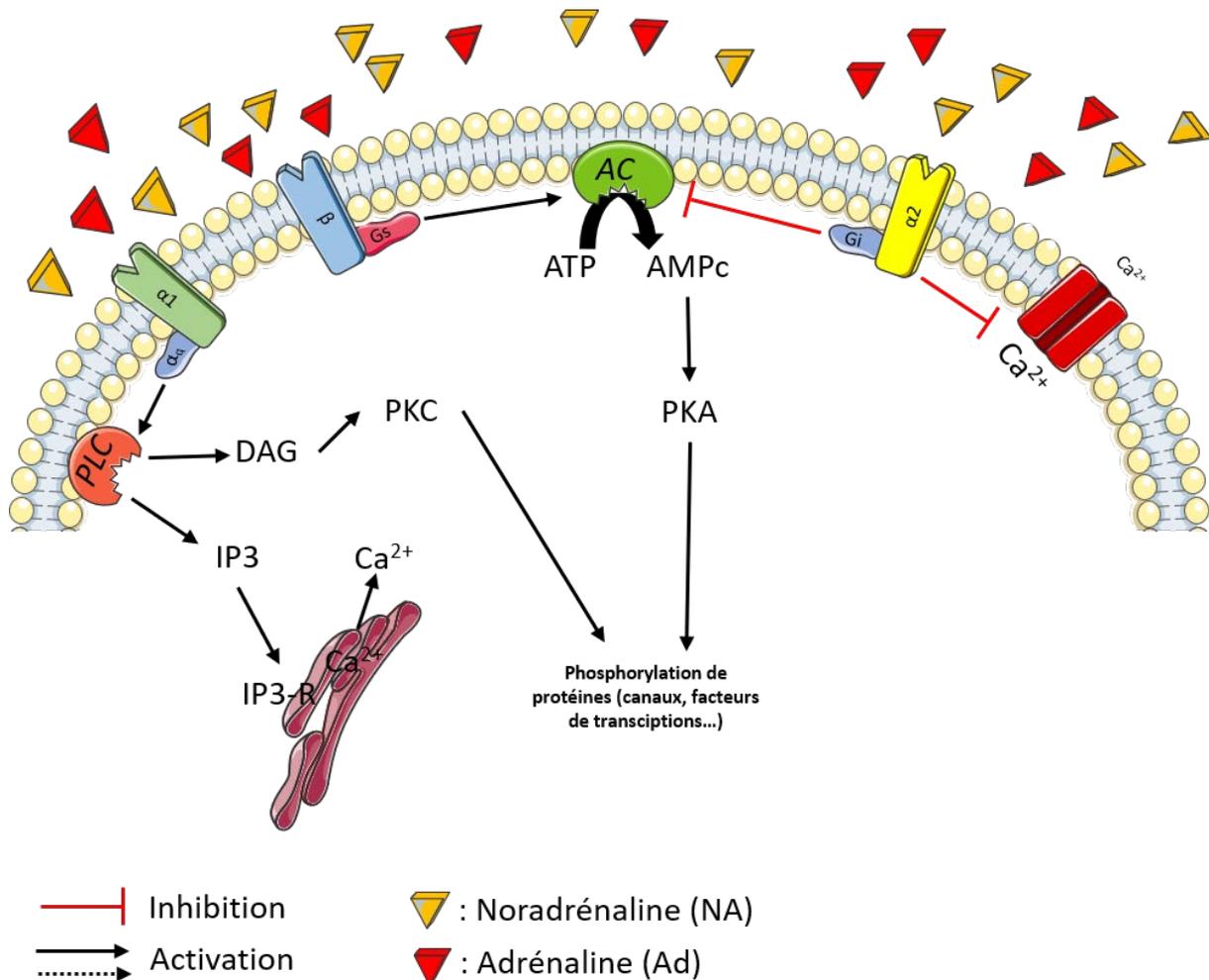


Figure 19 : Les récepteurs adrénérgiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui fixent la noradrénaline et l'adrénaline. Les récepteurs β et α_2 sont couplés respectivement aux protéines Gs et Gi qui activent (Gs) ou inhibent (Gi) la production d'AMPc. En cas d'activation, l'AMPc entraîne la phosphorylation des protéines telles que des canaux membranaires, des facteurs de transcription, etc.... Un autre récepteur, le récepteur α_1 , va lui activer, via la protéine Gq, la PLC qui stimule une chaîne de réactions en activant le DAG, l'IP3 et in fine la concentration calcique et en parallèle stimule la PKC conduisant à la phosphorylation protéique.

3. L'adrénaline

Dans le cytosol, la NA est convertie en Ad via l'enzyme PNMT (Fig. 15) suite à la recapture de la NA au niveau du cytoplasme par le VMAT-1. Cette synthèse, bien qu'essentiellement effectuée en périphérie, plus précisément au niveau des cellules chromaffines de la médullosurrénale, est aussi réalisée dans le groupement cellulaire C1-C3 du SNC. En réponse à un état de stress ou lors d'une activité physique, l'Ad va être sécrétée et entraîner des modifications physiologiques importantes. En effet, cette CA entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle, et une dilatation des bronches

et des pupilles. À ce jour, aucun système de recapture de cette CA suite à sa sécrétion n'a été décrit. Les voies d'utilisation de l'Ad sont les récepteurs adrénérgiques (chapitre II page 58) et sa dégradation est réalisée par les enzymes COMT et MAO (Schulz et al., 2004).

II. Tyrosine hydroxylase : du gène à la protéine

1. Le gène de la tyrosine hydroxylase

Dans les différentes espèces étudiées, la TH est codée par un gène unique dont la taille varie suivant les espèces entre 7,5 kilobases correspondant à 13 exons et 12 introns chez la souris (Iwata et al., 1992) ou le bovin (D'Mello et al., 1989), à 8,5 kilobases avec 14 exons et 13 introns chez l'homme (O'Malley and Rotwein, 1988). De plus, les souris invalidées pour la TH ne sont pas viables, ce qui prouve l'importance de cette protéine dans le monde du vivant (Gnagy, 2012). Ceci est en accord avec la forte conservation des séquences au cours de l'évolution puisqu'il existe 94 % d'homologie entre la souris et le rat, 74 % d'homologie entre l'homme et la souris, et jusqu'à 89 % pour la partie codante entre le rat et l'homme (Iwata et al., 1992). Dans les séquences régulatrices de l'expression du gène qui sont très conservées également chez les différentes espèces, les séquences AP2, AP1, E-box, POU et Hept permettraient l'expression de la TH de façon spécifique suivant les tissus (Fung et al., 1992). De plus, le gène de la TH contient un élément NRSE ou *neuronal restrictive silencer element* qui permettrait l'expression neuronale de la protéine (Fig. 20).

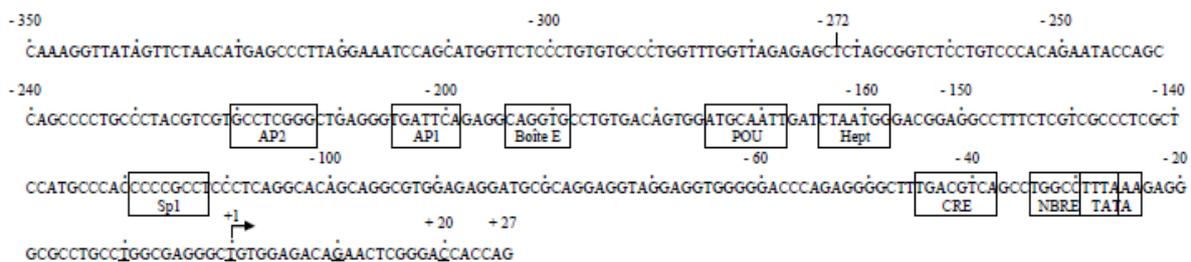


Figure 20 : Gène de la TH. Séquence nucléotidique du promoteur de la TH de rat avec la localisation des régions régulatrices tissu-spécifique (*d'après Fung et al., 1992*).

2. L'ARNm de la tyrosine hydroxylase

L'ARNm de la TH a longtemps été considéré comme n'existant que sous une seule forme, or chez les primates au moins 4 isoformes ont pu être mises en évidence, et chez le rat

2 isoformes sont retrouvées. Chez le rat, un site d'épissage alternatif est localisé sur l'exon 2 permettant les 2 isoformes (Lanièce et al., 1996).

3. La protéine tyrosine hydroxylase

La TH est classiquement décrite comme étant une protéine homotétramérique. Chaque monomère constituant la TH a une masse molaire de 60-61 kDa et est divisé en deux régions correspondant à la partie amino-terminale régulatrice de l'activité de la protéine et la partie carboxy-terminale catalytique (Fig. 21-A). Dans la partie catalytique, les 20 des 43 derniers acides aminés de la protéine formeraient la région permettant la tétramérisation de la protéine. Dans la région régulatrice de la TH, chacun des monomères peut se lier aux différents partenaires nécessaires à la synthèse de la L-DOPA, à savoir la L-tyrosine, l'oxygène et le cofacteur BH₄. Cette région possède également 4 résidus sérine en position 8, 19, 31 et 40 pouvant être phosphorylés et permettent de modifier l'activité de cette enzyme (Kumer and Vrana, 2002). L'activité de la TH est directement liée à sa phosphorylation ou déphosphorylation, l'activité étant augmentée si le taux de phosphorylation de la protéine est plus important. La TH peut être phosphorylée par plusieurs protéines, les différentes sérines de la partie régulatrice sont phosphorylées par différentes protéines kinases.

Une autre voie de régulation de l'activité de la TH est la disponibilité de ses substrats et de ses cofacteurs, L-tyrosine, oxygène et BH₄, nécessaires à la réaction enzymatique, ainsi que la CA produite par la réaction enzymatique. En effet, la DA et la NA inhibent l'activité de la TH, la DA forme un complexe avec le fer contenue dans l'enzyme et stabilise celle-ci dans sa forme inactive (Okuno and Fujisawa, 1991).

La TH peut également subir des régulations allostériques qui entraînent des modifications de son activité. En effet, l'héparine, les polyanions et les phospholipides interagissent avec la TH, ce qui augmente l'activité de l'enzyme de manière transitoire et réversible.

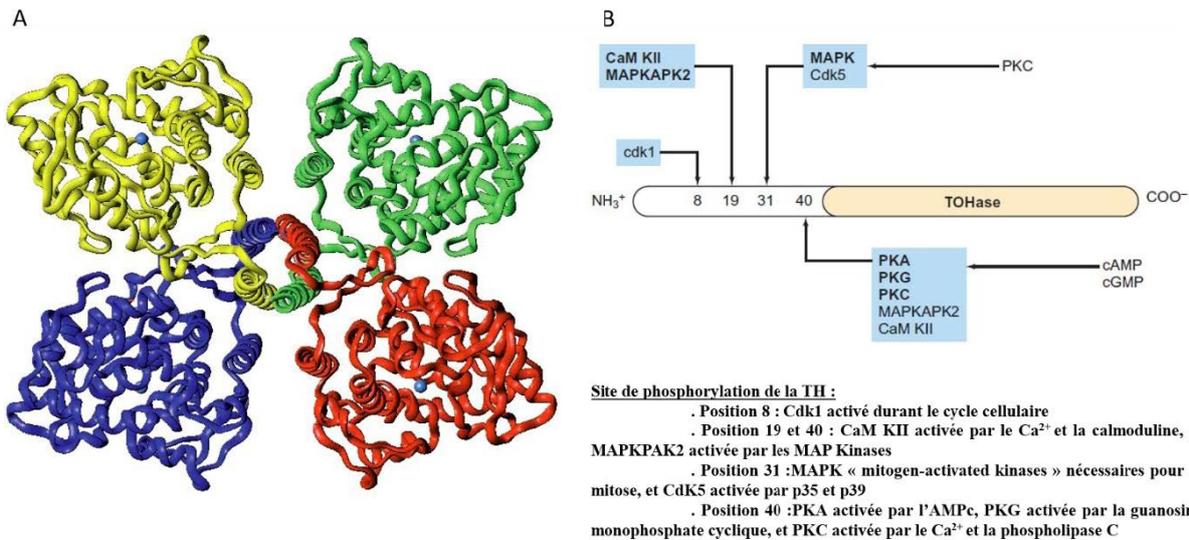


Figure 21 : Protéine TH. (A) La protéine TH est représentée sous sa forme homotétramérique (Fitzpatrick, 1999). (B) À l'extrémité N-terminale, les résidus sérine de chacune des quatre sous-unités de la TH peuvent être phosphorylés par un certain nombre de protéines kinases : Cdk1 pour la sérine en position 8, CaM kinase II et MAPKAP2 pour les sérines des positions 19 et 40, et MAPK et la kinase 5 dépendante de la cycline (Cdk5) pour la sérine en position 31. Les protéines kinase A (PKA) et G (PKG), la protéine kinase 2 activée par MAPK (MAPKAP2), la protéine dépendante du calcium/calmoduline kinase II (CaM KII) et la protéine kinase C (PKC) pour la sérine en position 40 (Gnegy, 2012).

III. Localisation des catécholamines dans le SNC : de l'embryon au stade adulte

Dans les années 1960, la méthode d'histofluorescence des monoamines développée par Falck et Hillarp a permis la visualisation de la DA et NA (Falck et al., 1962). La distribution des groupes neuronaux CA ne correspondant pas toujours aux structures anatomiques du SNC et le nombre de cellules CA variant d'une espèce à l'autre, Dahlstroem et Fuxe ont créé une nomenclature spécifique pour les groupements cellulaires CA (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Les douze premiers groupes de cellules nommés A1-A12 s'étendent de la médulla oblongata à l'Hyp-A12-A14-A15 (Björklund and Dunnett, 2007). Cette nomenclature a par la suite été complétée passant de douze à dix-sept groupes cellulaires. Dans le diencephale, aux douze premiers groupes sont ajoutés les groupements cellulaires A13 à A17 situés dans l'hypothalamus, l'aire pré-optique, le bulbe olfactif et la rétine. Les groupements de cellules A1-A17 se divisent en deux catégories, les groupes noradrénergiques, groupes A1-A7 avec le groupe A3 qui reste encore à ce jour controversé, et les groupes dopaminergiques, groupes A8-A17 (Smeets and González, 2000). À ces groupes de CA regroupant les neurones DA et NA s'ajoutent trois autres groupes représentant les neurones adrénérgiques, C1 à C3, qui se localisent dans la région bulbaire postérieure s (Fig. 22).

De nombreuses études décrivent la distribution de la TH au cours de l'embryogénèse, ces descriptions sont importantes pour la compréhension des fonctions biologiques de ce système (Olson and Seiger, 1972; Seiger and Olson, 1973; Specht et al., 1981; Verney, 1999). La mise en place des neurones CA au cours de l'embryogénèse est précoce, puisqu'une étude utilisant des souris transgéniques a montré à travers l'expression du gène LacZ sous le promoteur de la TH l'expression de celle-ci dès le stade embryonnaire E9.0 au niveau des ganglions sensoriels innervant le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf vague (X). Cette expression allant jusqu'aux nerfs trijumeau (V) et facial (VII), les ganglions de la racine dorsale, le tube neural ventrolatérale et le début des ganglions de la chaîne sympathique entre les stades E9.5 et E10.5 (Son et al., 1996). Cette mise en place précoce de neurones CA suggère un rôle régulateur ou trophique des fibres CA sur les neurones cibles au niveau des différentes structures cérébrales (Kasamatsu and Pettigrew, 1976; Bear and Singer, 1986). De plus, la maturation des groupements cellulaires CA ont des temporalités différentes durant l'embryogénèse, ceci pouvant refléter la mise en place des fonctions biologiques sur différentes périodes du développement. Une des particularité du système catécholaminergique est sa variabilité anatomique entre les espèces, de nombreuses études ont été entreprises sur différents modèles classiquement retrouvés en recherche fondamentale comme la souris, le rat, le poisson zèbre mais également sur des modèles plus originaux comme le caïman, le requin, le chien (Brauth, 1988; Stuesse et al., 1991; Pillay et al., 2017) avec comme finalité de mieux comprendre son rôle dans l'espèce humaine (Zecevic and Verney, 1995; Puellas and Verney, 1998; Verney, 1999). Passé les stades de l'embryon, les descriptions du système CA sont généralement ciblées sur une ou quelques régions anatomiques spécifiques parmi les différents groupes CA existants, comme l'Hyp-A12-A14-A15, le locus coeruleus (LC-A6), la ZI-A13 (Baker et al., 1983; Loughlin et al., 1986; Mitrofanis, 2005) mais plus rarement sur l'ensemble du SNC. Et toutes ces connaissances acquises à travers ces études ont conduit à envisager des thérapies cellulaires comme la transplantation de cellules fœtales afin de traiter les malades atteint par la maladie de Parkinson (Lindvall et al., 1992). Dans ce travail de thèse, un suivi de la mise en place du système CA à partir du stade E10.5 jusqu'au stade adulte a été réalisé chez les souris. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de l'outil d'imagerie tridimensionnelle ayant permis la visualisation et la description du système catécholaminergique dans son ensemble, comme décrit dans l'article I présenté dans cette thèse (Godefroy et al., 2020).

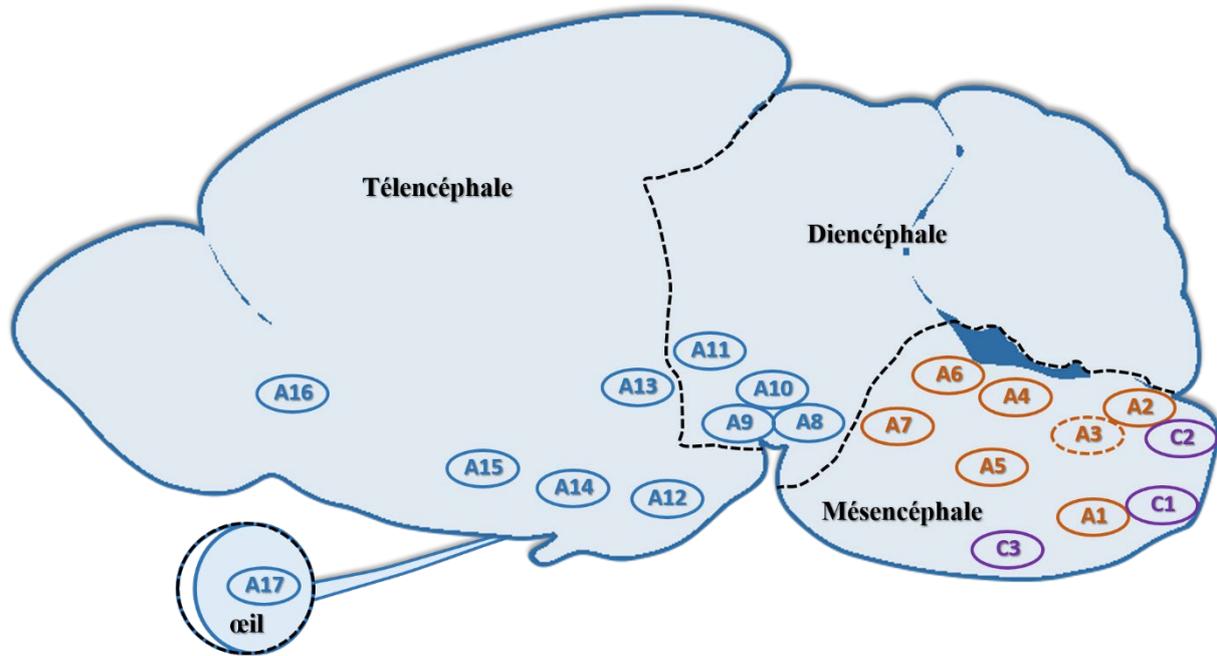


Figure 22 : Distribution des groupes neuronaux des cellules catécholaminergiques du SNC de souris. Les groupes C1-C3 (violet) représentent les cellules adrénergiques, les groupes A1-A7 (orange) représentent les cellules noradrénergiques et les groupes A8-A17 représentent les cellules dopaminergiques.

IV. Les divers rôles physiologiques des catécholamines

Les CA sont impliquées dans la régulation de l'activité locomotrice, la prise alimentaire, le sommeil, la reproduction, etc... Le choix dans cette étude a été de se focaliser sur quelques noyaux anatomiques précis pouvant expliquer les anomalies comportementales observées chez les souris déficientes en SELENOT comme décrit dans l'article II présenté dans cette thèse.

1. Le mésencéphale

a. L'area postrema (AP)

L'AP fait partie, avec le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau dorsal moteur du nerf X (DMX), du groupement cellulaire A2 de type noradrénergique (Rinaman, 1998; Blouet, 2013). L'AP est décrit comme étant le centre de régulation de la prise alimentaire en étant le premier relais pour l'intégration des signaux de satiété en lien avec l'appareil gastro-intestinal (Kachidiav and Pickel, 1993; Reiner et al., 2016). Ce groupement de noyau TH, sensible à la variation de facteurs circulants est directement en lien avec le NTS (Cunningham et al., 1994; Roman et al., 2016). La stimulation par l'amyline, sécrétée par le pancréas, des neurones de l'AP va entraîner, via les projections vers le NTS, la stimulation des neurones TH qui vont

libérer la DA dans le noyau accumbens et entraîner la sensation de rassasiement (Potes et al., 2010). Le regroupement de cellules CA de l'AP-A2 est un bon marqueur du centre de régulation de la prise alimentaire.

b. L'A5, le locus coeruleus (LC-A6) et l'A7

Des études de traçage des voies neuronales ont montré que le groupe de cellules A5 envoie des projections descendantes vers le *intermediolateral cell column* (IML), et donc que ce groupe de cellules est la voie principale comme source d'innervation sympathique de la surrénale et du pancréas (Clark and Proudfit, 1993; Jansen et al., 1997). De ce groupement cellulaire, des projections poly-synaptiques au muscle gastrocnémien sont observées (Nam and Kerman, 2016). Les cellules du groupement A7 projettent vers la moelle épinière avec une innervation dense vers l'IML (Bruinstroop et al., 2012), ces neurones établiraient des contacts synaptiques avec les motoneurones spinaux et les neurones préganglionnaires sympathiques, avec comme fonction principale un lien avec le système somatomoteur-sympathique (Nam and Kerman, 2016). Le LC-A6 a des projections plus complexes innervant différents organes : les reins, la rate et la graisse brune (Cano et al., 2001; Cano et al., 2003; Cano et al., 2004). La partie ventrale du LC-A6 projette principalement vers la moelle épinière tandis que la partie dorsale projette vers le cortex, le septum, l'hippocampe et l'hypothalamus (Mason and Fibiger, 1979; Waterhouse et al., 1983; Loughlin et al., 1986). Cette complexité fait de ce noyau un neuromodulateur important avec des fonctions affectant l'apprentissage, la prise de décision, le contrôle du sommeil et de l'éveil, la nociception, etc... (Chandler et al., 2019). Ces groupements noradrénergiques ont par conséquent de nombreuses fonctions vitales.

2. Le diencephale

a. La substance grise périaqueducale (PAG-A10dc)

La PAG-A10dc est un noyau complexe du diencephale impliqué dans de nombreuses fonctions cognitives et physiologiques. Différents travaux prouvent son implication dans les comportements en réponse aux stimuli de menace mais aussi dans le phénomène d'essoufflement (Faull et al., 2019). Ce noyau module également la perception de la douleur et de l'anti-nociception induite par les opioïdes dans des modèles de privation de sommeil (Skinner et al., 2011). Plus précisément, un noyau localisé au sein de la matière grise périaqueducale, adjacent à/et entourant la moitié ventrale de l'aqueduc cérébral est identifié comme le groupe de cellules A10dc (Marcos et al., 2011). Des injections de traceurs rétrogrades ont montré le trajet anatomique des fibres entre le noyau du lit de la strie terminale

(BSTld) et les neurones TH+ du groupement A10dc, suggérant un rôle essentiel des neurones dopaminergiques dans les troubles psychiatriques, y compris la dépression et dans l'anxiété en impliquant le neuropeptide CRF (Meloni et al., 2006).

- b. Retrorubral field (RRF-A8), la substance noire (SN-A9) et l'aire tegmentale ventrale (VTA-A10)

Les cellules dopaminergiques de ces trois groupes sont issues, durant le développement embryonnaire, d'un même complexe de cellules (Seiger and Olson, 1973), et l'origine commune de ces noyaux laisse suggérer une continuité du système dopaminergique passant par les trois voies principales : la voie nigrostriatale, mésocorticale et mésolimbique (Björklund and Lindvall, 1978).

Le groupement RRF-A8 joue un rôle dans les comportements de réponse à la peur. Des comportements variables sont décrits suivant les niveaux de danger perçus par les individus. Ces différents comportements sont, d'après différentes études, en partie influencés par le rôle des neurones du RRF-A8 qui s'adaptent aux réponses suivant les stimuli de menace (Bradfield and Iordanova, 2021). Moaddab et Mc Dannald ont montré que le réseau neuronal localisé dans le RRF-A8 intègre les stimuli de peur différemment suivant leur niveau et permet à l'animal d'avoir un comportement adapté face aux différents degrés de danger (Moaddab and McDannald, 2021). La SN-A9 se compose de neurones contenant de la neuromélanine conférant une couleur spécifique aux cellules qui la composent. Ce groupement de cellules est principalement connu et étudié pour son rôle dans la maladie neurodégénérative de Parkinson. Les modifications physiologiques dues à cette maladie, entraînant des symptômes moteurs tels que les tremblements, la rigidité musculaire, l'instabilité posturale, la bradykinésie et l'akinesie ont permis de comprendre le rôle des neurones dopaminergiques qui sont préférentiellement atteints dans cette maladie (Balestrino and Schapira, 2020). Le noyau VTA-A10 est un groupe dopaminergique impliqué dans les aspects des processus émotionnels, motivationnels et en association dans les actions de récompense sociale, ceci via le circuit mésolimbique auquel il appartient. Le stress est une composante physiologique importante pour ce groupement cellulaire car il va augmenter en situation non chronique l'excitabilité des cellules DA (Douma and de Kloet, 2020).

Les deux groupes cellulaires, de la SN-A9 et de VTA-A10, localisés dans le diencephale sont, d'un point de vue anatomique, des groupes de cellules dopaminergiques liés. Dans chaque hémisphère le groupement cellulaire A10 est médian et se trouve juxtaposé au noyau A9. Cet

ensemble de groupes de cellules est baptisé le *midbrain dopamine system* dans de nombreuses études. Les cellules dopaminergiques du groupement A10 possèdent le VMAT2, le DAT et le récepteur DRD2 (Morales and Margolis, 2017) et sont décrites comme ayant des projections dopaminergiques vers l'amygdale, l'hippocampe, le préfrontal cortex et le noyau accumbens (Douma and de Kloet, 2020). De même, une description simplifiée de ces deux groupes présente deux projections, la voie nigrostriatale qui relie la SN-A9 et le striatum dorsal, mais aussi le VTA-A10 vers le striatum ventral impliqué dans les mouvements volontaires et le captage des signaux de saillance et les signaux de prédiction d'erreur. La voie mésocorticale entre la VTA-A10 et le cortex a également un rôle dans les prédictions d'erreur, la signalisation de la saillance, la pertinence incitative, la motivation et les associations de récompense (Bissonette and Roesch, 2016). Cette description montre le lien fonctionnel, au-delà du lien anatomique, qui existe entre ces 2 groupes. De plus, la localisation anatomique du RRF-A8 au niveau du mésencéphale dorsal (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Fu et al., 2012) possède également des projections vers l'hippocampe. En effet, l'utilisation de traceurs antéro et rétro-grades ont mis en évidence ces projections entre le groupement de cellules A8 et le CA1 (Gasbarri et al., 1996). Ces observations suggèrent un rôle de relais pour le noyau A8 entre le système limbique et le système moteur gouverné par les noyaux A9 et A10.

c. Regroupement cellulaire A11

Les neurones TH⁺ du groupement A11 sont des neurones dopaminergiques possédant les enzymes nécessaires à la production de DA ainsi que le matériel permettant la sécrétion de ce neuropeptide, le VMAT2. Ne possédant pas le transporteur de la DA (DAT) permettant la recapture de celle-ci, ces neurones ont un temps d'action plus long que les neurones dopaminergiques « classiques » (Koblinger et al., 2014). Une autre particularité de ce groupement de cellules est la projection des fibres nerveuses vers la moëlle épinière, ce qui en fait l'une des principales source d'innervation dopaminergique (Ozawa et al., 2017). Les rôles physiologiques de ce groupement de cellules sont pour certains identifiés. Ce noyau est un centre de contrôle de la douleur, joue un rôle dans la modulation du réseau locomoteur spinal, et il est également impliqué dans le syndrome des jambes sans repos et la cataplexie même si pour le moment ces rôles restent peu étudiés (Koblinger et al., 2014).

3. Le télencéphale

a. La zona incerta (ZI-A13)

La ZI-A13, décrite par Auguste Forel, joue un rôle dans de nombreuses fonctions telles que l'activité viscérale, les fonctions d'éveil et d'attention, dans la locomotion, dans l'organisation des émotions et des traitements émotionnels et dans la nociception (Coenen et al., 2011; Moriya et al., 2020; Wang et al., 2020). Cette structure est en relation avec plusieurs zones anatomiques du cerveau dont le cortex, le cervelet, le thalamus, le tronc cérébral, la moëlle épinière, les noyaux gris centraux, l'amygdale, le prosencéphale basal et l'Hyp-A12-A14-A15 (Mitrofanis, 2005). Le temps d'action de la DA des neurones TH du groupement A13 est plus important car ces neurones ne possèdent pas la DAT nécessaire à la recapture de ce neurotransmetteur (Bolton et al., 2015; Essig and Felsen, 2016). Ce groupement de cellules A13 a un rôle d'intégration des signaux, en lien avec le colliculus supérieur en constituant un relais vers le LC-A6 et le PAG-A10dc, ce qui lui confère un rôle important dans les réponses comportementales liées à la coordination des mouvements et aussi d'évitement (Bolton et al., 2015; Essig and Felsen, 2016).

b. L'hypothalamus (Hyp-A12-A14-A15)

L'Hyp-A12-A14-A15 constitue le lien entre le système nerveux autonome et le système endocrinien (thyroïde, glandes sexuelles, corticosurrénales ...). Cette zone du SNC est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques car l'hypothalamus régule la faim, la soif, le sommeil, la température corporelle, et joue un rôle dans le contrôle des émotions et du comportement sexuel. Présent en grande quantité dans l'hypothalamus, la DA joue des multiples rôles en tant que neurotransmetteur mais également comme hormone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Kawano and Daikoku, 1987). La DA inhibe la libération des hormones de l'hypophyse postérieure et intermédiaire (Tilders et al., 1979; K. Racke, H. Ritzel, B. Trapp, 1980; Stoll et al., 1984), et au niveau de l'hypophyse antérieure elle peut également inhiber ou permettre la libération d'autres hormones comme la LH, la GH et la TSH. Dans l'éminence médiane, la DA inhibe la libération de la prolactine via les neurones TIDA (Annunziato, 1979). Des neurones dopaminergiques de l'Hyp-A12-A14-A15 se projettent également vers la moëlle épinière et ont des rôles nociceptifs (Swanson and Kuypers, 1980).

Chapitre III : L'imagerie tridimensionnelle : une nouvelle approche d'imagerie dans la recherche biologique

La microscopie photonique en recherche biologique est un domaine en constante évolution. Depuis l'invention du tout premier microscope par le hollandais Zacharias Janssen en 1595, et sous l'impulsion des pionniers de la microscopie du 17^{ème} siècle que sont Robert Hooke et Antoni van Leeuwenhoek, nous ne cessons de repousser les limites d'observation tant sur le plan de la résolution que sur la capacité à imager des échantillons de grande taille. Le développement des techniques de la microscopie super-résolutive telle que celles employées par le STED (*stimulated-emission-depletion*), PALM (*photo-activated localization microscopy*), STORM (*super resolution microscopy*) permet aujourd'hui d'obtenir des résolutions axiales de l'ordre du nm (Schermelleh et al., 2010), et permet d'être de plus en plus précis dans les observations subcellulaires. En même temps, à l'inverse de l'observation subcellulaire, l'autre révolution que connaît la microscopie est de pouvoir observer l'organisation biologique dans son ensemble, en trois dimensions. Les nouvelles techniques de préparation des échantillons, de microscopie et d'analyse permettent d'avoir accès à ces nouvelles visualisations. L'association de quatre techniques permet d'accéder à l'imagerie tridimensionnelle en biologie à savoir, l'immunomarquage *in toto*, la « transparençation », la microscopie à feuille de lumière et les logiciels de reconstruction et d'analyse d'images tridimensionnelles.

I. L'immunomarquage *in toto*

1. L'accessibilité des protéines d'intérêt

L'apport des méthodes d'histofluorescence des monoamines développées par Falk et Hillarp constituent un tournant dans le domaine de la microscopie photonique (Falck et al., 1962). L'utilisation d'anticorps ciblés contre un épitope d'intérêt, couplée à la fluorescence a révolutionné les méthodes d'observation. Une des contraintes les plus importantes est l'accessibilité de l'anticorps de marquage à l'épitope cible. Pour s'affranchir de cette difficulté, classiquement les immunomarquages sont réalisés sur coupe avec comme inconvénient majeur la perte d'information sur l'organisation d'un système dans son ensemble. Cette accessibilité aux épitopes d'intérêt est très limitée à cause de l'hétérogénéité des composants d'un échantillon biologique entier. En effet, les glucides, lipides et protéines qui composent tout organe sont des barrières physiques empêchant la pénétration des anticorps même de façon

post-mortem. Cependant en 1986, une étude sur le développement des neurones sérotoninergiques dans le SNC de rat au stade de développement embryonnaire E15 a utilisé un protocole d'immunomarquage nouveau : l'immunomarquage *in toto*. Ce protocole d'immunomarquage vise à marquer un échantillon biologique sans effectuer de coupe au préalable (Aitken, 1987). En gardant cette idée de ne pas modifier l'intégrité du tissu biologique étudié et en adaptant les conditions d'immunomarquage *in toto* sur des tissus à des différents stades de développement, de nombreux articles ont décrit des protocoles ayant fait avancer de façon spectaculaire l'immunomarquage *in toto*. En effet, l'utilisation de différents produits permettant la perméabilisation, le délipidation, la dépigmentation et aussi la décalcification permet d'augmenter l'accessibilité des anticorps à leur cible, et suivant les protocoles choisis ces produits seront différents (Vieites-Prado and Renier, 2021).

Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés en particulier à trois études qui décrivent des protocoles de marquage adaptés pour différents organes (cerveau, rein, moëlle épinière) sur le modèle murin au cours de son développement et adulte. Le premier, le protocole adapté pour les stades de développement embryonnaire et les stades post-nataux (Belle et al., 2014), le second le protocole iDISCO pour l'immunomarquage d'organes de souris adultes (Renier et al., 2014) et le troisième protocole iDISCO+ permettant de conserver la taille des échantillons après « transparsiation » (Renier et al., 2016). Les étapes des protocoles iDISCO et iDISCO+, en particulier les pré-traitements de l'échantillon, permettent une meilleure pénétration des anticorps pour atteindre les protéines cibles. En effet, l'utilisation de solvant comme le méthanol à différente concentration (de 20% à 100%) et le dichlorométhane ou encore le diméthylsulfoxyde (DMSO) vont avoir pour conséquence de délipider les échantillons, et de façon plus classique des détergents tel que le Triton ou le Tween vont améliorer la perméabilité de ces échantillons. Deux autres facteurs importants entrent en jeu dans l'immunomarquage *in toto* : 1) le temps, car les incubations sont beaucoup plus longues que lors des immunomarcages classiques sur coupe, passant de quelques heures à plusieurs jours pour l'*in toto*, 2) la température, qui comme cela a pu être montré sur un modèle de sphéroïde, augmente considérablement la pénétration des anticorps lorsqu'elle est réalisée à 37°C (Smyrek and Stelzer, 2017), 3) l'agitation nécessaire à une bonne pénétration des anticorps dans les échantillons pour l'immunomarquage *in toto*. Tous ces facteurs permettent aux anticorps de traverser les échantillons sur plusieurs millimètres d'épaisseur et ainsi d'accéder à leur cible.

2. Le stade de développement influence l'immunomarquage *in toto*

En prenant comme modèle de référence la souris, suivant le stade de développement étudié, les conditions d'immunomarquage *in toto* varient. Ceci s'explique par la maturation des organes qui seront moins perméables à des stades de développement avancés. Pour les stades embryonnaires, des stades très précoces jusqu'au stade E13.5, les immunomarquages peuvent être réalisés sur des embryons entiers. Pour les stades embryonnaires suivants jusqu'aux stades adultes, une dissection de l'organe d'intérêt doit être réalisée. De même, les étapes de perméabilisation sont moins drastiques pour les échantillons aux stades précoces jusqu'au stade P4 car la perméabilité est plus importante. Le protocole d'immunomarquage *in toto* décrit dans l'article de Belle et al. (2014) utilise des perméabilisants plus doux, comme la saponine à 0.1% et le triton à 0,5%, ceci ayant pour effet de ne pas endommager les échantillons qui à ces stades sont plus fragiles, tout en augmentant l'accessibilité des protéines cibles pour les anticorps. Après le stade P4, les échantillons deviennent moins perméables et l'immunomarquage nécessite d'associer des détergents tel que le Triton X-100 et le Tween-20 à des concentrations allant de 0,2% jusqu'à 2% pour le Tween-20. De plus, des étapes de délipidation sont réalisées avec différents solvants tels que le méthanol, le dichlorométhane, le DMSO, ceci ayant pour objectif de faciliter l'accessibilité des anticorps aux épitopes cibles, approche décrite dans l'article de Renier et al. (2014). Dans ce projet de thèse, une approche méthodologique que nous avons publiée (Godefroy et al., 2020) présente un organigramme méthodologique pour les différents stades de développement des échantillons étudiés (Fig. 23).

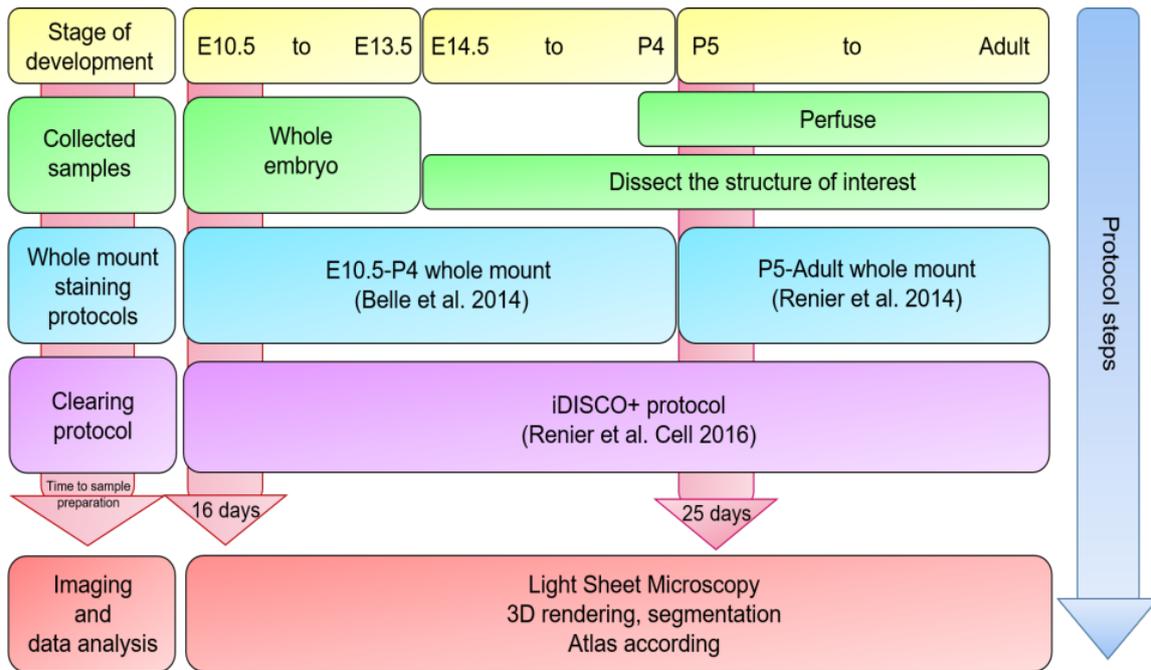


Figure 23 : Organigramme méthodologique pour l'imagerie 3D. Suivant les stades de développement des échantillons étudiés, les quatre étapes pour l'imagerie tridimensionnelle sont représentées par différentes couleurs. En vert est indiqué si les échantillons doivent être disséqués ou non, avec une perfusion à partir du stade de développement où cela devient possible. En bleu, le protocole d'immunomarquage *in toto* adapté. En violet, le protocole de « transparisation » à suivre. En rouge les étapes d'acquisition et d'analyse. Suivant le stade, le temps de préparation avant l'imagerie et l'analyse varie de 16 jours à 25 jours. (Godefroy et al., 2020).

II. La « transparisation »

1. Pourquoi un échantillon n'est pas transparent et comment le rendre transparent

Rendre un échantillon transparent est possible en permettant à la lumière de traverser celui-ci de façon homogène. Pour comprendre comment rendre transparent un échantillon, il faut d'abord savoir pourquoi il ne l'est pas. Un échantillon biologique n'est pas transparent car la lumière ne peut le traverser, ceci étant dû à trois raisons principales : 1) les différences d'indice de réfraction qui composent l'échantillon (Fig. 24 A), 2) la taille de l'échantillon (Fig. 24 A) et 3) les pigments qui bloquent le passage de la lumière (Fig. 24 B). Un échantillon biologique est constitué de nombreux éléments ayant des indices de réfraction hétérogènes. En effet, les protéines, les glucides, les lipides ou encore l'eau ont des indices de réfraction très variables allant de 1.33 pour l'eau jusqu'à des valeurs de 1.52-1.56 pour les protéines par exemple. Cette hétérogénéité des indices entraîne la dispersion de la lumière, ce qui rend l'échantillon opaque (Fig. 24 A) (Ueda et al., 2020). Tous les protocoles de « transparisation » sont basés sur le

même principe : homogénéiser les indices de réfraction des échantillons pour que la lumière ne se disperse plus dans l'échantillon. Des composés comme les pigments pouvant être présents dans la composition d'échantillons biologiques sont des éléments qui bloquent complètement le passage de la lumière (Fig. 24 B), il est donc indispensable de les éliminer avant l'homogénéisation. Diverses stratégies pour enlever ces pigments sont possibles telles l'utilisation de H_2O_2 qui blanchit de façon importante la pigmentation des hématies, par exemple pour l'œil une autre stratégie couplant l'utilisation d' H_2O_2 à une exposition lumineuse (11 watt/3000 kelvin) rend plus efficace la dépigmentation les cellules (Vigouroux et al., 2020). Une fois ces contraintes levées (Fig. 24 C), l'homogénéisation des échantillons devient possible et une fois réalisée la lumière peut les traverser, ils sont « transparisés » (Fig. 24 D).

