

Université de Montréal

**Étude de la dynamique des interactions des constituants du  
complexe de biosynthèse et d'insertion de la sélénocystéine  
dans la traduction des sélénoprotéines *in vivo***

par  
Étienne Pageau-Crevier

Département de biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en biochimie  
option génétique moléculaire

Juillet 2013

© Étienne Pageau-Crevier, 2013  
Aide à l'édition par Francine Cloutier, correctrice

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de la dynamique des interactions des constituants du complexe de biosynthèse et  
d'insertion de la sélénocystéine dans la traduction des sélénoprotéines *in vivo*

présenté par :  
Étienne Pageau-Crevier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Muriel Aubry, présidente-rapporteuse  
Dr Christian Baron, directeur de recherche  
Dr Stephen Michnick, membre du jury

## Résumé

Les sélénoprotéines sont des protéines auxquelles des sélénocystéines, soit le 21<sup>e</sup> acide aminé, sont incorporées durant leur traduction. Plus précisément, la sélénocystéine (Sec) est un dérivé métabolique de la sérine, mais structurellement équivalent à une cystéine dont on a remplacé l'atome de soufre par du sélénium. Elle se distingue des autres acides aminés puisqu'elle possède sa propre synthétase qui sert à convertir la sérine en Sec alors que le résidu est déjà fixé à l'ARNt. La position d'une Sec sur l'ARNm est indiquée par le codon UGA étant habituellement un signal STOP introduisant le concept de *recoding*. Grâce à une machinerie métabolique spécifique à l'ARNt<sup>Sec</sup> et à la présence d'un SecIS (*Selenocystein Insertion Sequence*) sur l'ARNm, ce codon permet la présence d'une Sec dans la protéine. Il est connu que la synthèse débute avec l'acétylation de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> par la seryl-ARNt synthétase (SerRS) afin de donner la seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Cette dernière est subséquemment phosphorylée par l'*O*-phosphoséryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> kinase (PSTK) qui donnera l'*O*-phosphoséryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Par la suite, un complexe de plusieurs protéines et cofacteurs, agissant comme machinerie pour l'incorporation des Sec durant la traduction, s'associe avec l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> puis l'ARNm et, finalement, les composantes du ribosome.

Parmi ces protéines, SepSecS catalyse l'étape finale de la synthèse des Sec en convertissant le *O*-phosphoséryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> en selenocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> utilisant le sélénophosphate comme source de sélénium. Des études récentes montrent que l'association avec SECp43 serait nécessaire pour que SepSecS joue son rôle et soit ségréguée au noyau pour s'associer à la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines, soit le complexe moléculaire qui reconnaît le codon UGA. Parmi les protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines que nous avons analysées, il y a eEFSec, RPL30, SPS2, SPS1, SBP2 et NSEP1.

Nos résultats d'analyse de la dynamique de l'interaction entre les constituants de la machinerie de biosynthèse et d'incorporation des Sec, confirment plusieurs données de la littérature, mais remettent en question le modèle jusqu'à maintenant établi. Une meilleure compréhension de la dynamique des interactions entre ses constituants et la

régulation de cette dynamique permet d'émettre des hypothèses quant au rôle de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines et de l'importance de sa complexité.

Nous avons analysé les interactions *in vivo* dans des cellules HEK293T au moyen de la technique de *Protein-Fragment Complementation Assay* (PCA) en couplant, par un clonage moléculaire, les gènes de chacune des protéines d'intérêt avec des fragments des gènes de la protéine luciférase (hRluc). Nous avons ainsi réalisé une fusion en N-terminal et en C-terminal des fragments de luciférase pour chacune des protéines d'intérêt. Puis, nous avons analysé la dynamique des interactions avec les composantes de la machinerie de biosynthèse des Sec. D'autres travaux seront essentiels afin de bâtir sur les résultats présentés dans cette recherche.

**Mots-clés :** Sélénocystéine, sélénoprotéine, sélénosome, ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, SepSecS, SLA/LP, SecP43, eEFSec, NSEP1, SPS1, SPS2, SBP2, RPL30, dynamique d'interactions, PCA.

## Abstract

Selenoproteins are proteins that incorporate selenocysteines, which is called the 21st amino acid, during their translation. Specifically, selenocysteine (Sec) is a metabolic derivative of serine, which is structurally equivalent to Cys except for replacement of sulfur with an atom of selenium in the  $\delta$ -position. It differs from other amino acids since a unique synthetase converts the serine into Sec while the residue is already attached to the tRNA. The codon for Sec on the mRNA is a UGA codon that is usually a STOP signal, introducing the concept of "recoding". Through a specific metabolic machinery for the tRNA<sup>Sec</sup> and the presence of a SecIS (Selenocysteine Insertion Sequence) on the mRNA, this codon allows the incorporation of the Sec into the protein. However, the mechanism of biosynthesis of this amino acid and its incorporation into proteins is not well understood. It is known that the synthesis starts with the acetylation of tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> by seryl-tRNA synthetase (SerRS) to give the seryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>. The latter is subsequently phosphorylated by the *O*-phosphoseryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> kinase (PSTK) which will generate the *O*-phosphoseryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>. Subsequently, a large complex of several proteins and cofactors acting as machinery for incorporation of Sec during translation, associates with tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> and the mRNA and finally, the components of the ribosome.

Among these proteins, SepSecS catalyzes the final step in the biosynthesis of Sec converting *O*-phosphoseryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> into selenocysteinyl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> using monoselenophosphate as a source of selenium. Recent studies showed that the association with SECp43 would be required for SepSecS to play its role to segregate into the nucleus to be associated with the machinery that recognizes the UGA codon. Among the proteins of the biosynthesis machinery of selenoproteins that we analyzed, there are eEFSec, RPL30, SPS2, SPS1, SBP2 and NSEP1.

Results of analysis of the dynamics of the interaction between the components of the Sec biosynthetic machinery confirm some data from the literature, but conflict with the model so far established. A better understanding of the dynamics of interactions between its constituents and the reaction of this process would allow us to make

assumptions about the role of the biosynthetic machinery of selenoproteins and the importance of its complexity.

We analyzed the dynamics of interaction *in vivo* in HEK293T cells using a Protein-Fragment Complementation Assay (PCA) based on a humanized Renilla luciferase (hRLuc) by coupling, by molecular cloning, genes encoding each protein of interest with gene encoding fragments of the luciferase protein (hRLuc). We have thus achieved an expression of fusion of N-terminal and C-terminal fragments for each luciferase protein of interest. Then, we analyzed the dynamics of the interaction with the components of the Sec biosynthetic machinery. Further work will be essential to build on the results presented in this research.

**Keywords :** Selenocysteine, selenoprotein, selenosome, tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, SepSecS, SECp43, eEFSec, RPL30, NSEP1, SPS1, SPS2, SBP2, interactions dynamic, PCA.

## Tables des Matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux .....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements .....	xvi
Chapitre I : Introduction .....	1
1.1. L'importance du sélénium dans la nature .....	1
1.1.1. Sources et biodisponibilité du sélénium.....	1
1.1.2. Présence du sélénium dans le règne animal .....	2
1.2. Rôle du sélénium dans le métabolisme chez l'humain.....	4
1.2.1. Distribution du sélénium et rétention dans le corps humain.....	5
1.2.2. Transport du sélénium.....	5
1.3. Biosynthèse de la sélénocystéine.....	6
1.3.1. Le Sec-ARNt <sup>[Ser]<sup>Sec</sup> .....</sup>	9
1.3.1.1. Structure des différents ARNt <sup>Sec</sup> .....	10
1.3.2. Machinerie de biosynthèse de la sélénocystéine dans les cellules eucaryotes .....	12
1.3.2.1. <i>Selenocysteine tRNA Synthase</i> (SepSecS ou SLA/LP).....	13
1.3.2.2. <i>tRNA-Selenocysteine Associated Protein</i> (SECp43).....	14
1.3.2.3. Sélénophosphate Synthétase 1 et 2 (SPS1 et SPS2) .....	14
1.4. Biosynthèse des sélénoprotéines .....	16
1.4.1. Eucaryotes .....	16
1.4.1.1. Le rôle du codon UGA .....	17
1.4.1.2. <i>Selenocysteine Insertion Sequence</i> ( <i>SecIS</i> ).....	18
1.4.1.3. <i>Eukaryote Elongation Factor Selenocysteine-tRNA-specific</i> (eEFSec) .	20
1.4.1.4. <i>Selenocysteine Insertion Sequence Binding Protein 2</i> (SBP2).....	21
1.4.1.5. <i>Ribosomal Protein L30</i> (RPL30).....	24
1.4.1.6. NSEP1 et Nucleolin.....	26
1.4.2. Procaryotes.....	28

1.4.3.	Archéobactéries.....	31
1.4.4.	Le Sélénoprotéome .....	33
1.4.4.1.	Glutathion Peroxydase (GSHPx).....	34
1.4.4.2.	Thiorédoxine Réductase (TrxR) .....	35
1.4.4.3.	Iodothyronine Désiodase (DIO).....	37
1.4.4.4.	Sélénoprotéines orphelines .....	39
1.4.4.4.1.	Sélénoprotéine P (SEPP1) .....	40
1.4.4.4.2.	Sélénoprotéine 15 kDa (Sep15).....	40
1.4.4.4.3.	Sélénoprotéine W.....	41
1.4.4.4.4.	Méthionine sulfoxide réductase B1 (MsrB1).....	41
1.4.4.4.5.	Autres sélénoprotéines.....	42
1.4.5.	Régulation de la biosynthèse des sélénoprotéines .....	42
1.4.5.1.	La voie <i>nonsense-mediated decay</i> (NMD) .....	44
1.4.5.2.	Rôle du 3'UTR .....	45
1.4.5.3.	Rôle de l'ARNt <sup>[Ser]Sec</sup> .....	45
1.4.5.4.	Régulation par des polymorphismes mononucléotidiques .....	46
1.5.	Les effets sur la santé chez l'homme liés au sélénium .....	47
1.5.1.	Dans le système immunitaire .....	50
1.5.1.1.	Dans les infections virales .....	51
1.5.2.	Dans les maladies inflammatoires et le stress oxydatif.....	51
1.5.3.	Dans le système de reproduction humaine.....	52
1.5.4.	Dans la régulation cérébrale et la neurodégénérescence.....	53
1.5.5.	Dans le métabolisme thyroïdien.....	54
1.5.6.	Dans le système cardiovasculaire .....	56
1.5.7.	Dans les cancers .....	56
1.6.	Hypothèses et Objectifs.....	57
1.6.1.	Objectif 1 – Établissement de l'essai <i>in vivo</i> pour étudier les interactions protéine-protéine au sein du sélénosome.....	58
1.6.2.	Objectif 2 – Analyse protéomique par PCA-hRLuc des interactions <i>in vivo</i> entre les différents constituants du sélénosome.....	60
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes .....		61
2.1.	Culture cellulaire .....	61
2.2.	Anticorps et plasmides .....	61

2.3.	Clonage et mutagenèse dirigée.....	62
2.4.	Immunobuvardage de Type Western.....	65
2.5.	Transfection.....	66
2.6.	Protein-Fragment Complementation Assay (PCA).....	66
2.7.	Analyse Statistique.....	67
Chapitre 3 : Résultats.....		68
3.1.	Objectif 1 – Établissement de l’essai pour étudier les interactions protéines-protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines.....	68
3.2.	Objectif 2 – Analyses des interactions <i>in vivo</i> des constituants du sélénosome.....	76
3.2.1.	Identification des interactions protéine-protéine dans un système à deux protéines dans les cellules HEK293T et NIH3T3.....	77
3.2.2.	Comparaison des interactions protéines-protéines <i>in vivo</i> des constituants du sélénosome dans les cellules NIH3T3 vs HEK293T.....	79
3.2.3.	Effet de la surexpression de SECp43 sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	81
3.2.4.	Effet de la surexpression de SepSecS sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	82
3.2.5.	Effet de la surexpression de SPS1 sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	83
3.2.6.	Effet de la surexpression de SBP2 sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	85
3.2.7.	Effet de la surexpression de RPL30 sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	86
3.2.8.	Effet de la surexpression de eEFSec sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	87
3.2.9.	Effet de la surexpression de SPS2 Se60C sur les interactions <i>in vivo</i> du sélénosome.....	88
Chapitre 4 : Discussion.....		91
Conclusion.....		100
Bibliographie.....		101

## Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des acides aminés sélénométhionine, sélénocystéine, cystéine et sérine. ....	3
Figure 2. Complexes protéiques impliqués dans la biosynthèse des sélénoprotéines. Figure tirée de (Bellinger et al., 2009). ....	9
Figure 3. Modèle de feuille de trèfle du Sec-ARNt de (A) foie de bovin et de (B) <i>Dictyostelium discoideum</i> . Figure tirée de (Hatfield et al., 2006b). ....	11
Figure 4. Modèle de la structure de l'élément SECIS. Figure tirée de (Hatfield et al., 2012) .....	19
Figure 5. Schéma de la biosynthèse et de l'incorporation de la sélénocystéine chez (A) les procaryotes ( <i>Escherichia coli</i> ) et (B) les archéobactéries ( <i>Methanococcus maripaludis</i> ). Figure tirée de (Hatfield et al., 2006a). ....	31
Figure 6. Implication des sélénoprotéines dans les systèmes antioxydants cellulaires. Figure tirée de (Bellinger et al., 2009) .....	37
Figure 7. Réactions de désiodation par les iodothyronines désiodases de Type I, II et III (D1, D2 et D3). Figure modifiée de (Larsen et al., 2012).....	39
Figure 8. Des variants de SBP2 conduisent à une synthèse des sélénoprotéines altérées résultant en une variété de troubles cliniques. ....	50
Figure 9. Voies impliquées dans la production de peroxyde thyroïdien (à gauche) et la protection de la cellule sélénium-dépendante (à droite). Figure tirée de (Schomburg, 2012). ....	55
Figure 10. Détermination de l'efficacité de la transfection transitoire selon la technique, le réactif et la quantité d'ADN (Réactif:ADN) pour la technique de PCA sur plaques à 96 puits avec des cellules HEK293T. ....	70
Figure 11. Détection de l'expression des protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines (A) exprimées en fusion avec hRLuc-F[1] et (B) hRLuc-F[2] par immunobuvardage de type Western.....	72
Figure 12. Application de la technique de l'essai PCA par hRLuc pour l'étude du comportement des constituants de liaison au SecIS de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines <i>in vivo</i> . Effet de la surexpression de (A) RPL30 et de (C) SBP2 sur l'interaction d'eEFSec avec SBP2 ou RPL30.....	75

Figure 13. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines détectée par PCA-hRLuc dans des cellules HEK293T. ....	78
Figure 14. Comparaison des résultats des essais PCA-hRLuc dans des cellules de reins d'embryons humains HEK293T et de sarcome fibroblastiques d'embryon de souris NIH3T3. ....	80
Figure 15. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SECp43 détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	82
Figure 16. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SepSecS détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	83
Figure 17. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SPS1 détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	84
Figure 18. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SBP2 détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	85
Figure 19. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de RPL30 détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	87
Figure 20. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence d'eEFSec détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	88
Figure 21. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SPS2 Se60C détectée par PCA dans des cellules HEK293T. ....	89
Figure 22. Tableau résumé des interactions protéines-protéines dans le sélénosome selon les résultats obtenus dans cette étude (représenté en jaune), les interactions déjà identifiées dans la littérature (représenté en bleu) et celles identifiées dans cette étude de même que dans la littérature (représenté en rouge). ....	90
Figure 23. Interactions dans la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines détectées par PCA dans des cellules HEK293T. ....	92
Figure 24. Machinerie impliquée et événements moléculaires pour la biosynthèse de la sélénocystéine (étape 1 à 4) puis pour sa translocation au noyau (étape 5 et 6) chez les eucaryotes. ....	98

Figure 25. Machinerie impliquée et événements moléculaires pour l'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines chez les eucaryotes.....	99
---	----

## Liste des tableaux

Tableau I : Liste des protéines impliquées dans la biologie du sélénium avec des fonctions connues ou des effets associés relatifs à la santé chez l'humain. Tableau modifié de (Rayman, 2012).....	48
Tableau II : Liste des plasmides et techniques de clonage.....	62
Tableau III : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la production des plasmides de l'essai PCA ainsi que pour la mutagenèse dirigée. ....	63

## Liste des abréviations

**3'UTR** : *3' untranslated region* ou région non traduite

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ARNt** : acide ribonucléique de transfert