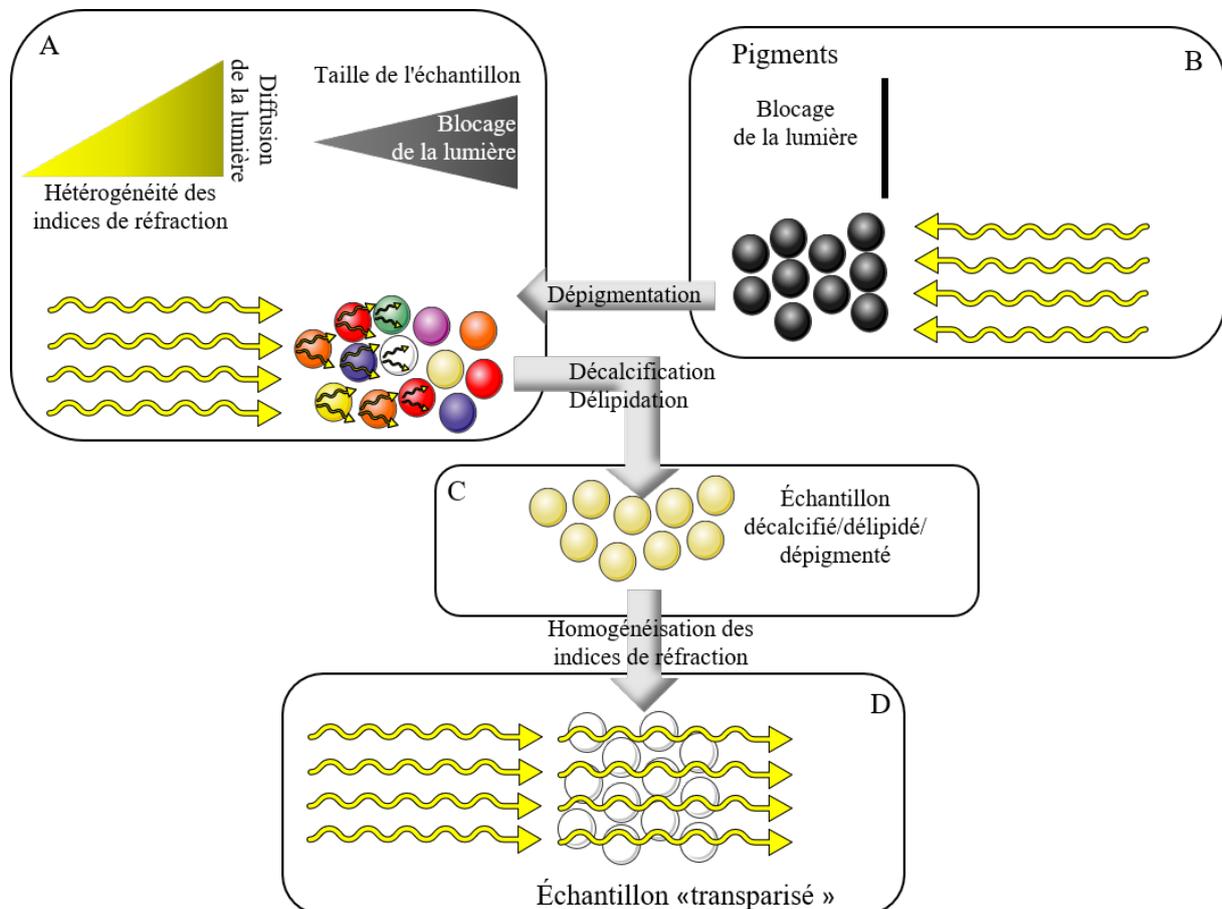


Figure 24 : Principe de la « transparisation » (A) l'hétérogénéité des indices de réfraction des composants d'un échantillon biologique va entraîner un phénomène de diffusion de la lumière ; plus la taille de l'échantillon augmente plus la lumière est bloquée rendant l'échantillon opaque. D'autres composés comme les pigments sont des barrières pour le passage de la lumière (B) et empêchent la pénétration de celle-ci. Un échantillon doit être décalcifié, délipidé et dépigmenté (C) ce qui permet ensuite d'homogénéiser celui-ci à un indice de réfraction donné afin de le rendre transparent (D).

2. Les familles de protocoles de « transparisation » et les critères de sélection

Un nombre important de protocoles se basant sur ce principe d'homogénéisation des indices de réfraction a été publié. Une revue, Ueda et al. (2020), a classé ces protocoles en trois familles : 1) les protocoles utilisant des solvants organiques, 2) les protocoles utilisant des réactifs aqueux et 3) les protocoles utilisant des polymères d'hydrogel. Pour répondre aux questions biologiques, l'orientation du choix vers telle ou telle famille de protocoles de « transparisation » est motivée par les critères suivants : 1) l'altération morphologique de la structure biologique, 2) l'homogénéité des indices de réfraction, 3) la conservation de la fluorescence endogène, 4) la toxicité des réactifs et 5) l'adaptabilité de la microscopie utilisée pour l'acquisition des images des échantillons.

Les protocoles modifient de façon différente la morphologie des échantillons. Les protocoles à base de solvants organiques entraînent, de façon plus ou moins importante, une réduction de la taille alors que les deux autres familles entraînent une expansion de l'échantillon. La dispersion de lumière reflète l'efficacité de la « transparisation », les protocoles à base de solvants organiques et utilisant des polymères d'hydrogel sont les plus efficaces car atteignent une bonne homogénéisation des indices de réfraction. En recherche fondamentale de nombreuses études utilisent comme des modèles biologiques exprimant de la fluorescence endogène. Contrairement aux protocoles hyper-hydratants ou à base de polymères d'hydrogel, les protocoles à base de solvants organiques endommagent fortement cette fluorescence endogène. Les solvants tels que le méthanol, le dichlorométhane et l'éther de benzyle entraînent un photoblanchiment de la fluorescence endogène, et un immunomarquage *in toto* sera nécessaire avec ce type de protocole. La toxicité des produits utilisés est une motivation dans le choix de la famille de protocoles suivant la disponibilité des équipements de protection nécessaires. Le choix du microscope et de ses caractéristiques est un point important oriente le choix du protocole de « transparisation ». La microscopie à feuille de lumière est une microscopie particulièrement adaptée aux échantillons traités suivant les protocoles de « transparisation » utilisant des polymères d'hydrogel ou des solvants organiques car elle permet l'imagerie d'échantillons épais.

| Famille de protocole | Altération de la morphologie | Diffusion de la lumière | Conservation de la fluorescence endogène | Toxicité des réactifs | Durée pour "transpariser" | Adapté à la microscopie par feuille de lumière |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|--|-----------------------|------------------------------------|--|
| Solvants organiques | + | 0 | 0 | +++ | quelques jours | +++ |
| Hyperhydratants | ++ | ++ | ++ | 0 | quelques jours à quelques semaines | 0 |
| Polymères d'hydrogel | ++ | 0 | ++ | +++ | quelques jours à quelques semaines | ++ |

Table 1 : Spécificités des familles de protocole de « transparence ». Critères de sélection permettant d'orienter le choix de la famille de protocoles de « transparence » à utiliser.

3. La « transparence » par solvants organiques

Spalteholz a publié en 1911 « *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten* » un article posant les bases de la « transparence » par utilisation de solvants organiques (Spalteholz, 1911). Il a décrit comment en déshydratant, blanchissant et en utilisant un mélange de benzylbenzoate et salicylate de méthyle les échantillons peuvent devenir transparents. Étant anatomiste, ce chercheur veut comprendre comment sont organisés les organismes sans avoir à les disséquer. L'exemple des deux batraciens « transparents » illustre cette approche (Fig. 25). Des années plus tard, en 2012, Ertürk et al. publient dans le journal *Nature protocols* un article sur la « transparence » décrivant une amélioration des protocoles utilisant les solvants organiques existant. Le changement majeur a consisté en le remplacement du solvant final permettant la « transparence » et l'homogénéisation de l'indice de réfraction, le mélange d'alcool benzylique et de benzoate de benzyl (1 :1) étant remplacé par un solvant aux propriétés plus intéressantes l'éther de benzyle. Ainsi en 2012, la « transparence » par solvant organique connaît un tournant, et à partir de ce moment cette technique porte le nom de 3DISCO pour **3** Dimensional Imaging of Solvent-Cleared **O**rgans (Ertürk, Mauch, et al., 2012).

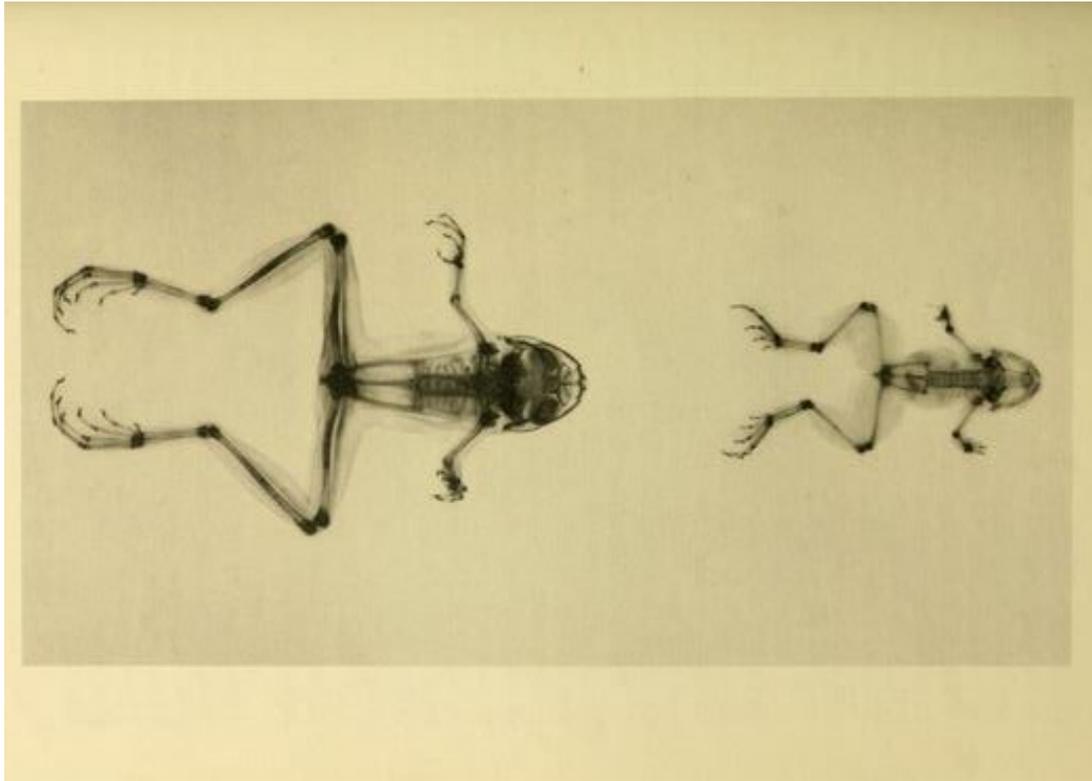


Figure 25 : Photographie de grenouilles « transparentes ». À gauche, une grenouille cricket en vue ventrale et à droite, une petite grenouille africaine ranidae en vue dorsale, toutes deux « transparentes » par la méthode développée par Spaltholz (*Spaltholz, 1911*).

4. Quelques caractéristiques de différents protocoles de « transparence » par solvants organiques

Dans cette famille de protocoles de « transparence », de nombreuses publications décrivent des protocoles utilisant divers types de solvants permettant d'avoir des caractéristiques variées sur les échantillons « transparents » obtenus (Fig. 26). L'expérience montre que la « transparence » par solvants organiques entraîne, à plus ou moins long terme, le photoblanchiment des protéines fluorescentes endogènes, celles-ci ne résistent pas suffisamment longtemps aux solvants utilisés et plus particulièrement aux peroxydes générés. De ce fait, des modèles d'animaux génétiquement modifiés qui expriment la GFP ne sont pas utilisables directement avec ces approches. Afin d'améliorer la conservation de la fluorescence endogène, certains réactifs stabilisateurs comme l'oxyde d'aluminium, l'hydroxytoluène butyle, le nanoboost, l'acétate de tocophérol, l'éthylènedinitrilotetra-2-propanol, le gallate de propyle sont utilisés pour préserver cette fluorescence. D'autres paramètres comme le pH et la température ont également des effets sur la conservation de la fluorescence endogène. Les fluorochromes de type cyanine ou alexa, largement utilisés pour les immunomarquages,

résistent aux solvants organiques trouvés dans cette famille de protocoles de « transparisation », l'immunomarquage *in toto* prend ainsi donc tout son sens. L'immunomarquage *in toto* couplé à la technique de « transparisation » par des solvants organiques ont ouvert des perspectives en imagerie 3D extrêmement novatrices. Toutefois, pour les protocoles 3DISCO et iDISCO, utilisant le tétrahydrofurane pour délipider et déhydrater les échantillons, présentent un inconvénient majeur pour certaines approches, à savoir le rétrécissement des échantillons. Une étude publiée en 2016 décrit comment en remplaçant, dans les premières étapes du protocole, le tétrahydrofurane par du méthanol, il est possible de palier à ce rétrécissement et ainsi avoir des échantillons ayant des caractéristiques fidèles à l'organe vivant. En plus de conserver la taille initiale des échantillons, ce protocole du nom de iDISCO+, possède un pouvoir de « transparisation » très important (Renier et al., 2016).

Depuis les années 2010, la « transparisation » par solvants organiques connaît de nombreuses mises aux points et d'évolutions, les protocoles uDISCO, vDISCO, fDisco, sDISCO (Pan et al., 2016; Cai et al., 2019; Qi et al., 2019; Hahn et al., 2019) sont des exemples d'adaptation de procédure ayant pour finalité par exemple de conserver la fluorescence native, ou encore de « transparer » des échantillons plus volumineux, comme une souris entière en utilisant uDISCO ou vDisco. Des protocoles ont même été adaptés spécifiquement pour certains organes, par exemple pour l'œil qui a une pigmentation importante le protocole EyeDISCO a été spécialement développé (Vigouroux et al., 2020).

Le protocole de « transparisation » choisi pour notre projet scientifique est le protocole iDISCO+ car répondant au mieux aux contraintes du projet : 1) le modèle étudié n'est pas un modèle d'animaux transgéniques exprimant de la fluorescence native, 2) la conservation morphologique est un point crucial pour élaborer un atlas et cartographier des neurones spécifiques, 3) la microscopie par feuille de lumière est une microscopie particulièrement adaptée pour ce type d'étude.

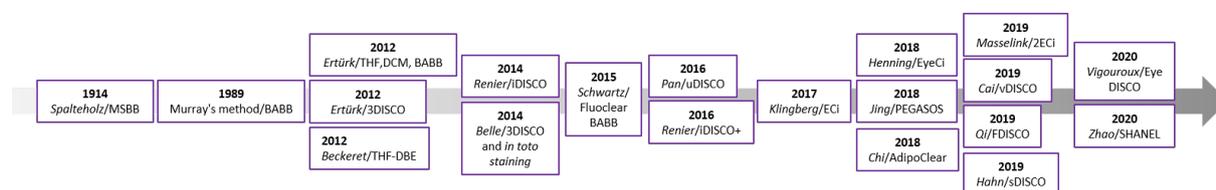


Figure 26 : Frise historique des différentes publications de « transparisation » par solvants organiques, inspiré de Vieites-Prado and Renier, 2021.

5. Les multiples domaines d'application de l'imagerie tridimensionnelle

L'imagerie tridimensionnelle ouvre des perspectives nouvelles et importantes dans de nombreux domaines biologiques. Cette technique a permis le développement de l'histologie. En 1993, Voie et al. publient un article dans *Journal of microscopy* qui décrit pour la première fois comment le sectionnement optique par plan orthogonal fluorescent permet la reconstruction tridimensionnelle macroscopique d'un échantillon biologique, en l'occurrence une cochlée pour cette étude. Quelques années plus tard, en 2007, un article publié dans le journal *Nature methods*, montre comment à partir d'échantillons rendus transparents de nouvelles informations sur l'organisation et l'architecture en trois dimensions sont accessibles pour de gros échantillons (Dodt et al., 2007). Depuis ces deux articles l'imagerie tridimensionnelle ne cesse d'apporter un regard nouveau dans la recherche fondamentale.

Cette nouvelle approche se développe de façon importante depuis plus d'une dizaine d'années et dans des domaines très variés. Le développement des méthodes de « transparençation » rend possible l'observation tridimensionnelle pour tout type d'organe (cerveaux, cœur, surrénale ...) (Ertürk, Mauch, et al., 2012; El-Mehdi et al., 2020; Houssari et al., 2020), voire d'animaux entiers (Susaki et al., 2014; Cai et al., 2019), et ceci pour de nombreuses espèces (grenouille, serpent, humain...) (Fig. 27). Les applications sont multiples : exemple de l'étude phénotypique comparative de souris invalidées pour les protéines DCC, Slit et ROBO3 montrant les défauts de projections axonales dans différents axes de projection, ou en 2016 avec le premier atlas tridimensionnel du développement humain, qui décrit la mise en place de système nerveux périphérique, vasculaire, bronchique, des organes reproducteurs, chez l'homme au cours des premières semaines de développement (Belle et al., 2017). Les images tridimensionnelles permettent un comptage global d'un type de neurones d'une structure étudiée, comme nous l'avons montré pour les neurones à vasopressine et à ocytocine de l'Hyp-A12-A14-A15 de souris (Godefroy et al., 2017). En visualisant un organe dans son ensemble, il devient possible aussi de suivre, de tracer et/ou de mesurer des prolongements neuronaux (Godefroy et al., 2020), ou de cartographier le réseau vasculaire (Kirst et al., 2020).

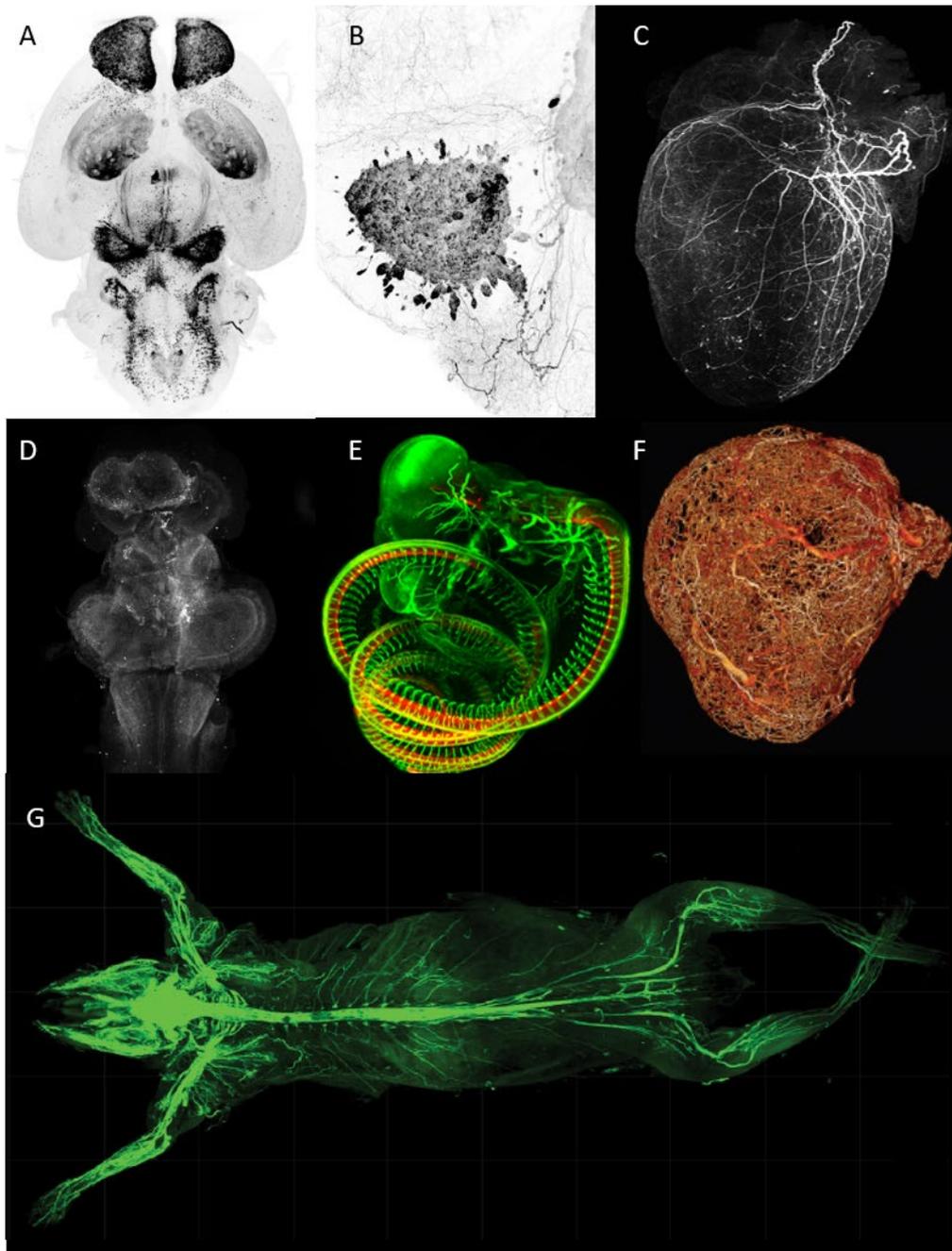


Figure 27 : Exemples des différentes applications possibles avec l'imagerie tridimensionnelle. De nombreux organes peuvent être étudiés et observés avec les méthodes de « transparation » par solvants organiques et ceci chez de multiples espèces. Le marquage catécholaminergique observé dans le SNC (A), la glande surrénale (B), le cœur (C) de souris et dans le SNC de grenouille(D). Les images (D), (E), (F) montrent que ce type d'imagerie est possible chez diverses espèces et différents modèles : (D) le système catécholaminergique dans le SNC de grenouille, (E) montre le marquage de la protéine du guidage axonal ROBO3 et la β III tubuline réalisé chez le serpent (Friocourt et al., 2019), (F) la vascularisation d'une xénotgreffe d'une tumeur humaine (Dobosz et al., 2014). (G) illustre la réalisation d'une transparation avec le protocole vDISCO d'une souris entière permettant l'observation du système nerveux (Molbay et al., 2021).

III. Microscopie pour échantillons « transparisés » : la feuille de lumière un outil particulièrement adapté

La microscopie a connu sa première révolution au 17^{ème} siècle grâce à Antoni van Leeuwenhoek qui a développé une technique de fabrication de lentilles contribuant à une amélioration considérable des observations dans le domaine de la biologie cellulaire. Depuis cette période, la microscopie n'a cessé de se développer et reste un outil indispensable d'observation dans la recherche. Dans le domaine de la microscopie optique, l'immunomarquage fluorescent a bouleversé cette approche d'observation, la possibilité d'immunomarquer des protéines cibles spécifiques avec des sondes fluorescentes permet une meilleure compréhension des systèmes biologiques étudiés. Les microscopes n'ont cessé de se développer pour permettre d'obtenir des informations de plus en plus importantes et précises. Une partie des limites d'observation en microscopie optique se trouve dans la résolution, axiale et latérale, mais également dans la profondeur de champ disponible. La microscopie confocale, classiquement utilisée dans le domaine de la recherche biologique, permet l'acquisition d'images avec une résolution axiale et latérale de l'ordre de respectivement 200 nm et 400-600 nm, ceci sur des profondeurs d'observation allant jusqu'à 150 µm sur des tissus épais. Cette profondeur d'observation pouvant être améliorée par la microscopie biphotonique, celle-ci permettant d'atteindre des profondeurs d'acquisition allant jusqu'à 500-800 µm. La profondeur de champ est un facteur limitant pour obtenir des images tridimensionnelles avec une haute résolution optique. De plus, l'opacité des échantillons empêche la pénétration de lumière et limite la qualité de l'imagerie 3D sur des gros tissus. Dans le chapitre III page 71, nous avons décrit comment les échantillons peuvent être rendus transparents, ce qui permet de s'affranchir d'une partie des contraintes optiques et facilite l'imagerie tridimensionnelle de tissus biologiques sans la réalisation au préalable de coupes histologiques sériées. Observer un cerveau en 3D, de manière globale jusqu'à la moindre de ses connexions neuronales, et ce sans avoir à le disséquer, est désormais possible avec la microscopie particulièrement adaptée pour ce type d'imagerie d'échantillons « transparisés », à savoir la microscopie à feuille de lumière. Cette microscopie développée en 1903 a pour principe, comme son nom l'indique, de rendre plan la source d'illumination via un montage optique (Fig. 28).

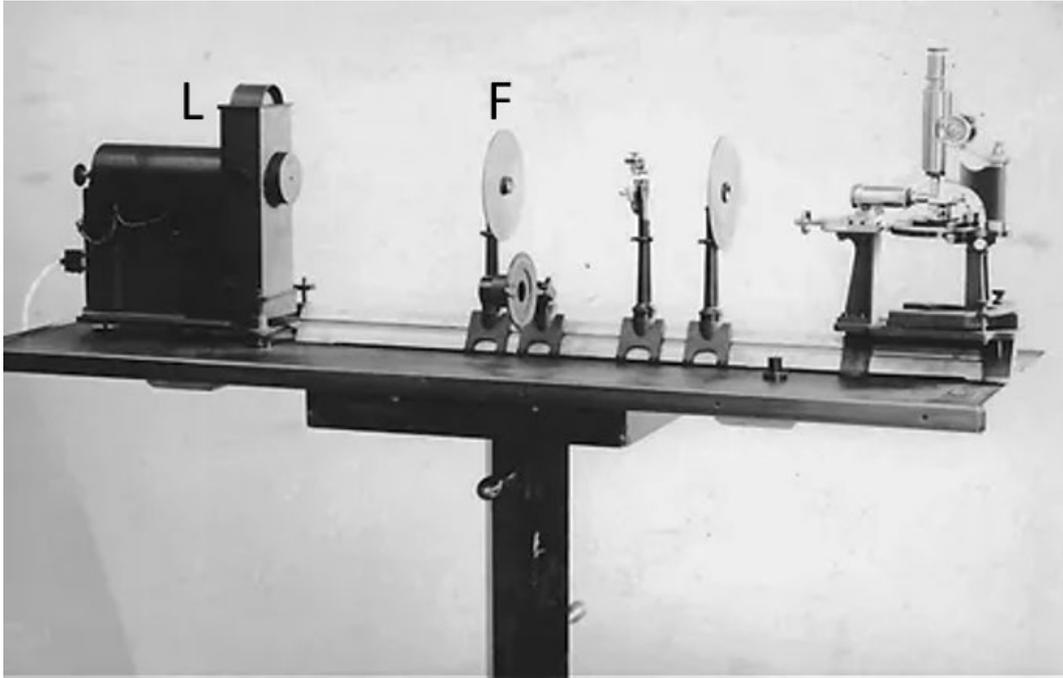


Figure 28 : Photographie du microscope à feuille de lumière développé par Zsigmondy et Siedentopf. La source de lumière (L) est dirigée vers un télescope (F) puis un condenseur afin de former une feuille de lumière.

Cette technique de microscopie à feuille de lumière aussi appelée SPIM pour *Selective Plane Illumination* (Huisken and Stainier, 2009) a pour principe l'illumination par plans optiques de l'échantillon. L'épaisseur du plan optique, noté z , va définir la résolution latérale de l'image, celle-ci est liée à la distance de Rayleigh x'_R suivant les propriétés des faisceaux gaussiens, $x'_R = (\pi \times w'_0)^2 / \lambda$, z étant le double de w'_0 (Fig. 29). Cette distance de Rayleigh est essentielle pour le recouvrement de l'échantillon. L'épaisseur de la feuille de lumière et sa longueur sont fonction de la longueur d'onde utilisée pour la générer. L'échantillonnage plan par plan, avec ce principe de microscopie qui possède des résolutions satisfaisantes, permet d'avoir des images rapides en comparaison à la microscopie plus conventionnelle comme la microscopie confocale ou biphotonique. La technique de microscopie à feuille de lumière associée aux échantillons biologiques transparents, permet d'obtenir des images sériées de la fluorescence émise sur l'ensemble de l'organe, et l'acquisition des plans optiques permet l'obtention d'une pile d'images qui, via des logiciels de reconstruction 3D, seront compilées pour former une image tridimensionnelle fidèle aux marquages cibles de l'organe étudié (Ertürk and Bradke, 2013).

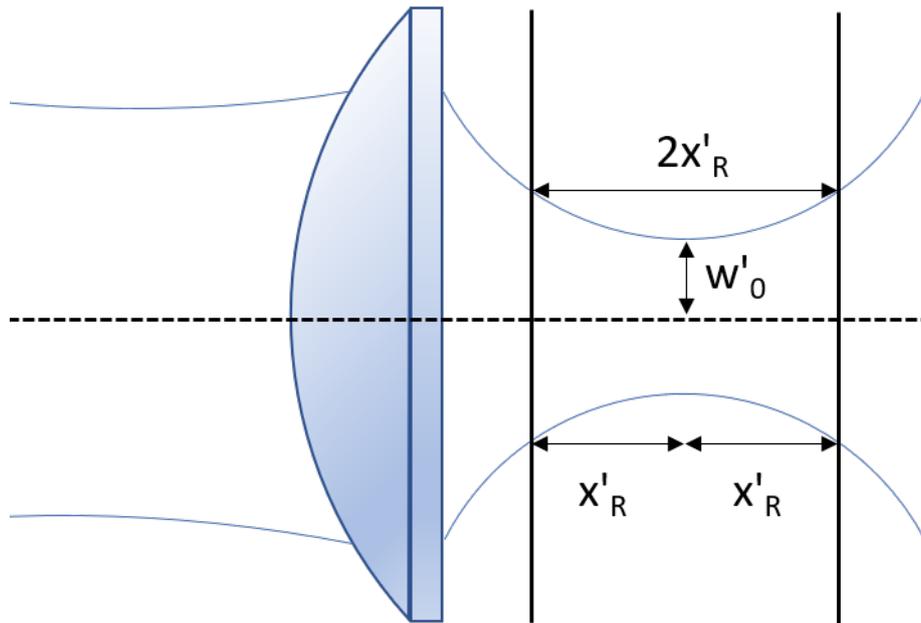


Figure 29 : Vue latérale d'une feuille de lumière. La résolution en z est égale au double de w'_0 et la longueur de recouvrement suit les propriétés des faisceaux gaussiens avec la formule de la distance de Rayleigh.

IV. L'imagerie tridimensionnelle, sa visualisation et ses analyses

L'acquisition de la fluorescence des échantillons transparents, précédemment décrits, permettent la visualisation tridimensionnelle d'un objet biologique via des logiciels de reconstruction 3D. Les piles d'images sériées vont être compilées pour obtenir une image volumique, avec une qualité des images qui dépendra des résolutions en x , y et z . Dans le cas de l'imagerie par microscopie à feuille de lumière, ces facteurs sont liés aux objectifs utilisés pour les résolutions en x et y , et l'épaisseur de la feuille de lumière pour la résolution en z . Les images acquises avec cette technologie donnent accès à des informations de l'ordre du μm de résolution et cela dans des volumes de plusieurs mm^3 , voire cm^3 pour les animaux entiers. Cette approche permet donc d'envisager le traitement d'images différemment. Avec ce type d'image, il est possible d'avoir des données volumiques (Dobosz et al., 2014), d'avoir un comptage du nombre réel de cellules dans un organe ou une sous-partie d'un organe choisi (Godefroy et al., 2017; Klingberg et al., 2017; Godefroy et al., 2020), d'avoir un traçage d'objets biologiques, comme le traçage du système vasculaire du SNC de souris (Kirst et al., 2020), ou encore le traçage de voies neuronales exprimant la TH dans le SNC de souris (Godefroy et al., 2017; Godefroy et al., 2020). L'accès à ce type d'analyse n'est possible qu'en réunissant plusieurs paramètres importants car la disponibilité des logiciels de reconstruction et d'analyse 3D reste encore très limitée. De plus, la puissance de calcul nécessaire pour traiter ce type de données est limitante pour la plupart des laboratoires de recherche fondamentale. Des progrès très

importants sont à réaliser tant en termes de développement d'outils de traitements robustes qu'à l'accessibilité de ceux-ci pour la communauté scientifique. Plusieurs groupes de chercheurs ont développé des algorithmes de traitement d'image pour répondre spécifiquement à des problématiques précises. Des logiciels de mapping tels que ClearMap ou MIRACL ont été développés pour le mapping des régions marquées dans le cerveau adulte de souris (Renier et al., 2016; Goubran et al., 2019) ou encore TubeMap qui lui permet de tracer et de modéliser la vascularisation d'un échantillon (Kirst et al., 2020). Beaucoup d'autres solutions « *home made* » existent ou sont en cours de développement pour améliorer les analyses des reconstructions tridimensionnelles.

Objectifs de thèse

Les sélénoprotéines sont des protéines ayant pour la plupart d'entre elles des fonctions biologiques très importantes pour l'organisme. Présentes dans la quasi-totalité des espèces vivantes, elles ont des fonctions biologiques diverses, enzymatiques, de protection contre le stress oxydant, dans le contrôle métabolique, etc... Comme décrit dans l'introduction, pour une partie de ces protéines les fonctions biologiques sont bien connues, alors que pour une autre partie d'entre elles les rôles ne sont que partiellement décrits. La SELENOT, bien qu'étant une sélénoprotéine indispensable pour l'organisme, est une des sélénoprotéines dont les fonctions ne sont aujourd'hui que partiellement comprises. Impliquée dans le processus sécrétoire des cellules, dans la régulation de l'homéostasie du RE, dans la régulation du stress oxydatif, dans le contrôle du repliement des protéines et jouant également un rôle dans la N-glycosylation des protéines (Hamieh et al., 2017; Anouar et al., 2018; Pothion et al., 2020), elle est exprimée dans différents organes endocriniens (Grumolato et al., 2008). Son rôle neuroprotecteur, en particulier la protection des neurones dopaminergiques, a été mis en évidence dans différentes études (Boukhzar et al., 2016; Shao et al., 2019; Alsharif et al., 2021) et des altérations du comportement ont été constatées chez le modèle de souris invalidées en SELENOT dans les cellules du SNC. En effet, ces souris présentent des phénotypes d'hyperactivité, une vulnérabilité aux toxines ciblant les neurones dopaminergiques (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016), mais aussi un hypogonadisme hypogonadotrophique provoquant des problèmes de reproduction (travaux en cours).

Nous avons émis l'hypothèse que les altérations phénotypiques des souris déficientes en SELENOT pouvaient être au moins en partie la conséquence d'un défaut de distribution de certains types neuronaux. Le rôle protecteur de la SELENOT des neurones dopaminergiques et l'hyperactivité observée à l'état basal laissent penser à un défaut du système catécholaminergique au niveau central des souris KO SELENOT conditionnelles.

En effet, les neurones catécholaminergiques, neurones exprimant trois types de neurotransmetteurs : la DA, la NA et l'Ad, sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Depuis leur découverte, il a été mis en évidence que les neurones catécholaminergiques sont essentiels dans les fonctions locomotrices, dans le sommeil, favorisent l'excitation, pour le tonus musculaire, dans les réponses à un état de stress, etc... Ces neurones sont décrits comme extrêmement vulnérables au stress oxydatif (Wang and Michaelis, 2010). Dans ce contexte biologique la SELENOT est une protéine très intéressante à étudier car son rôle dans la régulation ce stress oxydatif en fait un acteur essentiel pour les neurones CA.

Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus suite à l'invalidation de la SELENOT dans le SNC qui entraîne une augmentation de la vulnérabilité des cellules catécholaminergiques et peut expliquer les phénotypes comportementaux observés chez notre modèle de souris KO.

Afin de caractériser le SNC des souris KO SELENOT conditionnelles, une méthodologie basée sur les principes de la microscopie tridimensionnelle, en complément d'approches histologiques plus classiques d'immunomarquage et d'hybridation *in situ* à fluorescence, a été mise en place pour visualiser, décrire et caractériser les différents groupes de neurones catécholaminergiques.

Résultats

Premier article :

Three-dimensional mapping of tyrosine hydroxylase in the transparent brain and adrenal of prenatal and pre-weaning mice : Comprehensive methodological flowchart and quantitative aspects of 3D mapping

David Godefroy, Loubna Boukhzar, Christophe Dubessy, Maité Montero-Hadjadje, Laurent Yon, Lee E. Eiden, Youssef Anouar

Le projet de thèse impliquant la caractérisation du système catécholaminergique et la distribution des neurones exprimant la TH chez les souris déficientes en SELENOT, notre premier objectif a été d'étudier la mise en place de ce système chez la souris avec l'outil d'imagerie 3D. Ce premier objectif nous permet d'approcher l'étude anatomique des neurones TH+ à tous les stades du développement et ouvrir ainsi la voie à nos études ultérieures chez la souris mutantes. Nous avons établi la cartographie tridimensionnelle du système catécholaminergique à partir de l'immunomarquage de la TH dans l'ensemble de l'organisme de l'embryon de souris jusqu'au stade E13.5, puis uniquement dans le SNC de souris de E14.5 jusqu'au stade adulte, et enfin dans la glande surrénale du stade E11.5 au stade P14. Dans cette étude nous avons présenté la démarche méthodologique à suivre afin de réaliser une cartographie précise et en 3D, d'un système neurobiologique choisi. Suivant les stades de développement et l'organe étudié, les étapes de préparation de l'échantillon et les protocoles d'immunomarquage sont adaptés. Dans cette étude, une description au cours du temps des zones anatomiques du SNC exprimant la TH est réalisée ainsi qu'une description anatomique plus approfondie du développement du système catécholaminergique de la ZI-A13, de la SN-A9 et de VTA-A10, du LC-A6 et de la médulosurrénale.



Three-dimensional mapping of tyrosine hydroxylase in the transparent brain and adrenal of prenatal and pre-weaning mice: Comprehensive methodological flowchart and quantitative aspects of 3D mapping

David Godefroy^{a,b}, Loubna Boukhzar^{a,b}, Christophe Dubessy^{a,b}, Maité Montero-Hadjadje^{a,b}, Laurent Yon^{a,b}, Lee E. Eiden^c, Youssef Anouar^{a,b,*}

^a Normandie Univ., UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, 76821, Mont-Saint-Aignan, France

^b Institute for Research and Innovation in Biomedicine, 76000, Rouen, France

^c Section on Molecular Neuroscience, National Institute of Mental Health Intramural Research Program, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Tyrosine hydroxylase
Clearing
3D neuroanatomical mapping
CNS development
Adrenal

ABSTRACT

Background: Tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes the rate-limiting step for the biosynthesis of the catecholamines dopamine, noradrenaline and adrenaline. Although its distribution in different organs, species and stages of development has been the subject of numerous studies, the recent emergence of 3D imaging techniques has created the potential to shed new light on the dynamics of TH expression during the development of the mammalian central and peripheral nervous systems.

New method: Here, we describe a flowchart summarizing different protocols adapted to developmental stage-specific tissues to generate a 3D atlas of the catecholaminergic system in the brain and peripheral nervous system in mice from embryonic to pre-weaning stages. The procedures described allowed a quantitative assessment of developing TH-positive neuronal populations and pathways, previously understudied due to dimensional limitations.

Results: Our approach allowed us to reveal in 3D the dynamics of the onset and the establishment of the catecholaminergic system in embryonic and developing central and peripheral nervous system. Quantitative analyses applied to 3D images yielded accurate measurements of neuron population volumes and numbers, and tract pathway dimensions for selected TH-positive brain structures.

Comparison with existing methods: We applied a set of different protocols to yield a comprehensive flowchart for 3D imaging and a precise quantitative assessment of specific neuronal populations during the course of their development up to adulthood in mice.

Conclusion: The procedures described and the extensive 3D mapping of TH immunoreactivity at early embryonic and postnatal stages provide a comprehensive view of the onset and development of the catecholaminergic system in the mouse brain and sympathoadrenal nervous system.

Abbreviations: ACB, nucleus accumbens; Ad, adrenal; Ad a, adrenal anlage; CA, catecholamines; CNS, central nervous system; CP, caudoputamen; CSPall, central subpallium; DRG, dorsal root ganglion; Hy, hypothalamus; Is, isthmus; Kdy, kidney; LC, locus coeruleus; ME, median eminence; MfB, medial forebrain bundle; MH, medullary hindbrain; MTg, midbrain tegmentum; m2, mesomere 2; OB, olfactory bulb; OT, olfactory tubercle; PAG, periaqueductal gray; PH, pontine hindbrain; PHy, peduncular hypothalamus; PMH, pontomedullary hindbrain; PNS, peripheral nervous system; POA, preoptic alar plate; PPH, prepontine hindbrain; PSPa, peduncular subparaventricular area; PTh, prethalamus; PThTg, prethalamic tegmentum; PtTg, pretectal tegmentum; PVZ, periventricular zone; PVR, periventricular region; P1, prosomere 1; P2, prosomere 2; P3, prosomere 3; r1,2, rhombomere 1,2; r3,4, rhombomere 3,4; r5,6, rhombomere 5,6; r7,...,11, rhombomere 7,...,11; SCG, sympathetic chain ganglia; SN, substantia nigra; Spall, subpallium; Str, striatum; TH, tyrosine hydroxylase; TH-IR, tyrosine hydroxylase-immunoreactivity; ThTg, thalamic tegmentum; Thy, terminal hypothalamus; TIDA, tuberoinfundibular dopamine; VPall, ventral pallidum; V, trigeminal ganglia; VTA, ventral tegmental area; ZIC, zona incerta complex

* Corresponding author at: Normandie Univ., UNIROUEN, Inserm, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, 76821, Mont-Saint-Aignan, France.

E-mail address: youssef.anouar@univ-rouen.fr (Y. Anouar).

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108596>

Received 18 November 2019; Received in revised form 14 January 2020; Accepted 15 January 2020

Available online 05 February 2020

0165-0270/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Catecholamines (CA) act as neurotransmitters or hormones and are produced by neuronal and neuroendocrine cells that contain a dedicated catecholaminergic biosynthetic pathway (Goldstein et al., 1997). These monoamines include dopamine, noradrenaline and adrenaline, and derive from the conversion of the amino acid tyrosine by specific enzymes whose « chef de file » is the rate-limiting enzyme tyrosine hydroxylase (TH). This enzyme catalyzes the first step of CA biosynthesis and is widely used as a specific marker of CA neurons (Nagatsu et al., 1964). Since CA control various biological functions such as stress, emotions, learning and motor function, understanding the different steps of their biosynthesis has been a major focus of neurobiological studies for the past sixty years. In particular, the function and distribution of TH have been extensively studied throughout the central and peripheral nervous system (PNS) given the instrumental role of this enzyme in the biosynthesis of CA (Björklund and Dunnett, 2007; Luque et al., 1998; Smeets and González, 2000; Ugrumov et al., 2002).

Locating TH in the brain has been the subject of various research on different animal models and human tissue in adult and developing brain, leading to the distinction of several CA cell groups named A1 to A17 and C1 to C3 (Björklund et al., 1992; Björklund and Dunnett, 2007). Different studies focused on the CA system in specific brain structures, such as the forebrain (Yip et al., 2018), midbrain (Nelson et al., 1996), diencephalon (Björklund and Nobin, 1973), hypothalamus (Ruggiero et al., 1984), neostriatum (Unal et al., 2011), cerebral cortex (Zecevic and Verney, 1995) and cerebellum (Nelson et al., 1997), thus providing a detailed description of the TH-positive systems in neuroanatomical structures. Studies performed during embryonic brain ontogenesis in various species including mouse, rat, fish and human revealed that the development of the CA system is sequential, accompanying the appearance of various CA functions in the organism (Bhat and Ganesh, 2017; Golden, 1973; Olson et al., 1973; Puelles and Verney, 1998; Son et al., 1996; Specht et al., 1981a, b; Stuesse et al., 1991; Zecevic and Verney, 1995). The different CA are produced in LC (noradrenaline), VTA, SN, ZI and TIDA (dopamine) and medullary nuclei (adrenaline) in the CNS, and in sympathetic ganglia, DRG, enteric nervous system and adrenal for all three catecholamines in PNS.

The methods used to carry out these studies have undergone considerable evolution from the histofluorescence method developed by Falck-Hillarp (Falck et al., 1982) to more recent, sophisticated immunohistochemical techniques (Björklund and Dunnett, 2007). Although these techniques provided a precise definition of specific neuronal CA systems, most of them were carried out on histological sections of the brain which preclude spatial observation that allows the dynamic analysis of the onset and development of CA expression. Three-dimension mapping studies of TH distribution in the brain are just emerging with the development of new imaging methods using clearing approaches (Godefroy et al., 2017, 2018). Indeed, although immunolabeling an organ as a whole is a process used for mapping different structures since the 1980s, and applied to spinal cord (Selzer, 1979) and embryonic or postnatal brains (Aitken et al., 1987; Aitken, 1987; Luque et al., 1998), the *in toto* immunolabeling methods have undergone a significant development recently with the advent of sample clearing methodologies such as the 3Disco procedure (Ertürk et al., 2012; Renier et al., 2014; Belle et al., 2014) coupled with light sheet microscopy (Voie et al., 1993; Dodt et al., 2007). These techniques allow highly accurate 3D imaging of various tissues including the CNS (Belle et al., 2014, 2017; Godefroy et al., 2017, 2018; Renier et al., 2014, 2016) and neuronal and neuroendocrine ganglia and organs in the periphery.

In the present study, we first describe a flowchart allowing the generation of a three-dimensional immunohistochemical atlas in the mouse brain at different stages of development, from E10.5 to P14. The procedures described were applied to TH immunostaining, thus

allowing the analysis of the establishment of the CA system during brain and PNS development, in real organismic space, across time. Importantly, the procedures described allowed a quantitative assessment of developing TH-positive neuronal populations and pathways, previously understudied due to dimensional limitations, such as the ZIC and MfB, respectively. This approach also provides an integrated depiction of TH expression during development in various compartments of the nervous system. This in turn allows consideration of the relationship between neurochemical and anatomical maturation of the nervous system relevant to further probing of the role of CA as endocrine and neuronal actors both during development and in the adult mammal.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57BL/6 mice were maintained under controlled conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity, 14:10 h light/dark cycle) with free access to food and water *ad libitum*. All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines for the care and use of experimental animals approved by the European Community Council Directive 2010/63/UE and authorization number 2017 0126 1609 7586.