**aSelB** : *archaea selenocysteinyl-tRNA-specific translation factor*

**ATP** : adénosine triphosphate

**C ou Cys** : cystéine

**CJE (ou EJC)** : complexe de jonction de l'épissage (*epissage junction complex*)

**CoelH** : coelentérazine H

**DBC** : coelentérazine deepBlue C

**DIO** : iodothyronine désiodase

**DIT** : diiodotyrosine désiodase

**eEFSec** : *eukaryotic selenocysteine-tRNA-specific elongation factor*

**FAD** : flavine adénine dinucleotide

**FADH** : flavine adénine dinucléotide réduit

**FDH** : formate déshydrogénase

**FMDH** : formyle méthano furane déshydrogénase

**GFP** : *green fluorescent protein*

**GSH** : *glutathione*

**GSHPx** : glutathione peroxydase

**GSHRx** : glutathione réductase

**GTP** : *guanosine triphosphate*

**HEK** : *human embryonic kidney*

**hRLuc** : *humanized renilla luciferase*

**i<sup>6</sup>A** : résidu N6-isopentenyladenosine

**m<sup>1</sup>A** : résidu 1-méthyladénosine  
**mcm<sup>5</sup>U** : résidu 5-méthoxycarbonylméthyluridine  
**mcm<sup>5</sup>Um** : résidu méthoxycarbonylméthyl-2'-O-méthyluridine  
**MIT** : monoiodotyrosine désiodase  
**MsrB** : méthionine sulfoxyde réductase B  
  
**Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>** : sélénite de sodium  
**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : ion superoxyde  
  
**PCA** : *protein-fragment complementation assay*  
**PKAReg** : *Protein Kinase A regulatory subunit*  
**PKACat** : *Protein Kinase A catalytic subunit*  
**PSTK** : *O-phosphoseryl-ARNt<sup>Sec</sup> kinase*  
  
**RE ou ER** : réticulum endoplasmique  
**ROS** : *reactive oxygen species*  
**RPL30 ou L30** : *ribosomal protein L30*  
  
**S ou Ser** : sérine  
**SBP2** : *SecIS binding protein 2*  
**Se** : sélénium  
**Se<sup>2-</sup>** : ion sélénite ou séléniure  
**Sec ou U** : séléncystéine  
**SecIS** : *selenocysteine insertion sequence*  
**SECp43** : tRNA selenocysteine associated protein  
**SeIA** : séléncystéine synthase procaryote  
**SeIB** : *prokaryote selenocysteinyl-tRNA-specific translation factor*  
**SeID** : selenophosphate synthase procaryote  
**SEPN1** : sélénoprotéine N  
**SerRS** : *seryl-tRNA synthetase*  
**Sem** : sélénométhionine  
**SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : sélérate  
**Sep** : O-phosphosérine

**SEP15 ou Sel15** : 15 kDa sélénoprotéine

**SEPP1 ou SelP** : sélénoprotéine P

**SEPS1** : sélénoprotéine S

**SepSecS (ou SLA/LP ou mSelA)** : *Sep tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> : tRNA synthetase*

**SEPW** : sélénoprotéine W

**SLA/LP (ou SepSecS)** : *soluble liver antigen/liver-pancreas*

**SLA** : sclérose latérale amyotrophique

**SNP** : *single nucleotide polymorphism* ou polymorphisme mononucléotidique

**SPS1** : sélénophosphate synthétase 1

**SPS2** : sélénophosphate synthétase 2

**T<sub>2</sub>** : 3,3'-diiodothyronine

**T<sub>3</sub>** : triiodothyronine

**rT<sub>3</sub> ou reverse T<sub>3</sub>** : 3,3',5'-triiodothyronine

**T<sub>4</sub>** : thyroxine

**TNF** : *tumor necrosis factor*

**Trx** : thiorédoxine

**TrxR** : thiorédoxine réductase

**TSH** : *thyroid stimulating hormone*

**Um34** : 2'-O-hydroxyméthyl sur le groupement ribosyl à la position 34

**ψU** : pseudouridine

*À mon papa décédé trop tôt, je t'aime,  
À maman qui est ma source d'inspiration et ma force de vivre,  
Et à toutes les personnes qui m'ont  
encouragé et qui ont cru en moi quand je  
perdais espoir, vous êtes la raison  
pourquoi je me lève le matin.*

## Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur, Dr Christian Baron, qui m'a soutenu et m'a accordé sa confiance tout au long de mon programme d'études de maîtrise. Son expertise et son professionnalisme ont fait toute la différence quant à mon cheminement et à mon apprentissage. Je n'aurais probablement pas été en mesure de compléter une maîtrise en biochimie si j'avais évolué dans un autre laboratoire que celui de Christian. Je me sens choyé et chanceux de t'avoir eu comme mentor et j'espère faire honneur à la biochimie tout au long de ma carrière. Ce que j'ai appris, sous ta supervision, me caractérisera à tout jamais comme professionnel et, peu importe le métier ou la formation que j'ajouterai, à ma maîtrise, je resterai toujours un biochimiste œuvrant en l'honneur de la patience et du dévouement que tu m'as accordé durant les trois dernières années.

Ma famille est sans aucun doute le support qui m'a permis de poursuivre mes études graduées en toute sérénité. Papa, maman, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et surtout merci pour tous les sacrifices qui m'ont permis d'arriver là où je suis maintenant. À mon papa, j'aurais aimé plus que tout au monde que tu puisses lire mon mémoire. Je ne peux m'empêcher de penser que si j'avais fini un peu plus tôt, tu aurais pu. Avec maman, tu étais mon modèle de vie, mon inspiration, mon ange gardien et mon meilleur ami. Ta dernière leçon a été de m'obliger à prendre mes responsabilités plus tôt. Compte tenu de l'esprit scientifique des Crevier, je garde espoir que tu es toujours là quelque part.

Finalement, un merci tout particulier à l'équipe du laboratoire du Dr Baron, Mark, Ana Maria, Flore, John, Mazhad, Ingrid, Benoit et notre glorieux Arnold. Vous êtes un beau groupe et j'ai accompli davantage avec votre aide et au sein de votre laboratoire.

# **Chapitre I : Introduction**

## **1.1. L'importance du sélénium dans la nature**

Afin de bien comprendre l'importance du système de la sélénocystéine chez l'humain, il est important de comprendre l'importance du sélénium (Se). Ce dernier est un oligo-élément trace retrouvé dans la nature et présent partout à travers l'écorce terrestre et donc dans la plupart des végétaux. Il a été découvert en 1817 par un chimiste suédois, Jöns Jacob Berzelius mais ce n'est qu'en 1950 que les recherches biochimiques sur ses propriétés ont commencé, permettant de démontrer son action antioxydante (Berzelius, 1817). Le Se a une masse atomique de 78,96 unités et son numéro atomique est 34. Il se retrouve dans la même catégorie que l'oxygène, le soufre, le tellure et le polonium dans le groupe VI, et entre l'arsenic et le brome dans le tableau périodique (Adriano, 2001). Cet emplacement est très important pour expliquer plusieurs de ses relations biologiques avec le soufre, ainsi qu'avec l'arsenic et le phosphore. Sa configuration électronique et sa position dans le tableau périodique place le Se dans l'important groupe entre les métaux et les semi-métaux, aussi appelé les métalloïdes, soit des éléments qui ne sont ni totalement des métaux ni des non-métaux, mais partage des propriétés physiques entre les deux familles (Frost, 1972).

### **1.1.1. Sources et biodisponibilité du sélénium**

Le sélénium est largement, mais de façon inégale, réparti sur la surface de la Terre. Il est le 70e élément en abondance. Dans les sols, la concentration en Se est généralement faible, à environ 50 à 200 g/kg (Hartikainen, 2005). Le Se est concentré dans les sols des régions arides, comme la grande plaine nord-américaine soit du Mexique Nord, au Canada. On retrouve d'autres sols riches en Se comme en Chine, dans le bassin de l'Amazonie, la Colombie et le Venezuela, et moins intensivement en Australie et en Russie (Oldfield, 1987). Certains des sols les plus séléniés dans le monde, avec des concentrations allant jusqu'à 1250 mg/kg ont été trouvés en Irlande (Fisinin et al., 2009).

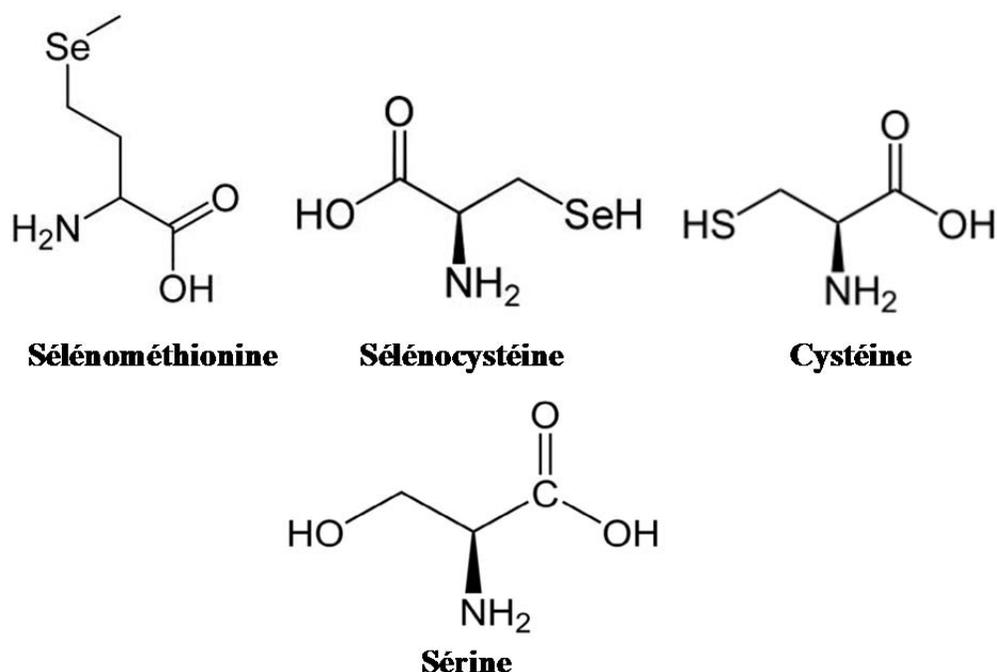
Le sélénium se retrouve sous quatre formes d'oxydation, sélérate Se(VI), sélénite Se(IV), élément sélénium Se(0) et sélélide Se(-II) incluant aussi les composés organosélénium. Il est présent dans les sols alcalins peu humides sous forme de sélénite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), en grande quantité et disponible pour l'absorption par les racines des plantes. En revanche, dans des sols acides, mal drainés, il est surtout présent sous forme de sélérate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), qui est indisponible pour l'absorption et doit être converti en sélénite. Un complexe de fer insoluble, appelé complexe ferrique-sélénite, peut également se former dans ces conditions. Le Se est généralement stable dans le sol et, à l'exception d'une légère oxydation par action microbienne, il n'est pas converti en formes solubles (Reilly, 2006).

### **1.1.2. Présence du sélénium dans le règne animal**

En 1957, les chercheurs Schwarz et Foltz ont découvert que des petites quantités de Se permettaient de prévenir la nécrose des cellules du foie de rats en carence de vitamine E, ce qui a confirmé son rôle essentiel dans les organismes eucaryotes et non seulement pour son action toxique (Schwarz et al., 1999). Le système de la sélélocystéine était encore loin d'être découvert, cependant la première fonction biochimique du Se dans les organismes eucaryotes a été découverte en 1973 lorsque ce dernier a été identifié comme un constituant de l'enzyme glutathion peroxydase (GSHPx) (Rotruck et al., 1973).

La majeure partie du Se dans les systèmes eucaryotes, procaryotes et archéobactéries est présente dans les protéines sous forme d'atomes dans les acides aminés, mimant les propriétés chimiques du soufre. Ces acides aminés sont plus précisément la sélélocystéine (Sec ou U) et la sélélocéthionine (Figure 1). Le sélénium est assimilé en compétition avec le soufre et est métabolisé en un certain nombre de composés organiques différents, le principal produit étant la sélélocéthionine. En ce qui concerne la Sec, l'atome de Se est présent dans une conformation très exposée, formant un groupement séléloc, conférant ainsi une réactivité accrue à la molécule comparativement à son équivalent structural, la cystéine (Cys). Le groupement séléloc est plus ionisé à pH physiologique et est un meilleur nucléophile que le groupement thiol de la Cys. Lorsqu'incorporée aux protéines, la Sec agit pratiquement toujours dans des

domaines catalytiques tels les motifs redox. En comparaison, la sélénométhionine contient un atome de Se lié à deux atomes de carbone, réduisant considérablement la réactivité de la molécule. D'ailleurs, il n'y a pas de fonction biologique connue associée à la sélénométhionine qui soit distincte de la méthionine (Shils et al., 2006).



**Figure 1. Structure chimique des acides aminés sélénométhionine, sélocystéine, cystéine et sérine.**

La présence de Se dans les protéines sous une forme alternative qui n'est pas dans une Sec, a été démontrée dans la *nicotinic acid hydroxylase* venant de *Clostridium bakeri* où le Se est en complexe avec le molybdène (Gladyshev et al., 1994).

Certaines plantes telles que le plancton, requièrent du Se pour leur croissance. Un de ces organismes Se-dépendant, le *dinoflagellate Peridinium gatouense*, a été largement utilisé dans des études écologiques en Suède afin de détecter la biodisponibilité du sélénium dans l'eau. Le sélénium ne semble pas être nécessaire à la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, bien que la levure peut récupérer de grandes quantités du milieu dans lequel il est cultivé. Les champignons, y compris ceux qui sont utilisés dans l'alimentation humaine, peuvent aussi accumuler et métaboliser le Se mais, selon les études, ils n'en ont pas besoin pour leur croissance.

Les organismes supérieurs réussissent généralement bien à répondre à leurs besoins en Se(-II) par leur régime alimentaire complexe. Les organismes unicellulaires prennent habituellement les formes oxydées de cet élément de l'environnement et le réduisent via leur métabolisme. Il est intéressant de noter que, en dépit d'une étroite fenêtre où le Se est biologiquement bénéfique et, il est encore difficile de savoir si le sélénium est transporté dans la cellule par un transporteur spécialisé et quelles espèces sont transportées. Même pour *Escherichia coli* (*E. coli*), l'un des organismes les plus étudiés, un mécanisme de transport spécifique pour le Se à travers la membrane cytoplasmique n'est pas caractérisé à ce jour. Au-dessus d'une concentration critique cependant, le Se utilise les voies du soufre et est métabolisé par les voies d'assimilation respectives. Le sélénate pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs de sulfate et est réduit par le système de réduction d'assimilation. Les mécanismes de biosynthèse synthétisant la Cys et la méthionine ne font pas de discrimination efficace entre le sélénium et le soufre, conduisant à la formation d'une Sec ou d'une Sem de manière non spécifique (Young, P. A. et al., 1975).

## **1.2. Rôle du sélénium dans le métabolisme chez l'humain**

Le rôle principal de la majeure partie du Se qui est absorbée par une cellule tant au niveau eucaryote, procaryote qu'archéobactérie, c'est de s'incorporer à la synthèse protéique pour ainsi former les sélénoprotéines. Chez les mammifères, le Se incorporé par la voie gastro-intestinale peut aussi se retrouver de manière non spécifique dans les tissus musculaires (Barceloux, 1999).

Contrairement aux 20 acides aminés communs dans les protéines, la Sec n'est pas omniprésente et elle est utilisée seulement quand elle est nécessaire pour la fonction des protéines. En conséquence, il s'agit normalement d'un groupe-clé fonctionnel (et presque toujours catalytique) dans les protéines. Par conséquent, l'information sur l'identité et les fonctions des sélénoprotéines est une ressource pour la compréhension des rôles biologiques et biomédicaux du Se.

### **1.2.1. Distribution du sélénium et rétention dans le corps humain**

Les différences dans la forme chimique affectent également les taux de rétention dans l'organisme au fil du temps. La sélénométhionine est entreposée de manière plus efficace que le sélénite ou le sélénate dans les organismes, mais n'est pas aussi efficace pour rendre le Se disponible à la synthèse protéique (Fairweather-Tait, 1997). Elle est beaucoup moins efficace pour garder les niveaux de Se stable dans l'organisme. Il semble que si la sélénométhionine est conservée dans les protéines des muscles et des autres tissus dans une plus grande mesure que les autres formes, cette rétention est non spécifique, et l'acide sélénoaminé est immédiatement utilisé comme un substitut de la méthionine dans la structure des protéines et non comme une composante d'une enzyme (Thomson, 1998).

Il est prouvé qu'il existe un ordre de priorité entre les organes pour l'absorption du Se dans différentes conditions de régime alimentaire. Lorsque les apports sont adéquats en Se, la concentration dans le foie et les reins est plus élevée que dans les autres organes. Dans l'ensemble, environ 30 % du Se dans les tissus est contenu dans le foie, 15 % dans les reins, 30 % dans les muscles et 10 % dans le plasma (OMS et FAO, 2002). Il a été déterminé que les reins possèdent un niveau de saturation maximale pour le Se et une exigence minimale, et ce au détriment des autres organes. Cette observation a été interprétée comme indiquant que le rein joue un rôle particulier dans l'équilibre le Se dans le corps (Oster et al., 1988).

### **1.2.2. Transport du sélénium**

Le Se absorbé est transporté dans le sang principalement lié aux protéines, après une réduction en sélénite dans les érythrocytes (Dreosti, 1980). Le procédé utilise le glutathion (GSH) réduit et implique l'enzyme glutathion réductase (GSHRx) (Jenkins et al., 1972). Chez l'homme, la quasi-totalité du Se lié aux protéines dans le sang est trouvée dans la fraction à très faible densité de  $\beta$ -lipoprotéines, avec de petites quantités liées à d'autres protéines (Sandholm, 1974). Cependant, la répartition entre ces protéines semble dépendre de la composition du régime alimentaire. Whanger a montré que près de 50 % du Se dans le plasma est associé à l'albumine chez les personnes qui ont une

alimentation dans laquelle la sélénométhionine est la forme principale de l'élément. Il est également prouvé que les différentes protéines agissent comme transporteurs de Se dans d'autres espèces animales (Young, V. R. et al., 1982).

### **1.3. Biosynthèse de la sélénocystéine**

La compréhension de la façon dont le Se est inséré dans les sélénoprotéines fonctionnelles et, surtout, les implications génétiques des processus impliqués a progressé rapidement au cours de la dernière décennie. Le Se est présent dans ces protéines sous deux formes principales (Hatfield et al., 2002). Une de celles-ci, dans laquelle le Se est inséré dans la protéine de manière post-traductionnelle comme cofacteur dissociable, est extrêmement rare et trouvée dans certaines enzymes bactériennes contenant du molybdène, par exemple comme mentionné précédemment la NADP(+) couplée-acide nicotinique hydroxylase de *Clostridium barkeri* (Gladyshev et al., 1996b). Dans tous les autres cas de sélénoprotéines découvertes jusqu'à présent, le Se est inséré de manière cotraductionnelle dans la protéine comme acide aminé Sec. Ce processus se retrouve dans tous les grands domaines du vivant et est responsable de la majorité des effets biologiques du Se (Hatfield et al., 2012).

La dépendance de différents organismes aux sélénoprotéines pour leur survie varie très largement entre les trois royaumes de la vie (Fu et al., 2002; Castellano et al., 2004; Kryukov et al., 2004). Certains organismes tels les levures et certaines plantes, n'utilisent pas les sélénoprotéines, tandis que quelques vertébrés sont dépendants de celle-ci pour leur survie, comme l'homme (Kryukov et al., 2003). Ainsi, il doit y avoir un avantage dans la sélection naturelle pour qu'ils conservent cette machinerie. Il est peu probable qu'autant d'énergie soit dépensée dans la nature afin de développer un système aussi hautement sophistiqué durant l'évolution, afin d'insérer uniquement un seul acide aminé dans les protéines, si ces protéines ne donnent pas un avantage pour la survie. De ce fait, il est important de comprendre pourquoi certaines espèces ont évolué en utilisant un système tirant avantage des propriétés du Se.

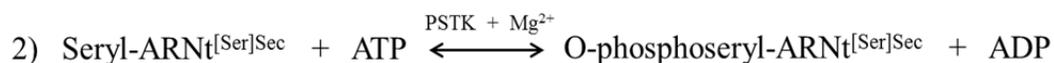
Afin d'étudier la biosynthèse des sélénoprotéines, il est important de comprendre les étapes complexes impliquées dans la biosynthèse de la Sec et son incorporation

ultérieure dans la traduction des sélénoprotéines. Ces découvertes ont été réalisées grâce à la collaboration de chercheurs de diverses spécialités de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la génétique en particulier (Stadtman, 1990). Leurs résultats, qui montrent que la Sec est radicalement différente de tous les autres acides aminés dans son mode de constitution et les étapes de biosynthèse, ont notamment eu comme conséquences significatives de modifier considérablement la compréhension du code génétique (Hatfield et al., 2002). Alors que la plupart des acides aminés sont aminoacylés sur leur ARNt correspondant, la Sec est synthétisée à partir d'une sérine dans une réaction multi étape alors qu'elle est attachée à son propre ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. La position d'une Sec sur l'ARNm est indiquée par le codon UGA étant habituellement un signal STOP. Grâce à une machinerie métabolique spécifique à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> et à la présence d'un SecIS (*Selenocysteine Insertion Sequence*) sur l'ARNm dans la région 3' non-traduite (3'UTR), ce codon détermine la présence d'une Sec dans la protéine.

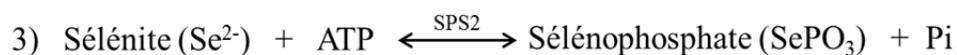
La biosynthèse de la Sec commence avec l'aminoacylation de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> par la séryl-ARNt synthétase (SerRS) en présence d'une sérine, ATP et Mg<sup>2+</sup> selon la réaction suivante (Hatfield et al., 1970) (Figure 2) :



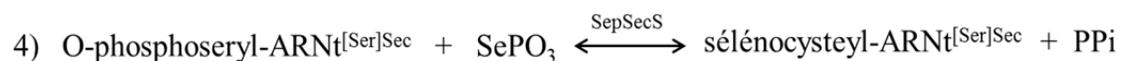
Le produit de cette réaction est un ARNt avec l'anticodon complémentaire pour UGA, mais chargé d'une sérine. Par la suite, la protéine PSTK ajoute un groupement phosphate au Seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> pour donner l'O-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. La réaction peut être exprimée de la façon suivante (Carlson et al., 2004):



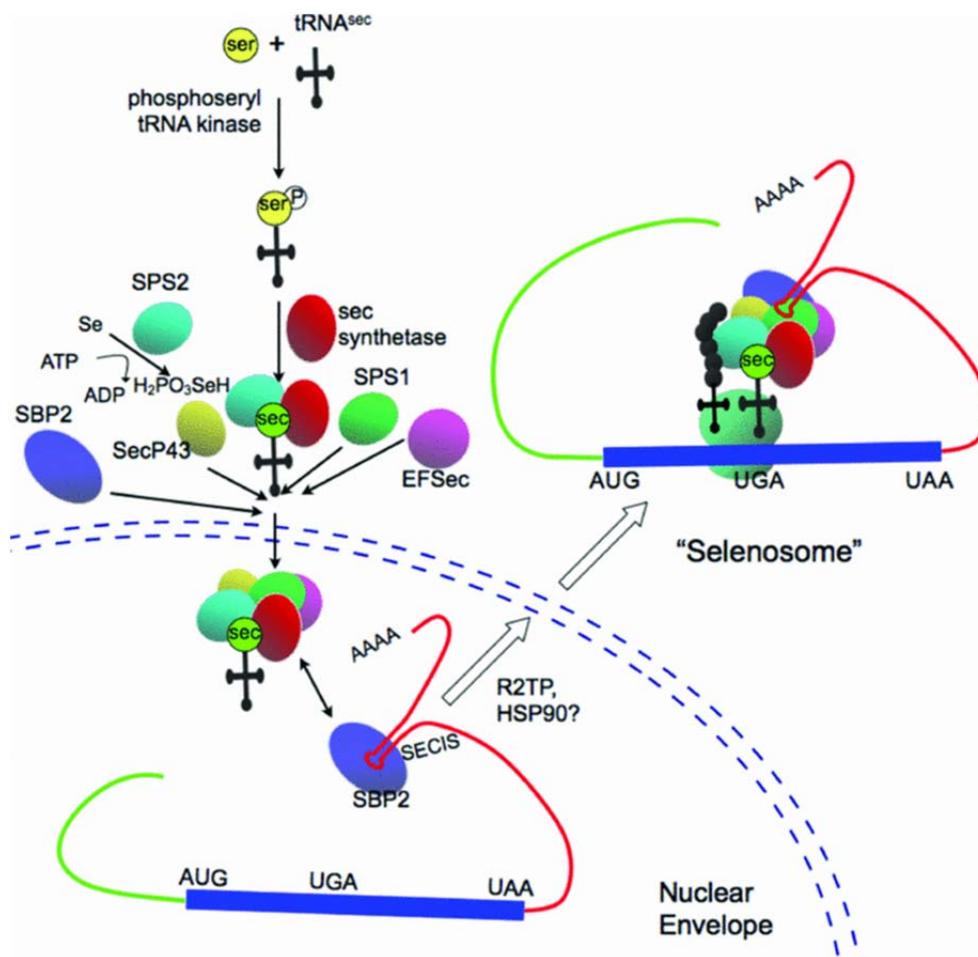
En parallèle de cette réaction, la protéine sélénophosphate synthétase 2 (SPS2) utilise le sélénite présent dans le cytoplasme afin de produire du sélénophosphate qui pourra alors être utilisé par la machinerie métabolique de la biosynthèse de la Sec (Tamura et al., 2004).



La dernière réaction de la synthèse de la Sec implique la Sec synthase (SepSecS), équivalente à la protéine Sela chez la bactérie, qui utilise le PLP comme cofacteur. SepSecS catalyse la réaction de déphosphorylation entre le sélénophosphate et l'O-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> afin de donner le sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, selon la réaction suivante (Xu et al., 2007b):



Bien qu'une grande partie soit désormais connue sur la manière dont la Sec est synthétisée chez les mammifères et la manière dont elle est incorporée dans les protéines, il y a encore des questions qui demeurent sur le processus. Afin de bien concevoir le processus complexe de ce système, l'identification de la liste complète des facteurs requis pour la biosynthèse de la Sec et de leurs interactions est une condition préalable pour avancer cette recherche.



**Figure 2. Complexes protéiques impliqués dans la biosynthèse des sélénoprotéines.**  
Figure tirée de (Bellinger et al., 2009).

Le sélénium est phosphorylé par SPS1 et utilisé pour synthétiser la Sec à partir de la sérine directement sur l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> par la SepSecS. L'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> chargé transloque au noyau avec les autres protéines formant le sélénosome y étant associé. La protéine SBP2 lie l'élément SecIS en 3'UTR de l'ARNm de la sélénoprotéine et recrute le complexe lié à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Le complexe assemblé est alors excrété du noyau pour permettre la traduction du UGA en Sec et se nomme ainsi le « sélénosome ».

### 1.3.1. Le Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>

De tous les ARNt qui ont été identifiés et leurs fonctions caractérisées, l'ARNt de la Sec venant du gène *trsp*, nommée ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, est des plus particuliers en recherche. Il est tout d'abord aminoacylé avec une sérine, puis ce n'est qu'une fois cette étape complétée que la biosynthèse de la Sec se produit. La désignation ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> indique que la sérine est convertie en Sec une fois attachée à l'ARNt (Jameson et al., 2002). L'ARNt<sup>Sec</sup> a été détecté dans les procaryotes, les eucaryotes et les archéobactéries

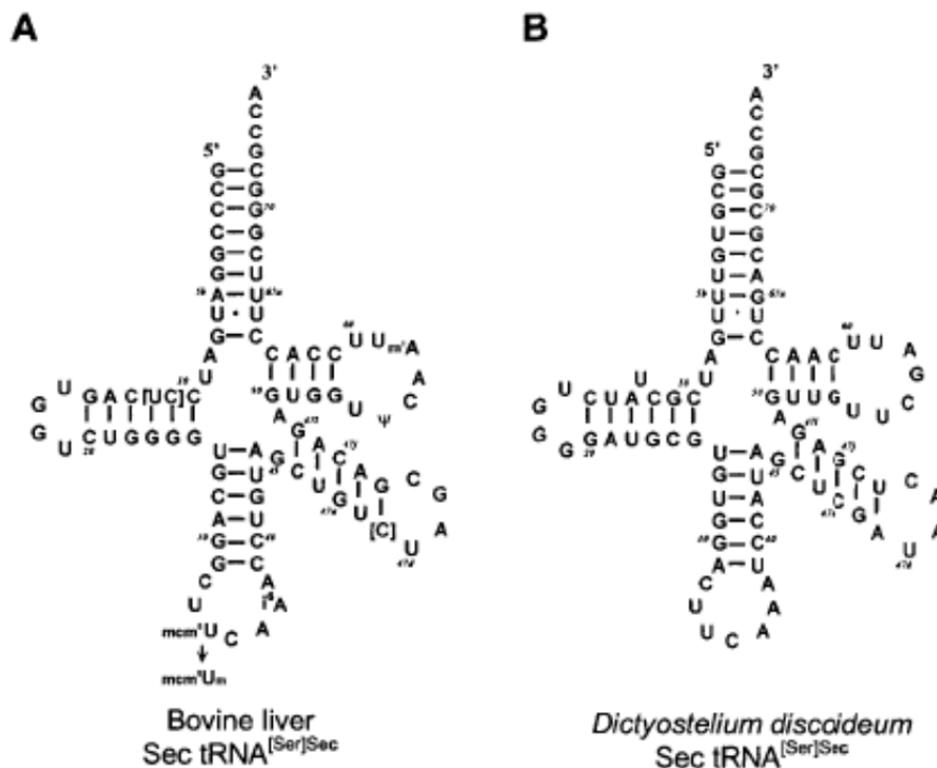
le situant ainsi comme un constituant répandu dans la nature. Cependant, alors que l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> a été caractérisé en détail chez les mammifères et d'autres espèces du règne animal, peu d'informations sont connues quant à ses particularités, ses fonctions et sa distribution dans d'autres organismes eucaryotes (Hatfield et al., 2006b).

Il a plusieurs caractéristiques uniques, dont celles d'être responsable de la traduction d'une classe entière de protéines, les sélénoprotéines. Contrairement aux 20 autres acides aminés retrouvés dans les protéines et issus surtout de l'alimentation, la Sec est biosynthétisée sur son propre ARNt par une Sec synthétase. De plus, les 20 aminoacyl-ARNt principaux retrouvés chez l'humain partagent tous un même facteur d'élongation eEF-2, tandis que l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> possède son propre facteur d'élongation dédié pour les sélénoprotéines, la *eukaryotic elongation factor selenocysteine-tRNA-specific* (eEFSec) (Fagegaltier et al., 2000b; Tujebajeva et al., 2000).

### 1.3.1.1. Structure des différents ARNt<sup>Sec</sup>

Les différents ARNt<sup>Sec</sup> sont les plus longs ARNt connus chez les eucaryotes, les archaea ou les procaryotes. Tous les ARNt<sup>Sec</sup> connus chez les mammifères sont d'environ 90 bases comme le sont présentés ceux à la Figure 3. L'ARNt<sup>Ser</sup>, soit l'ARNt canonique de la sérine, adopte un pli 7/5 où 7 et 5 indiquent respectivement le nombre de paires de bases dans le bras accepteur et le bras TΨC de l'ARNt. En contrepartie, l'ARNt<sup>Sec</sup> est un ARNt qui adopte soit un pli 9/4 chez les eucaryotes ou un pli 8/5 chez les procaryotes (Itoh et al., 2009a; Palioura et al., 2009; Chiba et al., 2010). Chez les deux organismes, la structure du bras accepteur-TΨC de l'ARNt<sup>Sec</sup> contient 13 paires de bases contrairement à une longueur standard de 12 paires de bases observées dans tous les autres ARNt. Cette différence dans la longueur du bras accepteur impose des contraintes structurelles et spatiales importantes dans les interactions entre l'ARNt<sup>Sec</sup> et les protéines de synthèse de la Sec. Par exemple, en plus des autres motifs de reconnaissance, toutes les protéines qui se lient à l'ARNt<sup>Sec</sup> contiennent un groupement de liaison 5'-phosphate, qui reçoit l'extrémité 5' de l'ARNt qui vient participer à la sélection de ses partenaires de liaison pour la synthèse de la Sec. Sans des motifs bien précis dans la région N-terminale de SerRS par exemple, l'enzyme ne serait pas en

mesure de reconnaître les éléments structuraux de l'ARNt<sup>Sec</sup> qui sont positionnées différemment (Biou et al., 1994).



**Figure 3. Modèle de feuille de trèfle du Sec-ARNt de (A) foie de bovin et de (B) *Dictyostelium discoideum*.** Figure tirée de (Hatfield et al., 2006b).

La structure secondaire de l'ARNt est représentée sous une forme appariée 9/4 (par exemple, 9 paires de bases dans la tige de l'accepteur et 4 paires de bases dans la tige-T).