Adult female C57BL/6 mice were set up for timed mating. One male and two females were coupled during one night, which was referred as gestational starting day before to remove the male. To confirm pregnancy, a weighting follow-up was performed. Embryonic (E) days of development 10.5 to E19.5 were thus obtained. For postnatal (P) stages, P0 is the time of delivery, P7 and P14 represent postnatal days 7 and 14. The embryonic and postnatal periods investigated are largely representative of the different stages of development of the catecholaminergic system in prenatal and pre-weaning mice.

2.2. Sample preparation

A flowchart of the procedures used in this study for samples at various developmental stages is shown in Fig. 1. Samples from E10.5 to E13.5 correspond to whole embryos which were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C . From E14.5 and later on, the brain and kidney with the adrenal gland were dissected and then fixed in PFA 4 % overnight at 4°C . Postnatal mice were anesthetized using a solution of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and P4 and older mice were perfused with phosphate-buffered saline (PBS) and then PFA 4 %. For E10.5 to P4, fixed tissues were washed twice in PBS for 1 h and then used for staining procedures.

For P7 and later stages, organs were pretreated with methanol before immunostaining. Fixed organs were washed in PBS for 1 h twice, then in 20-40-60-80 % methanol (in H_2O) and 100 % methanol twice for 1 h. They were then bleached with 3 % H_2O_2 in 100 % methanol overnight at 4°C in the dark without shaking to reduce tissue autofluorescence and improve antibody diffusion (Renier et al., 2014). Organs were rehydrated successively in 80-60-40-20 % methanol, and PBS, each step for 1 h before staining procedures.

2.3. Whole mount staining for TH

E10.5-P4 whole mount : Pretreated organs were incubated for blocking and permeabilization in PBSG-T (PBS, 0.2 % gelatin, 0.5 % Triton-X100) containing thimerosal (0.1 g/L) for 2 days at 37°C under agitation, then incubated with the primary antibody (rabbit anti-TH, Sigma, St Quentin-Fallavier, France) diluted 1:300 in PBSG-T containing 0.1 % saponin for 7 days at 37°C with gentle shaking. Organs were washed in PBS for 1 day and incubated with secondary antibodies (donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647, Interchim, Montluçon France) diluted 1:500 in PBSG-T containing 0.1 % saponin for 2 days at

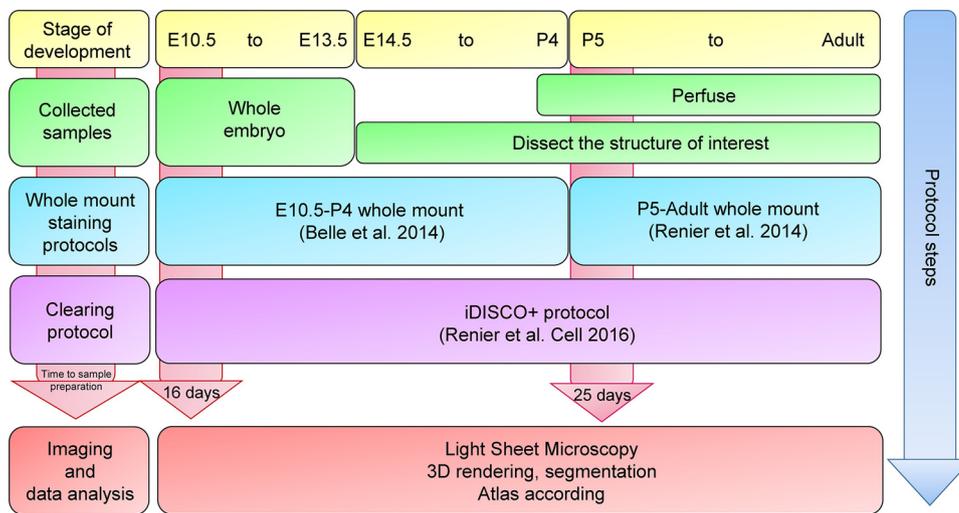


Fig. 1. Flowchart of the different steps and methods to create a tridimensional atlas in the mouse developing brain and adrenal applied to TH immunostaining. The different steps and protocols used to prepare the samples from developing brain and adrenal, and to analyze them in order to create a three-dimensional atlas of TH immunolabeling are shown. The experimental procedures were adapted according to the stage of mice development. Mice organs from E14.5 and later must be dissected before immunostaining. From P4 and later stages, mice are perfused and dissected. The immunostaining protocol described by Belle et al. (2014) was used for samples from mice between E10.5 and P4, while samples from P7 and later were immunostained following the protocol described by Renier et al. (2014). The clearing protocol used for all samples was iDISCO+ (Renier et al., 2016).

37 °C in a dark room with gentle shaking. Finally, samples were washed in PBS for 1 day before the clearing procedure.

P7-adult whole mount : Pretreated organs were incubated in a permeabilization solution (containing, 0.2 % Triton X-100, 20 % DMSO, 0.3 M Glycine in PBS) at 37 °C for 2 days, with shaking. Then, the organs were transferred in a blocking solution (PBS, 0.2 % Triton X-100, 6 % donkey serum) at 37 °C for 2 days with shaking. The organs were then washed in a solution of PBS containing 0.2 % Tween-20, 10 µg/mL heparin for 1 day and half, and incubated with the primary antibody (rabbit anti-TH, Sigma, Saint Quentin Fallavier France, diluted 1:300 in the incubation solution containing 0.2 % Tween-20, 5 % DMSO, 10 µg/mL heparin, 3 % donkey serum in PBS, during 7 days at 37 °C with shaking. The samples then were washed with the washing solution described above during 1 day, and then incubated with secondary antibodies (donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch, Interchim, Montluçon France) diluted 1:500 in the incubation solution during 7 days at 37 °C with shaking. Finally, the organs were washed in the washing solution during 1 day. Controls for the TH immunoreaction have been performed previously and showed no false immunostaining (Godefroy et al., 2017, 2018).

2.4. Clearing procedure

Tissues were cleared with the following iDISCO + protocol which causes the smallest shrinkage (less than 10 %) of the samples and an isotropic effect in both embryonic and adult CNS (Vigouroux et al., 2017; Ueda et al., 2020). First, the samples were dehydrated in methanol/H₂O solution (20 %, 40 %, 60 %, and 80 % 1 h each) and 100 % methanol for 1 h twice with shaking. The samples were then incubated overnight in 1 vol of 100 % methanol and 2 volumes of 100 % dichloromethane anhydrous (Sigma-Aldrich), and washed twice for 20 min in 100 % dichloromethane with shaking. Finally, the samples were incubated in 100 % dibenzyl ether (Sigma-Aldrich) for at least 3 h with shaking before imaging.

2.5. Light-sheet imaging

Cleared samples were imaged with an Ultramicroscope II (LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) using the InspectorPro software (LaVision BioTec, Bielefeld Germany). The light sheet was generated by a laser at wavelength of 561 nm or 640 nm (Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec, Bielefeld Germany) and two cylindrical lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus, Bielefeld Germany) with a 2x objective (MVPLAPO, Olympus, Bielefeld Germany) was used at different magnifications (0.63x, 0.8x, 1x, 1.25x, 1.6x, 3.2x, 4x). The samples were placed in a horizontal or sagittal orientation in an

imaging reservoir made of 100 % quartz (LaVision BioTec) filled with dibenzyl ether and illuminated from the side by the laser light. Images were acquired with a PCO Edge sCMOS CCD Camera (2560 × 2160 Pixel size, LaVision BioTec) following the characteristics of the system as described in the manufacturer settings manual (<https://www.lavisionbiotec.com/products/UltraMicroscope/specification.html>) for zoom factor and corresponding numerical aperture (NA) and resolution by pixel size. NA which determines the thickness of the light sheet in the system software was set at 0.163 which ensures a theoretical thickness of 4 µm. An overlapping is thus performed which depends on the magnification used, with a step size in Z-orientation between each image fixed at 2 µm resolution for 0.63x, 0.8x, 1x, 1.25x magnifications and 1 µm for 1.6x, 3.2x, 4x magnifications as recommended by the manufacturer. The acquisition speed is 800 ms for bidirectional light sheet acquisition and we usually image 2000 slices per sample. The use of several light sheets by the system that excite the sample from different angles ensures most homogenous fluorescence excitation and minimize artifacts like shadows and stripes.

2.6. Image processing and quantitative assessment of anatomic structures

Three-dimensional samples were constructed from a Z-series of Ultramicroscope II fluorescence images using the Imaris software, version 9.0.0_64 (<http://bitplane.com>, Zürich, Switzerland). Option tools of the software were used for 3D reconstruction and segmentation from a juxtaposition of serial 2D images of the region of interest (Godefroy et al., 2018) according to the Allen Brain Atlas. False colors were given to forebrain (brown), midbrain (green) and hindbrain (purple). Three-D pictures and tiff series were obtained using the « 3D view » and the « animation » tools of the Imaris software. The « filament tracer » and the « measure point » tools of the Imaris software were used to determine the length and width of MfB tract and fiber pathway of ZIC. Area volume was determined by using the « surface » tool and counting of TH + neurons was done with the « spot detection » tool. Movies were generated with the free software Fiji. Titles and transition additions were done with Movie Maker.

All images and the different measurements shown are based on several observations made on samples from 3 to 5 animals for each developmental stage. Quantitative data are represented as mean ± s.e.m (n = 3–5).

3. Results

3.1. Methodological issues

The flowchart described in Fig. 1 was followed to analyze TH-

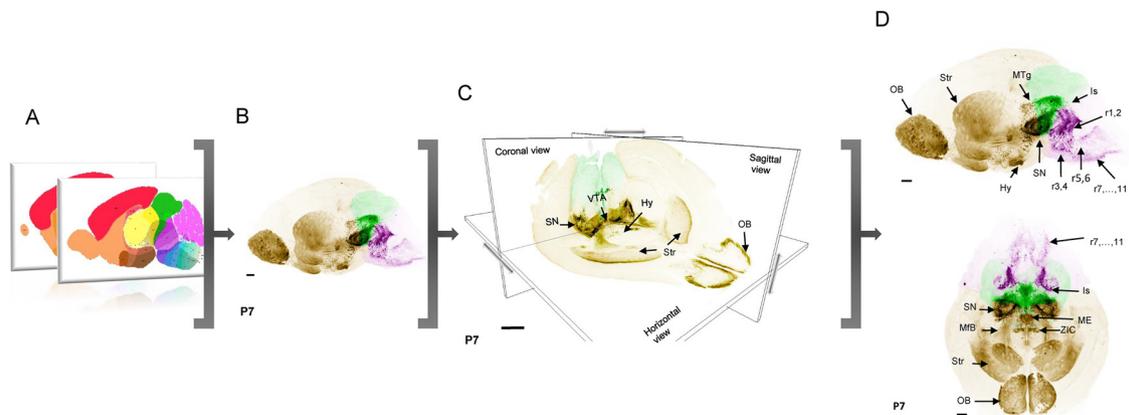


Fig. 2. Image analysis steps to generate 3D map of TH immunolabeling in the mouse brain. After image acquisition, maps from the Allen Brain Atlas (Image credit: Allen Institute) at different stages of development of the mouse, (A) are followed in order to assign false colors to the three major parts of the brain that are forebrain (brown), midbrain (green) and hindbrain (purple) in the 3D rendering (B). Using this 3D rendering where TH-expressing structures are demarcated in black color, a visualization in coronal, sagittal and horizontal sections is performed allowing the observation of the different labeled zones in 2D, and their correlation with the anatomical structures (C). A final image reconstruction provides the 3D localization of TH immunostaining, as illustrated in horizontal or sagittal views of P7 brain taken as an example (D).

immunoreactivity (IR) in embryonic and post-natal tissues. The flowchart recapitulates the different steps and protocols that were used to generate the data described in the present report. The distribution of TH-IR in the C57BL/6 mouse brain and sympathoadrenal system at E10.5 to E13.5 stages was analyzed using whole embryos, while it was carried out on dissected brain and adrenal tissue for E14.5 to adult stages (Fig. 1). Two immunostaining protocols were applied depending on the developmental stages (Fig. 1). After the clearing procedure, serial images of the whole samples were acquired and processed for a 3D rendering.

To facilitate the description of the localization in the brain and to identify precisely the different areas in which TH-IR is found at successive stages studied, we first segmented the 3D reconstructions into three parts corresponding to forebrain, midbrain and hindbrain, in agreement with the Allen Mouse Brain Atlas (Fig. 2A). For our analysis, these neuroanatomical areas were indicated by brown, green and purple colors, respectively (Fig. 2, B–D). Post processing of the images with the Imaris software made it possible to have access to full coronal, sagittal and horizontal sections of the brain, allowing a 2D unambiguous assignment of the labeling to cerebral structures (Fig. 2 C, and movie 1), and 3D mapping of TH-IR in the whole tissue (Fig. 2 D, and movie 1).

3.2. 3-D mapping of TH-IR in the developing CNS

The procedures described above allowed a fine 3D mapping of TH expression during development, in both cell bodies and processes in CNS. As early as E10.5, the occurrence of the catecholaminergic enzyme in different areas of the developing brain such as the SPall, PHy, THy and P1,2,3 in the forebrain, and the PPH, PH, PMH and MH in the hindbrain can be visualized (Fig. 3A, movie 2 and 3, and Table 1). At E11.5, additional TH-positive structures such as the MTg and m2 in the midbrain could be observed, as well as the Is and r1,2 subdivisions of the PPH giving rise to LC in the adult brain, the r3,4 of the PH, r5,6 of the PMH and the r7-11 of the MH could be demarcated (Fig. 3B, movie 2 and 3, and Table 1). At E12.5, more TH-immunoreactive structures including the Vpall, the Str and the CSPall areas of the SPall, the POA, the PTh and the ZIC are found in the forebrain (Fig. 3C, Fig. 5A, movie 2 and 3, and Table 1). At this stage, the MfB and the V are formed and are clearly visible (Fig. 3C, movie 2 and 3, and Table 1). A major change in CA system distribution is observed in the tegmental area between E13.5 and E16.5, with the formation of the PtTg, ThTg and PThTg visible at E14.5, and the PAG, VTA and SN structures which are clearly distinguished at E16.5 (Fig. 3, D–F, movie 3, and Table 1). In addition, TH

staining is detected in the OB at E14.5 (Fig. 3E). Different mature TH-positive structures could be readily observed in the mouse brain between E18.5 and P7, including different hypothalamic areas such as the PVZ, PVR, PSPa and ME, as well as the OT and the ACB (Fig. 3, G–I, movie 3, and Table 1).

3.3. 3-D mapping of TH-IR in the developing PNS

We could also analyze migrating neural crest cells and their arrival at their mature positions in the autonomic nervous system. The peripheral localization of TH-IR is first seen in the middle part of the SCG at stages E10.5–E13.5, and then extended on the upper and lower sides of the SCG, with a decrease in TH expression in the outer part at stage E11.5 (Fig. 3, A–D and movie 2). Besides, TH-IR is also observed during the early stages of adrenal ontogenesis (Fig. 4, movie 4). At E11.5, no TH-IR is found in the Ad at the apical region of the Kdy (Fig. 3B, Fig. 4A, Fig. 5D and movie 4). In contrast, 1 day later at E12.5, a strong TH-positive signal could be observed in this location (Fig. 3C, Fig. 4B, Fig. 5D and movie 4). At E13.5, the TH-positive chromaffin cells colonize the developing medulla of the adrenal gland, and are further grouped in later stages between E14.5–P4 to form the main adrenal medulla although additional dispersed groups of TH-positive chromaffin cells are still observed in the cortical area at later post-natal stages (Fig. 4, C–D, Fig. 5D and movie 4).

3.4. Comparative dynamics of TH-IR in developing catecholaminergic structures

Four specific anatomical regions were chosen to follow and compare their developmental dynamics (Fig. 5). The 3D imaging analysis allows to virtually dissect specific structures of interest in order to observe more anatomical details. We focused on TH labeling in major CA structures including the ZIC (forebrain), the VTA/SN (midbrain), the LC (hindbrain) and the adrenal gland (peripheral CA system) during mouse development at stages between E10.5 and P14. Fig. 5 shows in parallel, the evolution of TH-IR in these four structures, each column of images representing one structure (Fig. 5A–D). Each structure is observed under the same orientation (ZIC, VTA/SN are observed in coronal view, LC in sagittal view) in order to compare the labeling dynamics during development, except for the adrenal gland which was observed under different orientations.

In the presumptive ZIC area (Fig. 5A), we can see the emergence of TH-IR at E12.5. Indeed, two symmetrical islets of TH-IR are observed on both sides of the 3rd ventricle with a dorso-ventral orientation.

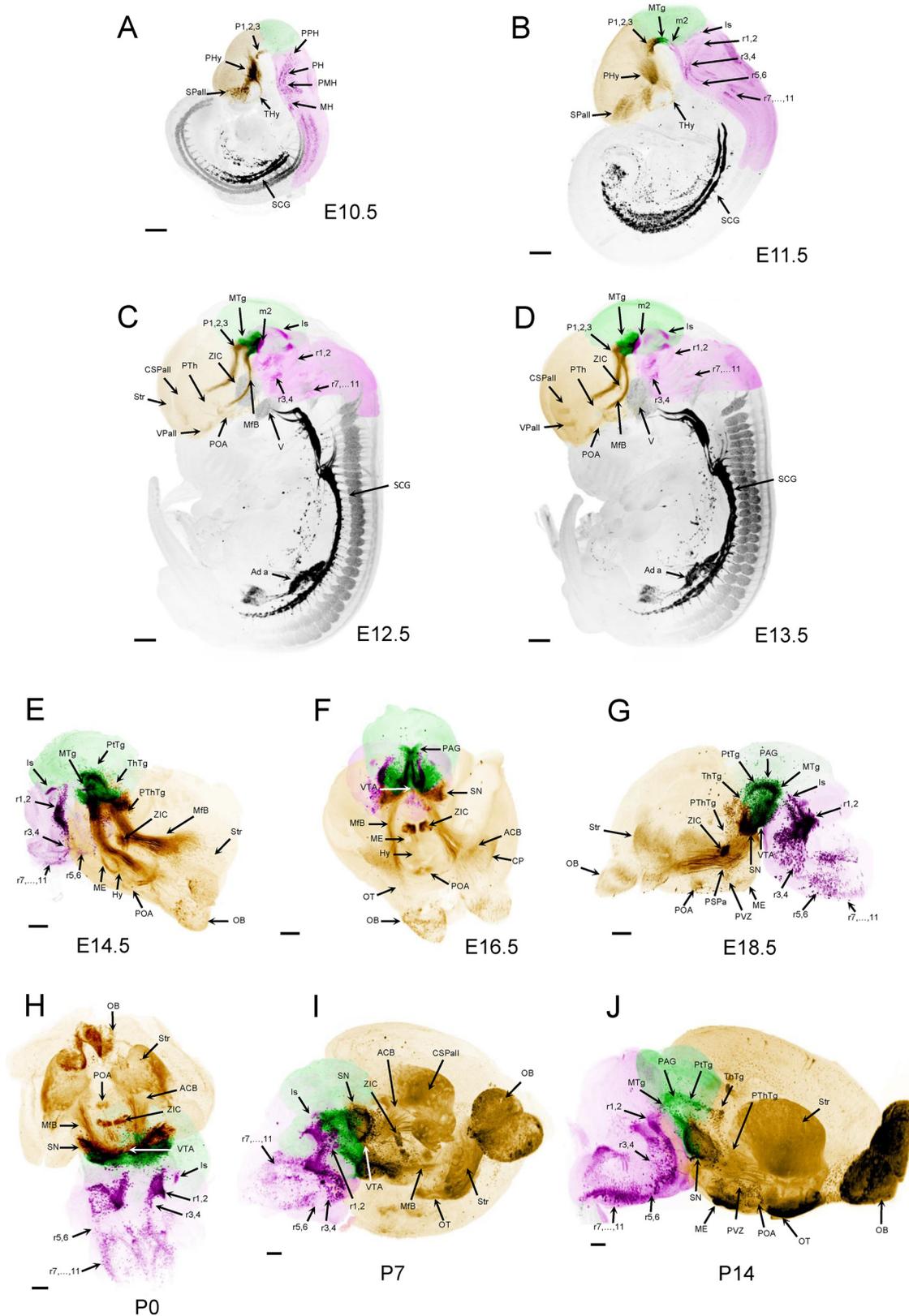


Fig. 3. 3D rendering of TH distribution during ontogeny in C57BL/6 mice at E10.5 to P14. (A–D) Sagittal views of whole embryos of C57BL/6 mice for developmental stages E10.5 to E13.5. (E–J) Clockwise 3D views of mouse brain at embryonic stages E14.5 to E19.5 and postnatal stages P0 to P14. Magnifications: E10.5, 1.6x; E11.5, 1.25x; E12.5, 1x; E13.5, 0.8x; E14.5, 1.25x; E16.5/E18.5/P0, 0.8x; P7/P14, 0.63x; scale bar: 500 μ m. Images shown are representative of observations made from 3 to 5 embryos or brains corresponding to each developmental stage.

Table 1
Summary of the distribution of TH-IR during development in the mouse nervous system.

| STAGES OF DEVELOPMENT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|--------|-------|--------|-------------|--------|--------------|--------|-------------|--------|------|------|-----------|------|--|
| E10.5 | | E11.5 | | E12.5 | | E13.5 | | E14.5 | | E15.5 to P14 | | | | | | | | |
| Forebrain | | | Vpall | | Vpall | | Vpall | | OB | | Vpall | | OB | | | | | |
| | SPall | | SPall | | SPall | | Str | | SPall | | Str | | Str | | CP | | | |
| | | | | | CSPall | | CSPall | | CSPall | | CSPall | | CSPall | | ACB | | | |
| | | | | | POA | | POA | | POA | | POA | | POA | | OT | | | |
| | | | | | PTh | | ZIC | | PTh | | ZIC | | PTh | | ZIC | | | |
| | PHy | | PHy | | PHy | | PHy | | PHy | | PHy | | Hy | | PVZ | | | |
| | | | | | | | | | | | | | PVR | | | | | |
| | Thy | | Thy | | Thy | | Thy | | Thy | | Thy | | Thy | | PSPa | | | |
| | | | | | | | | | | | | | ME | | | | | |
| | | | | | | | | | PThTg | | PThTg | | PThTg | | | | | |
| | | | | | | | | ThTg | | ThTg | | ThTg | | | | | | |
| | | | | | | | | PtTg | | PtTg | | PtTg | | | | | | |
| floor plate | | P1 | | floor plate | | P1 | | floor plate | | P1 | | floor plate | | P1Bs | | | | |
| | | P2 | | | | P2 | | | | P2 | | floor plate | | P2Bs | | | | |
| | | P3 | | | | P3 | | | | P3 | | P3 | | P3Bs | | | | |
| Midbrain | | | MTg | | MTg | | MTg | | MTg | | MTg | | MTg | | PAG | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | SC | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | SN | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | VTA | | |
| | | m2 | | m2 | | m2 | | m2 | | m2 | | m2 | | m2AL | | | | |
| Hindbrain | PPH | | PPH | | Is | | PPH | | Is | | PPH | | Is | | PPH | | Is | |
| | | | r1,2 | | PPH | | r1,2 | | PPH | | r1,2 | | PPH | | r1,2 | | r1,2 | |
| | PH | | PH | | r3,4 | | PH | | r3,4 | | PH | | r3,4 | | PH | | r3,4 | |
| | PMH | | PMH | | r5,6 | | PMH | | r5,6 | | PMH | | r5,6 | | PMH | | r5,6 | |
| MH | | MH | | r7,...,11 | | MH | | r7,...,11 | | MH | | r7,...,11 | | MH | | r7,...,11 | | |
| SCG | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | | SCG | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tract | | | | | MfB | | MfB | | MfB | | MfB | | MfB | | MfB | | MfB | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Between stages E13.5 and E15.5, TH labeling becomes more pronounced for cells near the ventricle, and the two islets are closer in the center of the CNS. From stage E16.5 on, we notice a change in the position of the islets and their orientation switches from a dorso-ventral position to a horizontal position, with a more homogeneous labeling on the whole structure. From E17.5 to P14, the ZIC peripheral cells are less grouped and from P4 and later the cells are individualized throughout the ZIC.

In the presumptive VTA area (Fig. 5B), TH-IR is visible on either side of the central axis from E10.5, with a less marked zone in the center. At stage E11.5, this central zone is labeled and the whole structure is immunostained without discontinuity. At stage E12.5, the

labeling is wider on both sides of the VTA and includes the emerging SN. From stage E14.5 on, the SN labeling area is larger with a more structured aspect. From stage E15.5 on, the SN area appears subdivided in two parts, a dorsal part having an ovoid shape and a ventral part with a triangular shape. The triangular part exhibits a more intense labeling on the edges.

In the LC presumptive area (Fig. 5C), the TH labeling is apparent at E10.5 with a linear distribution of cells up to E11.5. From E12.5, structural extensions pointing to the anterior part of the CNS are visible in this area. At E14.5 and later on, a specific organization of the structure in a fan shape can be visualized.

In the adrenal gland presumptive zone (Fig. 5D, movie 4), only SCG

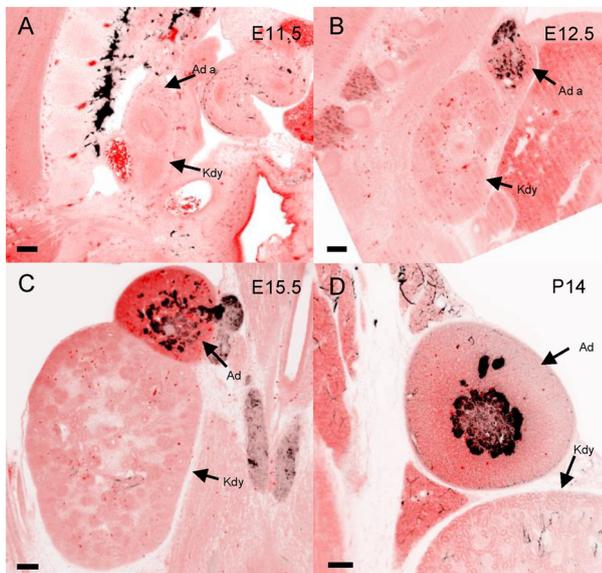


Fig. 4. (A–D) 2D visualization of TH-IR in the adrenal gland of C57BL/6 mice during development from E11.5 to P14. TH labeling is in black color and background in red color. Magnification 4x; scale bar: 100 μ m. Images shown are representative of observations made from 3 to 5 adrenal glands corresponding to each developmental stage.

are labeled at E10.5 and E11.5. At E12.5, cells apparently budding from the SCG start to form the adrenal anlage, which appear up to stage E13.5 as a cluster forming a half sphere detaching from the SCG. This half sphere detaches progressively during development to take a more spherical and ovoid shape. Cell aggregates are then observed throughout the adrenal gland and become more grouped in the center only at P7 and later on.

3.5. Quantitative measurements of specific neuronal parameters

In order to demonstrate the utility of the 3D imaging approach to quantify area volume, cell populations and length/width of fiber tracts during development, we selected two anatomical TH-positive structures, namely ZIC for cell body quantification, and MfB for quantification of fibers. These two « paradigmatic structures » will exemplify the issues for each, which approaches can then be applied to other fiber pathways and cell body clusters. We first applied this analysis to the ZIC in order to quantify the volume area and number of TH-positive neurons at different development stages. Cell counting could not be performed before P4 since the ZIC appeared as a very compact structure earlier. Therefore, at stages E12.5 to P0 the volume of the ZIC could be measured, while TH neuron number could be accurately counted from P4 to adult (Fig. 6). The results showed a continuous increase in the ZIC volume throughout brain development between E12.5 and adult, with more rapid growth between E17.5 and P7 (Fig. 6A). After P4, we were able to perform a segmentation of TH neurons in the ZIC, which allowed us to quantify precisely the number of these neurons (Fig. 6B). This analysis showed that the number of TH neurons in this cerebral structure is stable from P4 to adult, *i.e.* P4 = 994 ± 94 , P7 = 1027 ± 35 , P14 = 988 ± 98 , P21 = 1029 ± 27 and adult = 963 ± 63 . In addition, the counts in the two hemispheres were similar at all stages (Fig. 6B). These results show that the neuronal system expressing TH in the ZIC is symmetrical and that the neuron number is determined early during development while the volume is more dynamic.

We also investigated the development of the MfB, an extremely important nerve fiber network of the CNS, which crosses the lateral hypothalamus and the basal forebrain in a rostrocaudal direction and which contains dopaminergic fibers that project from the VTA to the

ACB (see Fig. 3C-I and movies 1–3). We measured the length and width of this tract at different stages of development, a quantitative assessment possible after 3D imaging. Measurements were made at the two hemispheres of each animal from E12.5 to adult. The images in Fig. 7A illustrate the developmental morphological changes of the length and width of the dopaminergic fibers connecting the VTA to the ACB, which are quantified in Fig. 7B. A slight increase in the length of the fibers is observed between E12.5 and E19.5, followed by a large increase until adult (Fig. 7B). The width of this tract strongly increased between stages E12.5 and E15.5, remained constant until E19.5 and showed a sharp steady-state increase thereafter until adult (Fig. 7B). The data obtained showed that the length of the tract is extended by approximately 60 % ($2066.9 \pm 50.76 \mu\text{m}$ to $3296.8 \pm 57.03 \mu\text{m}$) between stage E12.5 and stage P14, while the width at the junction with the ACB is increased by a factor higher than 10 between these two same stages ($269.4 \pm 29.40 \mu\text{m}$ to $2902.63 \pm 224.6 \mu\text{m}$).

Quantitative measurements of the fiber development of the TH-positive cells of the ZIC, corresponding to those performed for the MfB, could not be done. Tract-tracing methodology did allow the qualitative visualization of the development of these projections. It is important to note that the immunostaining *in toto* shows various fluorescence intensities for the different fibers according to the studied structure. Movies 2 and 3 of the 3D mapping of the catecholaminergic system from embryonic stages to P21 illustrate this phenomenon. Here, the MfB path is visible whereas the projections of the TH pathways of the ZIC are not. Nevertheless, these TH positive projections coming from the ZIC are visible in 2D slices at different orientation (movie 5). These are then traceable, which allows following them in 3D reconstructions (movie 6).

4. Discussion

Catecholaminergic neurons of the CNS comprise dopaminergic, noradrenergic, and a smaller population of adrenergic neurons, and their ontogeny has been well-described (Smeets and Reiner, 1994). In this study, an anatomical description of the structures of the CNS/PNS expressing TH at different stages of development in mice, precisely from stage E10.5 to pre-weaning, was performed. The present study confirms the ontogeny of TH expression within all known discrete cell groups centrally and peripherally described earlier as developed through section and serial-section histological examination (Bhat and Ganesh, 2017; Golden, 1973; Olson et al., 1973; Puelles and Verney, 1998; Son et al., 1996; Specht et al., 1981a, b; Stuesse et al., 1991; Zecevic and Verney, 1995). It also depicts in real space, in the developing nervous system, the simultaneity and processivity of the emergence of each TH cell group, their increased number, their consolidation through migration and maturation, and their connectivity with their targets. Three-dimensional visualization of the localization of the cells and neuronal pathways expressing TH provides an atlas of the appearance, migration, process elaboration, and apposition to other cell groups and nuclei throughout development. This provides insight into how catecholaminergic neurons in forebrain, midbrain and hindbrain, as well as sensory, autonomic, and enteric nervous systems mature in relation to each other and to their tissue and nuclear targets.

We focus briefly on the least-studied of these cell groups, those of the ZIC, to illustrate the particular advantages of the cleared-tissue, light sheet visualization method employed here to investigate quantitatively and qualitatively these neurons and their multiple projections from a deep area of the brain.

The ZIC as described a hundred years ago by Auguste Forel has many functions. It controls visceral activity, is involved in the functions of awakening and attention and also plays a role in locomotion. It also plays an important physiological role in the organization of emotion and emotional processing (Chou et al., 2018). This structure has different types of neurons including parvalbumin, nitric oxide synthase, gabaergic, glutamatergic, somatostatinergic, catecholaminergic

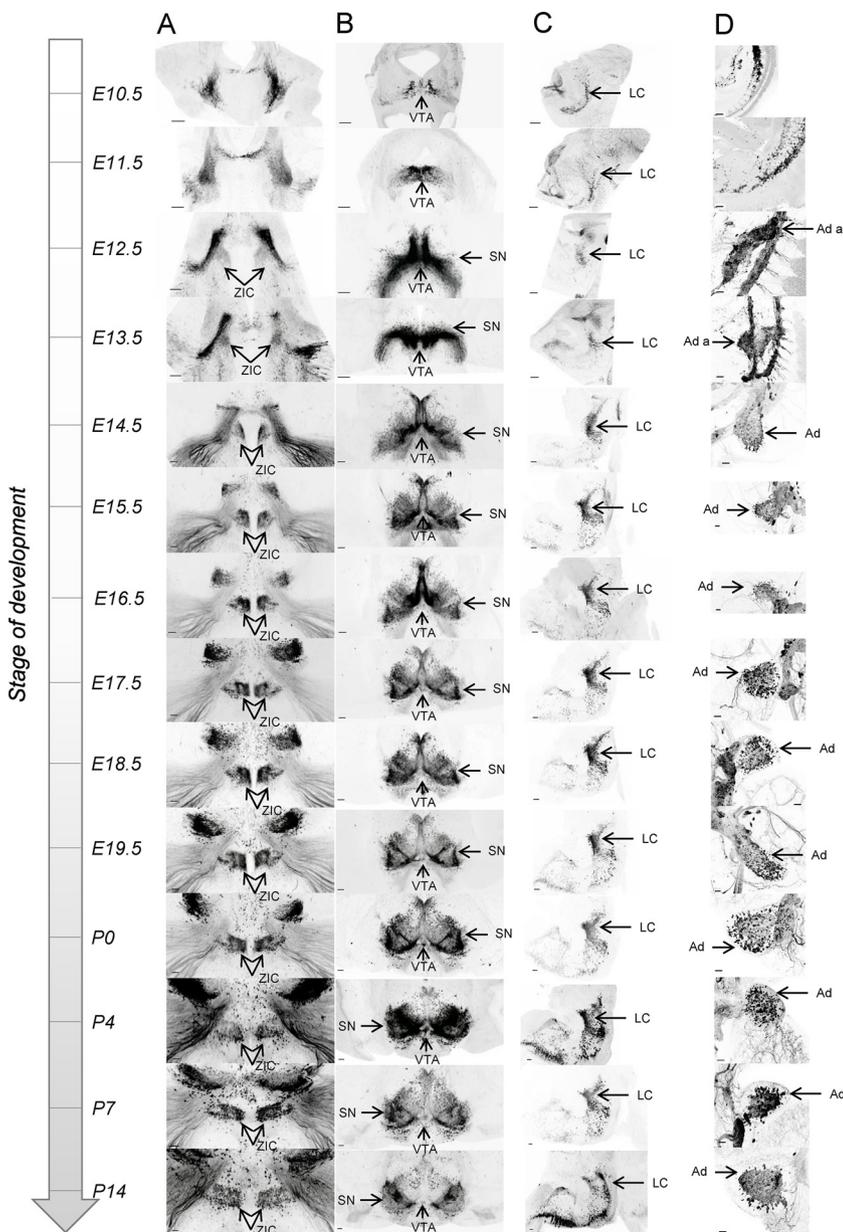


Fig. 5. Comparison of TH-IR in four selected anatomical structures (in black) during development from stages E10.5 to P14 in C57BL/6 mice. A virtual dissection was carried out from the 3D images of the SNC to individualize the structures of interest. (A) 3D coronal view of the ZIC developmental stages, (B) 3D coronal view of VTA/SN developmental stages, (C) 3D sagittal view of the LC developmental stages, (D) 3D view of the adrenal gland developmental stages at different angles of observation. Scale bar: 200 μm (A–C) and 100 μm (D). Images shown are representative of observations made from 3 to 5 embryos, brains or adrenal glands corresponding to each developmental stage.

forming sub-regions that are in connection with several anatomical areas of the brain: the cortex, the cerebellum, the thalamus, the brainstem, the spinal cord, basal ganglia, amygdala, basal forebrain, and hypothalamus (Mitrofanis, 2005).

What is not known about the ZIC is its relationship to the development of other catecholaminergic structures, and the developmental timetable of its discrete projections to both rostrally and caudally situated targets in the CNS. In this study, we show the relative appearance of axonal projections from ZIC to target areas in comparison to development of the MfB, the projection bundle arising from VTA/SN (Coenena et al., 2010). Their projections to discrete brain areas appear to occur with the same simultaneity as those of other catecholaminergic cell groups, including the LC.

Peripherally, we focus here on the cells that migrate probably from the neural crest and other neural structures (Furlan et al., 2017) to the adrenal anlage to form the mature adrenal medulla. It is well-known that adrenal medulla is formed from migration of sympathoblasts from the neural crest to the adrenal, forming the adrenomedullary anlage. What cannot be conveniently appreciated by conventional (section analysis and reconstruction) techniques, is the relationship between cell

number and phenotypic expression as these cells pass through areas in which the notochord influences the establishment of cell number and type on the way to the adrenal gland itself. Here, we have shown that the TH cells of the adrenal medulla (chromaffin cells) are migrating and gathering as a single process, phenomena which are under the control of various signals acting after their passage near organizing structures such as the notochord and the dorsal aorta as previously described (Huber et al., 2008; Unsicker et al., 2013). Besides, TH expression seems to occur at the same time in sympathetic neurons, as well as in sensory (dorsal root ganglia) cells, albeit expression in the latter wanes later in development (Björklund et al., 1992; Gootman and Totowa, 1986; Weihe et al., 2005).

5. Conclusion

The TH atlas produced here sets the stage to answer key questions about catecholaminergic development as yet unanswered. To summarize our findings here, the expression of TH during mouse development is not synchronized, in the early stages E10.5 and E11.5, VTA and LC express this enzyme and not the ZIC, SN and adrenal gland. E12.5

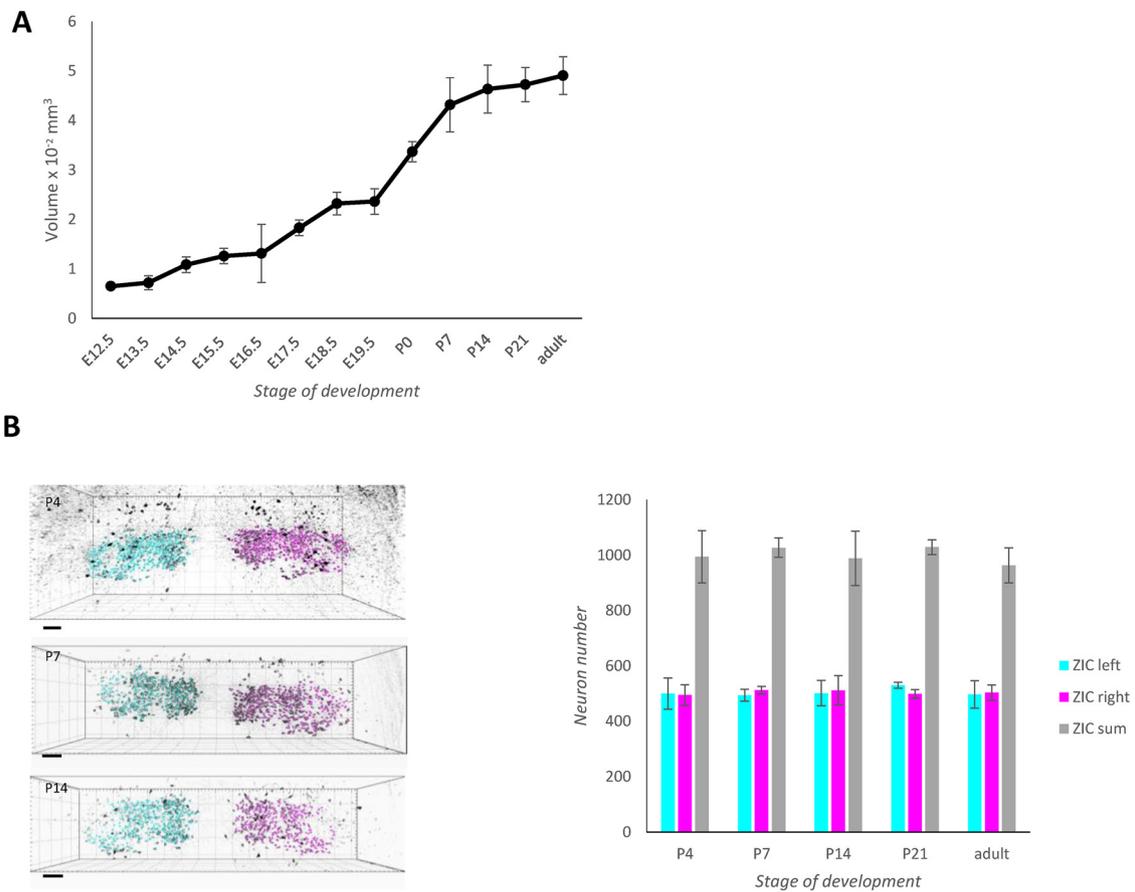


Fig. 6. Quantitative assessment of TH immunostaining in the ZIC of C57BL/6 mice at different developmental stages. (A) The volume occupied by the ZIC from stages E12.5 to adult was measured, and the data are presented as mean ± s.e.m (n = 3–5). (B, left panel) 3D reconstruction with “spots detection” was performed for the ZIC at P4, P7 and P14. (B, right panel) Quantification of the number of neurons from stages P4 to adult in the right part of the ZIC. Data are represented as mean ± s.e.m for each part and for the entire ZIC (n = 3–5). Magnification: P4, 4x; P7/P14, 3.2x; scale bar: 200 μm. Images shown are representative of observations made from 3 to 5 embryos or brains corresponding to each developmental stage.

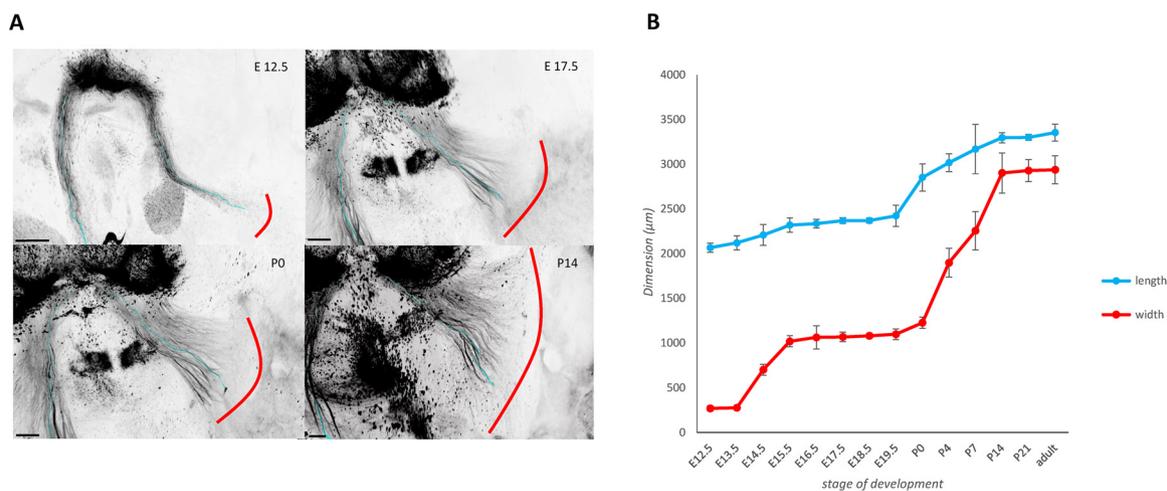


Fig. 7. Quantitative assessment of TH immunolabeling in the MfB of C57BL/6 mice from stages E12.5 to adult. (A) 3D reconstruction of nerve fibers in the MfB tract. Images shown are representative of observations made from 3 to 5 embryos or brains corresponding to each developmental stage. (B) Measurement of the length of the MfB tract (indicated by the blue line in A) and the width of this same tract in the area of connection with the ACB (indicated by the red line in A). Measurements are made for the right and left hemispheres of each brain and are represented as mean ± s.e.m (n = 3–5). Magnification: E12.5, 1x; E17.5/P0, 0.8x; P14, 0.63x; scale bar: 300 μm.

seems to be the key stage, all structures expressing TH. Maturation of the structures also seems to occur at different stages following this stage. Indeed, at stage P4, the structures in the CNS present a mature form, while the adrenal medulla does not seem to be completely formed

at these post-natal stages where TH-positive (chromaffin cells) are still observed outside the medulla. Many questions remain that could also be addressed in the future through 3D imaging. At what migratory/axon extension stages are other CA « traits » including vesicular

monoamine transporter 1/2, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase expressed? At what stages are cell body numbers established and secondary processes begin? How does the concurrent development of TH neurons in various compartments relate to transcription factors that control TH expression (e.g. MASH1, Phox2a/b). What is the relationship between maturation of targets and projections to targets? How do the phenotypes of afferent and efferent connections and local milieu influence catecholaminergic development and function? The relevance of these questions for developmental biology is clear, and they are also relevant for consideration of adult neurodegeneration and its developmental risk factors and precursors, in human diseases such as Parkinson's disease (Roostalu et al., 2019) and Alzheimer's disease (Kelly et al., 2017).