Afin de bien comprendre les différences avec les ARNt canoniques, il faut être en mesure d'identifier les nucléosides modifiés sur les différents isoformes de cette molécule. Les nucléosides modifiés dans l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> sont la 1-méthyladénosine (m<sup>1</sup>A) à la position 58, la pseudouridine (ψU) à la position 55, N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine (i<sup>6</sup>A) à la position 37 et le 5-méthoxycarbonylméthyluridine (mcm<sup>5</sup>U) pour alterner avec le méthoxycarbonylméthyl-2'-O-méthyluridine (mcm<sup>5</sup>Um) à la position 34 (Kim, L. K. et al., 2000). Ainsi, il est important de noter qu'il existe deux isoformes de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> chez les mammifères qui diffèrent l'un de l'autre par le groupement méthyle, le 2'-O-méthyluridine (Um34), présent à la position 34 de l'ARNt, décrite comme la position *wobble* de l'anticodon (Diamond et al., 1993). Sa synthèse se déroule sous un contrôle

très spécifique de la maturation du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> puisque la synthèse du Um34 est la dernière étape de la maturation Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. La synthèse du Um34 est dépendante de la structure primaire, secondaire et tertiaire de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> et ne peut pas être catalysée sans la synthèse préalable de la m<sup>1</sup>A, de la ψU, de la i<sup>6</sup>A et du mcm<sup>5</sup>U. Une altération dans la structure secondaire ou tertiaire de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> empêche l'ajout de l'Um34 (Kim, L. K. et al., 2000). Son rôle serait primordial dans la régulation de la synthèse des sélénoprotéines et dans la réponse cellulaire face à certains stress comme il sera démontré dans la section 1.4.5.3.

### **1.3.2. Machinerie de biosynthèse de la sélénocystéine dans les cellules eucaryotes**

La voie moléculaire de biosynthèse des Sec a été élucidée en grande partie chez les procaryotes, puis suivi par des études pour les eucaryotes et aux archéobactéries. Il est connu qu'un complexe de plusieurs protéines et cofacteurs, le sélénosome, agissant comme machinerie pour la biosynthèse et l'incorporation des Sec durant la traduction, s'associe avec l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> puis à l'ARNm et finalement avec les composantes du ribosome (Hatfield et al., 2002). La plupart des protéines connues jusqu'à maintenant issues de ce complexe ont été identifiées par des études de liaison à l'ARN et donc de manière *in vitro*. Cependant, le terme sélénosome n'a pas été retenu dans le temps puisque l'ensemble des protéines impliquées ne semble jamais se retrouver dans un seul complexe (Squires et al., 2008).

Dans les protéines faisant partie de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines, on retrouve en premier lieu les protéines reconnues pour être impliquées dans la biosynthèse de la Sec. Quant aux protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines impliquées principalement dans l'incorporation de la Sec dans les sélénoprotéines, elles seront traitées à la section 1.4.

Dans les constituants de la machinerie impliquée, on retrouve la protéine SepSecS, SECp43, SPS1, SPS2. PSTK et SerRS ne sont pas considérées comme des constituants de la machinerie de biosynthèse des Sec étant donné leur rôle largement en aval et l'absence d'interactions protéiques avec les autres constituants. Un des défis importants de ce complexe vient de la particularité des cellules eucaryotes à transcrire

l'ADN dans le noyau et à traduire l'ARNm dans le cytoplasme. De ce fait, il est important de bien comprendre où la synthèse des Sec se produit et quel est le signal de l'import nucléaire du complexe et à quel moment il est sécrété du noyau pour reprendre la traduction du reste de l'ARNm et ainsi accomplir l'incorporation de la Sec.

### 1.3.2.1. *Selenocysteine tRNA Synthase (SepSecS ou SLA/LP)*

Tel que décrit ci-dessus, une protéine ayant une activité Sec Synthase est nécessaire pour effectuer la dernière étape de la synthèse de la Sec. La compréhension du mécanisme complet de la biosynthèse de la Sec avec tous ses intermédiaires a été avancée lors de l'identification de la séquence codante de la protéine *soluble liver antigen/liver pancréas* (SLA/LP ou SepSecS) (Costa et al., 2000; Wies et al., 2000). Cette protéine de 500 acides aminés et de 48 kDa était connue principalement comme étant l'antigène menant à l'hépatite auto-immune chez l'humain, mais qui a aussi été prouvée comme interagissant avec l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> eucaryote (Gelpi et al., 1992; Palioura et al., 2010). SepSecS a une forte spécificité pour la forme *O*-phosphoseryl de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> à un tel point qu'il est impossible de la faire précipiter avec les intermédiaires seryl-ARNt<sup>Ser</sup>, ARNt<sup>Ser</sup> et seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Xu et al., 2007b). La structure cristallographique de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> humain en complexe avec SepSecS indique un mécanisme dépendant du phosphate de pyridoxal (PLP) pour la formation de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Deux molécules d'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> se lient à chaque tétramère de SepSecS dans le cytoplasme par leur bras accepteur T $\psi$ C de 13 paires de bases (où  $\psi$  indique la pseudouridine, un ribonucléoside dérivé de l'uridine). La liaison de l'ARNt permet d'induire un changement conformationnel dans le site actif de SepSecS. Ce changement permet à la phosphosérine (*O*-phosphoseryl) liée de manière covalente à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, d'être correctement orientée vers SepSecS pour la catalyse chimique. Une phosphosérine libre n'est pas en mesure de générer la catalyse (Palioura et al., 2009).

SepSecS a donc été proposée pour être la Sec synthase eucaryote en raison de son utilisation du PLP comme cofacteur et sa similitude globale avec l'homologue procaryote Sela (Kernebeck et al., 2001). La catalyse effectuée par SepSecS a permis de la renommer pour *O*-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> : sélénocystéine synthase (SepSecS)

(Yuan et al., 2006). Des études *in vitro* l'ont aussi découverte comme étant un cofacteur de SPS1 et SPS2 dans le cytoplasme (Small-Howard et al., 2006).

### 1.3.2.2. *tRNA-Selenocysteine Associated Protein (SECp43)*

SECp43 a un rôle présumé, mais qui n'a jamais été confirmée dans la littérature. Cette protéine de 287 acides aminés et de 43 kDa a été identifiée dans un criblage PCR afin d'identifier des protéines liant l'ARN et a été ainsi détecté comme liant le sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Ding et al., 1999). Jusqu'à maintenant, le rôle présumé de SECp43 a été déduit par un essai d'ARN interférence ciblant son expression qui démontre sa nécessité pour la méthylation du groupement 2'-hydroxyl-ribosyl de la base *wobble* du sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. En fonction de la méthylation sur l'uridine à la position 34 (le nucléotide *wobble*) de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, nommé Um34, la Sec s'incorporera dans des sélénoprotéines de réponses aux stress comme la famille de glutathion peroxydase, ou à des sélénoprotéines constitutives (*housekeeping*) telles que les thiorédoxine réductase (Chittum et al., 1997; Moustafa et al., 2001). La méthylation en Um34 correspond au niveau de Se dans l'organisme, tel qu'expliqué à la section 1.4.5.3 (Hatfield et al., 1991). Par contre, sa localisation nucléaire l'obligerait à traverser la membrane nucléaire pour se lier à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> et ainsi accomplir son rôle catalytique de méthylation.

De plus, d'autres rôles possibles de SECp43 viendraient du fait que sa présence favorisait la liaison de la *SecIS binding protein 2* (SBP2) à eEFSec et donc au SecIS ce qui favoriserait la formation du complexe multiprotéique. Un autre indice du rôle central de SECp43 viendrait de sa capacité à renforcer l'interaction entre SepSecS et SPS1 qui a été prouvée largement *in vitro* (Small-Howard et al., 2006). Finalement, l'analyse de sa localisation cellulaire indiquerait un rôle de protéine *scaffold* pour l'interaction entre SepSecS avec le sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> permettant de réguler la translocation au noyau de ce complexe (Figure 2) (Xu et al., 2005).

### 1.3.2.3. Sélénophosphate Synthétase 1 et 2 (SPS1 et SPS2)

Les sélénophosphates synthétases sont responsable de la synthèse du monosélénophosphate (Na<sub>2</sub>SePO<sub>3</sub>), un intermédiaire réactif du Se dans la biosynthèse de

la Sec (Veres et al., 1992; Glass et al., 1993). Il y a deux sélénophosphates synthétases chez les eucaryotes, soit SPS1 et SPS2, des protéines de respectivement 392 et 448 acides aminés équivalents à 43 et 49 kDa, qui convertissent le sélénite et l'ATP en  $\text{SePO}_3$  donnant aussi au passage de l'orthophosphate et de l'AMP. Ces protéines sont hautement conservées dans la nature pour les organismes utilisant le Se sous forme de Sec (Persson et al., 1997). Cependant chez l'homme, uniquement SPS2 catalyse la réaction de synthèse du monosélénophosphate. La fonction de SPS1, un paralogue de SPS2, est inconnue (Xu et al., 2007a). Une étude a indiqué un rôle métabolique en impliquant cette dernière dans du recyclage des Sec dans la cellule via une voie de récupération du Se dans la protéolyse après le *turnover* protéique d'une sélénoprotéine (Ravaglia et al., 2003). SPS2 est une sélénoprotéine d'environ 50 kDa par la présence d'une Sec sur son résidu 60 (Low et al., 1995; Stadtman, 1996). L'activité et la quantité de SPS2 dans la cellule dépendent donc de la disponibilité de Se. Cette enzyme joue un rôle d'autorégulation de la biosynthèse des sélénoprotéines et possiblement de la biosynthèse des sélénocystéines (Guimaraes et al., 1996).

L'étude de SPS2 *in vivo* n'est possible que sous sa forme variante Se60Cys pour être en mesure de l'exprimer convenablement dans les cellules. Les résidus Cys17 et Lys20 ont aussi été identifiés comme étant essentiels pour l'activité de SPS2. L'analyse de sa structure cristallographique a démontré un repliement conjoint des domaines  $\alpha/\beta$ . La protéine comprend deux domaines majeurs identifiés comme N-terminal et C-terminal tout simplement (soit les résidus 1-156 et 157-336), ce qui aide, cependant, à comprendre la réaction biochimique de sa catalyse. La flexibilité du résidu Sec/Cys est essentielle pour la réaction puisque la Sec peut ainsi attaquer l'hydrogène du sélénure de l'extérieur de la molécule (Itoh et al., 2009b). Bien que l'analyse structurale de SPS2 a fourni des renseignements très précieux sur le mécanisme de la réaction, il est plus difficile de déduire ses partenaires potentiels dans la cellule. Aucune interaction avec d'autres partenaires de la machinerie de biosynthèse de la Sec n'a été rapportée jusqu'à maintenant. Par contre, une interaction indirecte entre SPS1/SepSecS/SECp43 est connue a été caractérisée *in vitro* (Small-Howard et al., 2006).

Ainsi, considérant la difficulté que représente l'identification des protéines impliquées dans la biosynthèse de la sélénocystéine, une connaissance approfondie du

comportement moléculaire du complexe multiprotéique actuellement connu permettra probablement d'identifier les protéines-clés encore manquantes. La biosynthèse *in vitro* d'une Sec serait possible avec nos connaissances actuelles, mais beaucoup de questions perdurent quant à la stabilité de ce complexe, sa réaction à des conditions de stress tels les UV, les ROS ou l'infection virale et, finalement, ses nombreux déplacements dans les différents compartiments de la cellule.

## **1.4. Biosynthèse des sélénoprotéines**

L'étude de la biosynthèse des sélénoprotéines est intimement reliée avec la connaissance de leur action et du système du Se dans le corps humain. La plupart des informations que nous avons sur le processus de synthèse ont été obtenues de l'étude des bactéries, notamment *E. coli*. Bien qu'il existe des différences claires entre les procaryotes, les archéobactéries et les eucaryotes, cette information nous permet de donner une image globale, même si elle est encore incomplète, de ce qui se passe chez les mammifères (Gladyshev et al., 2004). L'identification de la liste complète des facteurs requis pour la biosynthèse des sélénoprotéines est aussi primordiale pour apprécier pleinement les événements dans l'évolution qui ont conduit aux trois stratégies essentiellement similaires, mais uniques, de l'utilisation de la Sec dans la nature.

### **1.4.1. Eucaryotes**

La synthèse des sélénoprotéines chez les eucaryotes est pratiquement identique sur plusieurs points au processus chez les archéobactéries et très similaire au processus chez les procaryotes, qui seront abordés dans les sections suivantes. Cette similitude est probablement due à une forte conservation de ce système dans l'évolution. Cependant, il y a des différences qui restent majeures (Baron et al., 1994). D'abord, la localisation du SecIS chez les eucaryotes se trouve dans le 3'UTR de l'ARNm et agit donc à distance, comparativement aux procaryotes où la séquence est immédiatement située en aval du codon UGA, et ce, dans le même cadre de lecture (Grundner-Culemann et al., 2001). Ensuite, un facteur d'élongation propre à la Sec est impliqué, l'eEFSec, qui est en mesure de se lier directement à l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, et qui ne peut se lier au SecIS (Tujebajeva

et al., 2000). En revanche, deux autres protéines lient le SecIS dans les ARNm des sélénoprotéines et lient aussi le ribosome. Ces facteurs sont la SBP2 et la *Ribosomal Protein L30* (RPL30) (Copeland et al., 2000; Chavatte et al., 2005). Il a été rapporté que SBP2 et RPL30 seraient en compétition pour la liaison au SecIS, démontrant la dynamique du complexe malgré l'interaction de tous ses constituants (Chavatte et al., 2005). SBP2 a été identifié comme protéine s'associant au ribosome alors que RPL30 a été identifié sous forme libre et lié à la large sous-unité ribosomale 60S (Kinzy et al., 2005).

Un modèle pour la biosynthèse des sélénoprotéines a été proposé et est constamment en évolution depuis sa première version en 2001. Le mécanisme de ce modèle sera décrit au cours de cette section en prenant compte des plus récentes découvertes contrairement au modèle proposé par Bellinger en 2009 (Figure 2). Il implique des constituants du complexe d'insertion de la sélénocystéine, comme examiné à la section 1.3.2 (Berry et al., 2001).

#### **1.4.1.1. Le rôle du codon UGA**

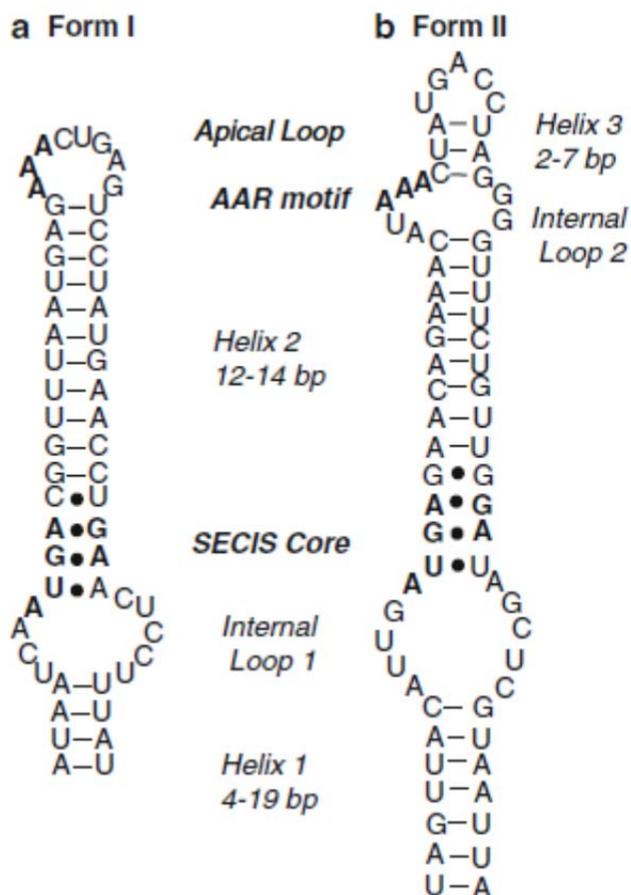
La découverte que la Sec est génétiquement codée et non pas simplement modifiée de manière post-traductionnelle représente une découverte très importante pour la génétique. Cette découverte devient majeure au moment où le codon UGA est responsable pour l'insertion de la Sec, alors qu'il était considéré auparavant comme un codon STOP. Il est désormais connu que cette double fonction pour un codon, bien que rare, n'est pas unique. Le codon AUG par exemple, qui normalement code pour l'initiation de la synthèse des protéines, également détermine l'insertion de la méthionine à des positions internes dans la protéine, tandis que l'UAG code pour l'insertion de la pyrrolysine dans certaines archéobactéries, alors qu'il agit également comme un codon STOP (Srinivasan et al., 2002).

L'utilisation de deux éléments SecIS pour l'insertion de multiples résidus Sec n'est pas un facteur de régulation important, mais l'emplacement des codons UGA dans la séquence codante est, quant à lui, très important. Deux éléments SecIS seront nécessaires pour insérer deux résidus Sec dans des régions éloignées de la protéine, alors

qu'un élément SecIS peut prendre en charge l'insertion de multiples résidus Sec, à la condition qu'ils soient situés dans la même région (Turanov et al., 2013).