Acknowledgements

We would like to thank Thibaut Chevalier for his contribution to the analysis of TH fibers tracking from ZIC. This research project was supported by the University of Rouen Normandie, INSERM (U1239), the Region Normandy and the European Regional Development Fund (ERDF – PACT-CBS program). Europe is involved in Normandy with the European Regional Development Fund. Images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108596>.

References

- Aitken, A.R., 1987. The preparation and use of embryonic brain wholemounts. *J. Neurosci. Meth.* 19, 297–304. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(87\)90072-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(87)90072-0).
- Aitken, A.R., Sandeman, R.E., Sandeman, D.C., 1987. Preparation of immunoperoxidase-labelled wholemounts of invertebrate brains. *J. Neurosci. Meth.* 21, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(87\)90097-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(87)90097-5).
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., Chédotal, A., 2014. A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep.* 9, 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037>.
- Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S.A., Collier, F., Giacobini, P., Chédotal, A., 2017. Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell* 169, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.008>.
- Bhat, S.K., Ganesh, C.B., 2017. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brain of the viviparous fish *Gambusia affinis*. *J. Chem. Neuroanat.* 85, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.05.004>.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci.* 30, 185–187. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.004>.
- Björklund, A., Nobin, A., 1973. Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cell groups in the rat diencephalon. *Brain Res.* 51, 193–205. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90372-7).
- Björklund, A., Hökfelt, T., Tohyama, M., 1992. Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS. *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol. 10 Elsevier Science Publishers B.V.*
- Chou, X.L., Wang, X., Zhang, Z.G., Shen, L., Zingg, B., Huang, J., Zhong, W., Mesik, L., Zhang, L.L., Tao, H.W., 2018. Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta. *Nat. Commun.* 9, 1151. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03581-6>.
- Coenena, V.A., Schlaepfer, T.E., Maedler, B., Panksepp, J., 2010. Cross-species affective functions of the medial forebrain bundle: Implications for the treatment of affective pain and depression in humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1971–1981. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.009>.
- Dotd, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Ziegglängsberger, W., Becker, K., 2007. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Meth.* 4, 331–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth1036>.
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., Dotd, H.U., 2012. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 11, 1983–1995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.119>.
- Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G., Torp, A., 1982. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 348–354. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90113-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90113-7).
- Furlan, A., Dyachuk, V., Kastriti, M.E., Calvo-Enrique, L., Abdo, H., Hadjab, S., Chontorotzea, T., Akkuratova, N., Usoskin, D., Kamenev, D., Petersen, J., Sunadome, K., Memic, F., Marklund, U., Fried, K., Topilko, P., Lallemand, F., Kharchenko, P.V., Ernfors, P., Adameyko, I., 2017. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science* 357 (6346). <https://doi.org/10.1126/science.aal3753>.
- Godefroy, D., Dominici, C., Hardin-Pouzet, H., Anouar, Y., Melik-Parsadaniantz, S., Rostène, W., Reaux-Le Goazigo, A., 2017. Three-dimensional distribution of tyrosine hydroxylase, vasopressin and oxytocin neurones in the transparent postnatal mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* <https://doi.org/10.1111/jne.12551>.
- Godefroy, D., Rostène, W., Anouar, Y., Reaux-Le Goazigo, A., 2018. Tyrosine-hydroxylase immunoreactivity in the mouse transparent brain and adrenal glands. *J. Neural. Trans.* <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1925-x>.
- Golden, S.G., 1973. Prenatal development of the biogenic amine systems of the mouse brain. *Dev. Biol.* 33, 300–311. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90139-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90139-5).
- Goldstein, D.S., Eisenhofer, G., McCarty, R., 1997. *Catecholamines: bridging basic science with clinical medicine*. Adv. Pharmacol Academic Press.
- Gootman, P.M., Totowa, N.J., 1986. *Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System*. Humana Press <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-459-7>.
- Huber, K., Franke, A., Brühl, B., Krispin, S., Ernsberger, U., Schober, A., von Bohlen und Halbach, O., Rohrer, H., Kalchheim, C., Unsicker, K., 2008. Persistent expression of BMP-4 in embryonic chick adrenal cortical cells and its role in chromaffin cell development. *Neural Dev.* 3–28. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-28>.
- Kelly, S.C., He, B., Perez, S.E., Ginsberg, S.D., Mufson, E.J., Counts, S.E., 2017. Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Comm.* 5, 8. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0411-2>.
- Luque, J.M., Biou, V., Nicholls, J.G., 1998. Three-dimensional visualization of the distribution, growth, and regeneration of monoaminergic neurons in whole mounts of immature mammalian CNS. *J. Comp. Neurol.* 390, 427–438. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980119\)390:3<427::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980119)390:3<427::AID-CNE9>3.0.CO;2-3).
- Mitrofanis, J., 2005. Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience* 130, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.017>.
- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., 1964. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917. <http://www.jbc.org/content/239/9/2910.citation>.
- Nelson, E.L., Liang, C.L., Sinton, C.M., German, D.C., 1996. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J. Comp. Neurol.* 369, 361–371. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960603\)369:3<361::AID-CNE3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960603)369:3<361::AID-CNE3>3.0.CO;2-3).
- Nelson, T.E., King, J.S., Bishop, G.A., 1997. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferents to the cerebellum differs between species. *J. Comp. Neurol.* 379, 443–454. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970317\)379:3<443::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970317)379:3<443::AID-CNE9>3.0.CO;2-3).
- Olson, L., Boréus, L.O., Seiger, A., 1973. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine- and catecholamine-containing neuron systems in the human fetal brain. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 139, 259–282. <https://doi.org/10.1007/BF00519968>.
- Puelles, L., Verney, C., 1998. Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in human embryos. *J. Comp. Neurol.* 394, 283–308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980511\)394:3<283::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980511)394:3<283::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y).
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., Tessier-Lavigne, M., 2014. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>.
- Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., Wang, V.X., Tang, C.Y., Olsen, O., Dulac, C., Osten, P., Tessier-Lavigne, M., 2016. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* 165, 1789–1802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.007>.
- Roostalu, U., Salinas, C.B.G., Thorbek, D.D., Skytte, J.L., Fabricius, K., Barkholt, P., John, L.M., Jurtz, V.I., Knudsen, L.B., Jelsing, J., Vrang, N., Hansen, H.H., Hecksher-Sørensen, J., 2019. Quantitative whole-brain 3D imaging of tyrosine hydroxylase-labelled neuron architecture in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Dis. Model. Mech.* <https://doi.org/10.1242/dmm.042200>. (in press).
- Ruggiero, D.A., Baker, H., Joh, T.H., Reis, D.J., 1984. Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region mouse in of mouse. *J. Comp. Neurol.* 223, 556–582. <https://doi.org/10.1002/cne.902230408>.
- Selzer, M.E., 1979. Variability in laps of identified neurons in the sea lamprey spinal cord examined by wholemount technique. *Brain Res.* 163, 181–193. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90348-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90348-2).
- Smeets, W., González, A., 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res. Rev.* 33, 308–379. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00034-5).
- Smeets, W.J., Reiner, A., 1994. *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge University Press pp. 500.
- Son, J.H., Min, N., Joh, T.H., 1996. Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene. *Mol. Brain Res.* 36, 300–308. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00255-Q](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00255-Q).
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981a. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 233–253. <https://doi.org/10.1002/cne.901990207>.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981b. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 255–276. <https://doi.org/10.1002/cne.901990208>.

- Stuesse, S.L., Cruce, W.L., Northcutt, R.G., 1991. Localization of serotonin, tyrosine hydroxylase, and leu-enkephalin immunoreactive cells in the brainstem of the horn shark, *Heterodontus francisci*. *J. Comp. Neurol.* 308, 277–292. <https://doi.org/10.1002/cne.903080211>.
- Ueda, H.R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., Keller, P.J., 2020. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1>. (in press).
- Ugrumov, M., Melnikova, V., Ershov, P., Balan, I., Calas, A., 2002. Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-expressing neurons in the rat arcuate nucleus: ontogenesis and functional significance. *Psychoneuroendocrinology* 5, 533–548. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(01\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(01)00091-9).
- Unal, B., Ibáñez-Sandoval, O., Shah, F., Abercrombie, E.D., Tepper, J.M., 2011. Distribution of tyrosine hydroxylase-expressing interneurons with respect to anatomical organization of the neostriatum. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 41. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00041>.
- Unsicker, K., Huber, K., Schober, A., Kalcheim, C., 2013. Resolved and open issues in chromaffin cell development. *Mech. Dev.* 130, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.11.004>.
- Vigouroux, R.J., Belle, M., Chédotal, A., 2017. Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Mol. Brain* 10–33. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0314-y>.
- Voie, A.H., Burns, D.H., Spelman, F.A., 1993. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J. Microscopy* 170, 229–236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x>.
- Weihe, E., Schütz, B., Hartschuh, W., Anlauf, M., Schäfer, M.K., Eiden, L.E., 2005. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J. Comp. Neurol.* 492, 370–379. <https://doi.org/10.1002/cne.20745>.
- Yip, S.H., York, J., Hyland, B., Bunn, S.J., Grattan, D.R., 2018. Incomplete concordance of dopamine transporter Cre (DAT^{IR^{Scrc}})-mediated recombination and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the mouse forebrain. *J. Chem. Neuroanat.* 90, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.12.002>.
- Zecevic, N., Verney, C., 1995. Development of the catecholamine neurons in human embryos and fetuses, with special emphasis on the innervation of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 351, 509–535. <https://doi.org/10.1002/cne.903510404>.

Deuxième article :

SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study

David Godefroy, Loubna Boukhzar, Ben Yamine Mallouki, Emmanuelle Carpentier, Christophe Dubessy, Fatiha Chigr, Yves Tillet and Youssef Anouar

L'invalidation de la SELENOT dans les neurones du SNC chez les souris entraîne des phénotypes comportementaux importants. En effet, des études publiées et en cours montrent que le modèle animal de souris KO SELENOT présente des comportements hyperactifs, anxiogènes et des défauts de reproduction (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). De plus, il a été montré que cette sélénoprotéine a un rôle neuroprotecteur, car la vulnérabilité des neurones dopaminergiques aux neurotoxiques est augmentée chez les souris KO SELENOT (Boukhzar et al., 2016; Shao et al., 2019). Ces résultats nous ont conduit à caractériser le système catécholaminergique dans le SNC des souris invalidées pour la SELENOT. Pour cela, une étude neuroanatomique utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente, le RNAscope, et l'immunomarquage ont permis de visualiser les cellules exprimant l'ARNm et la protéine SELENOT dans le SNC de souris adulte. Puis l'utilisation de l'imagerie tridimensionnelle pour l'observation et le comptage des neurones TH+ dans des zones neuroanatomiques a permis de voir les conséquences de la délétion de la SELENOT sur les neurones catécholaminergiques chez les souris KO SELENOT.

Ces résultats présentés dans ce deuxième article montrent que la SELENOT a un impact dans la distribution des neurones catécholaminergiques et cet impact diffère suivant le sexe de l'animal.

SELENOT Deficiency in the Mouse Brain Impacts Catecholaminergic Neuron Density: An Immunohistochemical, in situ Hybridization and 3D Light-Sheet Imaging Study

David Godefroy^a Loubna Boukhzar^a Ben Yamine Mallouki^a
Emmanuelle Carpentier^a Christophe Dubessy^a Fatiha Chigr^b Yves Tillet^c
Youssef Anouar^a

^aUNIROUEN, INSERM U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Normandie University, Rouen, France; ^bBioengineering Laboratory, Faculty of Sciences and Techniques, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco; ^cPhysiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 085 INRAE, CNRS 7247, IFCE, Centre INRAE Val de Loire, Université de Tours, Nouzilly, France

Keywords

Selenoprotein T · Tyrosine hydroxylase · Catecholaminergic neuron · iDISCO+ · Light-sheet imaging

Abstract

Background: Selenoprotein T (SELENOT), a PACAP-regulated thioredoxin-like protein, plays a role in catecholamine secretion and protects dopaminergic neurons. However, the role of SELENOT in the establishment of the catecholaminergic (CA) neuronal system is not known yet. **Methods:** We analyzed by immunohistochemistry and RNAscope in situ hybridization the distribution of SELENOT and the expression of its mRNA, respectively. In addition, 3D imaging involving immunostaining in toto, clearing through the iDISCO+ method, acquisitions by light-sheet microscopy, and processing of 3D images was performed to map the CA neuronal system. A semi-automatic quantification of 3D images was carried out. **Results:** SELENOT protein and mRNA are widely distributed in the mouse brain, with important local varia-

tions. Three-dimensional mapping, through tyrosine hydroxylase (TH) labeling, and semi-automated quantification of CA neurons in brain-specific SELENOT knockout mice showed a significant decrease in the number of TH-positive neurons in the area postrema (AP-A2), the A11 cell group (A11), and the zona incerta (ZI-A13) of SELENOT-deficient females, and in the hypothalamus (Hyp-A12-A14-A15) of SELENOT-deficient females and males. **Conclusion:** These results showed that SELENOT is diffusely expressed in the mouse brain and that its deficiency impacts CA neuron distribution in different brain areas including Hyp-A12-A14-A15, in both male and female mice.

© 2022 S. Karger AG, Basel

Introduction

Catecholamines control various biological functions such as stress, emotions, learning, and motor function [1–4]. Catecholaminergic (CA) neurons produce the

neurotransmitters noradrenaline (NA), adrenaline, or dopamine (DA) through a series of enzymatic modifications of the amino-acid precursor tyrosine. These neurons share the first two steps of the catecholamine-synthesis pathway catalyzed by tyrosine hydroxylase (TH) and L-Dopa decarboxylase, and that leads to DA. Adrenergic and NA neurons share a third step catalyzed by DA β -hydroxylase that leads to NA, and only adrenergic neurons which constitute a minor population of CA neurons express phenylethanolamine N-methyltransferase for adrenaline synthesis [5]. The distribution of CA neuronal groups described for the first time in the 1960s did not always correspond to defined anatomical structures, which led Dahlstrom and Fuxe [6] to create a nomenclature to name the first twelve CA cell groups designated from A1 to A12 located from the medulla oblongata (MO) to the Hyp. Later, the number of CA cell groups was incremented from twelve to twenty, with seventeen groups (A1–A17) distributed in the diencephalon, the olfactory bulb, and the retina to which were added 3 groups of adrenergic cells named C1–C3 [5]. In addition, the number of cells within CA groups varies among mammalian species [7]. Understanding the mechanisms leading to the occurrence of the different groups of CA neurons in the brain is necessary to better decipher the role of these neurons in physiological situations but also in several pathological conditions involving CA neurotransmitters.

Like other cell types endowed with a secretory pathway, CA neurons rely on the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER) to appropriately synthesize and deliver their secretory products. It is now well established that ER proteostasis regulation is altered in neurodegenerative diseases, and accumulating evidence indicates that these mechanisms also contribute to neuronal physiology, impacting brain development and function [8]. While mild insults increase the activity of protective chaperones and other proteostatic cues in the ER, prolonged cell stress or insufficient adaptive response causes cell death as it is the case in Parkinson's disease where dopaminergic neurons are affected [9]. We have recently shown that selenoprotein T (SELENOT), a member of ER selenoproteins involved in proteostasis and stimulated by the neuropeptide PACAP in neuroendocrine cells [10, 11], plays a pivotal role in hormone secretion, neuron survival, and response to stress [10, 12–14]. Conditional disruption of the SELENOT gene in nerve cells leads to morphological changes during the early stages of cerebral postnatal development, and behavioral alterations including hyperactivity in adulthood [13]. We also found

that SELENOT protects dopaminergic neurons in animal models of Parkinson's disease [12, 15]. These data suggest that the proteostatic action of SELENOT in the ER is instrumental to CA neuron development and function. However, there is currently no study reporting on the role of a selenoprotein or SELENOT in particular in the establishment of the brain cytoarchitecture at the global level or at a neuronal population level such as the CA neuronal system.

Neurons that have a CA phenotype were historically the first transmitter systems to be described in detail, because of the ease of their detection by formaldehyde-induced fluorescence [16]. Recent significant evolution has been made in the methods of histological studies initially developed by Falck et al. [17]. Indeed, although the immunolabeling of *in toto* organs such as the spinal cord [18] and postnatal brains or embryos [19, 20] has been developed since 1980, today new immunolabeling protocols significantly improved the *in toto* staining of adult samples [21]. Associating these *in toto* immunolabeling approaches with clearing techniques [21–23] and light-sheet microscopy imaging [24, 25] opens a new dimension to histological studies [26]. In the present study, the choice of this three-dimensional analytical approach associated with a conventional immunohistochemical approach and the RNAscope *in situ* hybridization technique is made to characterize the central CA neuronal system of mice lacking the SELENOT gene in nerve cells (Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl}) [13]. This allowed us to establish the differential role of SELENOT in the spatial distribution of CA neuron populations in the female and male mouse brain.

Materials and Methods

Animals

SELENOT-floxed (SELENOT^{fl/fl}) mice were generated at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). To selectively silence SELENOT gene in neural cells, SELENOT^{fl/fl} mice were bred with Tg (Nestin-Cre)1 Kln^{+/-} knock-in mice [12, 13], which were acquired from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Absence of SELENOT protein in the of brain Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} mice was previously established [12, 13]. It is known that nestin-driven Cre could exhibit some activity in a few peripheral tissues. However, the transgenic line Tg (Nestin-Cre)1 Kln^{+/-} used has been developed by placing the Cre recombinase under the control of a rat nestin promoter and the nervous system-specific enhancer present in the second intron. This promoter expresses Cre recombinase in neuronal and glial cell precursors. For experiments, animals were group-housed in a climate-controlled colony with a 12-h light/dark cycle (light on at 07:00 a.m.) and access to food and water *ad libitum*. Adult male and female mice between 3 and 12 months of age were used throughout this study.

RNA Scope-Fluorescent *in situ* Hybridization

Mice were anesthetized using a solution of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and perfused with sterile phosphate-buffered saline (PBS) followed by sterile paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were dissected and post-fixed in PFA 4% overnight at 4°C. Cryoprotection was performed through immersion in sterile sucrose 15% and 30%. Brains were frozen in isopentane in dry ice and stored at -80°C. Tissues were sectioned into 10–12- μ m slices with a cryostat. Slices were washed 5 min in sterile PBS and heated at 60°C in a dedicated oven (ACD HyBEZ™ II Hybridization System [220v] with ACD EZ-Batch Slide System; Bio-Techne, Rennes, France) under Bake mode for 30 min, and then post-fixed for 15 min with sterile PFA 4%. Slices were dehydrated in graded solutions of ethanol at 50%, 70%, and twice 100% during 5 min for each bath. Slices were covered with H₂O₂ for 5 min and washed with distilled H₂O two times. Slices were submerged for 10 s in distilled water at 99°C and 5 min in RNAscope 1X Target Retrieval Reagent (ACD Bio-Techne) at 99°C. Slides were rinsed for 15 s in distilled water at room temperature, submerged 3 min in ethanol 100% and dried at room temperature. Slices were covered with protease RNAscope (ACD Bio-Techne) for 30 min at 40°C and washed with distilled water two times. Hybridization was performed with 50 μ L/slice of RNAscope® probe mix (probe C1-TH targeting the sequence 483-1603 of NM_009377.1 – Mm-Th mRNA, and probe C2-SELENOT targeting the sequence 1428-3520 of NM_001040396.3 – Mm-SELENOT mRNA, ACD Bio-Techne) for 2 h at 40°C. Control probes were as follows: ubiquitin C gene, peptidylprolyl isomerase B (PIIB) gene and RNA polymerase II subunit gene were used as positive probes while the *E. coli* gene 4-hydroxy-tetrahydridipicolinate reductase was used as a negative control. After hybridization, slices were covered with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 1 during 30 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, and with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 2 for 30 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, and with RNAscope Multiplex FL v2 Amp 3 for 15 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, (RNAscope Multiplex FL v2 Amp 1, 2, 3: RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2; ACD Bio-Techne). After amplification, the staining steps were carried out sequentially. Slices were covered with RNAscope Multiplex FL v2 HRP-C1 (ACD Bio-Techne) for 15 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, then covered by 80 μ L of Opal 520 at 1/1,500 (Opal 520 reagent pack, FP1487001KT; Akoya Biosciences, Malborough, MA, USA) for 30 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, followed by staining of C1 to block with HRP blocker (ACD Bio-Techne) for 15 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times. Slices were covered by 80 μ L of Opal 650 at 1/1,000 (Opal 650 reagent pack, Akoya Biosciences) for 30 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times, and followed by staining of C2 to block with HRP blocker (ACD Bio-Techne) for 15 min at 40°C and washed at room temperature with RNAscope wash buffer two times. Staining of the nuclei was done with RNAscope DAPI (ACD Bio-Techne), and the slides were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tissue Immunostaining

Fixed tissues were sectioned in sagittal orientation into 10–12- μ m slices with a cryostat. The sections were post-fixed 30 min in

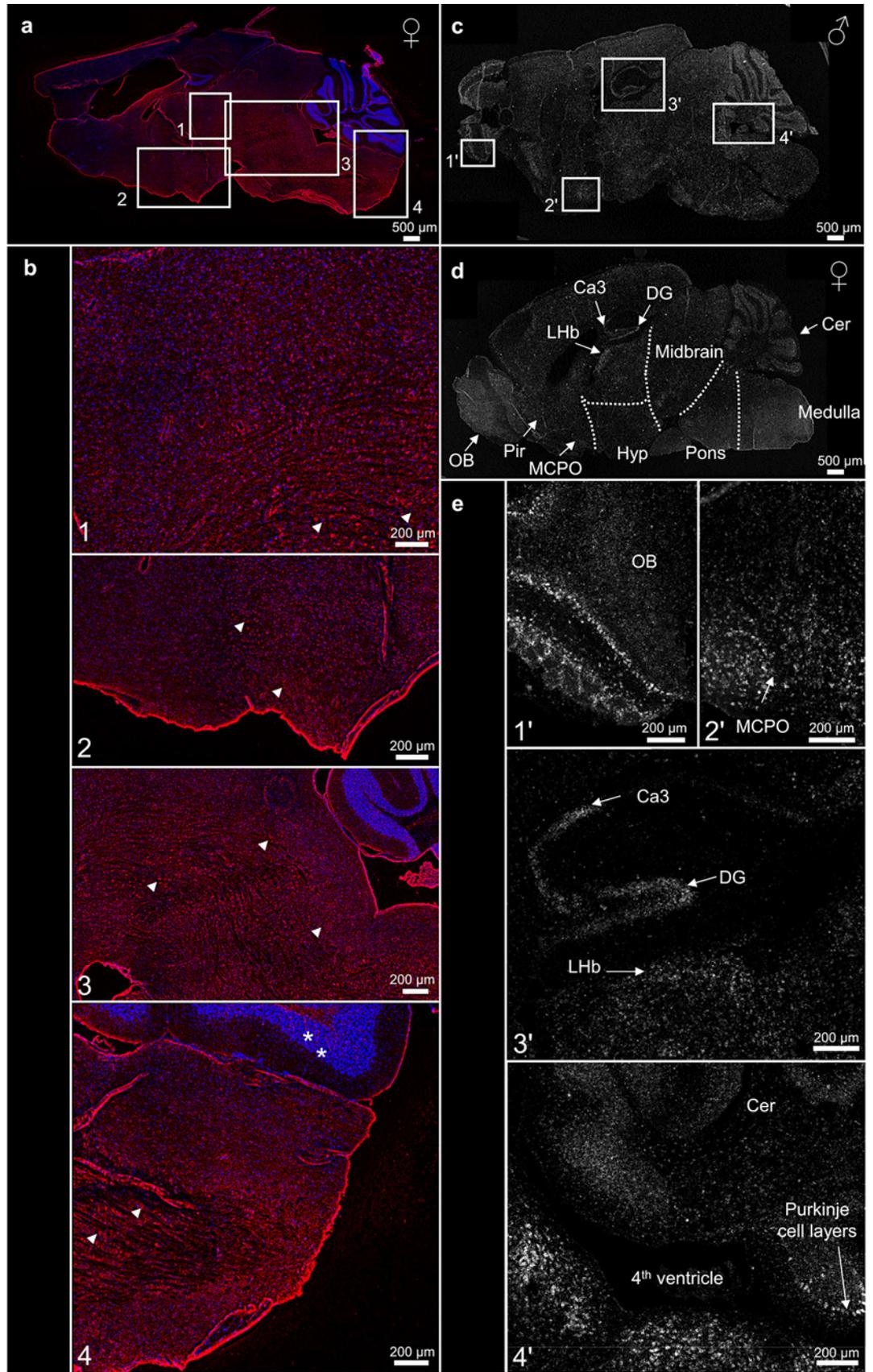
PFA 4% then washed three times with PBS. Samples were incubated with 1% donkey serum diluted in 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100 in PBS for 2 h at room temperature and exposed overnight at 4°C to primary antibodies, including rabbit anti-SELENOT diluted 1:200 [27] and sheep anti-TH diluted 1:5,000. Sheep anti-TH antibodies were raised against rat TH purified from rat pheochromocytoma cells according to a protocol previously described [28]. This antibody reproduced neuronal TH immunostainings previously described in the literature. Immunostaining was visualized using Alexa 594-conjugated secondary anti-rabbit antibodies diluted 1:200 (Invitrogen, Saint Aubin, France) or Alexa 647-conjugated secondary anti-sheep antibodies diluted 1:200 (Interchim, Montluçon, France). Nuclei were stained with 1 μ g/mL 4,6-diamino-2-phenylindole diluted 1:1,000 (DAPI; Sigma-Aldrich) in PBS prior to mounting the slides with PBS/glycerol 50/50.

Whole Brain Immunostaining

Mice were anesthetized using a solution of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and perfused with PBS followed by PFA 4%. Brains were dissected and post-fixed in PFA 4% overnight at 4°C. Brains were pretreated with methanol before immunostaining and washed in PBS for 1 h twice, then in 20–40–60–80% methanol (in H₂O) and 100% methanol twice for 1 h. They were then bleached with 3% H₂O₂ in 100% methanol overnight at 4°C in the dark without shaking. Organs were rehydrated successively in 80–60–40–20% methanol, and PBS, each step for 1 h before staining procedures. Pretreated brains were incubated in a permeabilization solution containing 0.2% Triton X-100, 20% DMSO, 0.3M glycine in PBS at 37°C for 2 days, with shaking. Then, the organs were transferred in a blocking solution (0.2% Triton X-100, 6% donkey serum in PBS) at 37°C for 2 days with shaking. The organs were then washed in a solution of PBS containing 0.2% Tween-20, 10 μ g/mL heparin for 1 day and half, and incubated with the primary antibody (rabbit anti-TH; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), diluted 1:300 in the incubation solution containing 0.2% Tween-20, 5% DMSO, 10 μ g/mL heparin, 3% donkey serum in PBS, for 7 days at 37°C with shaking. The samples then were washed with the washing solution described above for 1 day, and then incubated with secondary antibodies (donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch; Interchim, Montluçon, France) diluted 1:500 in the incubation solution for 7 days at 37°C with shaking. Finally, the organs were washed in the washing solution for 1 day. Controls for the TH immunoreaction have been performed previously and showed no false immunostaining [26, 29, 30].

Clearing Procedure

Tissues were cleared with the following iDISCO+ protocol. First, the samples were dehydrated in methanol/H₂O solution (20%, 40%, 60%, and 80% 1 h each) and 100% methanol for 1 h twice with shaking. The samples were then incubated overnight in 1 volume of 100% methanol and 2 volumes of 100% dichloromethane anhydrous (Sigma-Aldrich), and washed twice for 20 min in 100% dichloromethane with shaking. Finally, the samples were incubated in 100% dibenzyl ether (Sigma-Aldrich) for at least 3 h with shaking before imaging.



(For legend see next page.)

Light-Sheet Imaging

Cleared samples were imaged with an Ultramicroscope II (LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) using the ImspectorPro software (LaVision BioTec, Bielefeld, Germany). The light sheet was generated by a laser at wavelength of 640 nm (Coherent Sapphire Laser; LaVision BioTec) and six cylindrical lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10; Olympus, Bielefeld Germany) with a $\times 2$ objective (MVPLAPO; Olympus, Bielefeld, Germany) was used at different magnifications ($\times 0.63$, $\times 2.5$, $\times 3.2$). The samples were placed in a horizontal orientation in an imaging reservoir made of 100% quartz (LaVision BioTec) filled with dibenzyl ether and illuminated from the side by the laser light. Images were acquired with a PCO Edge sCMOS CCD Camera ($2,560 \times 2,160$ Pixel size; LaVision BioTec). The step size in Z-orientation between each image was fixed at $4 \mu\text{m}$ for $\times 0.63$ magnification and $1 \mu\text{m}$ for $\times 2.5$ and $\times 3.2$ magnifications. For the retrorubral field (RRF-A8), substantia nigra (SN-A9), and ventral tegmental area (VTA-A10), mosaic acquisition mode with three fields of view was used.

Thunder Imaging

Section staining by RNAscope in situ hybridization or immunostaining images were acquired by a DM6 Thunder Upright Fluorescence Microscope with a DFC9000 GT sCMOS camera (Leica Microsystems, Nanterre, France) and with $\times 10$ objective. Mosaic mode was used to acquire images of whole sections. Post-treatment with the LAS-X software (Leica Microsystems) was done to merge fields of view. Computational clearing, an innovant technology developed by Leica increases the quality of rendering.

Image Processing and Quantitative Assessment of Anatomic Structures

Three-dimensional samples were constructed from a Z-series of Ultramicroscope II fluorescence images using the Imaris software, version 9.0.0_64 (<http://bitplane.com>, Zurich, Switzerland). Three-D pictures and tiff series were obtained using the “Snapshot” and the “animation” tools of the Imaris software. Semi-automatic counting of TH-positive neurons was done with the “spot

Fig. 1. Expression of SELENOT protein and mRNA in the brain of adult WT (Nes-Cre) mice. **a** Immunolabeling of SELENOT in sagittal sections of adult mouse brain (red). Nuclei are labeled with DAPI (blue). **b** Magnification of different areas from **(a)** in the thalamus (**b1**), hypothalamus (**b2**), midbrain (**b3**), and the medulla (**b4**). Arrowheads indicate cells immunolabeled with anti-SELENOT. **c** In situ hybridization analysis of SELENOT mRNA in a sagittal section of male adult mouse brain. **d** In situ hybridization analysis of SELENOT mRNA in a sagittal section of female adult mouse brain. The pyriform nucleus (Pir), the hippocampus (Ca3), the supraoptic nucleus (MCPO), the cerebellum (Cer), the olfactory bulb (OB), the habenula (LHb), and the dentate gyrus (DG) are indicated by arrows, and anatomical structures of the hypothalamus, midbrain, pons, and the medulla are delimited by dotted lines. **e** Magnification of different areas from **c** in the OB (**e1'**), MCPO (**e2'**), hippocampus Ca3, DG, and LHb (**e3'**) and the 4th ventricle and Cer with the granular and the Purkinje cell layers (**e4'**). Images were acquired with the Leica *Thunder* microscope, with $\times 10$ magnification, mosaic reconstruction, and computational clearing treatment.

detection” tool of the Imaris software which uses predefined size and intensities thresholds, and a manual verification was used with the “clipping plan” tool as previously described [29, 31]. The cell numbers quantified in WT mice were similar to those previously described [32–34], thus further validating this procedure. Movies were generated with the free software Fiji. Titles and transition additions were done with Movie Maker.

Statistical Analysis

Data are reported as medians (min-max). The nonparametric Mann-Whitney U test was used. Probability values less than 0.05 were considered significant. Data were analyzed with GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

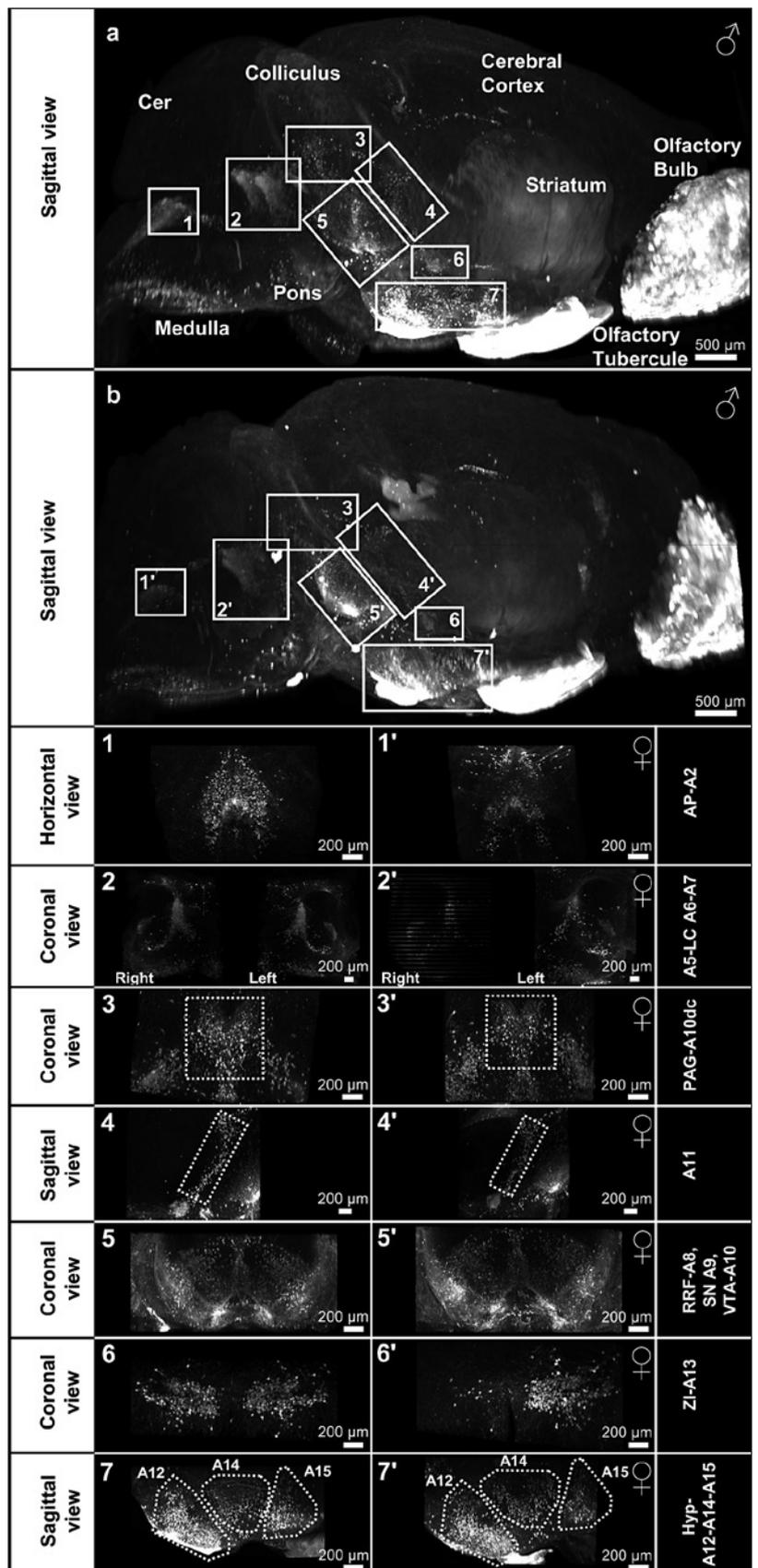
Results

SELENOT Distribution in the Mouse Brain

SELENOT immunostaining was performed on sagittal sections of adult C57bl/6 mouse brain (Fig. 1a). SELENOT exhibited a widespread distribution in the adult brain both in females (Fig. 1a) and males (not shown). Image acquisitions with higher magnification showed the immunostaining of numerous cells in different anatomical zones, including the thalamus (Fig. 1b1), the hypothalamus (Fig. 1b2), midbrain and pons (Fig. 1b3), and the medulla (Fig. 1b4). Within these regions, labeled cells displayed a variable SELENOT staining intensity, with a stronger signal in some areas (Fig. 1b, arrowheads). SELENOT was detected not only in cell bodies but also in nerve fibers, as illustrated in Figure 1b4 (indicated by asterisks). When the immunoreaction was performed in the presence of a SELENOT peptide that was used to generate the antibody, no labeling was observed for SELENOT while a co-labeling with a TH antibody was detected (online suppl. Fig. S1; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000522091).

In situ hybridization analysis confirmed the widespread expression of the SELENOT gene since the mRNA was also detected in various regions of the mouse brain (Fig. 1c, d). The diffuse expression profile of SELENOT mRNA was observed in both male (Fig. 1c) and female (Fig. 1d) mouse brain. Higher mRNA levels could be observed in the olfactory bulb and the glomerular layer (Gl) (Fig. 1e1'), in the pyriform nucleus, in the supraoptic nucleus (MCPO) (Fig. 1e2'), in the hippocampus (Ca3), dentate gyrus, the habenula (Fig. 1e3'), and around the 4th ventricle and in the cerebellum (Cer) within the granular and the Purkinje cell layers (Fig. 1e4'). Similarly, SELENOT mRNA is abundant in the hypothalamus within the PVN, in the ventral zone of the pons and the medulla (data not shown). In all these areas, cells exhibited a higher density of SELENOT

Fig. 2. 3D imaging of TH immunolabeling in the adult mouse brain. **a** 3D sagittal view of TH labeling with anatomical references in adult WT (Nes-Cre) mouse brain. Squares within the image represent anatomical zones magnified in images 1–7 shown below and corresponding to: (1) 3D horizontal view of the AP-A2, (2) 3D coronal view of A5, LC-A6, and A7, (3) 3D coronal view of PAG-A10dc, (4) 3D sagittal view of A11, (5) 3D coronal view of RRF-A8, SN-A9 and VTA-A10, (6) 3D coronal view of the ZI-A13, (7) 3D sagittal view of the Hyp-A12-A14-A15 in adult WT (NesCre) mouse brain. **b** 3D sagittal view of TH labeling with anatomical references in SELENOT-knockout mouse brain. Squares within the image represent anatomical zones magnified in images 1'–7' shown below and corresponding to: (1') 3D horizontal view of the AP-A2, (2') 3D coronal view of A5, LC-A6 and A7, (3') 3D coronal view of PAG-A10dc, (4') 3D sagittal view of A11, (5') 3D coronal view of RRF-A8, SN-A9 and VTA-A10, (6') 3D coronal view of the zona incerta (A13), and (7') 3D sagittal view of the Hyp-A12-A14-A15 in SELENOT-knockout mouse brain. Acquisitions were performed with the Ultramicroscope II, magnification $\times 0.63$ (**a**, **b**), (1–6 and 1'–6') magnification $\times 3.2$, and (7–7') magnification $\times 2.5$.



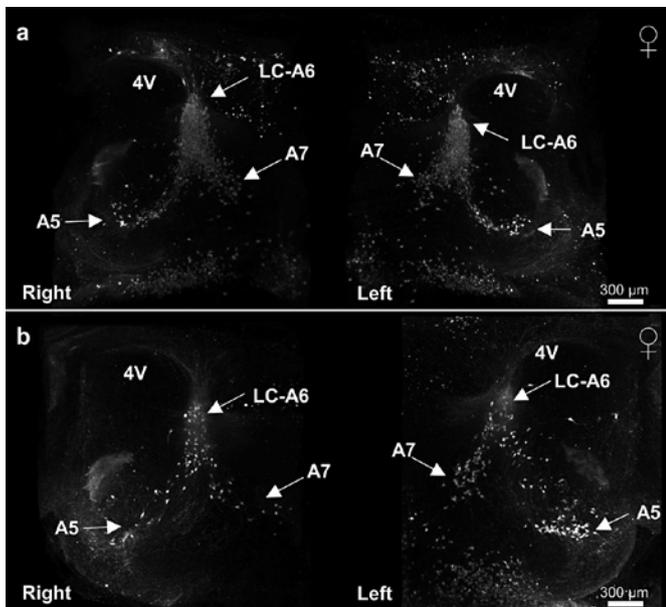


Fig. 3. 3D coronal visualization of TH immunolabeling in different catecholaminergic A5, LC-A6, A7 nuclei in WT (NesCre) (a) in SELENOT-knockout (b) brains of adult mice. Arrows indicate cell groups A5, LC-A6, and A7. 4V corresponds to the 4th ventricle. **a** The image in the left represents cell groups of the right hemisphere and the image in the right represents cell groups of the left hemisphere in a WT (NesCre) brain. **b** The image in the left shows cell groups of the right hemisphere and the image in the right shows cell groups of the left hemisphere in a SELENOT-knockout brain. Acquisitions were performed with the Ultramicroscope II; magnification $\times 3.2$.

transcripts per cell as compared to cells in other structures which display a lower level of transcript expression (Fig. 1e).