#### 1.4.1.2. *Selenocysteine Insertion Sequence (SecIS)*

La séquence d'insertion de la sélénocystéine (SecIS) est une structure tige-boucle résidant dans la région 3'UTR de tous les ARNm des sélénoprotéines comprenant environ 60 nucléotides (Figure 4). Il est un élément important pour permettre la formation du complexe central de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines lors de l'insertion de la sélénocystéine dans le polypeptide en synthèse. Sa présence est obligatoire pour permettre au ribosome de décoder le codon UGA de la Sec (Martin et al., 1998; Walczak et al., 1998). L'ARN SecIS possède une structure secondaire bien définie. Quatre paires de bases non Watson-Crick consécutives, avec un tandem central de paires de bases G.A/A.G, constituent le motif fonctionnel de l'ARN SecIS qui est reconnu par la protéine de liaison SBP2 (Walczak et al., 1996). Le tandem de paires de bases est une partie d'un motif récurrent, le point d'inflexion *K-turn*, se produisant dans une variété de différents ARN. Le *K-turn* est une hélice interne boucle-hélice, composée d'une tige non Watson-Crick contenant les paires de bases G.A et d'une tige conventionnelle canonique. La boucle interne entre la tige est toujours asymétrique et contient habituellement trois nucléotides non appariés sur un brin et aucun sur l'autre. L'ARN SecIS doit représenter une variante des séquences consensus *K-turn* à l'égard de différences structurelles limitées qui le distinguent.



**Figure 4. Modèle de la structure de l'élément SECIS.** Les deux types d'éléments SECIS sont illustrés ici par le premier (a) et deuxième (b) élément SECIS dans le 3'UTR de la sélénoprotéine P. La forme du SECIS (b) est caractérisée par une courte-hélice supplémentaire (hélice 3) au-dessus du motif AAR conservée. Figure tirée de (Hatfield et al., 2012)

Il est indispensable pour l'association de deux domaines de la protéine SBP2 et pour le recrutement du facteur d'élongation eEFSec afin de former un complexe stable SBP2/SecIS/eEFSec (Donovan et al., 2008). Cette découverte donne un aperçu mécaniste utile du processus d'incorporation de la Sec. SBP2 est membre d'une famille de protéines qui partagent le même domaine de liaison d'ARN appelé L7A/L30, comme la protéine RPL30 qui sera traitée à la section 1.4.1.5 (Copeland et al., 2000). Toutes les protéines possédant ce domaine de reconnaissance peuvent lier des motifs d'ARN K-turn. Trois structures de complexes ARN-protéine contenant les domaines de protéines L7A/L30 liés à l'ARN K-turn auxquelles ils s'associent ont été résolues jusqu'à maintenant et ne font que confirmer l'importance des résidus de ces domaines pour le système des sélénoprotéines (Klein et al., 2001).

L'importance de la fonction du SecIS *in vivo* a récemment été soulignée puisque la source d'une mutation dans le gène de la Sélénoprotéine N (SEPN1) causant une myopathie chez l'humain, a été identifiée dans son SecIS. La mutation AUGA → ACGA a des effets assez importants pour éliminer complètement SEPN1 de l'organisme (Allamand et al., 2006). Conséquemment, l'étude des SecIS et leur présence dans la cellule sont une considération majeure pour comprendre la machinerie d'assemblage des sélénoprotéines. Bien qu'il ne s'agisse pas de protéines, le SecIS ainsi que l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> contribuent à la complexité de ce système.

#### 1.4.1.3. *Eukaryote Elongation Factor Selenocysteine-tRNA-specific (eEFSec)*

Le décodage de la Sec emploie un sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. Il s'agit d'un facteur d'élongation spécifique présent tant chez les procaryotes (SelB ou EFSec) que chez les eucaryotes (eEFSec). eEFSec est une protéine de 569 acides aminés et faisant environ 72 kDa (Gladyshev et al., 2004). Ce facteur d'élongation est une GTPase qui se lie au sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, mais il ne s'associe pas directement avec les différents éléments SecIS. La présence d'un facteur supplémentaire est nécessaire (Tujebajeva et al., 2000). L'affinité de liaison d'eEFSec au GTP est environ trois fois plus élevée que pour le GDP, donc il n'y a pas de facteur d'échange de guanine (GEF) requis pour cette réaction dans le complexe. Conséquemment, eEFsec associé avec SBP2, le SecIS et en présence du sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, forme la machinerie pour la liaison de eEFSec (Zavacki et al., 2003). SBP2 et le SecIS permettent donc d'ajuster la conformation d'eEFSec pour sa reconnaissance par le ribosome.

L'analyse de la structure tertiaire et quaternaire de la protéine indique la présence de quatre domaines (Domaine I, II, III et IV) déterminés grâce à la structure cristallographique chez les archéobactéries, puis comparés chez les eucaryotes (Leibundgut et al., 2005). La fonction de chaque domaine d'eEFSec n'a pas encore été étudiée, mais en se basant sur la conservation de la séquence dans l'évolution, les trois premiers domaines d'eEFSec peuvent avoir des propriétés similaires au facteur d'élongation de la traduction eucaryote, eEF1A. Cette dernière représente la protéine principale qui fournit tous les aminoacyl-ARNt conventionnels au site A du ribosome

lors de la synthèse des protéines et elle est composée de trois domaines (Andersen et al., 2001).

Le domaine I est nécessaire pour l'activité GTPase et pour l'interaction avec les facteurs ribosomales. Le domaine II est principalement impliqué dans la liaison à l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, et le domaine III est impliqué dans les interactions avec le bras T de l'ARNt. Le Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> contient une structure empêchant la liaison d'eEF1A à la base de son bras T, fournissant ainsi la preuve de l'importance du domaine III pour la reconnaissance de l'ARNt (Bouzaidi-Tiali et al., 2007). Le domaine IV de eEFSec est nécessaire pour l'incorporation de la Sec en étant impliqué dans la liaison au Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, la régulation de la GTPase et au niveau de l'interaction avec SBP2 d'une manière SecIS-dépendante (Gonzalez-Flores et al., 2012).

eEFSec et SBP2 ont été démontrés comme interacteurs par une expérience de co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères, formant un complexe qui était sensible à l'ARNase. D'autres études dans des cellules de mammifères ont montré que les interactions entre eEFSec et SBP2 sont renforcées par la surexpression du gène *trsp*, soit celui de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. Cependant, il a été démontré plus tard, dans un système *in vitro*, que SBP2 ne pouvait pas former un complexe avec eEFSec, le GTP, et le Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> et il a plutôt causé la libération du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> de eEFSec (Small-Howard et al., 2006). eEFSec peut former un complexe avec SBP2 en présence d'un SecIS sans que la présence du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> ou du GTP nucléotidique ne soit nécessaire (Donovan et al., 2008).

Cependant, des recherches approfondies sont nécessaires pour clarifier le mécanisme d'activation qui favorise les interactions fonctionnelles entre eEFSec et le ribosome pour permettre l'incorporation de la Sec.

#### **1.4.1.4. Selenocysteine Insertion Sequence Binding Protein 2 (SBP2)**

La protéine SBP2, composée de 854 acides aminés et faisant 95 kDa, a été découverte par une expérience de chromatographie d'affinité en utilisant des séquences d'ARN de différents SecIS comme ligand (Copeland et al., 1999; Copeland et al., 2000). Son rôle est de stimuler l'incorporation de la Sec en s'associant aux SecIS des ARNm des sélénoprotéines et en recrutant le complexe eEFSec-sélénocysteinyI-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> au

ribosome (Copeland et al., 2001). SBP2 lie la sous-unité 60S du ribosome et une région interne boucle dans le centre du SecIS (Fletcher et al., 2000). La localisation cellulaire de SBP2 suggère qu'elle agit aussi comme navette une fois en complexe avec la machinerie de l'incorporation de la Sec dans le noyau nucléocytoplasmique, permettant ainsi aux ARNm des sélénoprotéines de contourner la voie *nonmediated-decay* (NMD) (de Jesus et al., 2006). Plus précisément, il s'agit de l'état redox de SBP2 qui régule sa localisation intracellulaire et son comportement pour le décodage de la Sec. Le stress oxydatif induit la séquestration nucléaire de SBP2, et éventuellement celle de ses ARNm, à laquelle elle est liée, et aboutit à une régulation négative de la synthèse des sélénoprotéines (Papp et al., 2006).

Plus précisément, SBP2 possède trois domaines biochimiquement distincts. La moitié C-terminale de la protéine comprend un domaine d'incorporation Sec (SID), qui est unique dans l'évolution, et un domaine de liaison à l'ARN (RBD). Le domaine RBD est un domaine important dans la famille des protéines de liaison à l'ARN L7Ae qui interagissent avec une variété d'ARN, en particulier trouvé dans les ARNr, les snARN, et les SecIS (Koonin et al., 1994). Un changement du domaine RBD fortement conservé dans la nature abolit la liaison de SBP2 au SecIS, mais pas au ribosome (Copeland et al., 2000). Ces deux domaines, SID et RBD, sont suffisants pour l'ensemble des trois fonctions connues de SBP2, soit la liaison au SecIS sous forme ouverte et non plié, liaison au ribosome, et incorporation de la Sec. La moitié N-terminale de la protéine est également unique dans l'évolution et n'a pas de fonction connue, mais sert vraisemblablement de régulateur de SBP2 puisque de nombreux organismes (ex. insectes, protistes et nématodes) ne possèdent pas le domaine N-terminal complet (Donovan et al., 2009).

Bien que les propriétés de SBP2 pour lier l'ARN soient jusqu'à maintenant bien connues, peu de progrès a été réalisé pour déterminer la façon dont elles fonctionnent pour promouvoir l'incorporation de la Sec. Lorsque les domaines SID et RBD sont exprimés comme protéines distinctes, ils sont en mesure d'accomplir pleinement le rôle d'incorporation de la Sec *in vitro*, mais ils n'interagissent pas de manière stable avec le ribosome. Ainsi, la fonction de liaison stable au ribosome n'est pas nécessaire pour

l'incorporation de la Sec (Donovan et al., 2008). De plus, SBP2 est en mesure de former un complexe stable avec le Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, le SecIS et eEFSec, suggérant que SBP2 peut agir directement sur la conformation d'eEFSec en amont de l'incorporation et sans doute avant la liaison au ribosome. Ainsi, un modèle propose que SBP2 lie de manière stable le ribosome et que la liaison du SecIS favorise un changement conformationnel dans le ribosome qui permet la liaison de eEFSec au détriment du facteur de terminaison de la traduction eRF1 (Caban et al., 2006). Il est possible qu'une liaison simultanée entre eEFSec et SBP2 afin induirait des changements conformationnels tant chez eEFSec que sur le ribosome, mais au même moment.

SBP2 étant une protéine de grande taille, comparable au facteur d'élongation eucaryote, l'étude de sa structure et de son comportement internes amène une grande compréhension sur ses interactions potentielles. En utilisant toujours les domaines SID et RBD pour séparer des protéines distinctes, il a été démontré qu'ils forment un complexe SecIS-dépendant et que le SID est impliqué dans la stabilisation de RBD pour lier le SecIS. Considérant que le domaine SID ne possède pas une activité de liaison stable au SecIS, il est important pour les deux domaines d'établir une interaction qui est favorisée par la liaison au SecIS. Fait intéressant, lorsque les résidus du SID, IILKE 526-530, sont changés en alanine, la stabilisation de la liaison de RBD au SecIS est préservée, mais l'interaction stable entre le SID et RBD est perdue (Donovan et al., 2008). Étonnamment, la protéine complète SBP2 mutante IILKE 526-530, qui contient à la fois le SID et les domaines RBD, n'est pas en mesure de lier le SecIS, indiquant que la présence de la séquence mutée bloque l'accès au SecIS. Ainsi, les résidus IILKE 526-530 sont un facteur déterminant pour la spécificité au SecIS.

De plus, SBP2 peut varier son affinité de liaison pour l'ARNm selon la sélénoprotéine qui doit être traduite. Il s'agit d'un rôle extrêmement important pour la différenciation des protéines dans la cellule selon le besoin des sélénoprotéines catalytiques versus constitutives ainsi que pour éviter la voie NMD impliquée dans la réponse cellulaire à des stress (Squires et al., 2007). Les résidus correspondants à IILKE 526-530 dans la protéine homologue chez la drosophile (SVRVY), ont été rapportés comme étant nécessaires pour la liaison à la forme du SecIS trouvé chez la drosophile

(Takeuchi et al., 2009). Sur la base de ces constatations, ce domaine de SBP2 a clairement été identifié comme un régulateur indirect de l'affinité du SecIS, ce qui en fait un sujet de prédilection pour la détermination du mécanisme moléculaire de SBP2 pour la liaison sélective à des SecIS.

Ainsi, en prenant ensemble les données accumulées *in vivo* et *in vitro* jusqu'à maintenant, la formation du complexe entre eEFSec et SBP2 est favorisée par le SecIS et éventuellement stabilisée par la présence du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. En rassemblant ce qui est connu à propos de la fonction de SBP2, de eEFSec, et du SecIS, il semble probable qu'ils forment un complexe stable et actif permettant la livraison du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> pour se lier au facteur de liaison ribosomique. Certains éléments dans le complexe comme la boucle du SecIS, peuvent jouer des rôles en aval dans la liaison du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> au site A du ribosome.

#### 1.4.1.5. *Ribosomal Protein L30 (RPL30)*

La seconde protéine de liaison au SECIS à être caractérisée en profondeur est de la protéine ribosomale L30 (RPL30), qui est un composant de la grande sous-unité ribosomale 60S chez les eucaryotes. Contrairement à SBP2, RPL30 est une protéine abondante qui est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus des mammifères. Bien qu'elle soit principalement associée avec le ribosome, une petite fraction existe dans d'autres compartiments cellulaires. RPL30 est trouvé dans le nucléole où elle intervient dans la transformation des ARNr, dans le noyau où elle se lie à son propre ARN pré-messager afin d'inhiber l'épissage et dans le cytoplasme où elle se lie à son propre ARNm mature pour en inhiber la traduction (Dabeva et al., 1993; Vilardell et al., 1994; Vilardell et al., 2000). L'existence de cette boucle de rétroaction autorégulatrice suggère que les niveaux d'expression de RPL30 doivent être étroitement contrôlés dans les cellules de mammifères.

L30 a démontré la capacité à se lier à des éléments SECIS la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction est spécifique au point où des mutations spécifiques dans le centre du SecIS sont suffisantes pour empêcher l'interaction. La similitude entre les nucléotides de liaison au SecIS pour RPL30 et SBP2 permet d'anticiper le comportement pour l'une

ou l'autre des protéines lors d'un changement dans la séquence du SecIS. Les sites d'interaction de RPL30 et SBP2 se chevauchent, mais ne sont pas identiques sur les SecIS. Les acides aminés nécessaires pour l'interaction de RPL30 avec les SecIS diffèrent de ceux qui interviennent dans la liaison de RPL30 avec l'ARN pré-messager de la sélénoprotéine (Bifano et al., 2013).

Comme indiqué plus haut, l'élément de SECIS peut subir une transition conformationnelle d'ouverte à pliée. Des études *in vitro* ont suggéré que RPL30 peut interagir soit avec la conformation ouverte ou pliée alors que SBP2 n'est limité qu'à la forme ouverte (Chavatte et al., 2005). L'affinité de RPL30 est beaucoup plus élevée pour un complexe SBP2/SECIS que pour le SECIS libre seulement, suggérant que SBP2 remodèle les éléments SECIS afin qu'ils deviennent des cibles de haute affinité pour RPL30. Considérant que RPL30 a la capacité d'induire une déformation dans son ARN pré-messager, elle peut également induire une pliure au niveau du centre du SECIS (Mao et al., 1999). Ces données suggèrent donc un modèle dans lequel l'élément SECIS agit comme un interrupteur moléculaire qui subit des changements conformationnels par ses protéines de liaison SBP2 et RPL30 (Chavatte et al., 2005).

En plus de l'activité de RPL30 pour lier le SecIS, il y a aussi des preuves fonctionnelles que cette protéine joue un rôle dans l'incorporation de la Sec. La surexpression de RPL30 dans des cellules d'hématome de rat augmente l'activité du recodage du UGA pour une construction d'un gène rapporteur *humanized renilla luciferase* (hRLuc) contenant un UGA avec un SecIS en 3'UTR pouvant ainsi détecter la traduction dans les cellules transfectées (Chavatte et al., 2005). Ainsi, RPL30 était le facteur limitant dans ce système en présence d'ARN rapporteurs surexprimés. Toutefois, des preuves sont encore manquantes quant au rôle essentiel de RPL30 dans la biosynthèse endogène des sélénoprotéines.

L'identification de RPL30 comme une composante de la machinerie de recodage du UGA pour l'insertion de la Sec chez les eucaryotes amène ainsi le besoin pour un nouveau modèle du mécanisme de biosynthèse des sélénoprotéines. Un ordre spécifique d'événements dans lesquels SBP2 se lie au SECIS de manière précoce tandis que RPL30 prendrait sa place en agissant au niveau du ribosome pendant l'incorporation de la Sec

(Chavatte et al., 2005). Ce modèle prend en considération les observations que SBP2 est exprimée à des niveaux très faibles dans la plupart des tissus somatiques et se lie à des éléments SECIS avec une plus grande affinité et spécificité. En revanche, RPL30 est une protéine abondante, omniprésente qui se lie au complexe SECIS/SBP2 avec une affinité supérieure comparativement au SecIS seul.