Distribution of CA Neuron Populations in SELENOT-Deficient Mice

Comparison of TH-positive neuronal groups in SELENOT knockout (NesCre-SELENOT^{fl/fl}) (KO) and WT (NesCre) mice was carried out using 3D imaging of in toto immunolabeled mouse brains. This analysis allowed us to determine the distribution of TH-positive neurons in particular regions of interest (Fig. 2, online suppl. Fig. S2–S6; Movie 1). Figure 2 shows the global labeling of the central CA system in adult WT (Fig. 2a) and KO mice (Fig. 2b). The different CA cell groups from A1 to A16 were found in these views of both WT and KO mice as illustrated in Figure 2a, b. However, further observations of the different CA cell groups revealed noticeable differences in cell density between WT and KO mice at the level of area postrema (AP-A2), A5, locus coeruleus (LC-A6), A7, A11 cell group (A11), zona incerta (ZI-A13), and

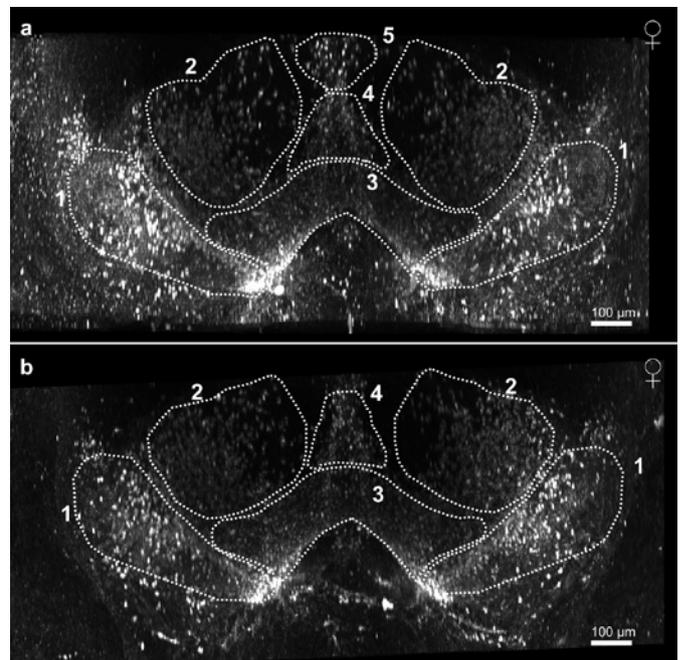
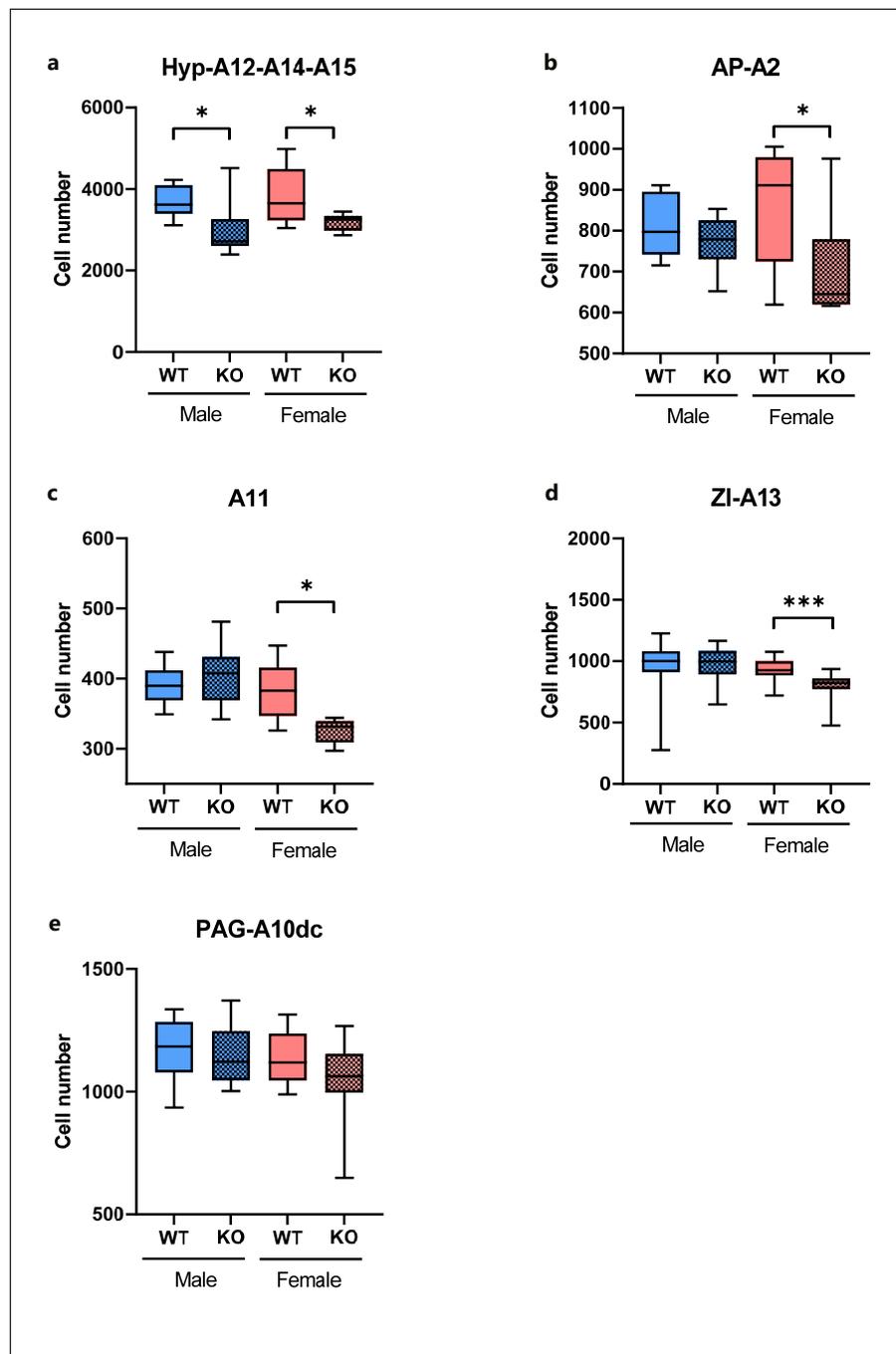


Fig. 4. 3D coronal visualization of TH immunolabeling in SN-A9 (dotted area 1), RRF-A8 (dotted area 2), VTA-A10 (dotted area 3), the central linear nucleus (Cli) (dotted area 4), and the ventral part of the PAG (dotted area 5). **a** Adult WT (NesCre) brain. **b** Adult SELENOT-knockout brain. Images were acquired with the Ultramicroscope II; magnification $\times 3.2$.

the hypothalamus (Hyp-A12–A14–A15), but not the RRF-A8, SN-A9, VTA-A10 cell groups (Fig. 2b1–7 for WT and b1'–7' for KO mice and online suppl. Fig. S2–S6). Of note, the ZI-A13 displayed an asymmetrical distribution between the left and the right hemispheres in KO mice (Fig. 2b6') compared to WT mice (Fig. 2b6). It should be noted that the asymmetry was more often observed in females than males, with a variable extent and without a privileged side (data not shown). Other CA cell groups like A5, LC-A6, A7, RRF-A8, SN-A9, and VTA-A10 could not be compared precisely at the cellular level because of the lack of resolution within these areas of high cellular density (Fig. 2b2, b5 for WT, and b2', b5' for KO mice). For instance, LC displayed noticeable cell density differences between WT and KO mice but the high number of CA neurons in this area precludes their quantitative assessment (Fig. 3a, b and online suppl. Movie 2). In contrast, we could not observe any apparent difference in cell distribution at the level of CA groups A8–A10 including the RRF-A8, SN-A9, and the VTA-A10 between WT and KO mice (Fig. 4a, b and online suppl. Movie 3), but again this observation could not be evaluated quantitatively due to the high cell density in these CA structures.

Fig. 5. Quantification of TH-positive neurons in the brain of adult male and female WT (NesCre) and SELENOT-knockout mice. Positive neurons were counted semi-automatically in AP-A2, PAG-A10dc, A11, ZI-A13, and Hyp-A12-A14-A15. **a** Counts were obtained from Hyp-A12-A14-A15 male (median value: 2,717 for KO mice, $n = 6$, vs. 3,619, for WT, $n = 9$; $p < 0.05$) and female (median value: 3,254 for KO mice, $n = 6$, vs. 3,619 for WT, $n = 9$; $p < 0.05$) mouse brain. **b** Counts were obtained from AP-A2 male (median value: 778 for KO mice, $n = 6$, vs. 797 for WT, $n = 7$) and female (median value: 645 for KO mice, $n = 7$, vs. 911 for WT $n = 11$; $p < 0.05$) mouse brains. **c** Counts were obtained from A11 male (median value: 407 for KO mice, $n = 6$, vs. 390 for WT, $n = 10$) and female (median value: 331 for KO mice, $n = 6$, vs. 383 for WT, $n = 9$; $p < 0.05$) mouse brains. **d** Counts were obtained from ZI-A13 male (median value: 997 for KO mice, $n = 13$, vs. 1,000 for WT, $n = 23$) and female (median value: 822 for KO mice, $n = 18$, vs. 926 for WT, $n = 21$; $p < 0.001$) mouse brains. **e** Counts were obtained from PAG-A10dc male (median value: 1,122 for KO mice, $n = 6$, vs. 1,184 for WT, $n = 9$) and female (median value: 1,063 for KO mice, $n = 7$, vs. 1,119 for WT, $n = 11$) mouse brains. Non-parametric Mann-Whitney U test, *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.



Images with higher magnification were used to quantify the TH⁺ neurons in a semi-automated manner (see online suppl. Fig. S2–S6; Movie 1) in different structures including AP-A2, periaqueductal gray (PAG-A10dc), A11, ZI-A13, and the Hyp-A12-A14-A15 where cells could be easily segmented. The quantitative data are presented in Figure 5. In male mice, a significant decrease in the number of TH⁺ neurons was only observed in Hyp-

A12-A14-A15 (median value: 2,717 for KO mice, $n = 6$, vs. 3,619, for WT, $n = 9$; $p < 0.05$) (Fig. 5a), the other regions including the AP-A2 (median value: 778 for KO mice, $n = 6$, vs. 797 for WT, $n = 7$) (Fig. 5b), A11 (median value: 407 for KO mice, $n = 6$, vs. 390 for WT, $n = 10$) (Fig. 5c), ZI-A13 (median value: 997 for KO mice, $n = 13$, vs. 1,000 for WT, $n = 23$, for the sum of the cells at both left and right sides regardless of the asymmetry) (Fig. 5d),

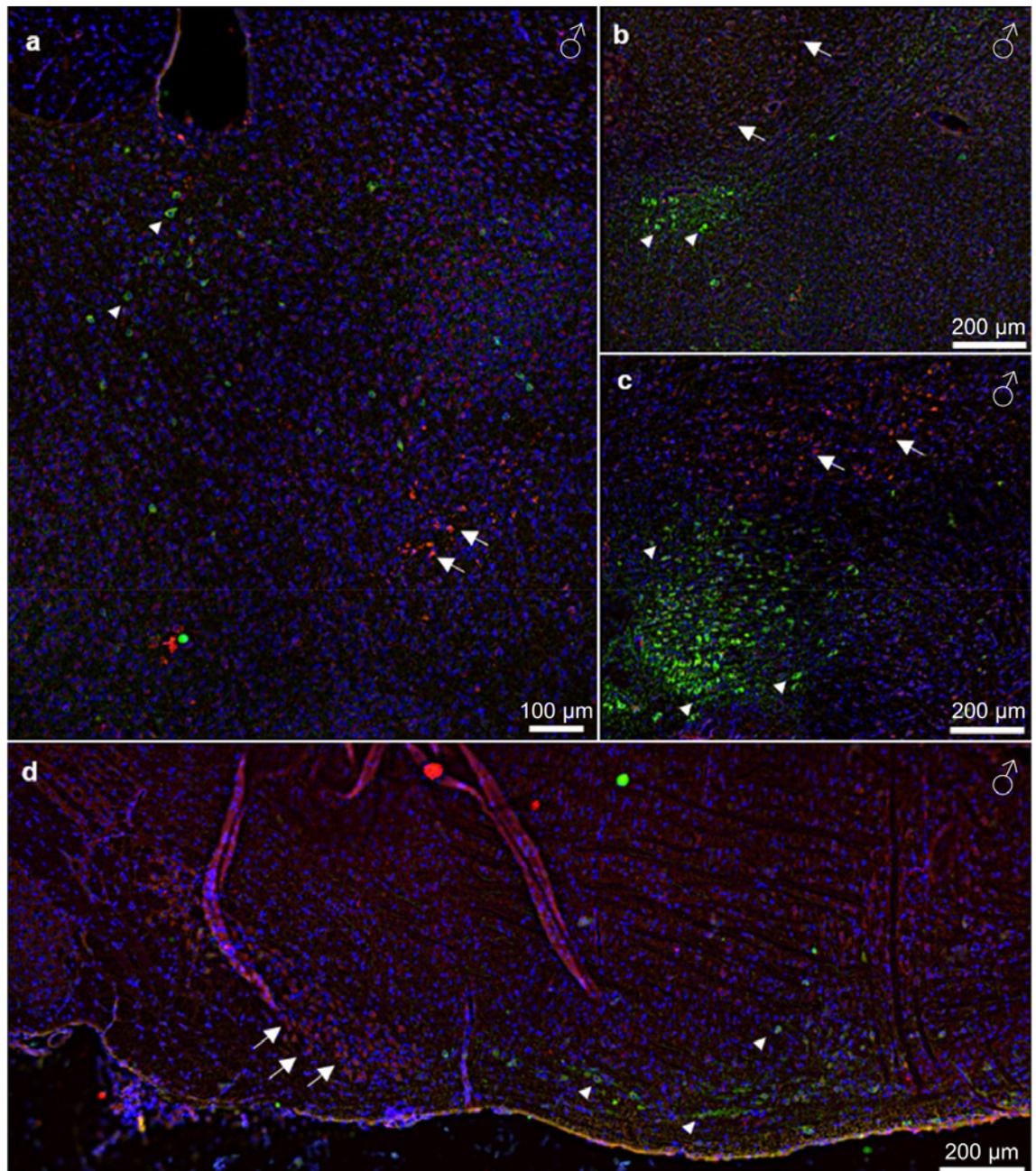


Fig. 6. Co-localization of SELENOT and TH in adult mouse brain. Sagittal sections were immunostained for SELENOT (red, arrows) and TH (green, arrowheads). Nuclei are stained with DAPI (blue). Different anatomical areas are shown: preoptic area (**a**), ZI-A13 (**b**), RRF-A8, SN-A9, VTA-A10 (**c**), and pons (**d**). Acquisitions were performed with the *Thunder* microscope, magnification $\times 10$, with mosaic reconstruction and computational clearing treatment.

and PAG-A10dc (median value: 1,122 for KO mice, $n = 6$, vs. 1,184 for WT, $n = 9$) (Fig. 5e) did not show significant differences in the number of TH+ neurons between the two mouse strains. In female mice, a significant decrease in TH+ neurons was observed in KO mice com-

pared to WT mice within Hyp-A12-A14-A15 (median value: 3,254 for KO mice, $n = 6$, vs. 3,619 for WT, $n = 9$; $p < 0.05$) (Fig. 5a), AP-A2 (median value: 645 for KO mice, $n = 7$, vs. 911 for WT $n = 11$; $p < 0.05$) (Fig. 5b), A11 (median value: 331 for KO mice, $n = 6$, vs. 383 for WT,

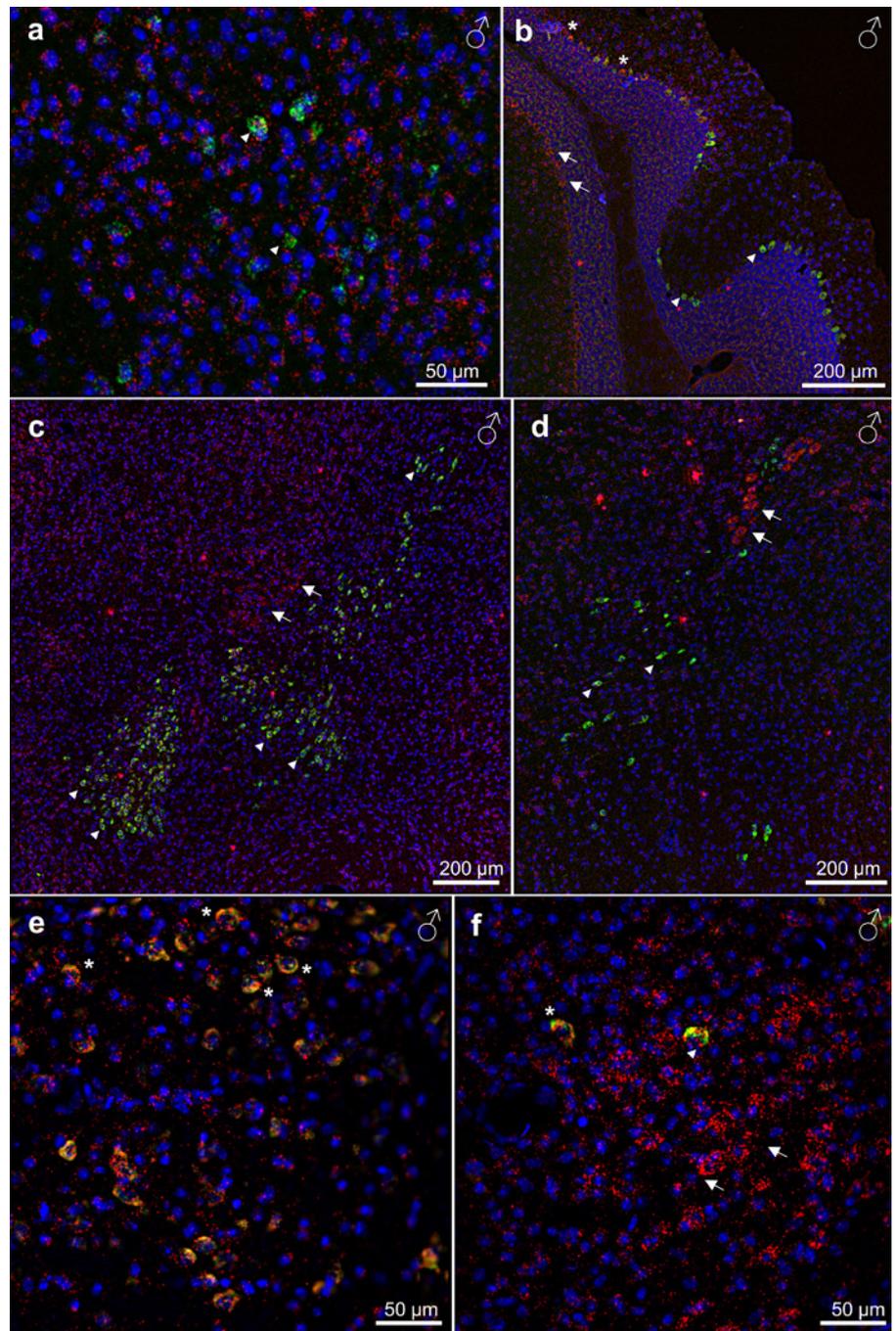


Fig. 7. Co-localization of SELENOT and TH mRNA in adult mouse brain. In situ hybridization analysis of SELENOT (red, arrows) and TH (green, arrowheads) mRNA was performed on sagittal sections using the RNA scope technology. Nuclei are stained with DAPI (blue). Cells showing expression of both mRNA are indicated by asterisks. Different anatomical zones are presented: ZI-A13 (**a**), Cer (**b**), SN-A9 and VTA-A10 (**c**), pons (**d**), SN-A9 (**e**), and pons (**f**). Acquisitions were performed with the *Thunder* microscope, magnification $\times 10$ and $\times 40$, with mosaic reconstruction and computational clearing treatment.

$n = 9$; $p < 0.05$) (Fig. 5c), and ZI-A13 (median value: 822 for KO mice, $n = 18$, vs. 926 for WT, $n = 21$, for the sum of the cells at both left and right sides regardless of the asymmetry; $p < 0.001$) (Fig. 5d). In contrast, the anatomical zone of PAG-A10dc did not show a significant difference between KO (median value: 1,063, $n = 7$) and WT (median value: 1,119, $n = 11$) mice (Fig. 5e).

Comparative Localization of SELENOT and TH in Adult Mouse Brain

In order to compare the neuroanatomical localization of SELENOT and TH, we used fluorescent double labelings either by immunohistochemistry (Fig. 6) or RNA scope in situ hybridization (Fig. 7). In Figure 6, immunohistochemical analysis of TH and SELENOT anatomical

distribution in adult mouse brain revealed that the two enzymes are highly expressed in different areas of the brain and that there is no apparent cellular colocalization of the two proteins as illustrated in the preoptic area (Fig. 6a), the ZI-A13 (Fig. 6b), RRF-A8 and SN-A9 (Fig. 6c), and the pons (Fig. 6d). However, RNA scope in situ hybridization showed that SELENOT mRNA could be expressed with TH mRNA at the cellular level in different regions of the brain including the ZI-A13 (Fig. 7a), Cer (Fig. 7b), SN-A9, and VTA-A10 (Fig. 7c, e), and pons (Fig. 7d, f) besides other regions with strong mRNA expression for one but not the other gene as also found by immunohistochemistry.

Discussion

SELENOT has recently attracted a lot of interest because of its essential function in the CNS and endocrine tissues [10, 11]. This thioredoxin-like selenoenzyme has been initially characterized as a PACAP-stimulated gene in neuroendocrine cells [27], which plays a critical role during development and exerts a neuroprotective function in adulthood. Additional studies revealed the instrumental role of SELENOT in hormone secretion in β -pancreatic cells [35], corticotroph cells [36], and chromaffin cells [14]. Although the SELENOT gene is essential for mouse development [13] and for the function of neuronal and neuroendocrine cells, no information is available yet on the impact of its gene expression on the development of major neuronal and neuroendocrine cell populations including CA cells where this selenoprotein was initially discovered and where it exerts key functions [12, 14, 15, 27]. Different histological techniques including 3D imaging of transparent brains from WT and SELENOT-deficient mice were used in the present study to address the influence of SELENOT on CA neuronal distribution. Analyses by immunohistochemistry and in situ hybridization revealed the widespread expression of SELENOT in the mouse brain, with more intense labeling of anatomical areas including OB, the Gl, Pir, Ca3, dentate gyrus, MCPO, habenula, pons, medulla, granular layers and the Purkinje cell layer of Cer and PVN in Hyp (data not shown). The large distribution of SELENOT in the brain and its known neuroprotective function as demonstrated in our previous studies [12, 13, 15] strongly suggest that this new selenoenzyme stimulated by the trophic neuropeptide PACAP ought to play a fundamental role in the development and function of various nerve cells.

We have then undertaken the characterization of the CA neuronal system in the CNS of conditional, Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} KO mice [12, 13] in comparison with WT mice, using the iDISCO⁺ three-dimensional imaging technique [21, 37]. In recent years, a range of clearing methods have been developed to remove lipid and bleach pigment content of a tissue and match the refractive properties of tissue and mounting media to render the tissue transparent. Clearing methods range in complexity from incubating tissue in various solutions to procedures involving electrochemical equipment to facilitate the imaging and 3-dimensional reconstruction of complex structures such as the brain including entire populations of cells. In this regard, light-sheet microscopy techniques used in the present study are particularly suited to imaging cleared tissues as they enable fast acquisition of large 3D volumes and can include multiangle illumination and imaging [21, 26, 38]. Applying this three-dimensional imaging approach to conditional Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} KO mice revealed alterations of different CA cell groups, including AP-A2, A11, A5, LC-A6, A7, ZI-A13, and Hyp-A12-A14-A15, which showed lower TH cell density compared to WT mice although the brain volume did not differ between WT and SELENOT-deficient mice as assessed by 3D whole brain imaging (data not shown). This finding is consistent with our previous results showing that brain-SELENOT deficient mice display a reduced cerebral volume at the postnatal stage P7 but not at adulthood, and altered behavioral phenotype, i.e., hyperactivity and anxiety, in adulthood [13]. In addition, the mouse line Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} exhibited a higher vulnerability of dopaminergic neurons to neurotoxin action, emphasizing the crucial role of SELENOT in protecting the CA neuronal system [12, 15, 39].

Quantification of neuron numbers in different brain regions using tridimensional images offers several advantages over 2D image quantification. First, the counting accuracy is improved since the area of interest is considered in its entirety thus reducing the difficulties inherent to images from serial sections, such as the form of the area to be counted or the erroneous counting of the same neurons several times. Second, the accessibility to different brain zones even within a certain region is also improved. Third, 3D image analysis allows a better delimitation of the region of interest based on the spatial continuation and organization of nerve cells. Using a semi-automated quantification, we measured the density of TH⁺ neurons from 3D images for the cell groups of AP-A2, PAG-A10dc, A11, ZI-A13, Hyp-A12-A14-A15. This analysis revealed a significant decrease in the density of TH⁺ cells

in different areas depending on the sex of the animal. Indeed, male KO mice showed a significant decrease in the number of TH⁺ cells only in the hypothalamus while females exhibited a decrease in AP-A2, A11, ZI-A13, and Hyp-A12-14-15. These results indicate that SELENOT plays a key role in the anatomical distribution of CA cell groups within the CNS likely through a neuroprotective action, and that the extent of this effect is sex-dependent. The protective effect of SELENOT in these neurons may involve its antioxidant properties as we have previously shown that SELENOT is able to protect cortical neuroblasts in culture against oxidative stress and apoptosis [13]. The sexual dimorphism shown by SELENOT for the protection of certain brain CA cell groups remains to be investigated and may underscore a previously unexplained differential antioxidant action of certain factors depending on the sex [40–42]. In contrast to these areas where TH-positive neurons could be quantified in a semi-automated manner from images obtained by light-sheet microscopy, other CA structures with high cell density like LC-A6, RRF-A8, SN-A9, or VTA-A10 could not be quantified due to resolution limitation which hampers cell segmentation for image analysis. This also applies for 3D imaging of neuronal projections which could be readily observed but whose quantification is rather challenging. To circumvent these limitations, different optical developments are ongoing in order to ameliorate the information obtained from cleared samples [23, 43, 44]. It should be mentioned that the lack of quantitation in these structures does not preclude the description of apparent differences between the two genotypes as indicated for LC-A6 where an apparent decrease of TH-positive neurons could be observed in the 3D images of SELENOT-deficient mice compared to WT. In addition, SELENOT could still play an important role in structures where no difference is observed. Indeed, SELENOT could play a role in the development and maintenance of CA neurons but also in their function in the mature brain as observed in Parkinson's disease models [12].

The groups of CA cells in which SELENOT would exert its protective role have different anatomical localizations and physiological roles. Among the groups of CA neurons that could be quantified, AP is part of the A2 cell group along with NTS (nucleus of the solitary tract) and DMX (dorsal motor nucleus of the X nerve) [45, 46]. AP noradrenergic nuclei are described as a center for food intake regulation by being the primary relay for the integration of satiety signals coming from the gastrointestinal tract [47, 48]. This CA cell group, which is sensitive to the variation of different circulating factors, is a direct anatomical

link with the NTS [49, 50]. For instance, amylin secreted by the pancreas stimulates AP neurons leading, via projections to the NTS, to stimulation of TH⁺ neurons which will release DA in the nucleus accumbens and cause the feeling of fullness [51]. Studies are currently ongoing to determine the role of SELENOT in feeding behavior.

The PAG, a nucleus of the midbrain, is involved in many functions. Various studies demonstrated its involvement in the behavioral response to threatening stimuli and in the perception of breathlessness [52]. This nucleus also modulates the perception of pain [53]. Specifically, a localized nucleus grouping within the PAG, adjacent to and surrounding the ventral half of the cerebral aqueduct is identified as the group A10dc cells [54]. Retrograde tracer injections showed an anatomical pathway between the bed nucleus of the stria terminalis and TH neurons of the A10dc group, suggesting an essential role of dopaminergic neurons in psychiatric, depressive, and anxiety disorders via the neuropeptide corticotropin-releasing factor [55]. Further studies will be required to assess the involvement of SELENOT in such behaviors.

The ZI-A13, described by Auguste Forel hundred years ago, is a neuronal hub involved in many functions: visceral activity, awakening and attention, locomotion, organization of emotion and emotional processing, and nociception [56–58]. This structure is connected with several anatomical areas of the brain: the cortex, the cerebellum, the thalamus, the brainstem, the spinal cord, basal ganglia, amygdala, basal forebrain, and hypothalamus [59]. The ZI-A13 group of cells is linked to the superior colliculus and is a relay to the LC-A6 and the PAG, which gives it an important role in the coordination of movements and avoidance actions [60, 61]. The reduction in the number of this group of neurons following SELENOT gene inactivation could impact different neurophysiological functions that remain to be identified.

Finally, Hyp-A12-A14-A15 is the link between the autonomic nervous system and the endocrine system. This area of the CNS is involved in many physiological functions to regulate hunger, thirst, sleep, body temperature, emotions, and sexual behavior. Present in large quantities in the hypothalamus, DA plays multiple roles as a neurotransmitter but also as a hormone in the hypothalamo-pituitary axis [62]. Our preliminary results indicate that SELENOT is required for neuroendocrine functions such as reproduction (manuscript in preparation).

Major CA structures such as SN-A9 or the VTA-A10 did not seem to present significant anatomical differences between WT and SELENOT-deficient mice. It is also possible that minor cell number variations in these struc-

tures could have been overlooked. However, SELENOT could still play a role in these structures although it would be dispensable for their presence in the brain.

Examination of the cellular expression of TH and SELENOT in the mouse CNS revealed that these two genes could be co-expressed in some brain nuclei, as assessed by in situ hybridization analysis. However, immunohistochemistry showed that anatomical areas with cells expressing high levels of SELENOT as described above are not colocalized with structures expressing TH. Certain cells with high SELENOT expression levels are found adjacent to areas with TH labeling. Importantly, these data indicate that areas where a reduction in neuron number was observed in brain SELENOT-deficient mice do not necessarily express SELENOT and that the protective effect of the latter could be mediated by other nerve cells. Thus, it is tempting to speculate that SELENOT-expressing cells other than those expressing TH in a certain brain area, such as GABAergic or glutamatergic neurons (our unpublished observations) may produce trophic factors that would support the development and maintenance of TH neurons which do not express SELENOT.

In conclusion, this study revealed the widespread expression of SELENOT with higher expression in different brain nuclei. Its deficiency in the mouse Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} has a major impact on CA neurons in several areas where neuron number was decreased as revealed by in toto whole mount 3D-imaging. Together, these data strongly suggest that SELENOT is a key selenoprotein for the integrity of the CNS, whose activity as a redox guardian of the ER involved in protein maturation [10, 11, 35] sustains CA neuron survival and probably adequate neurotransmitter genesis. Therefore, this SELENOT activity is likely to be required for various physiological, behavioral, and cognitive functions that will be elucidated in future studies. Since SELENOT has been previously shown to be involved in neuroendocrine cell function, its impact on neuroendocrine regulations through CA release should be further considered and investigated.

References

- 1 Santana Y, Montejo AL, Martín J, LLorca G, Bueno G, Blázquez JL. Understanding the mechanism of antidepressant-related sexual dysfunction: inhibition of tyrosine hydroxylase in dopaminergic neurons after treatment with paroxetine but not with agomelatine in male rats. *J Clin Med*. 2019;8(2):133.
- 2 Douma EH, de Kloet ER. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020;108:48–77.
- 3 Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol*. 1992;67(1):145–63.
- 4 Romo R, Schultz W. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *J Neurophysiol*. 1990;63(3):592–606.

Statement of Ethics

The experiments on animals were performed according to the rules of our institutions and following the guidelines of the European Community for Experimental Animal Use (Directive 2010/63/EU as amended by Regulation [EU] 2019/1010). All procedures using animals were approved by the Normandy Ethics Committee for Animal Care and Use and the French Ministry of Research (Authorization No. 16178-2018071817069319).

Conflict of Interest Statement

The authors declare no competing interest.

Funding Sources

This work was supported by grants from the University of Rouen Normandie (DC2N), INSERM (U1239), and the Regional council of Normandie and the European Community FEDER program (Europe gets involved in regional development through the ERDF program). Images were acquired in PRIMACEN, the cell imaging platform of Normandie.

Author Contributions

David Godefroy performed the 3D imaging and RNA scope in situ hybridization, planned experiments, analyzed data, and prepared the figures and the manuscript; Loubna Boukhzar performed immunohistochemistry; Ben Yamine Mallouki maintained animal colonies; Emmanuelle Carpentier was involved in RNA scope in situ hybridization; Christophe Dubessy and Fatiha Chigr contributed to experiment design and analyzed the data; and Youssef Anouar planned the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

- 5 Hökfelt T. Distributional of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. *Handb Chem Neuroanat*. 1984;2:277–379.
- 6 Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1964;Suppl 232:1–55.
- 7 Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;33(2–3):308–79.
- 8 Hetz C. Adapting the proteostasis capacity to sustain brain healthspan. *Cell*. 2021;184(6):1545–60.
- 9 Valdés P, Mercado G, Vidal RL, Molina C, Parsons G, Court FA, et al. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(18):6804–9.
- 10 Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med*. 2018;127:145–52.
- 11 Pothion H, Jehan C, Tostivint H, Cartier D, Bucharles C, Falluel-Morel A, et al. An essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis. *Antioxidants Redox Signal*. 2020;33(17):1257–75.
- 12 Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, et al. Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2016;24(11):557–74.
- 13 Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, et al. Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):5818–32.
- 14 Abid H, Cartier D, Hamieh A, François-Bellan AM, Bucharles C, Pothion H, et al. AMPK activation of PGC-1 α /NRF-1-dependent SELENOT gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress. *Mol Neurobiol*. 2019 Jun;56(6):4086–101.
- 15 Alsharif I, Boukhzar L, Lefranc B, Godefroy D, Aury-Landas J, do Rego JL, et al. Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol*. 2021;40:101839.
- 16 Goridis C, Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(7):531–41.
- 17 Falck B, Hillarp NÅ, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*. 1962 May;10(3):348–54.
- 18 Selzer ME. Variability in maps of identified neurons in the sea lamprey spinal cord examined by a wholemount technique. *Brain Res*. 1979;163(2):181–93.
- 19 Aitken AR. The preparation and use of embryonic brain wholemounts. *J Neurosci Methods*. 1987;19(4):297–304.
- 20 Aitken AR, Sandeman RE, Sandeman DC. Preparation of immunoperoxidase-labelled wholemounts of invertebrate brains. *J Neurosci Methods*. 1987;21(1):1–7.
- 21 Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. IDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 2014;159(4):896–910.
- 22 Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*. 2012;7(11):1983–95.
- 23 Molbay M, Kolabas ZI, Todorov MI, Ohn T, Ertürk A. A guidebook for DISCO tissue clearing. *Mol Syst Biol*. 2021;17(3):1–21.
- 24 Voie AH, Burns DH, Spelman FA. Orthogonal plane fluorescence optical sectioning: three dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J Microsc*. 1993;170(3):229–36.
- 25 Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*. 2007;4(4):331–6.
- 26 Godefroy D, Boukhzar L, Dubessy C, Montero-Hadjadje M, Yon L, Eiden LE, et al. Three-dimensional mapping of tyrosine hydroxylase in the transparent brain and adrenal of prenatal and pre-weaning mice: comprehensive methodological flowchart and quantitative aspects of 3D mapping. *J Neurosci Methods*. 2020;335:108596.
- 27 Grumolato L, Ghzili H, Hadjadje MM, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, et al. Selenoprotein T is a PACAP regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J*. 2008;22(6):1756–68.
- 28 Dubois MP. Les cellules corticotropes de l'hypophyse des bovins, ovins et porcins mise en évidence par immunofluorescence et caractères cytologiques. *Ann Biol Anim Bioch Biophys*. 1971;11(4):589–624.
- 29 Godefroy D, Dominici C, Hardin-Pouzet H, Anouar Y, Melik-Parsadaniantz S, Rostène W, et al. Three-dimensional distribution of tyrosine hydroxylase, vasopressin and oxytocin neurones in the transparent postnatal mouse brain. *J Neuroendocrinol*. 2017;29(12):1–10.
- 30 Godefroy D, Rostène W, Anouar Y, Goazigo AR. Tyrosine-hydroxylase immunoreactivity in the mouse transparent brain and adrenal glands. *J Neural Transm*. 2019;126(4):367–75.
- 31 El Nacheff WN, Hu C, Bronner ME. Whole gut imaging allows quantification of all enteric neurons in the adult zebrafish intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2022;34(4):e14292.
- 32 Skagerberg G, Lindvall O. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res*. 1985;342(2):340–51.
- 33 Grimm J, Mueller A, Hefti F, Rosenthal A. Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(38):13891–6.
- 34 Koblinger K, Füzesi T, Ejdrygiewicz J, Krjacic A, Bains JS, Whelan PJ. Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice. *PLoS One*. 2014;9(10):e109636–12.
- 35 Prevost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, et al. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology*. 2013;154(10):3796–806.
- 36 Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, et al. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep*. 2017;18(11):1935–46.
- 37 Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, et al. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell*. 2016;165(7):1789–802.
- 38 Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, et al. A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep*. 2014 Nov;9(4):1191–201.
- 39 Shao ZQ, Zhang X, Fan HH, Wang XS, Wu HM, Zhang L, et al. Selenoprotein T promotes proliferation and G1-to-S Transition in SK-N-SH Cells: implications in Parkinson's disease. *J Nutr*. 2019;149(12):2110–9.
- 40 Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med*. 1994 May;96(5):457–62.
- 41 Taqi MO, Saad-Zidane M, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Khdrawy O, Rings F, et al. Sexual dimorphic expression and release of transcription factors in bovine embryos exposed to oxidative stress. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(12):2005–19.
- 42 Di Florio DN, Sin J, Coronado MJ, Atwal PS, Fairweather D. Sex differences in inflammation, redox biology, mitochondria and autoimmunity. *Redox Biol*. 2020;31:101482.
- 43 Almagro J, Messal HA, Zaw Thin M, van Rheenen J, Behrens A. Tissue clearing to examine tumour complexity in three dimensions. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(11):718.
- 44 Vieites-Prado A, Renier N. Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development*. 2021 Sep;148(18):dev199369.
- 45 Blouet C. Le rôle du noyau du tractus solitaire dans la détection et l'intégration de multiples signaux métaboliques. *Méd Sci*. 2013;29(5):449–52.
- 46 Rinaman L. Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Comp Neurol*. 1998;399(1):101–9.
- 47 Kachidian P, Pickel VM. Localization of tyrosine hydroxylase in neuronal targets and efferents of the area postrema in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Comp Neurol*. 1993 Mar 15;329(3):337–53.

- 48 Reiner DJ, Mietlicki-Baase EG, McGrath LE, Zimmer DJ, Bence KK, Sousa GL, et al. Astrocytes regulate GLP-1 receptor-mediated effects on energy balance. *J Neurosci*. 2016; 36(12):3531–40.
- 49 Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun*. 2016;7:11905–11.
- 50 Cunningham ET, Miselis RR, Sawchenko PE. The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: an axonal transport and immunohistochemical study in the rat. *Neuroscience*. 1994;58(3): 635–48.
- 51 Potes CS, Turek VF, Cole RL, Vu C, Roland BL, Roth JD, et al. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin's hypophagic action. *Am J Physiol*. 2010;299(2):623–31.
- 52 Faull OK, Subramanian HH, Ezra M, Pattinson KTS. The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;98:135–44.
- 53 Skinner GO, Damasceno F, Gomes A, De Almeida OMMS. Pharmacology, Biochemistry and Behavior Increased pain perception and attenuated opioid antinociception in paradoxical sleep-deprived rats are associated with reduced tyrosine hydroxylase staining in the periaqueductal gray matter and are reversed by L-D. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;99(1):94–9.
- 54 Marcos P, Arroyo-Jimenez MM, Lozano G, Aguilar LA, Coveñas R. Mapping of tyrosine hydroxylase in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem and colocalization with CGRP. *J Chem Neuroanat*. 2011;41(2):63–72.
- 55 Meloni EG, Gerety LP, Knoll AT, Cohen BM, Carlezon WA. Behavioral and anatomical interactions between dopamine and corticotropin-releasing factor in the rat. *J Neurosci*. 2006;26(14):3855–63.
- 56 Coenen VA, Schlaepfer TE, Maedler B, Panksepp J. Cross-species affective functions of the medial forebrain bundle—Implications for the treatment of affective pain and depression in humans. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(9): 1971–81.
- 57 Moriya S, Yamashita A, Masukawa D, Setoyama H, Hwang Y, Yamanaka A, et al. Involvement of A13 dopaminergic neurons located in the zona incerta in nociceptive processing: a fiber photometry study. *Mol Brain*. 2020; 13(1):4–7.
- 58 Wang X, Chou XL, Zhang LI, Tao HW. Zona incerta: an integrative node for global behavioral modulation. *Trends Neurosci*. 2020; 43(2):82–7.
- 59 Mitrofanis J. Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience*. 2005;130(1):1–15.
- 60 Essig J, Felsen G. Warning! Dopaminergic modulation of the superior colliculus. *Trends Neurosci*. 2016;39(1):2–4.
- 61 Bolton AD, Murata Y, Kirchner R, Kim SY, Young A, Dang T, et al. A diencephalic dopamine source provides input to the superior colliculus, where D1 and D2 receptors segregate to distinct functional zones. *Cell Rep*. 2015;13(5):1003–15.
- 62 Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 1987; 265(2):242–53.

Fig. S1: Specificity control of the anti-SELENOT immunoreactivity. Tissue sections were incubated with the anti-SELENOT antibody that was previously preabsorbed to the antigenic peptide that served for rabbit immunization. The tissue sections were also incubated with TH antibody (green). Nuclei were colored with DAPI (blue). While no labeling was observed for SELENOT, TH labeling could be observed.

Fig. S2: 3D horizontal views of TH immunostaining in the AP-A2 in adult mouse brain. AP-A2 from adult female WT (a), female SELENOT-knockout (b), male WT (Nes-Cre) (c) and male SELENOT-knockout (d) mouse brains is shown. In each image, TH immunostaining is shown in the left and the 3D counting of neurons is indicated in the right (green dots). Scale bar 200 μm .

Fig. S3: 3D coronal views of TH immunostaining in PAG-A10dc in adult mouse brain. PAG-A10dc from adult female WT (a), female SELENOT-knockout (b), male WT (Nes-Cre) (c) and male SELENOT-knockout (d) mouse brains is shown. In each image, the immunostaining is shown in the left and the 3D counting of neurons is indicated in the right (red dots). Scale bar 200 μm .

Fig. S4: 3D sagittal views of TH immunostaining A11 : projections between the PAG and the ZI-A13 area in adult mouse brain. A11 of female WT (a), female SELENOT-knockout (b), male WT (Nes-Cre) (c) and male SELENOT-knockout (d) mouse brains are shown. In each image, the immunostaining is shown in the left and the 3D counting of neurons is indicated in the right (red dots). Scale bar 200 μm .

Fig. S5: 3D coronal views of TH immunostaining in ZI-A13 nucleus of adult mouse brain. ZI-A13 area from adult female WT (a), female SELENOT-knockout (b), male WT (Nes-Cre) (c) and male SELENOT-knockout (d) mouse brains is shown. In each image, the immunostaining is shown in the left and the 3D counting of neurons is indicated in the right (blue dots). Scale bar 200 μm .

Fig. S6: 3D sagittal views of TH immunostaining in the Hyp-A12-A14-A15 of adult mouse brain. Hyp-A12-A14-A15 from adult female WT (a), female SELENOT-knockout (b), male WT (Nes-Cre) (c) and male SELENOT-knockout (d) mouse brains are shown. In each image, the immunostaining is shown in the left and the 3D counting of neurons is indicated in the right (blue dots). Scale bar 200 μm .