De ce fait, il est intéressant de se demander ce que RPL30 pouvait remplir comme fonctions supplémentaires au cours de la biosynthèse. Par exemple, RPL30 pourrait lier le SECIS à un site spécifique sur le ribosome pour permettre de détacher le complexe après l'insertion de la Sec. De plus, est-ce que RPL30 permet la liaison du SECIS au ribosome ou celle-ci quitte le ribosome pour se lier à l'élément SECIS? Il existe plusieurs exemples d'autres protéines ribosomales non essentielles qui exercent des fonctions sans lien avec la synthèse des polypeptides, y compris L13a, laissant le ribosome participer à la traduction d'ARNm induits par l'interféron dans les macrophages (Mazumder et al., 2003a). Enfin, est-ce que l'activité de RPL30 lié au SecIS est suffisante pour promouvoir le recodage du UGA et l'insertion de la Sec une fois dans le ribosome?

#### **1.4.1.6. NSEP1 et Nucleolin**

La protéine Nucleolin est surtout connue pour son rôle facilitant la biogenèse des ribosomes dans le nucléole. Au cours des dernières années, les recherches démontrent clairement que la protéine exerce également une variété de fonctions inattendues dans d'autres compartiments cellulaires (Srivastava et al., 1999). Nucleolin régule l'expression de plusieurs transcrits cellulaires et viraux au niveau post-transcriptionnel en modifiant la stabilité de l'ARNm ou de la traduction dans le cytoplasme. Une étude récente a établi que la Nucleolin agit comme un régulateur positif pour la traduction des ARNm codants pour des sélénoprotéines ayant une fonction essentielle dans la cellule (Miniard et al., 2010).

Nucleolin a été identifié en tant que protéine de liaison potentielle du SECIS par criblage d'une banque d'expression bactérienne avec une sonde radiomarquée pour le SECIS de GSHPx1 (Wu, R. et al., 2000). Il est désormais connu que Nucleolin est une

protéine liant de manière très spécifique différents SECIS. Elle lie avec une affinité supérieure les SECIS de sélénoprotéines qui sont conservées lors d'une carence en Se ou qui présentent un phénotype sévère lorsque les gènes sont supprimés chez la souris. L'analyse des mutations dans les SECIS a révélé que la partie supérieure de la boucle du SECIS est nécessaire pour la liaison de Nucleolin. À ce jour, aucun site de liaison consensus entre les SECIS qui sont liés par Nucleolin n'a été identifié. Il est donc encore incompris comment Nucleolin discrimine les SECIS. Par contre, un certain nombre de sites différents pour la liaison de Nucleolin ont été identifiés dans les ARN préribosomiaux et dans les 5' et 3'UTR de plusieurs ARNm (Singh et al., 2004; Zhang et al., 2008).

L'expression et l'activité de la Nucleolin ne sont pas régulées par la quantité de Se. Même dans les cellules ayant un niveau satisfaisant de Se, SBP2 et RPL30 restent deux facteurs limitant pour l'incorporation de la Sec dans la biosynthèse des sélénoprotéines. En outre, les niveaux et la localisation nucléaire et cytoplasmique des ARNm des sélénoprotéines n'ont pas été modifiés dans les cellules déficientes en Nucleolin. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que Nucleolin est nécessaire pour l'expression optimale d'un sous-ensemble de sélénoprotéines, qui codent des fonctions essentielles.

En plus des quatre protéines décrites ci-dessus, plusieurs autres protéines de liaison au SECIS ont été observées. Deux groupes ont rapporté des résultats quant à la *nuclease sensible-binding protein 1* (NSEP1), également connu sous le nom DNA-binding protein B (DBPB), qui lie le SECIS de GSHPx1 (Shen et al., 1998; Fagegaltier et al., 2000a). Une étude plus récente a montré que le *knockdown* par ARN interférent de NSEP1, conduit à une diminution de 50 % de GSHPx1, mais l'expression des autres sélénoprotéines ou des protéines de contrôle autres que l'actine n'a pas été analysée (Shen et al., 2006).

Un développement intéressant dans le domaine de la biologie des sélénoprotéines révèle que l'élément SECIS interagit avec un certain nombre de facteurs agissant en trans. Ces protéines de liaison au SecIS ont une implication soit dans le mécanisme d'incorporation de la Sec ou dans la régulation de cette voie. Bien que SBP2 joue un rôle

important sur l'expression du sélénoprotéome, Nucleolin et NSEP1 remplissent des fonctions critiques dans l'identification de la sélénoprotéine qui sera synthétisée et dans la stabilité des ARNm en 3'UTR. Ces découvertes récentes changent le paradigme actuel d'un modèle centré sur SBP2 vers un modèle plus complexe dans lequel de multiples combinaisons de protéines de liaison au SECIS régulent l'expression de chaque sélénoprotéine individuellement ou des sous-ensembles de sélénoprotéines. Un grand axe de recherche pour l'avenir serait d'identifier des polymorphismes ou des changements dans RPL30, NSEP1 et Nucleolin ayant un impact sur l'expression des sélénoprotéines et par conséquent, sur la santé humaine.

### 1.4.2. Procaryotes

Il a été démontré dans *E. coli* que la synthèse des sélénoprotéines implique les produits de quatre gènes qui sont: SelC, codant pour l'ARNt chargé d'une Sec (Sec-ARNt<sup>Sec</sup>) qui contient le triplet UCA (l'anticodon pour UGA) (Leinfelder et al., 1988a), SelA, codant pour la Sec synthase, SelD codant pour la sélénophosphate synthétase et SelB, soit le facteur d'élongation qui reconnaît spécifiquement le Sec-ARNt<sup>Sec</sup> (Figure 5) (Heider et al., 1992; Baron et al., 1993a). L'ARNt<sup>Sec</sup> d'*E. coli* est le plus gros ARNt de cet organisme et sa structure, avec un bras supplémentaire et une boucle D spéciale, limite le type d'interactions tertiaires que cette molécule est capable de réaliser (Baron et al., 1993b). SelA et SelD sont essentiels pour la formation de Sec-ARNt<sup>Sec</sup> à partir de seryl-ARNt<sup>Sec</sup> (Baron et al., 1990).

La première étape de la synthèse de la Sec est l'aminocyclation de l'acide aminé sérine par la sérine ARNt synthétase pour produire Ser-ARNt<sup>Sec</sup> (Leinfelder et al., 1990). Le résidu Ser est ensuite utilisé pour fournir le squelette carboné pour la Sec. La SelA (la Sec synthase) qui change la molécule Ser-ARNt<sup>Sec</sup> en Sec-ARNt<sup>Sec</sup>, par un intermédiaire, l'aminocrylyl-ARNt<sup>Sec</sup>. Par analogie à la voie eucaryote, la conversion est provoquée par l'action de l'enzyme dépendante au pyridoxal phosphate (PLP) comme cofacteur. Cet intermédiaire sert d'accepteur du Se ce qui entraîne la formation du sélénocysteinyl-ARNt<sup>Sec</sup>. La réaction en deux étapes nécessite de l'ATP et entraîne une perte d'eau (Leinfelder et al., 1988b; Forchhammer et al., 1991a).

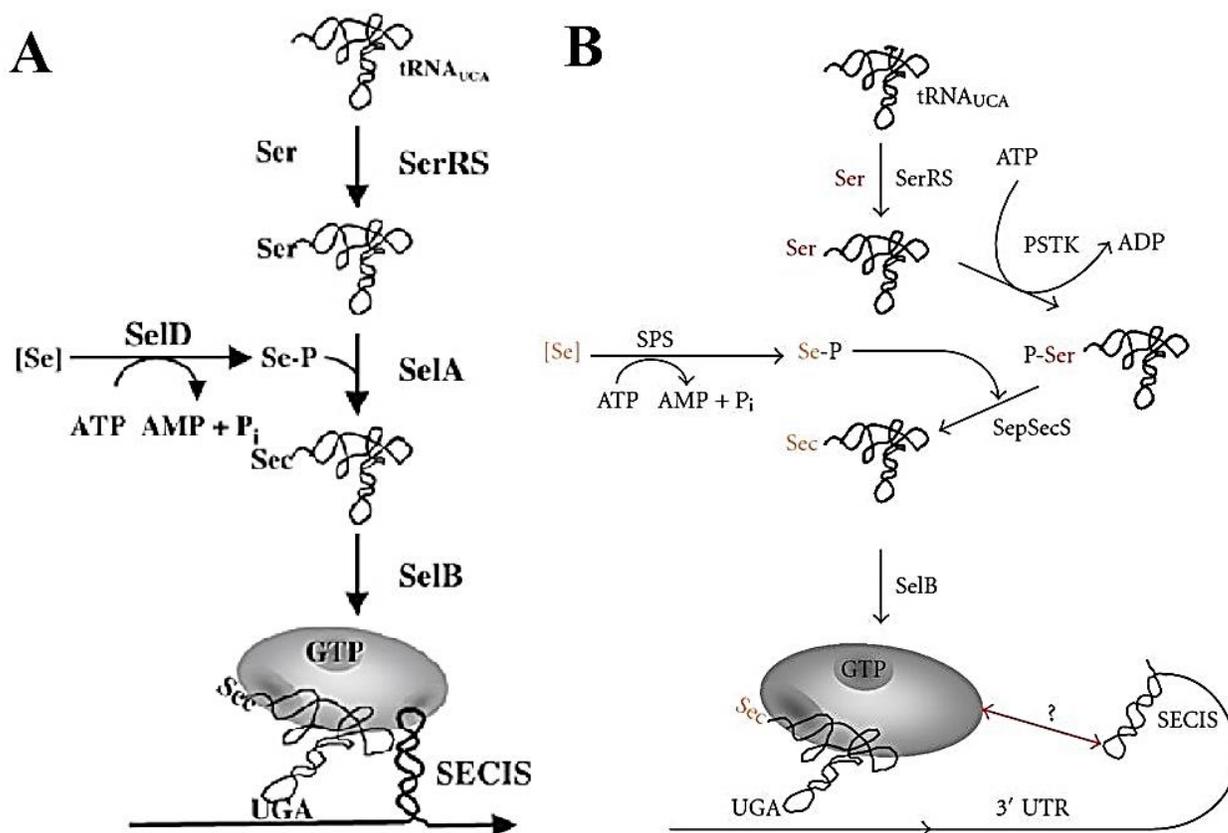
Le donneur de Se pour cette réaction a été caractérisé chez les procaryotes comme étant le monosélénophosphate qui est synthétisé à partir de sa forme réduite de sélénite. La réaction met en jeu l'hydrolyse de l'ATP en présence d'ions magnésium (Leinfelder et al., 1990). Dans la synthèse des protéines normales, l'allongement polypeptidique est provoqué à l'aide d'un facteur d'élongation, EF-Tu. Ceci forme un complexe ternaire avec du GTP et un ARNt aminoacylé qui pénètre dans le ribosome attaché à une molécule d'ARNm. L'ARNm est ensuite tiré par le ribosome et, lorsque ses codons rencontrent le site actif du ribosome, une interaction codon / anticodon se produit et le GTP est hydrolysé. Alors, EF-Tu subit un changement de conformation et l'ARNt chargé est libéré pour ajouter son acide aminé à la chaîne polypeptidique en synthèse. Quand un codon stop est détecté, la synthèse de la chaîne cesse et la protéine achevée est relâchée.

Le processus est différent dans l'incorporation cotraductionnelle de la Sec. Cela nécessite la formation d'un complexe quaternaire entre SelB, le GTP, Sec-ARNt<sup>Sec</sup>, et une séquence spécifique dans l'ARNm des sélénoprotéines (Bock et al., 1991). Cette séquence est connue comme la séquence d'insertion Sec bactérienne (bSecIS) qui ressemble aux structures tige boucle eucaryote, mais qui sont situées immédiatement en aval du codon Sec, le UGA (Huttenhofer et al., 1996). En raison de ses caractéristiques structurelles uniques, l'ARNt<sup>Sec</sup> n'est pas reconnu par le facteur d'élongation EF-Tu classique (Forster et al., 1990). SelB, la protéine procaryote GTP-dépendant d'élongation de la traduction spécifique à la sélénocystéine et liant l'ARNm, possède un domaine C-terminal unique de liaison au SecIS, qui ne se trouve pas dans EF-Tu et qui intervient dans sa capacité à se lier à l'ARNm, mais la protéine SelB d'*E. coli* partage une homologie significative avec EF-Tu (Forchhammer et al., 1989). Dans sa séquence en N-terminale, elle se lie stœchiométriquement avec la sélénocysteinyl-ARNt<sup>Sec</sup> et le GTP et ne discrimine pas seulement l'ARNt<sup>Sec</sup> des autres ARNt (Baron et al., 1991), mais également avec une grande rigueur le sélénocysteinyl-ARNt<sup>Sec</sup> de l'ARNt<sup>Sec</sup> non chargée, le seryl-ARNt<sup>Sec</sup>, ou l'alanyl-ARNt<sup>Sec</sup>, tous des intermédiaires dans la synthèse de la sélénocystéine (Forchhammer et al., 1991b). SelB délivre le sélénocysteinyl-ARNt<sup>Sec</sup> au site A du ribosome pour l'incorporation de la Sec dans la protéine en synthèse, se dissocie du ribosome et de l'élément du SecIS, et se réassemble avec un

nouveau sélénocysteinyl-ARNt<sup>Sec</sup> (Thanbichler et al., 2000). Cette spécificité pour la Sec explique pourquoi dans *E. coli* seulement la sélénocystéine est incorporée sur les codons UGA, même en présence du précurseur seryl-ARNt<sup>Sec</sup> (Thanbichler et al., 2001).

Ce complexe quaternaire peut être considéré comme un « dispositif d'ancrage » sur le site ribosomal, réunissant les éléments nécessaires à l'insertion de la Sec dans le polypeptide en synthèse (Kromayer et al., 1996). Cependant, il existerait une ambiguïté apparente avec le codon UGA et la Cys, récemment rapportée, qui prétend que le cysteyl-ARNt<sup>Sec</sup> forme un complexe assez stable avec la protéine SelB *in vivo* pour être incorporé dans une « simili » sélénoprotéine (Yuan et al., 2010a; Yuan et al., 2010b).

L'analyse de cette cascade de réactions biochimiques montre que le processus est plus complexe chez la cellule eucaryote que chez les procaryotes. L'évolution a favorisé un système contenant plus de protéines, comme PSTK, alors que l'avantage dans la sélection naturelle n'est pas évident. Actuellement, il existe trois explications plausibles. La première serait que l'*O*-phosphoseryl (phosphate) serait un meilleur groupe initial que le seryl (eau) pour se faire remplacer par le Se. L'efficacité cinétique globale serait améliorée avec PSTK / SepSecS par rapport à SelA. La seconde explication possible voudrait que le seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> soit plus sensible à la déacétylation que tout autre aminoacyl-ARNt (Matthaei et al., 1966). En absence de SelA comme protecteur, la phosphorylation par PSTK stabiliserait le groupement sur l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, servant ainsi aux fins de stockage des précurseurs de la sélénocysteinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Mizutani et al., 1986). La troisième et dernière explication stipule que le cysteyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, une forme non spécifique de l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> chargé avec une Cys, est formé *in vitro* avec du thiophosphate, plus efficacement à partir du *O*-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> que du seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>, faisant une répression ciblée des codons UGA avec la Cys (Tormay et al., 1998; Xu et al., 2010). Il s'agirait d'une "voie de secours" pour l'insertion de la Cys lors de la biosynthèse des protéines. En effet, un organisme manquant de Se survit mieux s'il intègre une Cys à la position de la Sec, probablement dans le but de sauver au moins une certaine activité enzymatique (Lu et al., 2009).



**Figure 5.** Schéma de la biosynthèse et de l'incorporation de la sélénocystéine chez (A) les procaryotes (*Escherichia coli*) et (B) les archéobactéries (*Methanococcus maripaludis*). Figure tirée de (Hatfield et al., 2006a).

### 1.4.3. Archéobactéries

Le second embranchement phylogénique des procaryotes englobe les archéobactéries, seulement reconnues comme un groupe phylogénétique distinct depuis 30 ans. Selon l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S, les archéobactéries ont une origine commune dans l'évolution avec les eucaryotes (Fox et al., 1977).