Movies

Movie. 1: Counting TH-positive neurons in adult mice brain and slicing to count these neurons in areas of interest

Movie. 2: TH-positive neurons in the A5, LC-A6 and A7 of WT (Nes-Cre) and SELENOT-knockout brains of adult mice

Movie. 3: TH-positive neurons of the RRF-A8, SN-A9 and VTA-A10 of WT (Nes-Cre) and SELENOT-knockout brains of adult

Figure S1 :

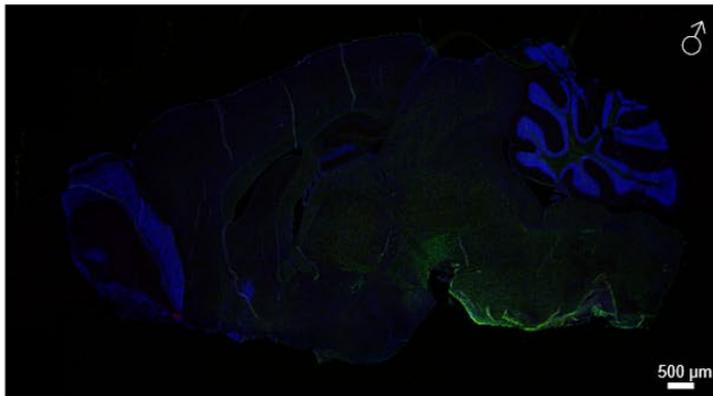


Figure S2 :

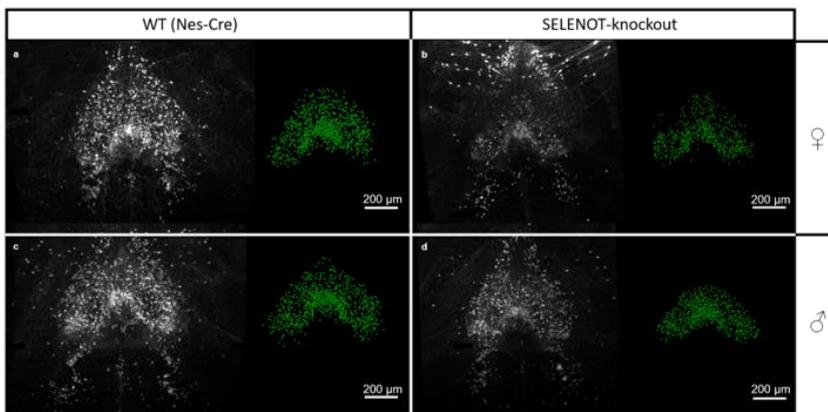


Figure S3 :

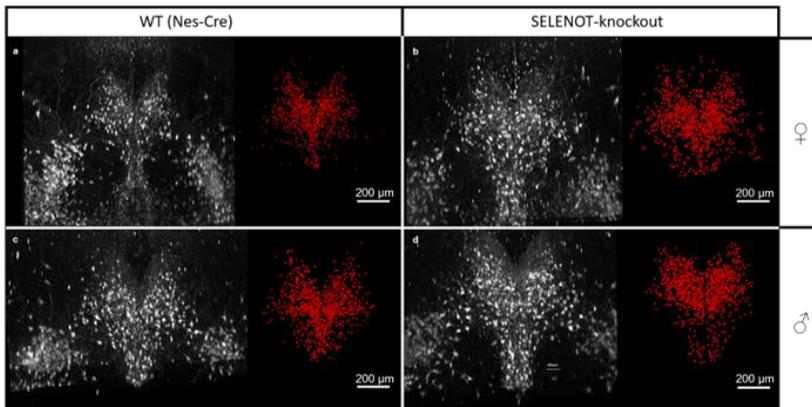


Figure S4 :

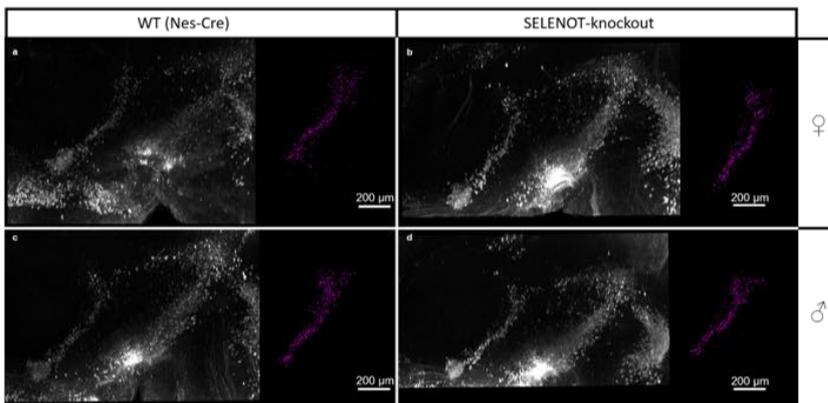


Figure S5 :

Neuroendocrinology DOI: 10.1159/000522091

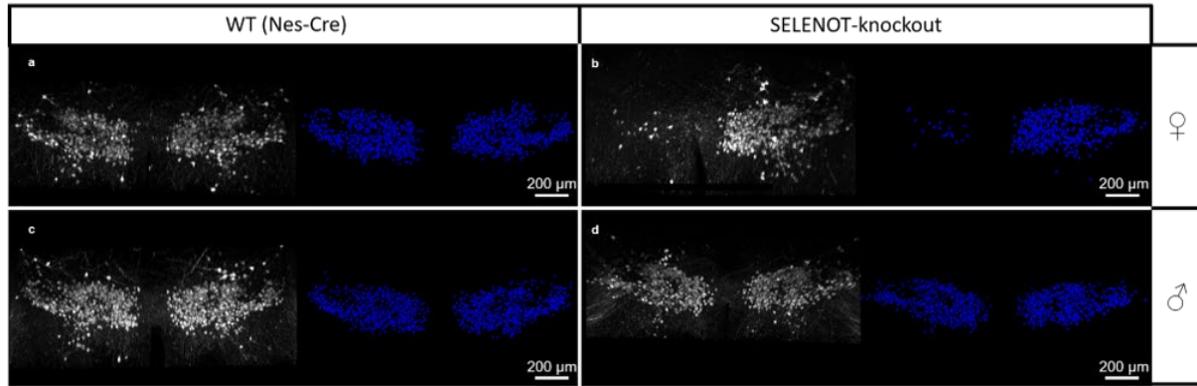
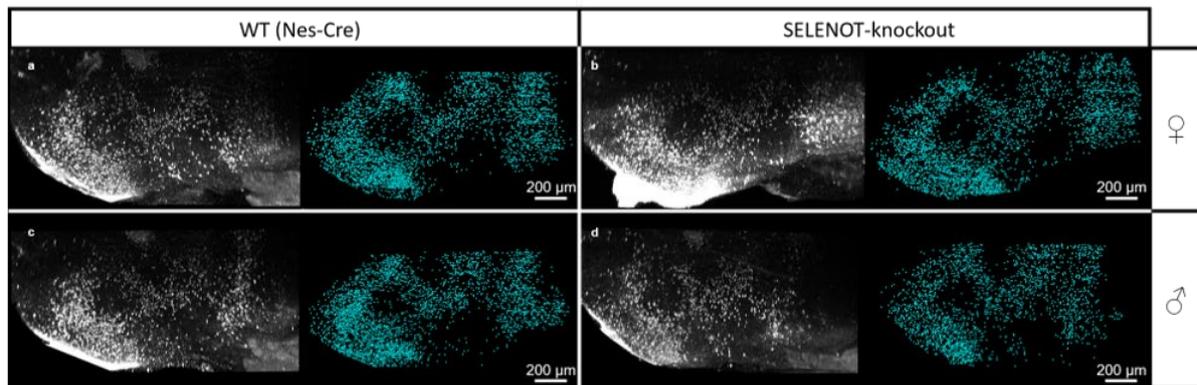


Figure S6 :



Résultats non publiés :**Impact de la SELENOT sur divers comportements chez la souris****Introduction**

La sélénoprotéine T (SELENOT), protéine possédant le motif Cys-x-x-Sec (CXXU), est une protéine contenant un atome de sélénium lui conférant une activité d'oxydo-réductase (Grumolato et al., 2008). La structure du site actif de cette protéine possède des homologies de conformation avec une autre sélénoprotéine, la SELENOW ainsi qu'avec les thiorédoxines. Elle a ainsi été définie comme étant une protéine de type thiorédoxine. La SELENOT est très conservée dans le monde du vivant et son rôle est essentiel pour l'organisme. En effet, l'invalidation totale de cette protéine est létale chez la souris (Boukhzar et al., 2016), ce qui indique son rôle essentiel dans le monde du vivant. Un modèle de souris KO conditionnel a été développé, en invalidant son gène dans les cellules du SNC. Ainsi, le croisement de souris floxées pour le gène de la SELENOT avec des souris exprimant la recombinaison Cre sous le promoteur de la nestine permet d'obtenir ces souris KO SELENOT conditionnelles (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). Ces souris présentent des perturbations comportementales importantes comme l'hyperactivité (Castex et al., 2016), un stress et une peur exacerbés, ainsi que des déficits de reproduction (données non publiées).

Des analyses comportementales ont été effectuées sur les souris KO SELENOT conditionnelles afin de relier les altérations neuroanatomiques du système catécholaminergiques à d'éventuelles altérations comportementales. Les tests d'évaluation de la force musculaire (le grip test), d'analyse de l'activité locomotrice, d'analyse du sommeil (PiezoSleep), de la roue d'activité volontaire, d'analyse de la marche (Digigait) et du conditionnement à la peur spontanée ont ainsi été réalisés sur notre modèle de souris adultes.

Les résultats obtenus montrent que l'invalidation de la SELENOT dans les cellules du SNC entraînent des perturbations comportementales et celles-ci pouvant être différentes suivant le sexe de l'animal. En effet, l'activité locomotrice mesurée montre une hyperactivité essentiellement chez les souris KO SELENOT mâles. Les tests d'évaluation de la force montrent également des perturbations dépendant du sexe de l'animal car les souris KO SELENOT présentent un temps d'atteinte du pic de force musculaire significativement plus court mais avec un pic de force significativement plus faible uniquement chez les souris femelles. Alors que le test d'évaluation du sommeil montre des temps de repos significativement plus court chez les souris KO SELENOT mâles et femelles.

Matériel et méthodes

Les animaux

Pour ces expérimentations, les animaux sont élevés dans des conditions de climat contrôlées avec des cycles jour/nuit de 12 h, et un accès à la nourriture et l'eau *ad libitum*. Les expérimentations sont réalisées sur des animaux adultes de 3 à 12 mois, mâles et femelles. Les souris étudiées sont les souris Nes-Cre/SELENOT^{fl/fl} issues des croisements de souris SELENOT^{fl/fl} avec des souris Tg (Nestin-Cre)1 Kln^{+/-}. Les souris mutantes présentent une invalidation de la protéine d'intérêt dans les cellules du SNC (Boukhzar et al., 2016; Castex et al., 2016). Les témoins étant les souris exprimant la Nes-Cre chez des souris dont le gène de la SELNOT n'est pas floxé.

Les procédures expérimentales

Évaluation de la force musculaire : le grip test

Le *Grip Strength Meter* (UGO Basile, Varese, Italy) piloté par le logiciel DCA est un appareil de mesure permettant de déterminer l'activité musculaire de la souris. Ces fonctions sont évaluées à travers les mesures de la force maximale développée par la souris et par le temps d'atteinte du pic de force maximum de la souris. Ce test complète les tests de comportement à la marche mais aussi les activités locomotrices, permettant de déceler des signes neurotoxiques. Ils donnent des informations complémentaires à l'interprétation des résultats des autres tests cités. Une grille reliée au système de mesure permet d'obtenir les valeurs de la résistance développée par chaque animal.

Analyse de l'activité locomotrice : ALM

Les cages équipées de rayons photoélectriques infrarouges permettent l'enregistrement de l'activité locomotrice des animaux (OMNITECH Electronics Inc, Columbus, OH, USA). Les animaux sont placés individuellement dans une cage et des séquences d'enregistrement de 10 min sur une durée totale d'expérimentation d'une heure sont effectuées avec le logiciel *Fusion SuperFlex*. Durant cette heure d'expérimentation, plusieurs paramètres sont enregistrés : la distance de déplacement, le temps d'immobilité, le nombre et le temps de mouvements et les épisodes d'activité horizontale et verticale. Ce système de stabulation permet l'évaluation de différentes fonctions : le retard moteur, la réponse à la nouveauté, le mécanisme d'habituation, l'exploration, les réponses au stress, l'anxiété, les effets sédatifs, les rythmes

circadiens, etc.... Dans notre étude, ce système est utilisé pour évaluer la réponse à la nouveauté, le mécanisme d'habituation, l'exploration, les réponses au stress et l'anxiété.

Analyse du sommeil : le PiezoSleep

Dans cette étude, le système utilisé pour mesurer les paramètres de sommeil des souris est le *PiezoSleep Wake System* (Signal Solutions LLC, Lexington, KY, USA) piloté par le logiciel *PiezoSleep*. Ce système, contrairement à d'autres, est un système non-invasif, équipé de capteurs permettant d'enregistrer automatiquement plusieurs paramètres de l'animal. Les animaux sont placés de façon individuelle dans chaque cage avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Les mouvements corporels de différentes intensités ainsi que les signaux respiratoires caractéristiques des phases de sommeil ou d'éveil sont enregistrés pendant le temps de l'expérimentation. Pour cette étude, les enregistrements durent 30 h avec des cycles jour/nuit de 12 h respectés. Cette approche permet une évaluation du sommeil chez les animaux, les temps de sommeil total de chaque animal durant l'expérience ainsi que les phases de sommeil dans les périodes diurnes et nocturnes sont discriminés.

Analyse de la marche : le DigiGait

Ce système est un appareil d'analyse d'image haute performance appelé *DigiGait Imaging System for Treadmill gait analysis* (Mouse Specifics Inc, Framingham, MA, USA), adapté pour les analyses spécifiques de la marche forcée. Une quantification spatio-temporelle des indices de la démarche de l'animal, à une vitesse fixée va permettre d'évaluer les potentiels déficits locomoteurs de l'animal. Une locomotion perturbée peut être le reflet d'une pathologie du SNC ou système nerveux périphérique, des phénomènes douloureux, des pathologies neuromusculaires, des pathologies ostéoarticulaires, la prise de médicament ou encore le vieillissement. Le *DigiGait* permet de filmer par dessous les animaux qui évoluent sur un tapis roulant à une vitesse donnée permettant d'obtenir une empreinte numérique de chaque patte qui sera analysée via le logiciel dédié, *DigiGait Imaging*. Cette analyse permet d'obtenir des données quantifiables de la posture et de la cinématique reflétant la force, l'équilibre et la coordination de l'animal.

Conditionnement à la peur spontanée

Les souris vont être placées dans des cages insonorisées permettant l'évaluation des sursauts des animaux suite à un signal sonore (BIOSEB, Vitrolles, France). Elles sont placées

pendant 15 min d'habituation avant le début des enregistrements des réactions suite à la survenue d'un évènement acoustique. Après cet évènement déclenchant une réponse de peur spontanée, des capteurs dans la cage mesurent via le logiciel *Startfear* le comportement des animaux en particulier les temps de « *freezing* », et d'activité d'exploration, avant et après l'évènement sonore.

Roue d'activité volontaire

La roue d'activité volontaire (INTELLIBIO SARL, Seichamps, France) est une roue mise à la disposition de l'animal dans la cage et pour une utilisation à volonté. Pendant l'utilisation par la souris, des paramètres particuliers sont enregistrés via le logiciel *ActiviWheel*. La souris utilise la roue d'activité de façon volontaire et autonome, pendant une durée de temps non déterminée par l'expérimentateur et ce sur une période de quatre jours. Durant cette période, un enregistrement du temps de rotation, de la vitesse de rotation, du sens de rotation et des accélérations sera réalisé. L'activité volontaire étant considérée comme un jeu, ces enregistrements permettent de mesurer des activités liées au plaisir de l'animal.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 9.0.0.

Résultats

L'absence de la SELENOT dans le SNC affecte la force musculaire chez la souris

L'évaluation de la force musculaire a été réalisée sur des groupes de souris mâles et femelles. Les résultats obtenus montrent que les souris femelles SELENOT-déficientes conditionnelles (n=15) développent un pic de force significativement plus faible que les souris femelles WT-Cre (n=12) avec respectivement 132.0 ± 23.5 grammes.force (gf) et 192.8 ± 23.9 gf, $p < 0.0001$ (Fig. 1-A). Cette différence de pic de force développée n'est pas retrouvée chez les souris mâles puisque les souris KO SELENOT conditionnelles (n=9) et les souris WT-Cre (n=12) présentent des valeurs de mesure de ce paramètre respectivement de 181.8 ± 49.5 gf et 169.8 ± 19.4 gf (Fig. 1-A). Le temps pour atteindre le pic de force est significativement plus faible chez les souris KO SELENOT conditionnelles des deux sexes. Les souris mâles KO SELENOT (n=9) et les souris WT-Cre (n=12) présentent des valeurs de mesure de ce paramètre respectivement de, 0.6 ± 0.2 sec et 1.0 ± 0.1 sec, $p < 0.0041$ (Fig. 1-B), et les souris femelles KO

SELENOT (n=15) et les souris WT-Cre (n=12) présentent des valeurs de mesures de ce paramètre respectivement de 0.5 ± 0.1 sec et 0.8 ± 0.2 sec, $p < 0.0346$ (Fig. 1-B).

Impact de l'absence de SELENOT sur l'activité locomotrice

Huit paramètres locomoteurs ont été mesurés pendant une heure d'expérimentation : la distance totale qui représente la distance totale parcourue par l'animal avec comme référence le centroïde de l'animal, l'activité horizontale qui représente le nombre de coupures des faisceaux des capteurs, le temps d'immobilité qui représente la durée passée par l'animal au repos, le repos étant défini comme une période d'inactivité égale ou supérieur à 1 sec, le temps de mouvement qui représente la durée passée par l'animal en activité avec l'activité définie comme une période de marche de l'animal, le nombre d'épisode de mouvement qui représente le nombre total d'épisodes locomoteur avec chaque épisode locomoteur séparé par une période de repos d'au moins 1sec, le nombre d'activité verticale qui représente le nombre de fois où l'animal se cabre sachant que l'animal doit descendre au moins 1sec sous le niveau du capteur vertical pour que le cabrage suivant puisse être comptabilisé, le nombre d'épisodes verticaux qui représente le nombre de fois où le faisceau vertical est coupé, le temps de mouvement vertical qui représente le temps accumulé par l'animal ayant un mouvement dans la direction verticale. Les résultats représentés dans la figure 2 montrent des paramètres locomoteurs significativement différents entre les souris KO conditionnelles et les souris WT-Cre.

Chez les animaux mâles (Fig. 2-A), la distance totale, sur une heure d'enregistrement, est significativement plus importante chez les souris KO SELENOT que chez les souris WT-Cre, 6378 ± 424 cm, n= 9 vs 4825 ± 191 cm, n= 8, $p < 0.05$. Cette distance totale parcourue est significativement plus importante durant les premières séquences d'enregistrement, de 0-10 min (1480 ± 100 cm, n= 9 vs 1154 ± 43 cm, n= 8, $p < 0.001$), de 10-20 min (1342 ± 106 cm, n= 9 vs 872 ± 48 cm, n= 8, $p < 0.001$), de 20-30 min (1084 ± 72 cm, n= 9 vs 769 ± 38 cm, n= 8, $p < 0.001$). L'activité horizontale sur une heure d'enregistrement est significativement plus importante chez les souris KO SELENOT que chez les souris WT-Cre, 12228 ± 797 , n= 9 vs 10012 ± 490 , n= 8, $p < 0.05$, cette activité horizontale parcourue est significativement plus importante durant les premières séquences d'enregistrement, de 0-10 min (2737 ± 197 , n= 9 vs 2109 ± 127 , n= 8, $p < 0.05$), de 10-20 min (2340 ± 150 , n= 9 vs 1739 ± 90 , n= 8, $p < 0.01$), de 20-30 min (2046 ± 131 cm, n= 9 vs 1589 ± 92 , n= 8, $p < 0.05$). Le temps d'immobilité sur une heure d'enregistrement est significativement plus important chez les souris WT-Cre que chez les souris KO SELENOT, 1201 ± 59 sec, n= 8 vs 900 ± 58 sec, n= 9, $p < 0.01$. Ce temps

d'immobilité est significativement plus important durant les premières séquences d'enregistrement, de 0-10 min (137 ± 6 sec, $n= 8$ vs 90 ± 10 sec, $n= 9$, $p<0.01$), de 10-20 min (185 ± 14 sec, $n= 8$ vs 114 ± 7 sec, $n= 9$, $p<0.01$), de 20-30 min (211 ± 14 sec, $n= 8$ vs 144 ± 11 sec, $n=9$, $p<0.01$). Le temps de mouvement sur une heure d'enregistrement est significativement plus important chez les souris KO SELENOT que chez les souris WT-Cre, 2699 ± 58 sec, $n= 9$ vs 2398 ± 59 sec, $n= 8$, $p<0.01$. Ce temps de mouvement est significativement plus important durant les premières séquences d'enregistrement, de 0-10 min (509 ± 10 sec, $n= 9$ vs 462 ± 6 sec, $n= 8$, $p<0.01$), de 10-20 min (485 ± 7 sec, $n= 9$ vs 414 ± 15 sec, $n= 8$, $p<0.01$), de 20-30 min (455 ± 11 sec, $n= 9$ vs 388 ± 14 sec, $n=8$, $p<0.01$). Le nombre d'épisode de mouvement sur une heure d'enregistrement est significativement plus important chez les souris WT-Cre que chez les souris KO SELENOT, 650 ± 24 , $n= 8$ vs 532 ± 28 , $n= 9$, $p<0.01$. Ce nombre d'épisode est significativement plus important durant les premières séquences d'enregistrement, de 0-10 min (87 ± 3 , $n= 8$ vs 59 ± 7 , $n= 9$, $p<0.01$), de 10-20 min (110 ± 6 , $n= 8$ vs 74 ± 4 , $n= 9$, $p<0.001$). Les mesures des événements verticaux montrent une différence significative avec un temps de mouvement vertical plus important chez les souris WT-Cre que chez les souris KO SELENOT durant la séquence d'enregistrement 30-40 min, 53 ± 5 , $n= 9$ vs 37 ± 4 , $n= 8$, $p<0.05$. Les autres paramètres mesurés ne sont pas significativement différents entre les deux types d'animaux.

Chez les animaux femelles, aucune des mesures effectuées sur l'ensemble de l'heure d'enregistrement ne présente de différences significatives (Fig. 2-B). Seulement quelques séquences d'enregistrement présentent des résultats significativement différents. En effet, la distance totale parcourue est significativement plus importante pour les souris KO SELENOT comparées aux souris WT-Cre durant la première séquence d'enregistrement, de 0-10 min (1397 ± 73 cm, $n= 10$ vs 1098 ± 63 cm, $n= 10$, $p<0.05$). Le nombre d'épisodes de mouvements est significativement plus important pour les souris WT-Cre comparées aux souris KO SELENOT durant la quatrième séquence d'enregistrement, de 30-40 min (121 ± 6 , $n= 10$ vs 105 ± 2 , $n= 10$, $p<0.01$). Le temps de mouvements verticaux est plus important chez les souris WT-Cre que chez les souris KO SELENOT durant la séquence d'enregistrement 50-60 min (55 ± 9 , $n= 10$ vs 23 ± 7 , $n= 10$, $p<0.01$).

Impact de l'absence de SELENOT sur le temps de sommeil

À partir des mesures réalisées de manière individuelle sur chaque souris et de façon non invasive en utilisant des cages *PiezoSleep*, le pourcentage de temps de sommeil a été quantifié.

Cette quantification est faite pour les temps de sommeil totaux sur l'ensemble de l'expérimentation, incluant les phases diurnes et nocturnes. Les résultats obtenus montrent une baisse significative des pourcentages totaux de temps de sommeil chez les souris mâles KO SELENOT par rapport au souris mâles WT-Cre (37.51%, n=9 vs 33.31%, n= 8, $p<0.01$) et chez les souris femelles KO SELENOT par rapport aux souris femelles WT-Cre (37.64%, n=9 vs 33.19%, n=10, $p<0.01$). Cette baisse significative est retrouvée sur les phases de sommeil nocturnes, avec 25.41% de sommeil chez les souris mâles KO SELENOT (n=8) et 32.60% chez les souris mâles WT-Cre (n=9). Les souris femelles montrent aussi une baisse significative de sommeil chez les KO SELENOT et de sommeil chez les WT-Cre (31.43%, n=9 vs 24.82%, n=10, $p<0.001$). La phase de sommeil diurne ne présente pas de perturbation du pourcentage de sommeil entre les souris mâles KO SELENOT et les souris mâles WT-Cre (46.84%, n=9 vs 48.29%, n= 8, $p>0.05$), ni entre les souris femelles KO SELENOT et les souris femelles WT-Cre (48.88%, n=9 vs 50.25%, n=10, $p>0.05$).

Impact de l'absence de la SELENOT sur la marche, le conditionnement à la peur spontanée et la roue d'activité volontaire

Les résultats obtenus avec ces trois dispositifs n'ont pas montré de résultats significativement différents entre les souris KO SELENOT et les souris WT-Cre. Il est tout de même important de noter qu'il a été impossible d'analyser les images de la marche pour les souris mâles KO SELENOT, qui ont été incapables d'initier une séquence de marche forcée sur une période d'enregistrement suffisante. Cette impossibilité de marche forcée montre néanmoins un défaut de comportement des souris mâles KO SELENOT.

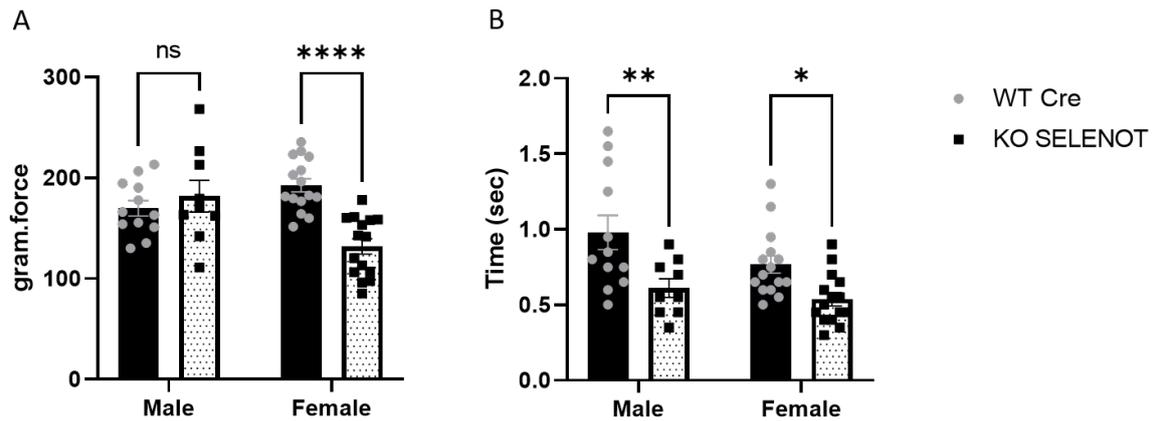


Figure 1 :

Quantification de la force musculaire des animaux. (A) Représentation des valeurs des pics de force en gramme force, développées par les souris avec pour les souris mâles KO SELENOT un pic de force de 181.8 ± 49.5 gf (n=9) et pour les souris mâles WT-Cre 169.8 ± 49.5 gf (n=12), pour les souris femelles KO SELENOT 132.0 ± 23.5 gf (n=15) et pour les souris femelles WT-Cre 192.8 ± 23.9 gf (n=15). (B) Représentation des valeurs du temps pour atteindre le pic de force en seconde avec pour les souris mâles KO SELENOT un temps de 0.6 ± 0.2 sec (n= 9) et pour les souris mâles WT-Cre 1.0 ± 0.1 sec (n=12), pour les souris femelles KO SELENOT 0.5 ± 0.1 sec (n=15) et pour les souris femelles WT-Cre 0.8 ± 0.1 sec (n=15). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, le test statistique utilisé est two-way ANOVA Bonferoni's *post hoc*, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.00001$.

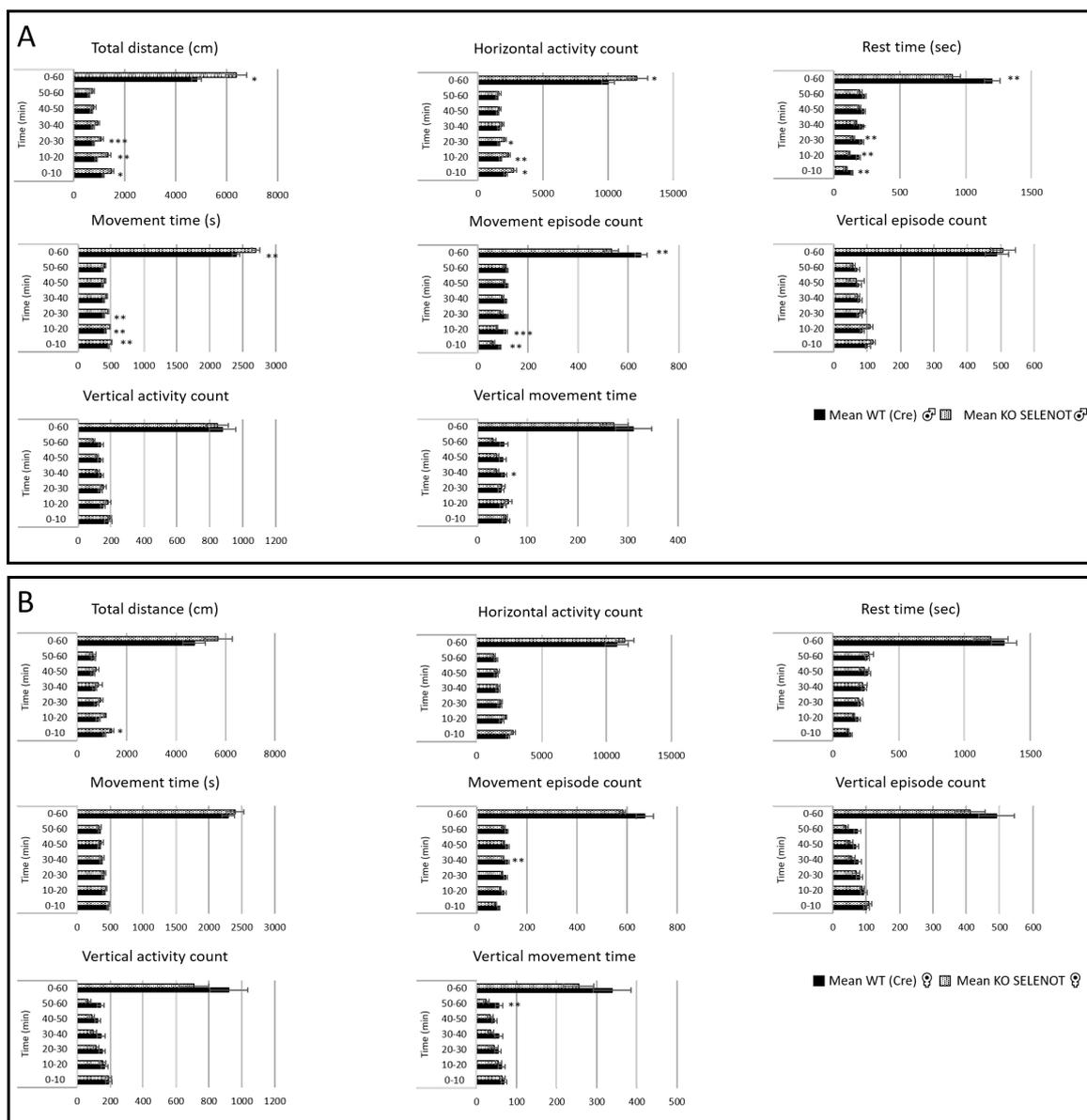


Figure 2 :

Mesure de l'activité motrice des souris SELENOT-déficientes et des souris WT-Cre. Quantification de l'activité locomotrice des souris avec l'enregistrement de séquences de 10 min pendant une heure des huit paramètres suivants : la distance totale, l'activité horizontale, le temps d'immobilité, le temps de mouvement, le nombre d'épisode de mouvement, le nombre d'activité verticale, le nombre d'épisodes verticaux et le temps de mouvement vertical. (A) Résultats des mesures de paramètres chez les souris mâles. (B) Résultats des mesures de paramètres chez les souris femelles. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, le test statistique utilisé est un test nonparamétrique Mann-Whitney, * $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$ et *** , $p < 0.001$.

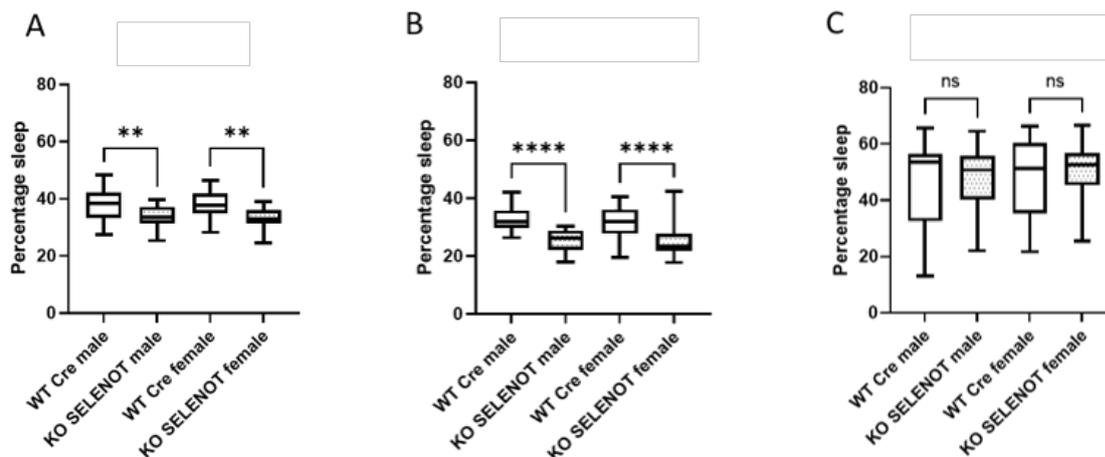


Figure 3 :

Temps de sommeil des souris SELENOT-déficientes et des souris WT-Cre. (A) Pourcentages des temps de sommeil sur le temps total de l'expérience, avec 33.31% du temps de sommeil chez les souris mâles KO SELENOT (n=8), 37.51% du temps de sommeil chez les souris mâles WT-Cre (n=9), 33.19% du temps de sommeil chez les souris femelles KO SELENOT (n=10) et 37.64% chez les souris femelles WT-Cre (n=9). (B) Résultat des pourcentages des temps de sommeil sur la phase nocturne de l'expérience, avec 25.41% du temps de sommeil chez les souris mâles KO SELENOT (n= 8), 32.60% du temps de sommeil chez les souris mâles WT-Cre (n=9), 24.82% du temps de sommeil chez les souris femelles KO SELENOT (n=10) et 31.43% chez les souris femelles WT-Cre (n=9). (C) Résultat des pourcentages des temps de sommeil sur la phase diurne de l'expérience, avec 48.29% du temps de sommeil chez les souris mâles KO SELENOT (n=8), 46.84% du temps de sommeil chez les souris mâles WT-Cre (n=9), 50.25% du temps de sommeil chez les souris femelles KO SELENOT (n=10) et 48.88% chez les souris femelles WT-Cre (n=9). Les données sont exprimées en pourcentage, le test statistique utilisé est one-way ANOVA Tukey comparaisons multiples, **, p<0.01 ; ****, p<0.00001

Conclusion et discussion

Les résultats des différents tests comportementaux montrent des anomalies chez les souris présentant une invalidation de la SELENOT au niveau du SNC. Dans cette étude, les tests sont réalisés sur des groupes de souris mâles et femelles afin de déterminer si les anomalies de comportement sont retrouvées de façon équivalente dans les deux sexes.

Un seul des comportements étudiés montre des perturbations similaires dans les deux sexes. En effet, le sommeil est diminué chez les souris KO SELENOT dans les deux sexes. Les résultats montrent un pourcentage du temps de sommeil total des souris KO SELENOT, mâles et femelles, significativement plus faible que celui des souris WT-Cre. L'impact sur le pourcentage du temps de sommeil diffère entre les phases nocturnes et diurnes. Seules les phases

nocturnes sont impactées et montrent une baisse significative du pourcentage de sommeil chez les animaux KO SELENOT.

La force musculaire est aussi affectée par la délétion de la SELENOT dans les cellules du SNC, mais cette délétion a des conséquences différentes suivant le sexe de l'animal. Dans cette étude, la force musculaire est caractérisée de deux manières : 1) le pic de force développé par l'animal et 2) le temps pour atteindre le pic de force. Les résultats montrent que chez le modèle de souris KO SELENOT, le temps pour atteindre le pic de force est plus court chez les souris KO SELENOT. En revanche, le pic de force n'est pas impacté de la même manière suivant le sexe de l'animal. En effet, les souris femelles KO SELENOT présentent un pic de force significativement plus faible que les souris WT-Cre, cette différence n'est pas retrouvée chez les souris mâles.

Les expérimentations d'activité locomotrice montrent également des perturbations chez les souris KO SELENOT. Les souris mâles présentent plus d'évènements de locomotion significativement différents que les souris femelles. Sur une heure d'expérimentation la distance parcourue, l'activité horizontale, le temps de mouvement et le nombre d'épisodes de mouvement sont significativement plus importants alors que le temps d'immobilité est significativement plus faible chez les souris mâles KO SELENOT. Les souris mâles KO SELENOT montrent des perturbations dans ces caractéristiques comportementales dans les premières phases de l'expérimentation jusqu'à la 30^{ème} min d'enregistrement. Les valeurs de mesures de l'activité verticale ne sont en revanche pas altérées. Contrairement aux mâles, les souris femelles ne présentent pas sur l'ensemble de l'expérimentation de différences significatives, malgré des mesures significatives différentes pour quelques courtes séquences d'enregistrement de 10 min, des mesures de distance parcourue, du nombre d'épisode de mouvement ou du temps de mouvement vertical.

Les tests de la roue volontaire, de la peur spontanée et de l'analyse de la marche (Digigait) n'ont montré aucune différence chez les souris KO SELENOT. Il est important de noter que l'analyse de la marche n'a pu être effectuée que sur les souris KO SELENOT femelles, les mâles étant fortement perturbés et ne permettant pas de réaliser les enregistrements nécessaires pour obtenir un nombre d'images suffisant pour extraire des données quantifiables.

Ces résultats montrent que l'inactivation de la protéine SELENOT au cours de l'embryogénèse des cellules du SNC, après l'expression de la Cre sous le promoteur de la nestine, a un impact important sur le comportement des souris à l'âge adulte. Le rôle de la SELENOT n'est que partiellement connu mais il est aujourd'hui admis que cette protéine joue

un rôle dans la protection contre le stress oxydant, dans le contrôle de la conformation protéique, dans la sécrétion hormonale et dans la N-glycosylation, ces activités étant probablement connectées entre elles (Anouar et al., 2018). Nous avons montré précédemment qu'au niveau du SNC l'invalidation de la SELENOT a des conséquences importantes sur la distribution des cellules catécholaminergiques. En effet, l'absence de SELENOT entraîne une baisse du nombre de neurones catécholaminergiques dans certaines cérébrales localisation précises telles que l'area postrema, la région A11, la zona incerta, et l'hypothalamus (Godefroy et al., 2022). Ces altérations neuroanatomiques pourraient expliquer en partie les manifestations comportementales constatées dans cette étude.

Bibliographie

- Anouar Y, Lihmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. 2018. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* **127**: 145–152.
- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, Hajji S El, 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. *Antioxidants Redox Signal* **24**: 557–574.
- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet JJ, Anouar Y, Falluel-Morel A. 2016. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* **53**: 5818–5832.
- Godefroy D, Boukhzar L, Mallouki BY, Carpentier E, Dubessy C, Chigr F, Tillet Y, Anouar Y. 2022. SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study. *Neuroendocrinology*: 1–15.
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, et al. 2008. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* **22**: 1756–1768.

Discussion

I. Le SNC, rôles primordiaux des sélénoprotéines pour cet organe

Le cerveau est un organe soumis à de nombreux facteurs de stress, son extrême oxygénation le rend particulièrement sensible au stress oxydatif. Pour s'en prémunir les cellules qui le composent doivent posséder les protéines essentielles à sa protection. Les sélénoprotéines sont des protéines essentielles pour assurer ces fonctions de protection et d'homéostasie cellulaire. Dans le cerveau, les sélénoprotéines les plus abondantes sont la GPX4, la SELENOW, la SELENOI, la SELENOF, la SELENOK, la SELENOM, la SELENOO et la SELENOT ; elles sont majoritairement localisées dans le RE. Les sélénoprotéines du RE sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie, du contrôle qualité des protéines, du repliement des glycoprotéines, de l'équilibre redox, des voies de signalisation et de la réponse au stress du RE. Un défaut de ces différentes fonctions peut conduire à la dégénérescence axonale et entraîner une mort progressive des neurones (Jehan et al., 2022). Le cerveau est l'un des organes le mieux protégé en cas de carence en sélénium, ce qui démontre l'importance des sélénoprotéines pour celui-ci. Les premières preuves de l'importance des sélénoprotéines au niveau du SNC ont été apportées suite à la génération de souris invalidées en SELENOP. En effet, cette invalidation de la SELENOP chez les souris entraîne des altérations neurologiques importantes, y compris des crises d'épilepsie, des mouvements altérés avec ataxie et/ou dystonie, de la neurodégénérescence avec mort prématurée, ou mort avant sevrage (Schweizer et al., 2021). Cependant, la SELENOP étant la sélénoprotéine de stockage du sélénium, les conséquences phénotypiques sur le modèle de souris KO SELENOP dépendent directement de la composition de la nourriture supplémentée ou non avec du sélénium (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003).

Plus généralement, le sélénium est un élément indispensable pour la plupart des organismes vivants, et son absence ou carence entraîne de nombreuses pathologies tels que des maladies cardiaques, des troubles neuromusculaires, des cancers, de l'infertilité masculine, des problèmes inflammatoires (Labunskyy et al., 2014). Les recherches dans ce domaine ont beaucoup progressé, de nombreuses études montrent l'importance des sélénoprotéines dans les diverses fonctions biologiques, dont les fonctions neurologiques (Schweizer et al., 2021) avec des rôles physiologiques clés dans la régulation du système redox et antioxydant. Autres exemples, la glutathion peroxydase inactive et piège les peroxydes lipidiques et hydrogéniques, ou la thiorédoxine réductase qui réduit les thiorédoxines oxydées telles que les hydroperoxydes lipidiques et le peroxyde d'hydrogène (Zhang et al., 2020).

Certaines pathologies sont décrites comme étant directement liées à des mutations de certaines sélénoprotéines, la mutation de la SELENON entraîne des troubles de type myopathie, celle de la glutathione peroxydase conduit à des anomalies osseuses et des troubles respiratoires, ou encore des mutations de la sélénocysteine synthase provoque des troubles du développement neurologique (Schweizer and Fradejas-Villar, 2016).

La SELENOT, sélénoprotéine d'intérêt dans ce projet de recherche, fait partie du sélénoprotéome qui se compose de 25 protéines dans l'espèce humaine (Kryukov et al., 2003). Cette sélénoprotéine, comme toutes les sélénoprotéines, possède un acide aminé ayant dans sa composition du sélénium. Localisée dans le RE, la SELENOT possède un site CXXU, ce motif représente un site retrouvé dans la plupart des sélénoprotéines à activité redox (Labunskyy et al., 2014), il est également présent dans des protéines de type thiorédoxine (CXXC) qui ont une activité redox, comme les thiorédoxines, les glutarédoxines et les disulfides isomérases (Dikiy et al., 2007). Ce motif est important pour l'activité des sélénoprotéines, notamment dans celles de type thiorédoxine agissant comme les GPx, exemple de la SELENOH (Dikiy et al., 2007) ou encore avec des activités de type protéines chaperonnes pour le repliement protéique comme les SELENOW et SELENOF (Labunskyy et al., 2014). Les travaux menés dans notre équipe de recherche ont démontré une activité de type thiorédoxine de la SELENOT, à partir de la protéine recombinante produite chez *Escherichia coli* avec le remplacement de la Sec par une Cys. En effet, l'activité d'oxydoréductase en présence de NADPH est maintenue, la réduction d'un substrat oxydé reste possible et est inhibé par l'aurothiomalate, inhibiteur spécifique des thiorédoxines, par contre l'activité de type GPx de la SELENOT n'est pas retrouvée (Boukhzar et al., 2016). La SELENOT serait un élément du système thiorédoxine qui compléterait au niveau du RE le système présent dans le cytoplasme et dans les mitochondries (Lee et al., 2013). Ces propriétés physico-chimique de la SELENOT ont amené les chercheurs à la définir comme une sélénoprotéine de type *thioredoxine-like* (Anouar et al., 2018). Ainsi, la SELENOT représenterait un élément important du système thiorédoxine cellulaire qui est essentiel au développement embryonnaire comme indiqué par la létalité embryonnaire des souris invalidées pour le gène de la SELENOT, tout comme ceux des souris invalidées pour les TrxR (Conrad et al., 2004 ; Jakupoglu et al., 2005). La SELENOT fait donc partie des sélénoprotéines essentielles pour le neurodéveloppement et a de nombreuses fonctions pour le maintien du système neurologique (Castex et al., 2016). Facteur important lors de l'ontogénèse, la SELENOT est retrouvée de façon ubiquitaire chez l'embryon avec des taux d'expression plus importants aux stades précoces du développement, et aussi dans de nombreux organes ayant

des fonctions endocrines ou neuroendocrines dans les stades adultes (cerveau, thymus, pancréas, hypophyse, testicule ...). Au niveau du SNC, la SELENOT est retrouvée dans plusieurs types cellulaires identifiés avec les marqueurs S100, doublecortine, nestine, calbindine, CgA, CgB et GFAP (Tanguy et al., 2011). Afin d'étudier les fonctions de la SELENOT dans un organisme complexe, un premier modèle de souris KO SELENOT conditionnelle ne touchant que les cellules neuronales et gliales du SNC a été développé au laboratoire. Ce modèle obtenu par croisement de souris Nestine-Cre avec des souris dont le gène de la SELENOT a été floxé est viable et bien que ne présentant pas de phénotype particulier à la naissance, les animaux KO SELENOT conditionnels vont avoir dans la première semaine de vie post-natale un volume de l'encéphale significativement réduit avec une réduction de taille de l'ordre de 21% pour le cervelet par exemple (Castex et al., 2016), d'autres régions du SNC, comme le striatum, présentent également des réductions du volume plus limitées. Cette diminution du volume de certaines zones du cerveau est compensée à l'âge adulte (Castex et al., 2016). Ces résultats suggèrent que la SELENOT pourrait influencer la mise en place de processus cellulaires essentiels au bon développement du SNC. Malgré cette compensation, le modèle de souris KO SELENOT conditionnelles présente à l'âge adulte des phénotypes comportementaux tel que l'hyperactivité (Castex et al., 2016), des déficits de reproduction, des troubles du sommeil (données non publiées). Sur des modèles pathologiques de souris avec injection de neurotoxiques, des études montrent une sensibilité plus importante des neurones dopaminergiques et suggèrent le rôle neuroprotecteur de la SELENOT sur ce type de cellules du SNC (Boukhzar et al., 2016; Shao et al., 2019; Alsharif et al., 2021). La SELENOT semble être une protéine importante pour les neurones de type catécholaminergique.

II. Une approche d'imagerie globalisée pour étudier le système catécholaminergique

Dans une première partie du projet de thèse, nous avons décrit comment en utilisant les principes de l'immunomarquage *in toto*, associé à une technique de « transparisation » et de microscopie à feuille de lumière, il est possible de créer un atlas tridimensionnel d'un système neurobiologique complexe. Ceci sur l'ensemble de l'embryon de souris à partir du stade de développement E10.5 jusqu'au stade de développement E13.5, et sur des organes individualisés comme le cerveau ou la glande surrénale pour les stades de développement suivants jusqu'à l'âge adulte de l'animal.

Nous avons ainsi décrit une approche optimisée permettant de caractériser en 3D l'anatomie du système catécholaminergique, au cours de différents stades de développement des souris jusqu'au stade adulte. Le système catécholaminergique est formé par trois types de neurones à savoir les neurones dopaminergiques, noradrénergiques et dans une moindre mesure adrénérgiques. Les premières descriptions du développement de ce système réalisées par Smeets et Reiner en 1994, sont des descriptions parcellaires, à certains stades du développement et focalisées sur des zones neuroanatomiques précises (Smeets and Reiner, 1994). Notre étude confirme les descriptions issues de ces nombreuses études histologiques précédentes décrivant la mise en place du système catécholaminergique (Golden, 1973; Olson et al., 1973; Specht et al., 1981; Stuesse et al., 1991; Zecevic and Verney, 1995; Son et al., 1996; Puellas and Verney, 1998; Bhat and Ganesh, 2017). Toutefois grâce à notre approche 3D, l'observation de l'ensemble de l'échantillon permet de voir la simultanéité et la processivité de l'émergence de chaque groupe de cellules CA lors des étapes du développement. En effet cette technique de microscopie permet d'avoir des données sur l'expansion des neurones au cours du développement mais aussi une quantification du nombre de cellules qui expriment la TH. De plus, les notions de maturation, de migration et de connectivité de régions deviennent observables en 3D ce qui améliore la compréhension de l'organisation du système étudié. À partir des données tridimensionnelles sur la localisation des cellules et des voies neuronales exprimant la TH, un atlas a été élaboré. Il décrit l'apparition, la migration, les processus d'apposition de groupes cellulaires et de noyaux tout au long du développement. Il donne un aperçu de la façon dont les neurones catécholaminergiques du télencéphale, du diencéphale et du mésencéphale, ainsi que les systèmes nerveux sensoriel, autonome et entérique se développent dans le temps les uns par rapport aux autres. L'accessibilité à l'intégralité des informations d'un échantillon ouvre la possibilité de se focaliser sur une zone d'intérêt particulière, en isolant celle-ci par dissection numérique. Cette étude décrit plusieurs zones anatomiques durant leur développement, ainsi que la temporalité de leur mise en place. Trois zones anatomiques du SNC, la ZI-A13, la SN-A9/VTA-A10, le LC-A6 et la glande surrénale qui fait partie du système nerveux périphérique sont décrites pour les stades de développement allant de E10.5 jusqu'au stade adulte. Les résultats montrent qu'au cours du développement de la souris, l'expression de la TH est asynchrone. Alors que dans les premiers stades E10.5 et E11.5, la VTA-A10 et le LC-A6 montrent une expression de cette enzyme, celle-ci n'est pas observable dans la ZI-A13 et la glande surrénale. Le stade E12.5 du développement du système catécholaminergique est défini comme une étape clé car il correspond à un stade où l'expression

de la TH est présente dans toutes les structures étudiées. Un autre aspect qui est mis en évidence est la maturation des structures qui semble également plus ou moins avancée suivant le stade de développement de l'animal. Par exemple, au stade P4, les structures du SNC présentent une forme mature, alors que la médullosurrénale ne semble pas complètement formée à ce stade post-natal. Les cellules chromaffines, TH-positives, sont encore observées en dehors de la zone médullaire. Ces observations complètent les données décrites sur ces structures. Ainsi, la ZI-A13, décrite par Auguste Forel, est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme le contrôle de l'activité viscérale, les fonctions d'éveil et d'attention, de locomotion et dans l'intégration de l'émotion et de son traitement (Chou et al., 2018). Cette zone se compose de différents types neuronaux incluant les neurones exprimant la parvalbumine, le monoxyde d'azote synthase, le GABA, le glutamate et la somatostatine. Le type neuronal d'intérêt de l'étude sont les neurones catécholaminergiques ; ceux-ci forment une des sous-régions de la zona incerta en lien avec plusieurs zones anatomiques du cerveau tels que le cortex, le cervelet, le thalamus, le tronc cérébral, la moelle épinière, les ganglions de la base, l'amygdale, le télencéphale et l'hypothalamus (Mitrofanis, 2005). L'apport de l'imagerie 3D permet de visualiser des projections axonales quelles que soient leurs directions, comme celles visibles dans la ZI-A13 se dirigeant vers le *medial forebrain bundle* (MfB), MfB lui-même issu de la projection des neurones de la SN-A9/VTA-A10 vers le striatum. Nous avons également montré qu'avec cette approche, l'analyse des organes périphériques est possible. Il est admis que la formation de la médullosurrénale se fait à partir de la migration des sympathoblastes de la crête neurale vers la surrénale, qui lors des premiers stades du développement vont former l'ébauche adrénomédullaire. Les approches classiques d'histologie ne permettent pas d'obtenir facilement des images de l'établissement des cellules issues de la notocorde s'établissant dans la glande surrénale, ce que nous avons pu visualiser via cette approche. Nous constatons que les cellules TH de la médullosurrénale migrent et se rassemblent dans un seul et même processus et ceci sous l'influence de différents signaux qui vont avoir une action après le passage à proximité de structures organisatrices. La vision globalisée de l'expression de la TH montre qu'elle se fait dans le même temps, pour les neurones sympathiques et les neurones sensoriels, au niveau des ganglions de la racine dorsale, bien que cette expression dans ces dernières diminue au court du développement (Gootman, 1986; Björklund et al., 1992; Weihe et al., 2005). Dans le domaine de la biologie du développement du système cathécholaminergique, cette approche ouvre de nombreuses perspectives et permet d'envisager des réponses à des questionnements toujours actuels. Par exemple, à quels stades de migration/d'extension d'autres « caractères »

des axones catécholaminergiques sont exprimés, notamment le transporteur vésiculaire de monoamine 1/2, la décarboxylase d'acides aminés L aromatiques, la dopamine beta-hydroxylase et la phényléthanolamine N-méthyltransférase ? À quelles étapes le nombre de corps cellulaires est-il établi et les processus secondaires commencent-ils ? Comment le développement simultané des neurones TH dans divers compartiments est lié aux facteurs de transcription qui contrôlent l'expression TH (par exemple MASH1, Phox2a/b) ? Quelle est la relation entre la maturation des cibles et les projections vers les cibles ? Comment les phénotypes des connexions afférentes et efférentes et le milieu local influencent-ils le développement et la fonction catécholaminergique ? Mais ces perspectives ne restent pas fermées aux seuls questionnements liés au neurodéveloppement. Les réponses sont aussi des pistes très importantes pour la compréhension de la neurodégénérescence chez l'adulte et pour comprendre pourquoi et comment les facteurs de risque peuvent avoir des conséquences dans le développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (Roostalu et al., 2019).

L'imagerie 3D, bien qu'ouvrant des perspectives importantes reste encore à améliorer pour obtenir des niveaux de résolution s'approchant de ce que l'on peut obtenir aujourd'hui à partir des approches histologiques plus classiques. En effet, cette technologie ne permet pas encore aujourd'hui l'accès à des analyses fines pour les études portant sur des problématiques subcellulaires, la visualisation des épines dendritiques est par exemple impossible avec les résolutions proposées par la microscopie à feuille de lumière. L'amélioration des optiques pour les rendre résistants tout en corrigeant les artefacts dus aux milieux d'imagerie particuliers utilisés sont des développements technologiques en cours. La résolution étant liée à l'épaisseur de la feuille de lumière ainsi qu'à son homogénéité de plan, les limitations physiques rencontrées aujourd'hui sont aussi des aspects à améliorer. Ces exemples de développements techniques et technologiques restent nécessaires pour s'approcher des types de données obtenues à partir de coupes via la microscopie ultra-résolutive et pouvant s'appliquer à des organes entiers. Un autre aspect devant être amélioré concerne le post-traitement et la gestion des données. La microscopie à feuille de lumière génère des fichiers de plusieurs dizaines, voire centaines, de gigaoctet, le poids de ces fichiers les rend difficilement manipulables. Il est nécessaire de développer des logiciels de traitement adaptés à ce type de fichiers afin de répondre aux besoins d'analyses en bio-informatique. De plus, la gestion de la volumétrie des données est aussi à prendre en considération car le déplacement et le stockage de ce type de données nécessitent des infrastructures adaptées. La première partie du projet pose donc les

bases de notre analyse, en révélant les difficultés pouvant être rencontrées dans les démarches d'analyses biologiques tridimensionnelles.

III. Caractérisation du système catécholaminergique des souris KO SELENOT conditionnelles

L'observation et l'analyse tridimensionnelle sont des approches efficaces pour la caractérisation d'un modèle. La quantification des cellules, le traçage de filament ou de vaisseaux sont totalement révolutionnés avec ce type d'imagerie. De nombreuses études montrent les possibilités et les avantages de l'analyse histologique 3D, ceci sur différents modèles biologiques. L'une des premières publications démontrant la puissance de l'imagerie 3D pour la description de phénotypes altérés au cours du neurodéveloppement du SNC dans des modèles de souris génétiquement modifiées décrit la mise en place des trajets axonaux du fasciculus rétroflexus chez les souris invalidées pour les protéines Silt/ROBO et DCC/Netrin, couples protéiques impliqués dans les processus de guidage axonale (Belle et al., 2014). D'autres études quantifiant différents types cellulaires, comme les cellules glomérulaires ou neuronales dans l'intégralité ou une sous-région de l'organe étudié, montrent la puissance et la précision obtenues avec ce type d'imagerie (Godefroy et al., 2017; Klingberg et al., 2017; Soumier et al., 2022). De plus, tracer et modéliser des réseaux vasculaires (Renier et al., 2016), ou de fibres nerveuses (Godefroy et al., 2020) ont été complètement bouleversés par l'approche de l'imagerie tridimensionnelle.

En s'appuyant sur l'approche développée dans la première partie du projet de recherche, et sur des approches histologiques plus classiques tels que l'hybridation *in situ* fluorescente et l'immunomarquage, la suite de l'étude a consisté en la caractérisation du système catécholaminergique des souris KO SELENOT conditionnelles.

Les résultats obtenus montrent une distribution ubiquitaire de la SELENOT au niveau du SNC, tant au niveau de son ARNm qu'au niveau de l'expression de la protéine. Les marquages par hybridation *in situ* fluorescente et immunomarquage sur des coupes de cerveaux adultes WT ont permis de décrire en partie la localisation et la répartition de la SELENOT dans le SNC de souris. Bien qu'ubiquitaire, les marquages ont montré des zones anatomiques plus intenses au niveau du bulbe olfactif, en particulier la zone glomérulaire, mais aussi dans les zones telles que le noyau piriforme de l'hippocampe (Ca3), le gyrus denté, l'hypothalamus, le noyau supraoptique (MCPO), l'habenula, le pons, la medulla, le 4^{ème} ventricule et les couches

granulaires et la couche des cellules de Purkinje du cervelet. La co-expression cellulaire de la TH et de la SELENOT dans le SNC de souris n'est pas mise en évidence sur l'ensemble des zones observées. En effet, les zones anatomiques avec des cellules présentant une expression plus importante de la SELENOT ne sont pas colocalisées avec les cellules présentant le marquage TH. Les cellules SELENOT ayant un niveau d'expression plus important que le niveau de base se trouvent dans des zones adjacentes des zones cellulaires TH⁺. Les observations des immunomarquages des cellules TH et SELENOT sans co-expression plus intense que le niveau de base sont confirmées par les co-marquages des ARNm de la SELENOT et de la TH. Toutefois, il est important de nuancer cette notion car pour une partie des cellules du cervelet, du diencephale et de la medulla, les cellules exprimant l'ARNm de la TH peuvent présenter une expression de l'ARNm de la SELENOT plus intense que le niveau de base observé dans la majorité des cellules exprimant l'ARNm de la TH. Ces données sur l'expression de la SELENOT par les cellules TH avec des niveaux différents suivant la zone anatomique observée posent la question des conséquences possibles de la distribution des neurones CA chez les souris délétées en cette sélénoprotéine. La caractérisation des neurones CA dans le SNC des souris KO SELENOT conditionnelles est réalisée via la technique d'imagerie tridimensionnelle mise en place dans la première partie de l'étude (Godefroy et al., 2020). L'approche tridimensionnelle montre des altérations de groupes cellulaires CA dans l'AP-A2, le groupe cellulaire A11, le groupe cellulaire A5, le LC-A6, le groupe cellulaire A7, la ZI-A13 et de l'Hyp-A12-A14-A15 avec une densité de cellule TH⁺ plus faible chez les souris KO SELENOT conditionnelles. La quantification cellulaire est réalisée de façon semi-automatisée en 3D pour les groupements cellulaires du AP-A2, PAG-A10dc, groupe cellulaire A11, ZI-A13, Hyp-A12-A14-A15, et les résultats obtenus montrent une baisse de la densité des cellules TH⁺ qui est dépendante du sexe de l'animal. Les souris KO SELENOT conditionnelles mâles présentent une baisse du nombre des cellules TH uniquement au niveau de l'Hyp-A12-A14-A15, alors que les femelles présentent une baisse dans l'AP-A2, le groupe A11, la ZI-A13 et l'Hyp-A12-A14-A15. Ces résultats montrent que la SELENOT a un rôle protecteur des cellules CA du SNC. Cette protection est plus importante chez les souris femelles car davantage de régions anatomiques sont affectées. Une hypothèse pour comprendre la différence de protection en fonction du sexe de l'animal peut s'expliquer en partie par le stress dû au cycle hormonal des femelles. Des résultats antérieurs de l'équipe ont montré que la SELENOT jouait un rôle dans l'adaptation aux conditions de stress cellulaire induits lors de la production hormonale basale ou stimulée. En effet, l'inhibition de l'expression de la SELENOT dans un modèle de cellules

corticotropes entraîne un stress du RE, des défauts de glycosylation et une réduction de la production de l'hormone corticotrope, que ce soit au niveau de la sécrétion basale ou stimulée (Hamieh et al., 2017). Une fonction similaire pouvant être envisagée dans les cellules CA *in vivo*.

Plus généralement, un dimorphisme sexuel du métabolisme du sélénium et de l'expression des sélénoprotéines a été montré à travers différentes études. La régulation de l'expression de protéines à sélénium dans certains organes non sexuels varie en fonction du sexe de l'animal. Dans le foie, organe vital du système digestif, des différences d'activité des sélénoprotéines DIO1, GPX1 et SELENOS sont constatées, avec une activité plus faible de la DIO1 chez les femelles rates et souris, contrairement à la GPX1 qui elle présente une activité plus importante (Sachdev and Sunde, 2001; Riese et al., 2006). Pour la SELENOS, son expression est plus importante chez le mâle (Stoedter et al., 2010). Autre exemple, dans les poumons la GPX1 est plus active chez les souris mâles (Tondreau et al., 2012). Les organes reproducteurs, par définition, sont également soumis à un dimorphisme sexuel. Dans les testicules, certaines sélénoprotéines ont une importance primordiale, comme par exemple la GPX4 qui est essentielle pour la spermatogénèse et la fertilité des souris mâles (Schneider et al., 2009). L'importance du sélénium dans cet organe est démontrée par la priorisation de l'apport de cet atome via la SELENOP dans les cellules du testicule, avant même les cellules du cerveau, permettant d'avoir une disponibilité en sélénium dans cet organe reproducteur même en cas de carence. Ceci passe par l'expression plus importante de l'apoER2, récepteur membranaire ayant un rôle clef dans l'entrée de la SELENOP dans cet organe (Burk and Hill, 2015). La forte expression de la SELENOS et la SELENOT dans les cellules de Leydig semble montrer un rôle majeur dans la synthèse de la testostérone (Windmill et al., 2007; Tanguy et al., 2011). Ces exemples montrent que les dimorphismes sexuels entraînent une régulation différente de certaines sélénoprotéines dans les organes et prouve que le sexe de l'animal peut influencer le métabolisme cellulaire et les activités des sélénoprotéines.

IV. Phénotypes comportementaux et altérations du système catécholaminergique chez les souris KO SELENOT

Les troubles comportementaux révélés chez les souris KO SELENOT conditionnelles peuvent s'expliquer en partie par les altérations de la densité des cellules CA observées. Les résultats des analyses comportementales obtenus chez les animaux invalidés en SELENOT ont

montré une altération de la force musculaire, ces résultant étant impactés par le sexe de l'animal. En effet, les femelles KO SELENOT conditionnelles développent une force musculaire moins importante que les souris contrôles, ce qui n'est pas retrouvé chez les souris mâles. En revanche, l'absence de SELENOT dans les cellules du SNC entraîne une baisse significative du temps d'atteinte du pic de force indépendamment du sexe de l'animal. Il est bien établi que la contraction des muscles squelettiques est influencée par les CA. En effet en 1958, une étude par Bowman et al. montre que les CA impactent la contraction musculaire au niveau du tibia de chat (Bowman and Zaimis, 1958). Plus récemment, des travaux menés chez le singe ont permis de démontrer que les neurones noradrénergiques du locus coeruleus sont impliqués dans l'effort physique avec une activité transitoire de ces neurones lors d'un exercice de force, ainsi qu'une ampleur d'activation de ce noyau catécholaminergique proportionnelle à l'effort produit (Bornert and Bouret, 2021). Ces observations peuvent au moins en partie expliquer les altérations de la force constatées dans notre modèle de souris invalidées pour la SELENOT, qui seraient dues à des déficits au niveau de certains noyaux catécholaminergiques. Pour compléter ces résultats, une étude focalisée sur les motoneurones et les conséquences de l'absence de la SELENOT au niveau du SNC devra être réalisée. En effet le lien entre les projections du LC-A6 vers la colonne ventrale de la moëlle épinière et l'effet dépolarisant des CA sur ces motoneurones peuvent être une explication à la modulation de la force musculaire dans ce modèle de souris (Commissiong et al., 1978; Kitazawa et al., 1985). Reste à comprendre le dimorphisme sexuel observé et son impact sur la force développée par l'animal et le temps d'atteinte du pic de force.

Les études précédemment effectuées dans notre groupe de recherche ont montré une hyperactivité chez les souris adultes KO SELENOT (Castex et al., 2016). Ces données ont été complétées dans notre étude en discriminant le sexe de l'animal. Les résultats obtenus ici montreraient une hyperactivité seulement chez les souris mâles. Cependant, ces données devront être complétées en augmentant le nombre d'animaux et aussi en faisant des groupes par tranche d'âge pour déterminer l'impact de ces paramètres sur l'hyperactivité des animaux invalidés pour la SELENOT dans le SNC. Nous émettons l'hypothèse que cette hyperactivité peut être la conséquence d'un état de stress plus important chez les souris mâles. En effet, les situations de stress et/ou d'anxiété peuvent conduire à ce type de comportement hyperactif (Strekalova et al., 2005). De plus, le circuit d'interprétation d'évènement traumatisant et stressant passe par une activation du système noradrénergique, dont l'hypothalamus et le locus coeruleus font partie. La modulation de l'interprétation des évènements traumatisant est soumis

à influence hormonale qui impacte différemment ces modifications selon le sexe de l'animal (Maheu and Lupienn, 2003), ceci pouvant expliquer en partie les différences observées entre les mâles et les femelles dans notre modèle animal.

L'analyse de la marche forcée étudiée pour déterminer si la locomotion est perturbée chez la souris invalidée pour la SELENOT au niveau central a pu être réalisée uniquement avec les souris femelles, les souris mâles ayant été incapables d'effectuer ce test. Cette incapacité à effectuer ce test de marche forcée est en soi une indication d'un potentiel stress développé par les souris KO SELENOT mâles. Les hypothèses avancées pour expliquer l'hyperactivité constatée préférentiellement chez les animaux mâles peuvent s'appliquer également pour le test de marche forcée. En effet, les altérations de la distribution des neurones catécholaminergiques dans l'Hyp-A12-A14-A15 et le LC-A6 pourraient entraîner une mauvaise adaptation au stress, avec une compensation via le système hormonal qui serait plus efficace chez les souris femelles que chez les mâles, expliquant en partie une hyperactivité plus prononcée et la non réalisation de la marche forcée chez les mâles. Ces résultats sont d'autant plus importants qu'ils montrent une implication différente de la SELENOT dans la régulation du système catécholaminergique suivant le sexe, lui conférant un statut particulier comme cible médicamenteuse potentielle. En effet, d'autres axes de recherche du laboratoire montrent des perspectives thérapeutiques intéressantes pour la SELENOT, en modulant différemment la réponse du système catécholaminergique suivant le sexe notamment pour traiter des troubles liés au stress post-traumatique ou dans des cas de sevrage aux opiacés (Ross and Van Bockstaele, 2020). Ainsi, nous montrons dans ce travail de thèse qu'une autre fonction du système catécholaminergique liée à la régulation du stress semble être perturbée différemment selon le sexe de l'animal KO SELENOT conditionnel.

Des suivis du cycle du sommeil et d'éveil ont aussi été effectués sur nos animaux KO SELENOT conditionnels. Les circuits neuroanatomiques et les mécanismes du contrôle du sommeil sont extrêmement complexes. De nombreuses régions neuroanatomiques telles que le locus coeruleus, l'aire tegmentale ventrale, la substance grise périaqueducale, l'hypothalamus, et la zona incerta, ainsi que de nombreux types neuronaux comme les neurones hypocrétine/oréxine, gabaergiques, glutamaergiques et catécholaminergiques, etc... sont impliquées dans ces mécanismes de contrôle du sommeil (Léger et al., 2010; Scammell et al., 2017; Eban-Rothschild et al., 2018). L'altération d'un ou plusieurs paramètres des circuits de contrôle peut avoir des conséquences importantes et perturber les cycles de sommeil et d'éveil. Comprendre comment des facteurs environnementaux et physiologiques influencent le

sommeil, et avoir la possibilité d'initier et de mettre fin à ces commandes des circuits du sommeil et d'éveil est essentiel pour élucider les fonctions à l'intérieur et au-delà du SNC (Weber and Dan, 2016). Dans nos expérimentations, les enregistrements de phase de sommeil ont montré une altération de cette fonction vitale chez les animaux génétiquement modifiés, ceci indépendamment du sexe. Les temps de sommeil sont réduits chez les souris KO SELENOT conditionnelles. Nous avons constaté chez ces animaux que la distribution des neurones TH dans les groupements neuronaux LC-A6, ZI-A13 et Hyp-A12-A14-A15 est altérée chez les souris transgéniques mâles et femelles. Ces groupements cellulaires font partie des circuits de contrôle du sommeil et sont donc certainement impliqués dans les perturbations des cycles du sommeil et d'éveil de ces animaux. La SELENOT est donc une cible intéressante pour comprendre les mécanismes de régulation de cette fonction vitale car son absence dans les cellules du SNC perturbe les phases de sommeil et d'éveil de façon limitée, uniquement dans les phases nocturnes. Cette limitation dans la perturbation est un avantage important pour la compréhension d'un système si complexe.

Ainsi, les zones anatomiques du système catécholaminergique impactées chez les souris KO SELENOT peuvent altérer de nombreuses fonctions physiologiques bien connues. Afin de montrer l'ensemble des éventuelles corrélations comportementales et phénotypiques suite à l'altération du système catécholaminergique, nous avons résumé dans une table ci-dessous (Table 2) les liens possibles entre les données neuroanatomiques et comportementales obtenues. La table présente différents cas de figure indiqués par les chiffres 1 à 4 selon le type de corrélation entre l'observation neuroanatomique et le phénotype constaté : 1) une corrélation positive entre la baisse de la densité des neurones TH de la région anatomique étudiée et l'altération des comportements contrôlés par cette région, suggérant que les modifications du système catécholaminergique observés influencent directement le comportement contrôlé par cette zone anatomique chez les souris KO SELENOT, ceci sans dimorphisme sexuel, ou bien 2) avec un dimorphisme sexuel. 3) une absence de corrélation avec soit une baisse de la densité des cellules TH sans que les rôles physiologiques de cette zone ne soient perturbés, ou des comportements altérés sans que la densité des cellules CA de la région anatomique impliquée ne soit modifiée, ceci indépendamment du sexe de l'animal, et 4) une corrélation négative sans impact de la densité des cellules TH, ni du comportement contrôlé par la zone anatomique étudiée en l'absence de SELENOT dans le SNC. Les résultats correspondent à la corrélation de type 1) pour l'Hyp-A12-A14-A16 chez ces souris KO SELENOT conditionnelles, car celles-ci ont des troubles du sommeil, un comportement sexuel perturbé (résultats non présentés), et

présentent une densité des cellules CA plus faible dans cette zone. Ce même type de corrélation 1) est retrouvé au niveau du LC-A6, les souris KO SELENOT montrent une altération de la densité de cellules catécholaminergiques pouvant expliquer les troubles du sommeil constatés. La corrélation de type 2) est retrouvée pour le noyau AP-A2, où seules les souris femelles ont une prise de poids modifiée (résultats non présentés), ceci pouvant s'expliquer par la perturbation du système catécholaminergique dans cette zone, sans que les souris mâles ne présentent ces phénotypes. Le groupement de cellules A11 correspond à la corrélation de type 3) avec des animaux femelles ayant un nombre de cellules catécholaminergiques plus faible sans que le comportement contrôlé par cette zone ne soit impacté, et sans aucune perturbation constatée pour les animaux mâles. La zone anatomique ZI-A13 correspond également à la corrélation de type 3) car la baisse de la densité cellulaire pourrait expliquer les troubles du sommeil chez les souris femelles, alors que les souris mâles présentent aussi des troubles du sommeil sans modification du nombre de cellules CA dans cette région anatomique. Pour la zone VTA-A10, les résultats correspondent également à la corrélation de type 3) car les animaux mâles présentent des comportements de stress/hyperactivité important alors que la densité cellulaire des neurones CA ne semble pas être altérée, et les souris femelles ne présentent aucune modification ni de distribution cellulaire ni de comportement. Les noyaux PAG10dc, SN-A9 et RRF-A8 correspondent à la corrélation de type 4) sans perturbation aussi bien au niveau cellulaire que comportemental. Ces différentes corrélations montrent pour le cas 1) une importance fondamentale de la SELENOT dans le SNC sur l'ensemble des animaux. Pour le cas 2) un rôle ou pas de la SELENOT dans le SNC selon le sexe de l'animal. Pour le cas 3) une absence de corrélation totale des phénomènes, avec des souris KO SELENOT présentant soit une perturbation de la distribution des cellules du système catécholaminergique mais avec de possibles mécanismes de compensation suffisants pour limiter les conséquences sur le comportement de la souris, soit des perturbations comportementales passant par un autre système que le système catécholaminergique qui n'est pas affecté par l'invalidation de la SELENOT, et ceci pour au moins un des deux sexes. Enfin, le cas 4) avec des régions anatomiques où la SELENOT ne semble pas indispensable.

| | Sexe | LC-A6 Apprentissage, Prise de décision, Sommeil/éveil, Nociception, Force, Stress | Hyp-A12-A14- A15 Prise alimentaire Sommeil/éveil, Température, Emotion, Comportements sexuels, Stress | AP-A2 Prise alimentaire | VTA-A10 Processus émotionnels, Motivationnels, Récompense sociale, Stress | A11 Douleur, Locomotion | ZI-A13 Coordination des mouvements, Peur, Sommeil/éveil | PAG-A10dc Peur, Essoufflement, Anxiété/ dépression | RF-A8 Peur | SN-A9 Contrôle moteur |
|--|------|---|--|-------------------------------|--|-------------------------------|--|--|---------------|-----------------------------|
| Diminution du nombre de cellules CA chez le modèle KO SELENOT conditionnel | ♀ | + | + | + | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 |
| | ♂ | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Phénotype comportementale chez le modèle KO SELENOT conditionnel | ♀ | + | + | + | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 |
| | ♂ | + | + | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| Type de corrélation | | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |

Table 2 : Représentation des corrélations possibles entre les zones anatomiques du système catécholaminergique du SNC affectées et les phénotypes comportementaux chez les souris mâles et femelles KO SELENOT conditionnelles. Les altérations sont représentées par des +, alors que l'absence d'altération par des 0. Les perturbations constatées présentent différents cas de figures : 1) une corrélation positive avec la densité des neurones TH⁺ de la région anatomique étudiée et les comportements pilotés par cette région sont altérés chez les souris KO SELENOT, laissant penser que les modifications du système catécholaminergique influence directement le comportement géré par cette zone anatomique chez les souris KO SELENOT ceci sans dimorphisme sexuel, ou bien 2) une corrélation positive avec un dimorphisme sexuel. 3) une absence de corrélation avec soit une modification de la densité des cellules TH⁺ sans que les rôles physiologiques de cette zone ne soit perturbés, ou des comportements altérés sans que la densité des cellules CA de la région anatomique impliquée ne soit modifiée, ceci indépendamment du sexe de l'animal. 4) corrélation négative ni la densité des cellules TH⁺, ni les comportements gérés par la zone anatomique étudiée ne sont impactés par l'absence de SELENOT dans le SNC.

Ces résultats nous permettent pour la suite des études de recherche sur le modèle de souris KO SELENOT conditionnel de se focaliser sur des cibles neuroanatomiques précises, montrant ainsi l'intérêt de l'approche d'imagerie tridimensionnelle qui représente un outil très intéressant pour obtenir une vision intégrée de l'ensemble d'un organe contrairement aux approches classiques. La relation des modifications de densité cellulaire et les phénotypes comportementaux peut être appréhendée de manière globalisée. Nous notons que les régions

neuroanatomiques du LC-A6 et de l'Hyp-A12-A14-A15 semblent être des régions particulièrement affectées par l'absence de la SELENOT dans le cerveau. Le rôle de la SELENOT dans l'AP-A2 semble être important uniquement chez les souris femelles. Il serait donc intéressant de concentrer les futures recherches du rôle de la SELENOT dans le cerveau sur ces trois régions neuroanatomiques.

Conclusion et perspectives

Les travaux de cette thèse montrent à travers les résultats obtenus l'importance de la SELENOT dans le SNC. En particulier, les conséquences de son absence dans les cellules nerveuses notamment des altérations importantes du système catécholaminergique associées à des troubles comportementaux.

Dans une première partie de ces travaux, nous décrivons une méthodologie novatrice pour l'analyse anatomique tridimensionnelle du système catécholaminergique dans l'intégralité du SNC chez la souris, au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. L'association de l'immunomarquage *in toto*, du protocole de « transparisation » iDISCO+, de la microscopie par feuille de lumière et de l'utilisation du logiciel d'imagerie de reconstitution 3D, a permis de produire un atlas tridimensionnel du système catécholaminergique de la souris. Au cours du développement, la description de la temporalité de la maturation des cellules TH est décrite précisément et ceci sur différentes zones anatomiques choisies : la ZI-A13, RRF-A8, SN-A9, VTA-A10 et LC-A6. Des comptages du nombre de cellules de la ZI-A13 et des mesures de longueur et de largeur des faisceaux de fibres constituant le MfB au cours du développement sont décrits dans ces travaux. L'utilisation de l'approche tridimensionnelle rend ainsi possible un repérage dans l'espace afin de décrire précisément un groupe neuronal mais aussi grâce à un logiciel dédié l'obtention de données quantitatives.

La caractérisation d'un système anatomique est essentielle pour comprendre sa fonction et la visualisation intégrée s'avère être un moyen très puissant dans la description de ce système et de ses altérations possibles. Le modèle étudié dans ces travaux de thèse est le modèle de souris dont le gène de la SELENOT est invalidé de façon conditionnelle dans les cellules nerveuses (Boukhar et al., 2016; Castex et al., 2016). Ce modèle animal présente des altérations comportementales, avec notamment une activité locomotrice plus importante (Castex et al., 2016). Dans la suite de ce projet de thèse, la caractérisation tridimensionnelle du système catécholaminergique des souris KO SELENOT adultes a été réalisée. En suivant la méthodologie décrite dans la première partie du projet, une observation et une description anatomique des noyaux A5, LC-A6, A7, RRF-A8, SN-A9 et VTA-A10 ont montré qu'en absence de SELENOT, le noyau LC-A6 présente une diminution de la densité des neurones TH. Une quantification des neurones TH des noyaux AP-A2, PAG-A10dc, A11, ZI-A13 et Hyp-A12-A14-A15 montre une diminution dans les noyaux AP-A2, A11 et ZI-A13 des souris KO SELENOT femelles et dans l'Hyp-A12-A14-A15 des souris KO SELENOT mâles et femelles. L'ARNm et la protéine de la SELENOT sont exprimés de façon ubiquitaire dans le SNC avec toutefois des groupements de cellules présentant des niveaux d'expression plus

importants. Bien que l'ARNm de la SELENOT ait pu être localisé dans les cellules TH+, les cellules qui expriment plus fortement l'ARNm de la SELENOT ne semblent pas être des neurones catécholaminergiques. Néanmoins, l'absence de cette protéine semble avoir des conséquences importantes sur ce types de neurone.

Des analyses comportementales ont été réalisées afin de poursuivre la caractérisation phénotypique de ce modèle animal. L'évaluation de la force musculaire, de l'activité locomotrice, du sommeil et de la marche a été réalisée pour les relier à d'éventuels déficits d'un système de neurotransmission à savoir le système catécholaminergique qui est connu pour jouer un rôle essentiel dans le contrôle de différentes activités ou fonctions biologiques. Les résultats obtenus ont révélé des altérations importantes de la force musculaire, de l'activité locomotrice et du sommeil. En effet, les animaux dont le gène de la SELENOT est invalidé dans les cellules nerveuses présentent une altération de la force musculaire, avec un temps d'atteinte du pic de force plus court chez les souris KO SELENOT et un pic de force plus faible uniquement chez les souris KO SELENOT femelles. L'activité locomotrice est, elle, impactée préférentiellement chez les souris KO SELENOT mâles. L'origine de ces dimorphismes sexuels n'est pas connue à l'heure actuelle et nécessitera des études complémentaires.

Le sommeil est également altéré dans notre modèle de souris, et ceci de façon identique pour les deux sexes. Le rôle précis de la SELENOT dans les neurones CA impliqués dans le contrôle du sommeil reste à élucider. La caractérisation de l'ensemble des comportements observés est importante pour la compréhension du rôle de la SELENOT dans le SNC. Ces comportements peuvent être liés à différentes perturbations neuronales, différents types de cellules nerveuses et différentes régions anatomiques dont les cellules CA font partie. En accord avec nos résultats, de précédentes études ont permis de montrer que les souris KO pour la SELENOT avait une altération du taux de dopamine au niveau du striatum et une sensibilité des neurones dopaminergiques aux neurotoxines qui est augmentée (Boukhzar et al., 2016).

Le rôle de cette sélénoprotéine dans la protection contre stress oxydatif ou encore son implication dans le contrôle de la maturation des protéines pourraient jouer un rôle fondamental pour maintenir une densité normale des neurones CA. De plus, la SELENOT ne semble pas avoir les mêmes effets selon le sexe de l'animal. En effet, il a été montré dans cette étude que la densité des neurones CA dans les différents groupements cellulaires n'est pas impactée de façon équivalente suivant le sexe de l'animal, et que le comportement de ces mêmes animaux invalidés en SELENOT ne présente pas les mêmes anomalies selon le sexe.

Le vieillissement des animaux est un facteur à prendre également en compte dans nos futurs travaux de recherche puisqu'il est admis que la régulation du stress cellulaire est altérée dans les organismes plus âgés. Chez notre modèle de souris, des résultats préliminaires que nous avons obtenus vont dans ce sens et montrent que la densité des neurones catécholaminergiques varie suivant l'âge de l'animal.

L'ensemble de ces résultats ouvrent des perspectives de recherche intéressantes. Une étude plus précise des mécanismes cellulaires impliquant la SELENOT dans les neurones TH+ devra être entreprise afin d'expliquer pourquoi ce type de neurones semble présenter une sensibilité importante en l'absence de cette sélénoprotéine et ce de manière différente selon la localisation neuroanatomique et le sexe de l'animal. De plus, afin de mieux comprendre le rôle de chaque groupement de neurones CA impacté par l'absence de la SELENOT, il sera intéressant de faire des invalidations ciblées pour des groupements de cellules donnés. Cette invalidation ciblée pouvant être réalisée en utilisant des techniques d'injection stéréotaxique de virus permettant l'inactivation de la SELENOT dans les neurones TH+ d'une région anatomique précise. Ceci pourrait permettre de reproduire des phénotypes comportementaux altérés de manière ciblée. De plus, l'utilisation d'agonistes catécholaminergiques pourrait être entreprise dans notre modèle de souris KO SELENOT afin de déterminer si les altérations observées peuvent être réversées.

Enfin, d'autres types de neurones peuvent également être altérés par l'inactivation du gène de la SELENOT et il serait donc intéressant de continuer la cartographie tridimensionnelle du SNC des souris KO pour d'autres types cellulaires et d'autres organes périphériques.

Références bibliographiques

A-

- Abid H, Cartier D, Hamieh A, François-Bellan A-M, Bucharles C, Pothion H, Manecka D-L, Leprince J, Adriouch S, Boyer O, et al. 2019. AMPK activation of PGC-1 α /NRF-1-dependent SELENOT gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress. *Mol Neurobiol* **56**: 4086–4101.
- Aitken AR. 1987. The preparation and use of embryonic brain wholemounts. *J Neurosci Methods* **19**: 297–304.
- Allmang C, Wurth L, Krol A. 2009. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1415–1423.
- Alsharif I, Boukhzar L, Lefranc B, Godefroy D, Aury-Landas J, Rego JL do, Rego JC do, Naudet F, Arabo A, Chagraoui A, et al. 2021. Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol* **40**.
- Alsina B, Serras F, Baguñà J, Corominas M. 1998. patufet, the gene encoding the Drosophila melanogaster homologue of selenophosphate synthetase, is involved in imaginal disc morphogenesis. *Mol Gen Genet* **257**: 113–123.
- Andreesen JR, Ljungdahl LG. 1973. Formate dehydrogenase of Clostridium thermoaceticum: incorporation of selenium 75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol* **116**: 867–873.
- Annunziato L. 1979. Regulation of the tuberoinfundibular and nigrostriatal systems evidence for different kinds of dopaminergic neurons in the brain. *Neuroendocrinology* **29**: 66–76.
- Anouar Y, Lihrmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. 2018. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* **127**: 145–152.

-B-

- Baker H, Joh T, Ruggiero A, Reis J. 1983. Variations in number two mouse strains of dopamine neurons and activity in hypothalamus of. *J Neurosci* **3**: 832–843.
- Balestrino R, Schapira AHV. 2020. Parkinson disease. *Eur J Neurol* **27**: 27–42.
- Baqui MMA, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. 2000. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* **141**: 4309–4312.

- Barage SH, Deobagkar DD, Baladhye VB. 2018. Characterization of structural and functional role of selenocysteine in selenoprotein H and its impact on DNA binding. *Amino Acids* **50**: 593–607.
- Bear MF, Singer W. 1986. Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* **320**: 172–176.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **63**: 182–217.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J. 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 1143–1149.
- Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD. 1996. Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J Inorg Biochem* **61**: 117–124.
- Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, Chédotal A. 2017. Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell* **169**: 161–173.
- Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A. 2014. A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep* **9**: 1191–1201.
- Berry MJ, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. 1991. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* **353**: 273–276.
- Bertz M, Kühn K, Koeberle SC, Müller MF, Hoelzer D, Thies K, Deubel S, Thierbach R, Kipp AP. 2018. Selenoprotein H controls cell cycle progression and proliferation of human colorectal cancer cells. *Free Radic Biol Med* **127**: 98–107.
- Bhat SK, Ganesh CB. 2017. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brain of the viviparous fish *Gambusia affinis*. *J Chem Neuroanat* **85**: 1–12.
- Bissonette GB, Roesch MR. 2016. Development and function of the midbrain dopamine system: What we know and what we need to. *Genes, Brain Behav* **15-1**: 62–73.
- Björklund A, Dunnett SB. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* **30-5**: 194–202.
- Björklund A, Hökfelt T, Tohyama M. 1992. Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS. *Handb Chem Neuroanat*.
- Björklund A, Lindvall O. 1978. The meso-telencephalic dopamine neuron system: A review of its anatomy. *Limbic Mechanisms*.

- Blouet C. 2013. Le rôle du noyau du tractus solitaire dans la détection et l'intégration de multiples signaux métaboliques. *médecine/sciences* **29**: 449-477.
- Bolton AD, Murata Y, Kirchner R, Kim SY, Young A, Dang T, Yanagawa Y, Constantine-Paton M. 2015. A diencephalic dopamine source provides input to the superior colliculus, where D1 and D2 receptors segregate to distinct functional zones. *Cell Rep* **13**: 1003–1015.
- Borchert A, Chi CW, Ufer C, Schiebel H, Savaskan NE, Kuhn H. 2006. The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J Biol Chem* **281**: 19655–19664.
- Bornert P, Bouret S. 2021. Locus coeruleus neurons encode the subjective difficulty of triggering and executing actions. *PLOS Biol* **19**: 1-29.
- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, Hajji S El, 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. *Antioxidants Redox Signal* **24**: 557–574.
- Bowman WC, Zaimis E. 1958. The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on skeletal muscle contractions in the cat. *J Physiol* **144**: 92–107.
- Bradfield LA, Iordanova MD. 2021. Threat perception: Fear and the retrorubal field. *Curr Biol* **31**: R469–R471.
- Brauth SE. 1988. Catecholamine neurons in the brainstem of the reptile Caiman crocodilus. *J Comp Neurol* **270**: 313–326.
- Brodde O-E, Bruck H, Leineweber K. 2006. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* **100**: 323–337.
- Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VGJM, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Esteves M, Saper CB. 2012. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol* **520**: 1985–2001.
- Buettner C, Harney JW, Berry MJ. 1999. The Caenorhabditis elegans homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differs from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. *J Biol Chem* **274**: 21598–21602.
- Burk RF, Hill K a E. 1994. Selenoprotein P. A selenium-rich glycoprotein1. *Mol Biol*: 1891–1897.

Burk RF, Hill KE. 2009. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1441–1447.

Burk RF, Hill KE. 2015. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu Rev Nutr* **35**: 109–134.

-C-

Cai R, Pan C, Ghasemigharagoz A, Todorov MI, Förstera B, Zhao S, Bhatia HS, Parra-Damas A, Mrowka L, Theodorou D, et al. 2019. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections. *Nat Neurosci* **22**: 317–327.

Cano G, Card JP, Sved AF. 2004. Dual viral transneuronal tracing of central autonomic circuits involved in the innervation of the two kidneys in rat. *J Comp Neurol* **471**: 462–481.

Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. 2003. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* **460**: 303–326.

Cano G, Sved AF, Rinaman L, Rabin B, Card JP. 2001. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol* **439**: 1–18.

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

Chandler DJ, Jensen P, McCal JG, Pickering AE, Schwarz LA, Totah NK. 2019. Redefining noradrenergic neuromodulation of behavior: Impacts of a modular locus coeruleus architecture. *J Neurosci* **39**: 8239–8249.

Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. 2020. Extracellular glutathione peroxidase GPx3 and its role in cancer. *Cancers* **12**: 2197.

Chang SN, Lee JM, Oh H, Park JH. 2016. Glutathione peroxidase 3 inhibits prostate tumorigenesis in TRAMP mice. *Prostate* **76**: 1387–1398.

Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM. 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 408–416.

Chen CS, Wen TN, Tuan HM. 1982. Selenium-containing tRNAs from *Clostridium sticklandii*. Cochromatography of seleno-tRNA I with l-valyl-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 1403–1407.