Comme chez les bactéries et les eucaryotes, l'insertion de la sélénocystéine dans les archaea est dirigée par un codon UGA (Figure 5). Cependant, les archaea ne contiennent pas de structures secondaires dans la région codante de l'ARNm de la sélénoprotéine qui agiraient comme SecIS. Autrement, ces structures peuvent être trouvées dans les régions non traduites 3'UTR de l'ARNm (Wilting et al., 1997). Dans sept des huit gènes des sélénoprotéines de *M. maripaludis*, les éléments présumés du

SecIS sont situés en aval du codon stop, soit dans l'extrémité 3'UTR, cependant dans un cas il se situerait dans le 5'-UTR (Hendrickson et al., 2004). Un gène de sélénoprotéine chez *M. jannaschii* ne peut uniquement être exprimé dans *M. maripaludis* qu'en présence du SecIS. De plus, une analyse par mutations ponctuelles de la séquence du SecIS a démontré que la structure est plus importante que la séquence pour permettre l'insertion de la sélénocystéine (Rother et al., 2001).

L'ARNt<sup>Sec</sup> des archaea possède toutes les particularités dans sa forme, mais diffère des ARNt conventionnels de la cellule. Il est plus similaire structurellement aux ARNt eucaryotes qu'aux équivalents bactériens (Commans et al., 1999). L'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> de *Methanocaldococcus jannaschii* peut être chargé avec un L-sérine par la seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> synthétase d' *E. coli* et être converti aussi en sélénocystéinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> par la sélénocystéine synthase d' *E. coli*. Ainsi, cette découverte laisse croire que la voie moléculaire des archéobactéries pour la synthèse des sélénocystéines serait identique à celle des procaryotes (Rother et al., 2000). Cependant, aucun homologue de la protéine Sela n'a pu être identifié dans leur génome. À la place, un gène codant pour une kinase uniquement présente et utilisée chez les archaea et chez les eucaryotes utilisant des sélénoprotéines a été découvert (Carlson et al., 2004). Il s'agit de l'équivalent archéen de PSTK qui a permis la découverte de l'homologue eucaryote. Comme dans la voie eucaryote décrite précédemment, cette protéine transfère un groupement phosphate au seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> donnant le O-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> et menant à sa désignation comme l'O-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> kinase (PSTK) (Hatfield et al., 1982; Kaiser et al., 2005).

La présence d'un homologue archéal de SLA/LP a été démontrée par une réaction croisée avec un anticorps spécifique à la protéine eucaryote, dans des extraits cellulaires de *M. jannaschii* (Herkel et al., 2002). Par la suite, des analyses *in vitro* ont démontré que la protéine homologue à SLA/LP chez *M. maripaludis* catalyse la conversion par l'utilisation de sélénophosphate de O-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> en sélénocystéinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Yuan et al., 2006). Cette découverte a été le début d'une distinction entre le processus chez les procaryotes et celui des eucaryotes et des archéobactéries qui auparavant impliquaient uniquement une sélénocystéine synthase pour la conversion du seryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> en sélénocystéinyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Autre facteur

important dans la biosynthèse archéenne, une analyse de la séquence du génome de *M. jannaschii* a permis de révéler un homologue à la protéine SelB bactérienne, nommé archaeal SelB (aSelB). Cet homologue lie le GTP et l'aminoacyl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> comme l'équivalente bactérienne (Bult et al., 1996). Une cellule n'exprimant pas le gène de aSelB ne peut produire de sélénoprotéines (Rother et al., 2003).

#### 1.4.4. Le Sélénoprotéome

Les récents progrès dans le séquençage à haut débit et les analyses bio-informatiques ont permis l'identification efficace des protéines contenant des atomes de Se sous forme d'acides aminés. L'information contenue dans les bases de données de séquences a ainsi créé le terme de sélénoprotéomes désignant l'ensemble complet de sélénoprotéines dans les organismes. L'information est actuellement disponible pour les sélénoprotéomes de tous les grands organismes modèles dont l'humain, qui possède 25 gènes de sélénoprotéines (Lobanov et al., 2009; Reeves et al., 2009) découverts jusqu'à maintenant.

La fonction de la majorité des sélénoprotéines est leur rôle d'oxydoréductases (Tableau I). Cependant, la fonction de nombreuses sélénoprotéines, en particulier celles chez les vertébrés, demeure encore inconnue. Par contre, par analogie et analyse de séquences on peut s'attendre à ce que la majorité de ces sélénoprotéines non caractérisées soient également des oxydoréductases (Kryukov et al., 2004; Lobanov et al., 2009). Dans ces protéines, le Se présent sous forme de sélénocystéine est le résidu catalytique utilisé parce qu'il est un meilleur nucléophile que la Cys, tel qu'expliqué dans la section 1.1.2 et donc plus efficace dans la poche catalytique d'une oxydoréductase (Stadtman, 1996). La Sec change de façon réversible son état redox au cours de la catalyse permettant des catalyses successives et rapides.

Toutes les sélénoprotéines à travers les trois règnes de la vie (eucaryote, procaryote et archéobactérie) peuvent être vaguement regroupées en trois catégories de protéines selon leur structure. La famille de sélénoprotéines la plus abondante comprend des protéines contenant la Sec dans la région N-terminale ou dans un domaine central de la sélénoprotéine. Beaucoup de ces sélénoprotéines présentent des motifs identiques à la thiorédoxine (Trx) ou analogues à la thiorédoxine (*thioredoxine-like*), mais certaines

protéines (par exemple SelD et MsrA) ont des motifs bien différents, mais font quand même partie de cette famille de la localisation de leur résidu Sec.

Dans le second groupe, la Sec est située dans les séquences C-terminales des protéines. Ces enzymes ont jusqu'ici été décrites que chez les eucaryotes et incluent les sélénoprotéines K, S, O, I et la famille des Trx. Sauf pour les Trx, la fonction de la Sec dans ces sélénoprotéines n'est pas connue.

Les sélénoprotéines du troisième groupe utilisent la Sec pour lier des métaux redox (Mo, W, Ni) dans leurs sites actifs. Cette classe de protéines comprend les hydrogénases : formate déshydrogénase (FDH) et formyle méthanoformane déshydrogénase (FMDH) (Lee et al., 2011). Toutefois, bien que rare, il existe des fonctions non catalytiques des Sec. Des exemples connus comprennent les résidus Sec dans la région C-terminale de SEPP1 qui sont utilisés pour transporter le Se (Burk et al., 1999).

De manière plus globale, les familles des sélénoprotéines les plus communes chez les mammifères, principalement chez l'homme, se regroupent majoritairement en quatre familles selon leur fonction. Cette catégorisation englobe aussi de ce fait des protéines n'ayant pas de résidu Sec dans leur séquence. Il faut noter que la quatrième famille (autres sélénoprotéines) englobe uniquement les sélénoprotéines n'entrant pas dans les trois autres familles.

#### **1.4.4.1. Glutathion Peroxydase (GSHPx)**

Les mammifères possèdent huit glutathion peroxydases (GSHPx1-GSHPx8), dont cinq sont des enzymes contenant une Sec (GSHPx1, GSHPx2, GSHPx3, GSHPx4 et GSHPx6). Cependant, GSHPx6 est une protéine contenant un résidu Cys à la place de la Sec chez de nombreux rongeurs, y compris les souris et les rats, de sorte que ces organismes n'ont que quatre sélénoprotéines GSHPx (Kryukov et al., 2003).

GSHPx1 est la première sélénoprotéine animale identifiée et elle est aussi la plus abondante chez les mammifères, en particulier dans le foie et les reins (Rotruck et al., 1973). Elle catalyse la réduction des hydroperoxydases par l'utilisation du glutathion contrairement aux enzymes glutarédoxines qui sont oxydés par des substrats, et réduits de façon non enzymatique par le glutathion.

Au cours des dernières années, une autre GSHPx, la GSHPx4, a reçu beaucoup d'attention en raison de son statut essentiel lors du développement embryonnaire chez les souris et son rôle dans la régulation des taux d'hydroperoxydes associés aux phospholipides (Figure 9) (Seiler et al., 2008). En outre, la forme mitochondriale de cette protéine joue un rôle structural pour la formation des cellules germinales matures et est impliquée au cours de la spermiogenèse (Ursini et al., 1999). Alors que GSHPx1 et GSHPx4 sont exprimés dans toutes les cellules, GSHPx2 est gastro-intestinal et GSHPx3 est présente principalement dans le rein et sécrétée dans la circulation sanguine. Elle se localise dans la membrane basale des tubules proximaux du rein (Olson et al., 2010). Cependant, on ne sait pas comment GSHPx3 peut fonctionner dans le milieu extracellulaire en l'absence de niveaux suffisants de réducteur thiol. Outre les mammifères, des sélénoprotéines GSHPx homologues ont été identifiées chez la plupart des animaux ainsi que divers eucaryotes unicellulaires ou procaryotes. Cependant, la forme ancestrale de ces protéines est la forme contenant une Cys, suggérant ainsi que la Cys a été remplacée par une Sec probablement au cours de l'évolution afin de rendre ces enzymes de meilleurs catalyseurs.

#### **1.4.4.2. Thiorédoxine Réductase (TrxR)**

L'ensemble de la famille des thiorédoxines réductases (TrxR) est dépendant du Se puisque les 3 TrxR connues jusqu'à maintenant sont des sélénoprotéines. Elles sont membres de la famille des enzymes pyridine-disulfure oxydoréductases et présentes dans divers tissus. Ce sont des flavines adénines dinucléotides (FAD) contenant des sélénoprotéines homodimériques qui, en liaison avec la thiorédoxine (Trx) et le NADPH, forment une puissante dithiol-disulfure oxydoréductase avec des rôles multiples dans la cellule, comme dans le système de la Trx (Figure 9). La sélénocystéine dans les TrxR est localisée dans le C-terminal sur l'avant-dernier résidu de la séquence des protéines (Gladyshev et al., 1996a). Les TrxR ont évolué dans le temps à partir de la famille des GSHRx considérant la forte similarité entre les deux et le fait que certains organismes primitifs n'ont pas de TrxR. La famille de cette dernière s'est différenciée en ajoutant une extension C-terminale contenant une Sec laquelle est devenue un substrat

intraprotéique pour le centre actif situé en N-terminale (Gromer et al., 1998; Sun et al., 1999; Sandalova et al., 2001; Sun et al., 2001a).

TrxR1 est une protéine cytosolique et nucléaire. Sa fonction principale voit à contrôler l'état de réduction de la thiorédoxine. Toutefois, elle présente une spécificité très large pour ses substrats, en particulier en ce qui concerne les composés de faible poids moléculaire. Cette dernière est présente sous forme d'au moins six isoformes générés par initiation de la transcription alternative et épissage alternatif (Arner et al., 2000; Sun et al., 2001b; Rundlof et al., 2004; Su et al., 2004).

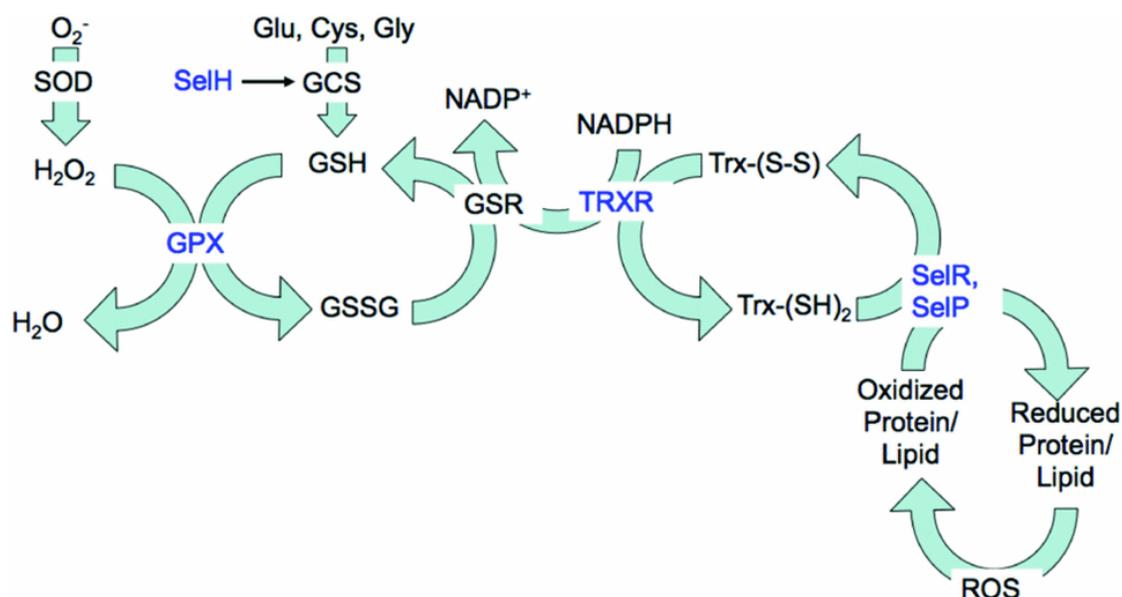
Thiorédoxine réductase 2 (TrxR2), est constituée d'unités d'environ 56 kDa, avec une structure similaire, mais non identique à celle de TrxR1 (Mustacich et al., 2000). Son rôle biologique n'est pas connu, mais elle semble agir comme une défense mitochondriale spécifique contre les ROS produits par la chaîne respiratoire (Gladyshev et al., 1999).

Une protéine homologue très proche de TrxR1 est la thiorédoxine/glutathion réductase (TrxR3) qui, par rapport à d'autres TrxR de mammifères, a un domaine glutathion réductase en N-terminal supplémentaire (Sun et al., 2001a). Cette protéine est impliquée dans la formation des liaisons disulfures au cours de la maturation des cellules germinales spermatiques (Su et al., 2005). TrxR3 peut catalyser de nombreuses réactions spécifiques pour les systèmes de thiorédoxine et pour le glutathion. TrxR2 est une protéine mitochondriale qui maintient la thiorédoxine et les glutarédoxines mitochondriales à l'état réduit (Figure 9). TrxR1 et TrxR3 sont essentiels pour le développement embryonnaire chez les mammifères (Conrad et al., 2004; Jakupoglu et al., 2005).

Le système des TrxR / Trx joue un rôle-clé dans la synthèse de l'ADN, avec la Trx comme donneur d'hydrogène pour la ribonucléotide réductase. Les TrxR régulent également l'expression du gène par l'activation de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription. Le système est également impliqué dans plusieurs autres fonctions-clés, y compris régulation de la croissance cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, la régénération des protéines inactivées par le stress oxydatif et la régulation de l'état redox cellulaire (Arner et al., 2001). Dans un environnement *in vitro*, le système des TrxR / Trx peut réduire directement le peroxyde d'hydrogène ainsi que les

hydroperoxydes organiques et les lipides, puis servir comme donneur d'électrons pour la GSHPx plasmatique et la DOI1 (Bjornstedt et al., 1994).

Finalement, il y a un intérêt marqué pour la recherche sur les TrxR en raison de leur éventuelle relation avec un certain nombre de maladies chez les humains et de leur potentiel pour le développement de médicaments (Tableau I) (Gromer et al., 2004).



**Figure 6. Implication des sélénoprotéines dans les systèmes antioxydants cellulaires.**  
Figure tirée de (Bellinger et al., 2009)

Les sélénoprotéines (en bleu) ont un rôle essentiel dans les systèmes antioxydants GSH-dépendants et TRX-dépendant. Les GSHPx catalysent la décomposition des peroxydes dans l'eau. SelH augmente l'expression de l'enzyme de synthèse du GSH, la GCS ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthetase). Les TrxR réduisent les Trx oxydés. Certaines sélénoprotéines, comme SelR et SelP (SEPP1), utilisent le Trx comme donneur d'électrons pour former des couples redox pour la détoxification des protéines et des lipides oxydés.

#### 1.4.4.3. Iodothyronine Désiodase (DIO)

Les iodothyronines désiodases jouent un rôle physiologique important dans le corps en catalysant l'activation et l'inactivation des hormones thyroïdiennes, qui sont responsables de la régulation de plusieurs processus métaboliques. La famille des désiodases est composée de trois membres (DOI1, DOI2 et DOI3) qui activent ou désactivent les hormones thyroïdiennes par désiodation réductrice. Elles diffèrent selon leur localisation tissulaire, leur implication dans la désiodation de la thyroxine, et selon

leur effet combiné et leurs interactions, mais possèdent toutes au moins 50 % de similarité de séquence. Ils sont responsables de la régulation précise et spécifique, selon le tissu, du métabolisme des hormones thyroïdiennes (Bianco et al., 2002). Toutes les DIO sont des protéines membranaires complètement intégrées dans la paroi de 29 à 33 kDa.