- Chen L-L, Huang J-Q, Wu Y-Y, Chen L-B, Li S-P, Zhang X, Wu S, Ren F-Z, Lei X-G. 2021. Loss of Selenov predisposes mice to extra fat accumulation and attenuated energy expenditure. *Redox Biol* **45**: 102048.
- Chen L-L, Huang J-Q, Xiao Y, Wu Y-Y, Ren F-Z, Lei XG. 2020. Knockout of selenoprotein V affects regulation of selenoprotein expression by dietary selenium and fat intakes in mice. *J Nutr* **150**: 483–491.
- Chen Y, Wang K, Zhang D, Zhao Z, Huang J, Zhou L, Feng M, Shi J, Wei H, Li L, et al. 2020. GPx6 is involved in the in vitro induced capacitation and acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology* **156**: 107–115.
- Chernorudskiy A, Varone E, Colombo SF, Fumagalli S, Cagnotto A, Cattaneo A, Briens M, Baltzinger M, Kuhn L, Bachi A, et al. 2020. Selenoprotein N is an endoplasmic reticulum calcium sensor that links luminal calcium levels to a redox activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**: 21288–21298.
- Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. 2005. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**: 437–443.
- Chou X, Wang X, Zhang Z, Shen L, Zingg B, Huang J, Zhong W, Mesik L, Zhang LI, Tao HW. 2018. Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta. *Nat Commun* **9**: 1151.
- Christine S-P, Philippe C, Alain K. 1995. Sélénium, sélénoprotéines : une autre lecture du code génétique. *médecine/sciences* **11**: 1081–88.
- Chu JH, Yan YX, Gao PC, Chen XW, Fan RF. 2020. Response of selenoproteins gene expression profile to mercuric chloride exposure in chicken kidney. *Res Vet Sci* **133**: 4–11.
- Clark FM, Proudfit HK. 1993. The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. *Brain Res* **616**: 200–210.
- Coenen VA, Schlaepfer TE, Maedler B, Panksepp J. 2011. Cross-species affective functions of the medial forebrain bundle-Implications for the treatment of affective pain and depression in humans. *Neurosci Biobehav Rev* **35**: 1971–1981.
- Commissiong JW, Hellström SO, Neff NH. 1978. A new projection from locus coeruleus to the spinal ventral columns: histochemical and biochemical evidence. *Brain Res* **148**: 207–213.

- Cone JE, Martin Del Rio R, Davis JN, Stadtman TC. 1976. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: Identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**-8: 2659–2663.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. 2005. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* **25**: 7637–7644.
- Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. 2007. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biol Chem* **388**: 1019–1025.
- Cunningham ET, Miselis RR, Sawchenko PE. 1994. The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: An axonal transport and immunohistochemical study in the rat. *Neuroscience* **58**: 635–648.

-D-

- D’Mello SR, Turzai LM, Gioio AE, Kaplan BB. 1989. Isolation and structural characterization of the bovine tyrosine hydroxylase gene. *J Neurosci Res* **23**: 31–40.
- Dahlstroem A, Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* **232**: 1–55.
- Darras VM. 2021. Deiodinases: How nonmammalian research helped shape our present view. *Endocrino* **162**: 1–9.
- Dikiy A, Novoselov S V., Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin N V., Hatfield DL, Gladyshev VN. 2007. SelT, SelW, SelH, and Rdx 12: Genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* **46**: 6871–6882.
- Dobosz M, Ntziachristos V, Scheuer W, Strobel S. 2014. Multispectral fluorescence ultramicroscopy: Three-dimensional visualization and automatic quantification of tumor morphology, drug penetration, and antiangiogenic treatment response. *Neoplasia* **16**: 1–13.
- Dobrovolska O, Shumilina E, Gladyshev VN, Dikiy A. 2012. Structural analysis of glutaredoxin domain of mus musculus thioredoxin glutathione reductase. *PLoS One* **7**: 1–7.

- Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, Deussing JM, Eder M, Zieglgänsberger W, Becker K. 2007. Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* **4**: 331–336.
- Douma EH, de Kloet ER. 2020. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci Biobeh Rev* **108**: 48-77.
- Dudkiewicz M, Szczepińska T, Grynberg M, Pawłowski K. 2012. A novel protein kinase-like domain in a selenoprotein, widespread in the tree of life. *PLoS One* **7**: 1-17.

-E-

- Eban-Rothschild A, Appelbaum L, De Lecea L. 2018. Neuronal Mechanisms for Sleep/Wake Regulation and Modulatory Drive. *Neuropsychopharmacology* **43**: 937–952.
- Ecker A, Barbosa NV, Ardisson-Araujo D. 2020. Accessing the transcriptional status of selenoproteins in skin cancer-derived cell lines. *J Trace Elem Med Biol* **60**: 1-10.
- El-Mehdi M, Takhlidjt S, Khair F, Prévost G, Do Rego JL, Do Rego JC, Benani A, Nedelec E, Godefroy D, Arabo A, et al. 2020. Glucose homeostasis is impaired in mice deficient in the neuropeptide 26RFa (QRFP). *BMJ Open Diabetes Res Care* **8**: 1-12.
- Ertürk A, Bradke F. 2013. High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Exp Neurol* **242**: 57–64.
- Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Förstner F, Keck T, Becker K, Jährling N, Steffens H, Richter M, Hübener M, et al. 2012. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med* **18**: 166–171.
- Essig J, Felsen G. 2016. Warning! Dopaminergic modulation of the superior colliculus. *Trends Neurosci* **39**: 2–4.

-F-

- Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A. 2000. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J* **19**: 4796–4805.
- Falck B, Hillarp N-A, Thieme G, Torp A. 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* **10**: 348–354.
- Faull OK, Subramanian HH, Ezra M, Pattinson KTS. 2019. Neuroscience and biobehavioral reviews the midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neurosci Biobehav Rev* **98**: 135–144.
- Fitzpatrick PF. 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* **68**: 355–381.

- Flohe L, Günzler WA, Schock H. 1973. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letters* **32** : 32–34.
- Fomenko DE, Novoselov S V., Natarajan SK, Lee BC, Koc A, Carlson BA, Lee TH, Kim HY, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2009. MsrB1 (methionine-R-sulfoxide reductase 1) knockout mice: Roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form. *J Biol Chem* **284**: 5986–5993.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. 1978. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**: 2639–2644.
- Fredericks GJ, Hoffmann FKW, Rose AH, Osterheld HJ, Hess FM, Mercier F, Hoffmann PR. 2014. Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 16478–16483.
- Friocourt F, Kozulin P, Belle M, Suárez R, Di-Poi N, Richards LJ, Giacobini P, Chédotal A. 2019. Shared and differential features of Robo3 expression pattern in amniotes. *J Comp Neurol* **527**: 2009–2029.
- Fu YH, Yuan Y, Halliday G, Rusznák Z, Watson C, Paxinos G. 2012. A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse. *Brain Struct Funct* **217**: 591–612.
- Fung BP, Ok Yoon S, Chikaraishi DM. 1992. Sequences that direct rat tyrosine hydroxylase gene expression. *J Neurochem* **58**: 2044–2052.
- G-
- Gammelgaard B, Rasmussen LH, Gabel-Jensen C, Steffansen B. 2012. Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by in vitro flux and biotransformation studies in Caco-2 cells and ICP-MS detection. *Biol Trace Elem Res* **145**: 248–256.
- Gasbarri A, Packard MG, Sulli A, Pacitti C, Innocenzi R, Perciavalle V. 1996. The projections of the retrorubral field A8 to the hippocampal formation in the rat. *Exp Brain Res* **112**: 244–252.
- St. Germain DL, Hernandez A, Schneider MJ, Galton VA. 2005. Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals. *Thyroid* **15**: 905–916.
- Gladyshev VN, Jeang KT, Wootton JC, Hatfield DL. 1998. A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem* **273**: 8910–8915.

- Gladyshev VN, Regina BF, Arnér ES, Berry MJ, Bruford EA, Burk RF, Carlson BA, Castellano S, Chavatte L, Conrad M, et al. 2016. Selenoprotein gene nomenclature. *J Biol Chem* **291**: 24036–24040.
- Gnegy ME. 2012. *Catecholamines. Basic Neurochem*: 283–299.
- Godefroy D, Boukhzar L, Dubessy C, Montero-Hadjadje M, Yon L, Eiden LE, Anouar Y. 2020. Three-dimensional mapping of tyrosine hydroxylase in the transparent brain and adrenal of prenatal and pre-weaning mice: Comprehensive methodological flowchart and quantitative aspects of 3D mapping. *J Neurosci Methods* **335**: 1-11.
- Godefroy D, Dominici C, Hardin-Pouzet H, Anouar Y, Melik-Parsadaniantz S, Rostène W, Reaux-Le Goazigo A. 2017. Three-dimensional distribution of tyrosine hydroxylase, vasopressin and oxytocin neurones in the transparent postnatal mouse brain. *J Neuroendocrinology* **29**: 1–10.
- Golden GS. 1973. Prenatal development of the biogenic amine systems of the mouse brain. *Dev Biol* **33**: 300–311.
- Gong T, Hashimoto AC, Sasuclark AR, Khadka VS, Gurary A, Pitts MW. 2019. Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant activity. *Antioxid Redox Signal* **35**: 1–13. doi: 10.1089/ars.2018.7594
- Gootman PM, editor. 1986. *Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System*.
- Goubran M, Leuze C, Hsueh B, Aswendt M, Ye L, Tian Q, Cheng MY, Crow A, Steinberg GK, McNab JA, et al. 2019. Multimodal image registration and connectivity analysis for integration of connectomic data from microscopy to MRI. *Nat Commun* **10**: 1–17.
- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* **14**: 644–53.
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, et al. 2008. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* **22**: 1756–1768.
- Gu H, Wall SC, Rudnick G. 1994. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* **269**: 7124–7130.

Gu Q. 2002. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* **111**: 815–835.

Guo M, Gao X, Zhang N, Qiu C, Li C, Deng G. 2016. Effects of Se on the diversity of SelT synthesis and distribution in different smooth muscle tissues in rats. *Biol Trace Elem Res* **170**: 340–347.

-H-

Hahn C, Becker K, Saghafi S, Pende M, Avdibašić A, Foroughipour M, Heinz DE, Wotjak CT, Dodt HU. 2019. High-resolution imaging of fluorescent whole mouse brains using stabilised organic media (sDISCO). *J Biophotonics* **12**: 1–29.

Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**: 1609–1623.

Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, et al. 2017. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep* **18**: 1935–1946.

Hamilton SJ. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* **326**: 1–31.

Han SJ, Lee BC, Yim SH, Gladyshev VN, Lee SR. 2014. Characterization of mammalian selenoprotein O: A redox-active mitochondrial protein. *PLoS One* **9**: 1–7.

Hassler R. 1978. Striatal control of locomotion, intentional actions and of integrating and perceptive activity. *J Neurol Sci* **36**: 187–224.

Hatfield DL. 2001. *Selenium*. Springer Nature.

Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. 2014. Selenium and selenocysteine: Roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci* **39**: 112–120.

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF. 2003. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem* **278**: 13640–13646.

Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, Hirabayashi Y, Savitzki D, Tal G, Mandel H, Sugimoto H. 2018. EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans. *J Lipid Res* **59**: 1015–1026.

Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalifa I, Godefroy D, Schapman D, Hemanthakumar KA, Bizou M, et al. 2020. Lymphatic and immune cell cross-talk regulates cardiac recovery after experimental myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**: 1722–1737.

Huang J, Bao D, Lei CT, Tang H, Zhang CY, Su H, Zhang C. 2020. Selenoprotein T protects against cisplatin-induced acute kidney injury through suppression of oxidative stress and apoptosis. *FASEB J* **34**: 11983–11996.

Huisken J, Stainier DYR. 2009. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* **136**: 1963–1975.

-I-

Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y. 2003. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 278–286.

Itoh K, Watanabe K, Wu X, Suzuki T. 2010. Three members of the iodothyronine deiodinase family, dio1, dio2 and dio3, are expressed in spatially and temporally specific patterns during metamorphosis of the flounder, *paralichthys olivaceus*. *Zool Sci* **27**: 574–580.

Iwata N, Kobayashi K, Sasaoka T, Hidaka H, Nagatsu T. 1992. Structure of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 348–354.

-J-

Jansen ASP, Hoffman JL, Loewy AD. 1997. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: A viral tracing study. *Brain Res* **766**: 29–38.

Jehan C, Cartier D, Bucharles C, Anouar Y, Lihrmann I. 2022. Emerging roles of ER-resident selenoproteins in brain physiology and physiopathology. *Redox Biol* **55**: 1-13

Jeong D won, Kim TS, Chung YW, Lee BJ, Kim IY. 2002. Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett* **517**: 225–228.

Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG. 1998. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 4029–4034.

-K-

Kachidiav P, Pickel VM. 1993. Localization of tyrosine hydroxylase in neuronal targets and efferents of the area postrema in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Comp Neurol* **329**: 337-353.

Kasamatsu T, Pettigrew JD. 1976. Depletion of brain catecholamines: failure of ocular dominance shift after monocular occlusion in kittens. *Science* **194**: 206–209.

Kawano H, Daikoku S. 1987. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: Retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* **265**: 242–253.

- Kim H-Y, Gladyshev VN. 2004. Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine- S -sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell* **15**: 1055–1064.
- Kirst C, Skriabine S, Vieites-Prado A, Topilko T, Bertin P, Gerschenfeld G, Verny F, Topilko P, Michalski N, Tessier-Lavigne M, et al. 2020. Mapping the fine-scale organization and plasticity of the brain vasculature. *Cell* **180**: 780-795.
- Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. 2019. Dopamine: Functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cell Mol Neurobiol* **39**: 31–59.
- Klingberg A, Hasenberg A, Ludwig-Portugall I, Medyukhina A, Männ L, Brenzel A, Engel DR, Figge MT, Kurts C, Gunzer M. 2017. Fully automated evaluation of total glomerular number and capillary tuft size in nephritic kidneys using lightsheet microscopy. *J Am Soc Nephrol* **28**: 452–459.
- Koblinger K, Füzesi T, Ejdrygiewicz J, Krajacic A, Bains JS, Whelan PJ. 2014. Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice. *PLoS One* **9**: 1–12.
- Kohrle J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe L. 2000. Selenium in biology: Facts and medical perspectives. *Biol Chem* **381**: 849–864.
- Korotkov K V., Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2001. Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:Glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* **276**: 15330–15336.
- Kossinova O, Malygin A, Krol A, Karpova G. 2014. The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of the 28S rRNA. *Rna* **20**: 1046–1056.
- Kryukov G V., Castellano S, Novoselov S V., Lobanov A V., Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**: 1439–1443.
- Kryukov G V., Gladyshev VN. 2004. The prokaryotic selenoproteome. *EMBO Rep* **5**: 538–543.
- Kryukov G V., Kryukov VM, Gladyshev VN. 1999. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* **274**: 33888–33897.
- Kumer SC, Vrana KE. 2002. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67**: 443–462.
- Kitazawa T, Saito K, Ohga A. 1985. Effects of catecholamines on spinal motoneurons and spinal reflex discharges in the isolated spinal cord of the newborn rat. *Brain Res* **351**: 31–36.

-L-

- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2014. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* **94**: 739–777.
- Lanièce P, Le Hir H, Bodeau-Péan S, Charon Y, Valentin L, Thermes C, Mallet J, Dumas S. 1996. A novel rat tyrosine hydroxylase mRNA species generated by alternative splicing. *J Neurochem* **66**: 1819–1825.
- Lee S, Kim SM, Lee RT. 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* **18**: 1165–1207.
- Léger L, Sapin E, Goutagny R, Peyron C, Salvart D, Fort P, Luppi PH. 2010. Dopaminergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep in the rat. *J Chem Neuroanat* **39**: 262–271.
- Lenz M, Lens PNL. 2009. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Sci Total Environ* **407**: 3620–3633.
- Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A. 1999. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* **274**: 38147–38154.
- Li J ping, Zhou J xuan, Wang Q, Gu G qin, Yang S jin, Li C ye, Qiu C wei, Deng G zhen, Guo M yao. 2016. Se enhances MLCK activation by regulating selenoprotein T (SelT) in the gastric smooth muscle of rats. *Biol Trace Elem Res* **173**: 116–125.
- Li K, Feng T, Liu L, Liu H, Huang K, Zhou J. 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**.
- Li Z, Zhang Di, Li Q, Yang Xiaoli, Zhang R, Zhang Dandan, Yang Xuena, Wang C, Tan X, Xiong Y. 2020. Effects of methylation of deiodinase 3 gene on gene expression and severity of Kashin–Beck disease. *J Cell Physiol* **235**: 9946–9957.
- Lindvall O, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Björklund A, Mardsen CD. 1992. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson’s disease: One-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* **31**: 155–165.
- Liu H, Wang X, Zhang B, Han Z, Wang W, Chi Q, Zhou J, Nie L, Xu S, Liu D, Liu Q, Gou X. 2021. Concentration and distribution of selenium in soils of mainland China, and implications for human health. *J Geochemical Explor* **220**.
- Liu J, Chen Q, Rozovsky S. 2018. Selenocysteine-mediated expressed protein ligation of SELENOM. *Methods Mol Biol* **1661**: 265–283.

- Liu J, Du J, Zhang Y, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ. 2006. Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Hum Gene Ther* **17**: 105–116.
- Liu Z, ye Q, Wang F, Guo Y, Cui R, Wang J, Wang D. 2021. Protective effect of thioredoxin reductase 1 in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **741**.
- Lönnerdal B, Vargas-Fernández E, Whitacre M. 2017. Selenium fortification of infant formulas: Does selenium form matter? *Food Funct* **8**: 3856–3868.
- Loughlin SE, Foote SL, Bloom FE. 1986. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: Topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience* **18**: 291–306.
- Low SC, Berry MJ. 1996. Knowing when not to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **21**: 203–208.
- Lu J, Holmgren A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **66**: 75–87.
- M-**
- Maheu FS, Lupienn SJ. 2003. La mémoire aux prises avec les émotions et le stress : un impact nécessairement dommageable? *médecine/sciences* **19**: 118–124.
- Mammadova-Bach E, Jaeken J, Gudermann T, Braun A. 2020. Platelets and defective n-glycosylation. *Int J Mol Sci* **21**: 1–16.
- Marcos P, Arroyo-Jimenez MM, Lozano G, Aguilar LA, Coveñas R. 2011. Mapping of tyrosine hydroxylase in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem and colocalization with CGRP. *J Chem Neuroanat* **41**: 63–72.
- Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov A V., Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2012. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* **7**: 1-18.
- Mason ST, Fibiger HC. 1979. Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **187**: 703–724.
- Mazza R, Gattuso A, Imbrogno S, Boukhzar L, Leo S, Mallouki BY, Filice M, Rocca C, Angelone T, Anouar Y, et al. 2019. Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Biol* **222**: 1-9.
- Meloni EG, Gerety LP, Knoll AT, Cohen BM, Carlezon WA. 2006. Behavioral and anatomical interactions between dopamine and corticotropin-releasing factor in the rat. *J Neurosci* **26**: 3855–3863.

- Merk D, Ptok J, Jakobs P, Ameln F Von, Greulich J, Kluge P, Semperowitsch K, Eckermann O, Schaal H, Ale-agma N, et al. 2021. Selenoprotein T protects endothelial cells against lipopolysaccharide-induced activation and apoptosis. *Antioxidants* **10**: 1-14.
- Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JÅ, Spyrou G. 1999. Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem* **261**: 405–412.
- Missale C, Russel Nash S, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189–225.
- Mitrofanis J. 2005. Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience* **130**: 1–15.
- Moaddab M, McDannald MA. 2021. Retrorubral field is a hub for diverse threat and aversive outcome signals. *Curr Biol* **31**: 2099-2110.
- Molbay M, Kolabas ZI, Todorov MI, Ohn T, Ertürk A. 2021. A guidebook for DISCO tissue clearing. *Mol Syst Biol* **17**: 1–21.
- Morales M, Margolis EB. 2017. Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **18**: 73–85.
- Moriya S, Yamashita A, Masukawa D, Setoyama H, Hwang Y, Yamanaka A, Kuwaki T. 2020. Involvement of A13 dopaminergic neurons located in the zona incerta in nociceptive processing: A fiber photometry study. *Mol Brain* **13**: 4–7.
- Motsenbocker MA, Tappel AL. 1982. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* **719**: 147–153.
- Moustafa ME, Antar HA. 2012. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* **50**: 736–747.
- N-
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. *J Biol Chem* **239**: 2910–2917.
- Nakashima A, Hayashi N, Kaneko YS, Mori K, Sabban EL, Nagatsu T, Ota A. 2009. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. *J Neural Transm* **116**: 1355–1362.
- Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystöm C, Nordman T, Miranda-Vizuete A, Olsson JM, Eriksson L, Björnstedt M, Arnér ESJ, Spyrou G. 2004. Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells: Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem* **279**: 54510–54517.

- Nam H, Kerman IA. 2016. Distribution of catecholaminergic presympathetic-premotor neurons in the rat lower brainstem. *Neuroscience* **324**: 430–445.
- Nickel A, Kottra G, Schmidt G, Danier J, Hofmann T, Daniel H. 2009. Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem Biol Interact* **177**: 234–241.
- Nordberg J, Arnér ESJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. *Free Radic Biol Med* **31**: 1287–1312.
- Novoselov S V., Kryukov G V., Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2007. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* **282**: 11960–11968.

-O-

- O'Malley KL, Rotwein P. 1988. Human tyrosine hydroxylase and insulin genes are contiguous on chromosome 11. *Nucleic Acids Res* **16**: 4437–46.
- Okuno S, Fujisawa H. 1991. Conversion of tyrosine hydroxylase to stable and inactive form by the end products. *J Neurochem* **57**: 53–60.
- Olson L, Boréus LO, Seiger Å. 1973. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine- and catecholamine-containing neuron systems in the human fetal brain. *Z Anat Entwicklungsgesch* **139**: 259–282.
- Olson L, Seiger Ake. 1972. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. *Zeitschrift far Anat und Entwicklungsgeschichte* **137**: 301–316.
- Oudouhou F, Casu B, Doggwa Puemi AS, Sygusch J, Baron C. 2017. Analysis of novel interactions between components of the selenocysteine biosynthesis pathway, SEPHS1, SEPHS2, SEPSECS, and SECp43. *Biochemistry* **56**: 2261–2270.
- Ozawa H, Yamaguchi T, Hamaguchi S, Yamaguchi S, Ueda S. 2017. Three types of A11 neurons project to the rat spinal cord. *Neurochem Res* **42**: 2142–2153.

-P-

- Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Loubopoulos A, Matryba P, Plesnila N, Dichgans M, Hellal F, Ertürk A. 2016. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* **13**: 859–867.

- Pan T, Liu T, Tan S, Wan N, Zhang Y, Li S. 2018. Lower selenoprotein T expression and immune response in the immune organs of broilers with exudative diathesis due to selenium deficiency. *Biol Trace Elem Res* **182**: 364–372.
- Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ. 2007. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem* **282**: 23759–23765.
- Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, Guicheney P. 2003. Selenoprotein N: An endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* **12**: 1045–1053.
- Pillay S, Bhagwandin A, Bertelsen MF, Patzke N, Engler G, Engel AK, Manger PR. 2017. Regional distribution of cholinergic, catecholaminergic, serotonergic and orexinergic neurons in the brain of two carnivore species: The feliform banded mongoose (*Mungos mungo*) and the caniform domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *J Chem Neuroanat* **82**: 12–28.
- Potes CS, Turek VF, Cole RL, Vu C, Roland BL, Roth JD, Riediger T, Lutz TA. 2010. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin's hypophagic action. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **299**: 623–631.
- Pothion H, Jehan C, Tostivint H, Cartier D, Bucharles C, Falluel-Morel A, Boukhzar L, Anouar Y, Lihmann I. 2020. Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis. *Antioxidants Redox Signal* **33**: 1257–1275.
- Pournasir M, Ghorbian S, Ghasemnejad T, Fattahi A, Nouri M. 2021. Glutathione peroxidase 3 (extracellular isoform) levels and functional polymorphisms in fertile and infertile men. *Middle East Fertil Soc J* **26**: 1-8.
- Prevost G, Arabo A, Jian L, Queleynec 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 β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* **154**: 3796–3806.
- Puelles L, Verney C. 1998. Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in human embryos. *J Comp Neurol* **394**: 283–308.
- Q-
- Qi Y, Grishin N V. 2005. Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins Struct Funct Genet* **58**: 376–388.

Qi Y, Yu T, Xu J, Wan P, Ma Y, Zhu J, Li Y, Gong H, Luo Q, Zhu D. 2019. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Arch di Stud Urbani e Reg* **48**: 1–13.

-R-

Racke K, Ritzel H, Trapp B, Muscholl E. 1980. Dopaminergic modulation of evoked vasopressin release from the isolated neurohypophysis of rat. *Archives of Pharmacology*. **319**: 56–65.

Reiner DJ, Mietlicki-Baase EG, McGrath LE, Zimmer DJ, Bence KK, Sousa GL, Konanur VR, Krawczyk J, Burk DH, Kanoski SE, et al. 2016. Astrocytes regulate GLP-1 receptor-mediated effects on energy balance. *J Neurosci* **36**: 3531–3540.

Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, et al. 2016. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* **165**: 1789–1802.

Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. 2014. IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**: 896–910.

Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. 2006. Selenium-dependent pre-and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology* **147**: 5883–5892.

Rinaman L. 1998. Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Comp Neurol* **399**: 101–109.

Robinson MF, Rea HM, Friend GM, Stewart RDH, Snow PC, Thomson CD. 1978. On supplementing the selenium intake of New Zealanders. *Br J Nutr* **39**: 589–600.

Rocca C, Boukhzar L, Granieri MC, Alsharif I, Mazza R, Lefranc B, Tota B, Leprince J, Cerra MC, Anouar Y, et al. 2018. A selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischaemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta Physiol* **223**: 1-16.

Rocca C, Pasqua T, Boukhzar L, Anouar Y, Angelone T. 2019. Progress in the emerging role of selenoproteins in cardiovascular disease: focus on endoplasmic reticulum-resident selenoproteins. *Cell Mol Life Sci* **76**: 3969–3985.

Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. 2016. brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun* **7**: 1–11.

- Roman M, Jitaru P, Barbante C. 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metalomics* **6**: 25–54.
- Roostalu U, Salinas CBG, Thorbek DD, Skytte JL, Fabricius K, Barkholt P, John LM, Jurtz VI, Knudsen LB, Jelsing J, et al. 2019. Quantitative whole-brain 3D imaging of tyrosine hydroxylase-labeled neuron architecture in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *DMM Dis Model Mech* **12**: 1-18.
- Ross JA, Van Bockstaele EJ. 2020. The role of catecholamines in modulating responses to stress: Sex-specific patterns, implications, and therapeutic potential for post-traumatic stress disorder and opiate withdrawal. *Eur J Neurosci* **52**(1): 2429–2465.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE. 1980. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Nutr Rev* **38**: 280–283.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**: 588–590.
- S-
- Sachdev SW, Sunde RA. 2001. Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and-4 in rat liver. *Biochem. J* **357**: 851–858.
- Saito Y, Takahashi K. 2002. Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* **269**: 5746–5751.
- Savica R, Benarroch EE. 2014. Dopamine receptor signaling in the Forebrain: Recent insights and clinical implications. *Neurology* **83**: 758–767.
- Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. 2017. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* **93**: 747–765.
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **190**: 165–175.
- Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Angelis MH, et al. 2009. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J* **23**: 3233–3242.
- Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J. 2003. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* **370**: 397–402.
- Schrauzer GN. 2000. Recent Advances in Nutritional Sciences Selenomethionine : A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Recent Adv Nutr Sci* **130**: 1653–1656.

- Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. 2004. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Front Horm Res* **31**: 1–25.
- Schweizer U, Bohleber S, Zhao W, Fradejas-Villar N. 2021. The neurobiology of selenium: Looking back and to the future. *Front Neurosci* **15**: 1-8.
- Schweizer U, Fradejas-Villar N. 2016. Why 21? the significance of selenoproteins for human health revealed by inborn errors of metabolism. *FASEB J* **30**: 3669–3681.
- Seiger Å, Olson L. 1973. Late prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. *Z Anat Entwicklungsgesch* **140**: 281–318.
- Shao ZQ, Zhang X, Fan HH, Wang XS, Wu HM, Zhang L, Cheng WH, Zhu JH. 2019. Selenoprotein T promotes proliferation and G1-to-S transition in SK-N-SH cells: Implications in Parkinson's disease. *J Nutr* **149**: 2110–2119.
- Sharma S, Kim LH, Mayr KA, Elliott DA, Whelan PJ. 2018. Parallel descending dopaminergic connectivity of A13 cells to the brainstem locomotor centers. *Sci Rep* **8**: 1–15.
- 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.
- Simonović M, Puppala AK. 2018. On elongation factor eEFSec, its role and mechanism during selenium incorporation into nascent selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1862**: 2463–2472.
- Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohé R, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. 2006. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**: 639–650.
- Skinner GO, Damasceno F, Gomes A, Almeida OMMS De. 2011. Pharmacology, biochemistry and behavior increased pain perception and attenuated opioid antinociception in paradoxical sleep-deprived rats are associated with reduced tyrosine hydroxylase staining in the periaqueductal gray matter and are reversed by L-D. *Pharmacol Biochem Behav* **99**: 94–99.
- Smeets WJA, Reiner A. 1994. Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates. *Cambridge Univ Press*.
- Smeets WJAJ, González A. 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: New perspectives through a comparative approach. *Brain Res Rev* **33**: 308–379.

- Smyrek I, Stelzer EHK. 2017. Quantitative three-dimensional evaluation of immunofluorescence staining for large whole mount spheroids with light sheet microscopy. *Biomed Opt Express* **8**: 1-16.
- Son JH, Min N, Joh TH. 1996. Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene. *Mol Brain Res* **36**: 300–308.
- Soumier A, Habart M, Lio G, Demily C, Sirigu A. 2022. Differential fate between oxytocin and vasopressin cells in the developing mouse brain. *iScience* **25**: 1-20.
- Spalteholz W. 1911. Ober das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen. *S Hirzel, Leipzig*.
- Specht LA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. 1981. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J Comp Neurol* **199**: 255–276.
- Stiasny K, Wetter T., Trenkwalder C, Oertel W. 2000. Restless legs syndrome and its treatment by dopamine agonists. *Parkinsonism Relat Disord* **7**: 21–25.
- Stoedter M, Renko K, Hög A, Schomburg L. 2010. Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice. *Biochem J* **429**: 43–51.
- Stoll G, Martin R, Voigt KH. 1984. Control of peptide release from cells of the intermediate lobe of the rat pituitary. *Cell Tissue Res* **236**: 561–566.
- Strekalova T, Spanagel R, Dolgov O, Bartsch D. 2005. Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol* **16**: 171–80.
- Stuesse SL, Cruce WLR, Northcutt RG. 1991. Localization of serotonin, tyrosine hydroxylase, and leu-enkephalin immunoreactive cells in the brainstem of the horn shark, *Heterodontus francisci*. *J Comp Neurol* **308**: 277–292.
- Su D, Novoselov S V., Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2005. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase: Roles in bisulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* **280**: 26491–26498.
- Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK. 2009. Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci Rep* **29**: 329–338.

- Sunde RA, Zemaitis ET, Blink AB, Lawinger JA. 2018. Impact of glutathione peroxidase-1 (Gpx1) genotype on selenoenzyme and transcript expression when repleting selenium-deficient mice. *Biol Trace Elem Res* **186**: 174–184.
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, et al. 2014. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**: 726–739.
- Swanson LW, Kuypers HGJM. 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* **194**: 555–570.
- T-
- Takeuchi A, Schmitt D, Chapple C, Babaylova E, Karpova G, Guigo R, Krol A, Allmang C. 2009. A short motif in drosophila SECIS binding protein 2 provides differential binding affinity to SECIS RNA hairpins. *Nucleic Acids Res* **37**: 2126–2141.
- Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka DL, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, et al. 2011. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* **152**: 4322–4335.
- Taylor EW, Bhat A, Nadimpalli RG, Zhang W, Kececioglu J. 1997. HIV-1 encodes a sequence overlapping env gp41 with highly significant similarity to selenium-dependent glutathione peroxidases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **15**: 393–394.
- Tilders FJH, Van der woude HA, Swaab DF, Mulder AH. 1979. Hypothalamic lesions electrothermic lesions were made in the mediobasal hypothalamus of ether anaesthetized rats. *Brain Res* **171**: 425–435.
- Tondreau MY, Boucher E, Simard M, Tremblay Y, Bilodeau J-F. 2012. Sex-specific perinatal expression of glutathione peroxidases during mouse lung development. *Mol Cell Endocrinol* **355**: 87–95.
- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, et al. 2006. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* **10**: 241–252.

Turner DC, Stadtman TC. 1973. Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch Biochem Biophys* **154**: 366–381.

-U-

Ueda HR, Dodt HU, Osten P, Economo MN, Chandrashekar J, Keller PJ. 2020. Whole-brain profiling of cells and circuits in mammals by tissue clearing and light-sheet microscopy. *Neuron* **106**: 369–387.

-V-

Varone E, Pozzer D, Di Modica S, Chernorudskiy A, Nogara L, Baraldo M, Cinquanta M, Fumagalli S, Villar-Quiles RN, De Simoni MG, et al. 2019. SELENON (SEPN1) protects skeletal muscle from saturated fatty acid-induced ER stress and insulin resistance. *Redox Biol* **24**: 1-14.

Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E, Hashimoto AS, Hoffmann PR. 2011. Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. *J Immunol* **186**: 2127–2137.

Verney C. 1999. Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microsc Res Tech* **46**: 24–47.

Vieites-Prado A, Renier N. 2021. Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development* **148**: 1-17.

Vigouroux RJ, César Q, Chédotal A, Nguyen-Ba-Charvet KT. 2020. Revisiting the role of DCC in visual system development with a novel eye clearing method. *Elife* **9**: 1–30.

Voie AH, Burns DH, Spelman FA. 1993. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J Microsc* **170**: 229–236.

-W-

Wang F han, Peng X, Chen Y, Wang Y, Yang M, Guo M yao. 2019. Se Regulates the contractile ability of uterine smooth muscle via selenoprotein N, selenoprotein T, and selenoprotein win mice. *Biol Trace Elem Res* **192**: 196–205.

Wang L, Jing J, Yan H, Tang J, Jia G, Liu G, Chen X, Tian G, Cai J, Shang H, et al. 2018. Selenium pretreatment alleviated LPS-induced immunological stress via upregulation of several selenoprotein encoding genes in murine RAW264.7 cells. *Biol Trace Elem Res* **186**: 505–513.

- Wang X, Chou X lin, Zhang LI, Tao HW. 2020. Zona incerta: An integrative node for global behavioral modulation. *Trends Neurosci* **43**: 82–87.
- Waterhouse BD, Lin CS, Burne RA, Woodward DJ. 1983. The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* **217**: 418–431.
- Weber F, Dan Y. 2016. Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature* **538**: 51–59.
- Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE. 2005. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J Comp Neurol* **492**: 370–379.
- Whanger PD. 2000. Selenoprotein W: A review. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1846–1852.
- Windmill K, Tenne-Brown J, Bayles R, Trevaskis J, Gao Y, Walder K, Collier GR. 2007. Localization and expression of selenoprotein S in the testis of *Psammomys obesus*. *J Mol Histol* **38**: 97–101.
- Wingler K, Böcher M, Flohé L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R. 1999. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem* **259**: 149–157.
- Wingler K, Müller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohé R. 2000. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* **119**: 420–430.
- Wittwer AJ. 1983. Specific incorporation of selenium into lysine- and glutamate- accepting tRNAs from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**: 8637–8641.

-X-

- Xia Y, Piao J, Hill KE, Burk RF. 1967. *Selenium In Biology And Human Health Springer-Verlag*. Angewandte Chemie International Edition.
- Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, Hatfield DL. 2007. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem J* **404**: 115–120.
- Xu XM, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, Hatfield DL. 2005. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J Biol Chem* **280**: 41568–41575.

-Y-

- Yeh J, Beilstein MA, Andrews JS, Whanger PD. 1995. Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W. *FASEB J* **9**: 392–396.

Yoshizawa S, Böck A. 2009. The many levels of control on bacterial selenoprotein synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1404–1414.

-Z-

Zecevic N, Verney C. 1995. Development of the catecholamine neurons in human embryos and fetuses, with special emphasis on the innervation of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* **351**: 509–535.

Zhang X, Xiong W, Chen LL, Huang JQ, Lei XG. 2020. Selenoprotein V protects against endoplasmic reticulum stress and oxidative injury induced by pro-oxidants. *Free Radic Biol Med* **160**: 670–679.

Zhang Y, Roh YJ, Han SJ, Park I, Lee HM, Ok YS, Lee BC, Lee SR. 2020. Role of selenoproteins in redox regulation of signaling and the antioxidant system: A review. *Antioxidants* **9**: 1–17.

Zhao L, Feng Y, Deng J, Zhang NY, Zhang WP, Liu XL, Rajput SA, Qi DS, Sun LH. 2019. Selenium deficiency aggravates aflatoxin B1-induced immunotoxicity in chick spleen by regulating 6 selenoprotein genes and redox/inflammation/apoptotic signaling. *J Nutr* **149**: 894–901.

Zhao X, Liu L, Zhou W, Cai Q, Huang Q. 2020. Roles of selenoprotein T and transglutaminase in active immunization against entomopathogenic fungi in the termite *reticulitermes chinensis*. *J Insect Physiol* **125**: 1-8.

Zhuang W, Liu J, Li W. 2021. hsa-miR-33-5p as a therapeutic target promotes apoptosis of breast cancer cells via selenoprotein T. *Front Med* **8**: 1–10.

Title: Characterization of neurons expressing tyrosine hydroxylase in wild-type and SELENOT invalidated mice: three-dimensional imaging and behavioral analysis

Resume: Selenoproteins are proteins containing at least one selenium atom in their amino acid chain. These proteins found in almost all living species have multiple biological functions. Indeed, they enter the metabolic pathway of thyroid hormones, they are antioxidant enzymes, enzymes essential for protein folding, they participate in the transport of selenium in the body, they are involved in the synthesis of proteins, they have a role in redox signaling, but for some of them the functions are still only partially understood. Previous work carried out in our team described some of the functions of a particular selenoprotein, SELENOT. This selenoprotein located in the ER allows the stabilization of the OST complex which catalyzes N-glycosylation. In addition, the antioxidant and regulatory functions of redox homeostasis suggest a protective role for this selenoprotein. Results corroborating this hypothesis made it possible to verify this neuroprotective role of SELENOT. In a model of neurotoxicity, it was shown that SELENOT protects dopaminergic cells. This SELENOT seems to have an important role in the maintenance and survival of cells of catecholaminergic phenotype.

Catecholaminergic cells are neurons expressing catecholamines (CA). CA are part of the neurotransmitters and hormones belonging to the group of monoamines, including dopamine, noradrenaline and adrenaline which have multiple biological functions, with localization and distribution in the CNS varying according to the species. A particular neuroanatomical nomenclature for this category of neurons has been developed in order to describe the different biological roles of different groups of cells. In addition to the link between neuroanatomical region and biological role, each CA is involved in different biological functions. Indeed, adrenaline regulates blood sugar, heart rate and blood pressure, noradrenaline plays a role in the functions learning, sleep, emotions and attention, and finally, dopamine nicknamed the *pleasure hormone* is described for its motor functions and its role in attention and reward. The catecholaminergic system is a very complex system, which consists of neurons whose basal state of oxidative stress seems to be greater than for other types of neurons. This state of stress would be linked to CA metabolism and their degradation pathway, making catecholaminergic neurons more sensitive. This sensitivity would explain the fundamental role of SELENOT for the survival of this family of neurons.

In order to better understand the implications of this SELENOT in the CNS, a conditional SELENOT KO mouse model was generated in our laboratory. This model, in which the SELENOT gene is disrupted only in nerve cells, exhibits altered behavioral phenotypes in adulthood, suggesting a possible disturbance of the CA system. Indeed, these KO SELENOT mice show hyperactivity, they have reproductive and weight gain deficits, and anxiety behavior. In view of these phenotypic observations, we undertook the characterization of the CA system in the CNS of this KO SELENOT mice.

In order to characterize the CA system of conditional SELENOT KO mice, we have: 1) used an innovative imaging approach, three-dimensional imaging allowing to have a globalized view of the organ and the type of cell studied, and 2) carried out behavioral analysis. A methodological flowchart initially designed made it possible to generate a three-dimensional atlas of the CA system, and this methodological approach was then used to characterize certain groups of CA neurons in conditional SELENOT knockout mice. The results showed alterations in the distribution of catecholaminergic neurons in certain groups of the CA system which might be correlated with behavioral alterations.

Keywords: SELENOT, catecholaminergic system, three-dimensional imaging, behavioral analysis.

Titre : Caractérisation des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase chez les souris sauvages et invalidées pour la SELENOT : imagerie tridimensionnelle et analyse comportementale

Résumé : Les sélénoprotéines sont des protéines contenant dans leur chaîne d'acides aminés au moins un atome de sélénium. Ces protéines ont de multiples fonctions biologiques, elles entrent dans la voie métabolique des hormones thyroïdiennes, ce sont des enzymes antioxydantes, des enzymes essentielles pour le repliement protéique, elles participent au transport du sélénium dans l'organisme, elles sont impliquées dans la synthèse de protéines et elles ont un rôle dans la signalisation redox, mais pour une partie d'entre elles les fonctions ne sont que partiellement élucidées. Des travaux antérieurs menés dans notre équipe ont décrit quelques fonctions d'une sélénoprotéine en particulier, la SELENOT. Cette sélénoprotéine localisée dans le RE stabilise le complexe OST, complexe impliqué dans la N-glycosylation des protéines. De plus, des activités antioxydantes et régulatrices de l'homéostasie redox suggèrent un rôle protecteur de cette sélénoprotéine. En utilisant un modèle de neurotoxicité, il a été montré que la SELENOT protège les cellules dopaminergiques et semble avoir un rôle important dans le maintien et la survie des cellules de type catécholaminergique.

Les catécholamines (CA) exprimées par les cellules catécholaminergiques, sont des neurotransmetteurs et hormones appartenant au groupe des monoamines dont font partie la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline qui ont de multiples fonctions biologiques, avec une localisation et une distribution dans le SNC variant suivant les espèces. Une nomenclature neuroanatomique particulière pour cette catégorie de neurones a été créée afin de décrire les différents rôles biologiques des groupes de cellules CA. En plus du lien entre la région neuroanatomique et le rôle biologique, chaque CA est impliquée dans différentes fonctions. En effet, l'adrénaline régule la glycémie, la fréquence cardiaque et la tension artérielle, la noradrénaline a des rôles dans les fonctions d'apprentissage, du sommeil, des émotions et de l'attention, et enfin la dopamine surnommée *l'hormone du plaisir* est décrite pour ses fonctions motrices, dans les mécanismes de l'attention et de la récompense. Le système catécholaminergique est donc un système très complexe, qui se compose de neurones dont l'état basal du stress oxydant semble être plus important que dans d'autres types de neurones. Cet état de stress serait lié au métabolisme des CA et à leur voie de dégradation rendant les neurones catécholaminergiques plus sensibles. Cette sensibilité expliquerait le rôle fondamental de la SELENOT pour la survie de cette famille de neurones.

Un modèle de souris KO SELENOT conditionnel a été créé dans notre laboratoire. Ce modèle dont la SELENOT est invalidée dans les cellules nerveuses présente à l'âge adulte des phénotypes comportementaux altérés suggérant une possible perturbation du système catécholaminergique. En effet, ces souris KO SELENOT présentent une hyperactivité, ont des troubles de la reproduction et de prise de poids, et présentent des comportements d'anxiété. Au vu de ces observations phénotypiques, nous avons entrepris la caractérisation du système catécholaminergique dans le SNC de ces souris KO SELENOT.

Afin de caractériser le système catécholaminergique des souris KO SELENOT conditionnelles, nous avons : 1) utilisé une approche d'imagerie novatrice, l'imagerie tridimensionnelle permettant d'avoir une vision globalisée de l'organe et du type cellulaire étudiés, et 2) réalisé une analyse du comportement. Une charte méthodologique a permis dans un premier temps de créer un atlas tridimensionnel du système catécholaminergique, et cette approche a ensuite été utilisée pour caractériser certains groupes de neurones CA chez la souris KO SELENOT conditionnelle. Les résultats montrent des altérations de la distribution des neurones catécholaminergiques pouvant être corrélées avec des déficits comportementaux.

Mots clés : SELENOT, système catécholaminergique, imagerie tridimensionnelle, analyse comportementale.