La découverte que le Se est impliqué dans le métabolisme de l'iode a été la première indication que l'oligo-élément a d'autres rôles métaboliques que ceux d'une peroxydase. La DIO de type I (DIO1) a été identifiée comme une sélénoprotéine puisque la carence en Se augmentait le niveau de thyroxine (T<sub>4</sub>), tout en réduisant celui du 3,3',5-triiodothyronine (rT<sub>3</sub>), et que ces changements étaient dus à une baisse d'activité des désiodases hépatiques (Beckett et al., 1987). Son ARNm a démontré qu'il contenait un seul codon UGA dans le cadre de lecture, et ce, dans le site actif de chaque sous-unité de liaison au substrat (Berry et al., 1991a). DIO1 est une protéine liée à la membrane, comprenant un homodimère de deux sous-unités de 27 kDa, dont chacune contient un résidu Sec (Berry et al., 1991b). Elle est située principalement dans la thyroïde, le foie, les reins et les glandes pituitaires. Le rôle de DIO1 dans le métabolisme est de catalyser la monodésiodation des iodothyronines à la position 5' du cycle phénolique ou la position 5 du cycle tyrosyle (Figure 7). Le tout permet la formation de la T<sub>3</sub> biologiquement active, ainsi que l'isomère biologiquement inactif la 3,3',5-triiodothyronine (T<sub>3</sub> inverse ou rT<sub>3</sub>). En outre, la désiodation de T<sub>3</sub> et la rT<sub>3</sub> mène à la formation d'un autre isomère biologiquement inactif, la 3,3'-diiodothyronine (T<sub>2</sub>). Ainsi, le rôle global de la DIO1 semble fournir du T<sub>3</sub> actif au plasma pour inactiver les hormones T<sub>4</sub> et T<sub>3</sub>, et éliminer la rT<sub>3</sub> de la circulation (Arthur et al., 1990).

La DIO de type 2 (DIO2) est une sélénoprotéine liée à la membrane, avec des sous-unités d'environ 32 kDa. Elle est exprimée principalement dans le cerveau, les tissus adipeux bruns, l'hypophyse et le placenta. Sa réaction de catalyse majeure est la 5'-monodésiodation pour convertir T<sub>4</sub> en T<sub>3</sub> et rT<sub>3</sub> en T<sub>2</sub>. Son rôle principal est la production intracellulaire de T<sub>3</sub> (Salvatore et al., 1996).

Une troisième désiodase est la DIO de type (DIO3). Il s'agit d'une protéine de 32 kDa, située principalement dans le système nerveux central, le placenta, et la peau. Elle catalyse la désiodation du cycle tyrosyle et inactive les hormones thyroïdiennes en



autoradiographie (Kyriakopoulos et al., 2000). En plus des sélénoprotéines dont l'existence a jusqu'ici été confirmée, il y a d'autres protéines contenant des Sec, non identifiées, chez les mammifères (Behne et al., 2001).

#### **1.4.4.4.1. Sélénoprotéine P (SEPP1)**

SEPP1 est une glycoprotéine de 43 kDa ayant quatre isoformes. Il s'agit de la seule sélénoprotéine contenant plusieurs résidus Sec à travers sa séquence (Burk et al., 2005). Par exemple, les SEPP1 chez l'homme et la souris ont 10 résidus Sec alors que chez le *Danio rerio* la protéine homologue à SelP en a 17. Elle est aussi riche en histidine qu'en Cys ce qui lui confère des propriétés de couplage à des atomes métalliques. Le nombre de résidus Sec dans cette protéine varie considérablement dans le règne des mammifères indiquant son rôle primordial dans l'évolution (entre 7 et 15 résidus dépendamment de l'espèce) (Lobanov et al., 2008a).

SEPP1 est la principale sélénoprotéine dans le plasma. Elle est synthétisée principalement dans le foie et est responsable de l'apport en Se pour certains autres organes et tissus (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003). Elle a pour fonction de protéger les cellules contre les dommages endothéliaux de peroxydation pendant l'inflammation, en particulier lorsqu'ils sont causés par le peroxyde d'azote, une espèce réactive formée lors de la réaction entre l'oxyde nitrique et l'ion superoxyde dans des conditions inflammatoires (Arteel et al., 1999).

#### **1.4.4.4.2. Sélénoprotéine 15 kDa (Sep15)**

La Sep15 est une sélénoprotéine qui a été détectée chez les rats et les humains et elle est fortement exprimée dans les cellules épithéliales de la prostate (Gladyshev et al., 1998). Les études ont démontré que le gène de Sep15 est situé sur un chromosome souvent touché par le cancer (Kumaraswamy et al., 2000), et que l'apport en Se semble diminuer l'incidence du cancer de la prostate (Clark et al., 1998), Sep15 joue probablement un rôle dans la protection contre cette forme de cancer. En plus de la présence de Sep15 dans la prostate, un isoforme ubiquitaire est également présent chez les mammifères (Gladyshev et al., 2001).

#### **1.4.4.4.3. Sélénoprotéine W**

La sélénoprotéine W (SEPW) a été purifiée à partir de muscles squelettiques de rat. Elle est très présente dans les muscles squelettiques, le cœur, le cerveau, les glandes germinales et la rate. Il s'agit d'une protéine cytosolique de faible poids moléculaire d'environ 10 kDa, avec un seul résidu sec par molécule (Vendeland et al., 1995). Ses fonctions biochimiques et physiologiques ne sont toutefois, pas connues. Elle est impliquée dans le métabolisme du muscle cardiaque, agissant dans un rôle redox avec le glutathion (Gu et al., 1999). Chez les agneaux et les autres animaux de la ferme, elle est nécessaire pour la prévention, en collaboration avec la vitamine E, de la maladie du muscle blanc. Les niveaux de SEPW réagissent rapidement aux changements dans l'apport en Se, ce qui en fait potentiellement un marqueur utile des niveaux de Se dans le corps humain (Vendeland et al., 1993).

#### **1.4.4.4.4. Méthionine sulfoxide réductase B1 (MsrB1)**

MsrB1 (méthionine sulfoxide réductase B1) est la première sélénoprotéine identifiée avec une approche bio-informatique. La famille des protéines méthionines sulfoxydes réductases (Msr) comprend des enzymes de réparation qui réduisent justement les résidus méthionines oxydées dans les protéines. MsrB1 a d'abord reçu le nom de Sélénoprotéine R (Kryukov et al., 1999) et, par la suite, Sélénoprotéine X (Lescure et al., 1999). Cependant, une fois que son rôle de catalyseur stéréochimique spécifique pour la réduction du résidu méthionine-R-sulfoxide dans les protéines a été découvert, elle a été renommée MsrB1 (Kryukov et al., 2002b). Les mammifères ont deux autres homologues de la famille de MsrB dans leur protéome, MsrB2 et MsrB3, qui contiennent une Cys à la place du résidu Sec respectivement dans la mitochondrie et dans le réticulum endoplasmique (Kim, H. Y. et al., 2004). Dans le foie et les reins des mammifères, MsrB1 a la plus forte activité de tous les MsrB, de sorte que la fonction de réparation réductrice des protéines dépend du Se chez les mammifères. MsrB1 est situé dans le cytosol et le noyau. Les souris MsrB1<sup>-/-</sup> sont viables, mais sont caractérisées par un stress oxydatif très élevé (Fomenko et al., 2009).

#### 1.4.4.4.5. Autres sélénoprotéines

Les sélénoprotéines suivantes sont absentes des mammifères, mais ont été identifiées chez d'autres eucaryotes : méthionine-S-sulfoxide réductase (MsrA), protéine disulfide isomérase (PDI), sélénoprotéine U (SelU), sélénoprotéine L (SelL), sélénoprotéine J (SelJ), Fep15, toutes les sélénoprotéines plasmodiques (Sel1, Sel2, Sel3 et Sel4) et la sélénoprotéine SelTryp venant du *Typanosoma*.

MsrA est une famille de protéines largement présentes dans le domaine eucaryote avec sa fonction de réparation des résidus méthionines dans les protéines. Tout comme la famille MsrB, elle catalyse une réduction stéréospécifique d'une méthionine sulfoxide, mais plus précisément de la méthionine-S-sulfoxide. MsrA a été d'abord découverte dans les algues *Chlamydomonas* (Novoselov et al., 2002), puis identifiée chez d'autres eucaryotes et certains procaryotes.

PDI est aussi très présente à travers les eucaryotes, contrairement à la PDI contenant une Cys. Elle est essentielle pour la formation des ponts disulfides dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules (Obata et al., 2005). SelU (Castellano et al., 2005), SelJ (Castellano et al., 2004), Fep15 (Novoselov et al., 2006) et SelL (Shchedrina et al., 2007) ont été découvertes chez des poissons ou autres invertébrés, mais leurs rôles ne sont pas encore complètement élucidés. Les quatre sélénoprotéines de Plasmodium (Sel1-Sel4) ne montrent aucune similarité détectable à d'autres protéines (Lobanov et al., 2006). Cependant, Sel1 et Sel4 ont leur résidu Sec dans la région C-terminale qui peut être lié à SelK et SelS.

#### 1.4.5. Régulation de la biosynthèse des sélénoprotéines

Il est clair, à partir d'études animales et humaines, que l'expression des sélénoprotéines est régulée par l'alimentation en Se et que la carence en Se provoque une diminution générale, mais pas uniforme, des niveaux de toutes les sélénoprotéines (Burk et al., 1993). Il existe dans la cellule et dans l'organisme en général une hiérarchie d'expression des sélénoprotéines afin de maintenir un niveau individuel de chaque sélénoprotéine et, également, afin de retenir le Se dans les différents organes comme mentionnés précédemment (Hatfield et al., 2002).

L'effet de la carence en Se sur chaque sélénoprotéine est marqué par le fait que toute carence sévère peut causer par exemple une diminution de l'activité de GPX1 dans le foie de rat de l'ordre 99 % ou encore entraîner une chute de 75 % de l'activité GPX4. Un déficit en Se cause différents niveaux de réduction d'activité des sélénoprotéines dans les différents organes, selon le niveau de la carence (Lei, X. G. et al., 1995). Les changements dans l'activité de chaque sélénoprotéine provoquée par une carence en Se sont accompagnés par des changements dans l'abondance de l'ARNm des diverses sélénoprotéines. Bien que les changements dans l'ARNm ne correspondent pas toujours à des changements dans l'activité des sélénoprotéines, le parallèle est tout de même présent quant à la hiérarchie des effets sur l'expression des protéines.

Comparativement à la baisse de l'activité des protéines mentionnées précédemment, les études sur les effets de la carence sévère en Se dans le foie des rats ont révélé qu'une quantité d'ARNm de GPX1 a été le plus touchée, avec une baisse de 90 %, l'ARNm de DIO1 a chuté de 50 %, alors qu'il n'y avait pas d'effet significatif sur les niveaux d'ARNm de GPX4 (Bermano et al., 1995). Ces résultats indiquent que la synthèse des sélénoprotéines et l'abondance de leur ARNm diffèrent dans leur sensibilité selon l'apport nutritionnel en Se non seulement dans un seul tissu, mais aussi entre les tissus (Hesketh et al., 2002).

Il a été démontré, dans une étude sur des cellules de foie de rats en carence de Se, que les taux de transcription des gènes de GSHPx1, GSHPx4 et DIO1 ne sont pas affectés par le déficit, même s'il y a des changements dans l'abondance de leur ARNm et dans l'activité enzymatique (Bermano et al., 1995). Ces résultats ont été interprétés comme une indication que les mécanismes post-traductionnels jouent un rôle important dans la régulation de la synthèse des sélénoprotéines en réponse à la disponibilité en Se. Ce contrôle implique la régulation de la stabilité de l'ARNm (Hadley et al., 2001; Weiss Sachdev et al., 2001). Ce point de vue est soutenu par la constatation que, dans les cultures cellulaires, l'enrichissement du milieu avec du Se affecte différemment la stabilité des ARNm de GSHPx1, GSHPx2 et GSHPx4 (Bermano et al., 1996).

#### 1.4.5.1. La voie *nonsense-mediated decay* (NMD)

La dégradation des ARNm des sélénoprotéines dans les tissus ou cellules en carence de Se est due à la voie NMD (Moriarty et al., 1998). Cette voie est utilisée dans les cellules eucaryotes comme un mécanisme d'élimination des ARNm dans lesquelles la traduction se termine prématurément en raison d'une mutation pour un codon non-sens. Dans la voie NMD, le codon non-sens doit être positionné > 50-55 nt en amont d'une jonction post-épissage exon-exon, et elle dépend de la présence d'un complexe de jonction d'exon (CJE) de la protéine, inséré au cours de l'épissage du pré-ARNm et situé à ~ 20-25 nt en amont de la jonction exon-exon (Nagy et al., 1998; Rebbapragada et al., 2009). Dans ces conditions, le complexe de traduction décroche au codon non-sens avant qu'il ne puisse enlever le CJE hors de l'ARNm, permettant aux protéines du CJE et à ses partenaires de recruter la machinerie de dégradation de l'ARNm (Hwang et al., 2010).

Pour la production de sélénoprotéines sous des conditions adéquates de Se, la concentration du Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> est suffisamment élevée pour que la NMD n'ait pas lieu, puisque la traduction se poursuit après l'UGA, balayant le CJE hors de l'ARNm et empêchant ainsi la dégradation des ARNm (Sunde et al., 2011). Sous des conditions déficientes en Se par contre, l'hypothèse corrobore que le manque d'une concentration suffisamment élevée en Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> résulte au décrochage de la machinerie de traduction au UGA quand le UGA est > 50-55 nt en amont d'une jonction exon-exon. Par exemple, dans le cas de l'ARNm de GSHPx1 avec son UGA situé à 105 nt de la jonction d'épissage exon-exon, le CJE n'est pas délogé de l'ARNm lors du premier tour de la traduction, ce qui entraîne la dégradation des ARNm de GSHPx1 lors d'une carence en Se. En revanche, lorsque le codon UGA est situé près de la jonction exon-exon, comme pour MsrB1 codé par le gène Sepx1, son UGA est situé à 34 nt du site de jonction d'épissage exon-exon. Le complexe de traduction décroche aussi à l'UGA lors d'une carence, mais il est assez proche pour déloger le CJE, empêchant ainsi la voie NMD d'agir sur cet ARNm (Weiss et al., 1998).

#### 1.4.5.2. Rôle du 3'UTR

Chaque ARNm de sélénoprotéine eucaryote possède dans son propre 3'UTR, un élément SECIS essentiel pour l'insertion de la Sec. D'autres régions du 3'UTR sont toutefois suffisamment différentes pour être en mesure de déterminer en partie le mode d'expression des sélénoprotéines dans des conditions d'une carence en Se. Les différences dans le 3'UTR de l'ARNm de la sélénoprotéine peuvent être d'une importance cruciale dans le mode de traduction des différents ARNm. Lorsque le 3'UTR d'origine de DIO1 et DIO3 a été échangé contre celui d'une autre sélénoprotéine, les activités des enzymes ont été modifiées (Berry et al., 1991a). Les différences dans les séquences 3'UTR sont également soupçonnées d'être responsable des variations dans les taux de conversion et la stabilité relative des ARNm entre les différentes sélénoprotéines, reflétant probablement la différence dans la capacité des 3'UTR des ARNm de former un complexe avec le Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> et les protéines formant le complexe de liaison au SECIS (Gupta et al., 2013). La priorisation dans la biosynthèse des sélénoprotéines dépend de différences dans les séquences 3'UTR et des protéines qui y sont liées, justifiant ainsi l'hypothèse que des facteurs de liaison restent encore à découvrir (Mazumder et al., 2003b).

En raison de ces différences, la formation du complexe et la capacité de l'appareil d'incorporation de la Sec pour le recodage du UGA varient en fonction de l'offre en Se, limitant ainsi la production de la Sec. Par exemple, lorsque le Se est abondant, les ARNm, tant de GSHPx1 que de GSHPx4, sont traduits et les deux sélénoprotéines sont synthétisées. Toutefois, lorsque le Se devient le facteur limitant de la biosynthèse de la Sec, et en supposant que le 3'UTR de l'ARNm de GSHPx4 est plus efficace que celui de GSHPx1 pour concurrencer les composantes de la machinerie de l'incorporation, la traduction de GSHPx1 est réduite tandis que celle de GSHPx4 est maintenue (Sunde, 2010).

#### 1.4.5.3. Rôle de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>

En plus de la stabilité de l'ARNm des sélénoprotéines et des quantités limitées des facteurs transitoires, comme SBP2 ou RPL30, la synthèse des sélénoprotéines est également réglementée par la stabilité du Sec-ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. Comme expliqué à la section

1.3.1, deux isoformes de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> ont été caractérisés dans les cellules de mammifères, mcm<sup>5</sup>U et mcm<sup>5</sup>Um qui contiennent la méthylation au résidu 34. La méthylation est censée provoquer un changement dans la conformation de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, allant d'une conformation compacte à relativement plus ouverte et plus stable (Jameson et al., 2002). La constatation que les suppléments de Se augmentent l'abondance relative de l'isoforme méthylé, ainsi que la quantité totale d'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, indique que c'est cet isoforme méthylé qui est actif pour la traduction protéique et que la méthylation de l'ARNt<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> est un autre mécanisme pour la régulation de la synthèse sélénoprotéique (Jameson et al., 2004)

#### 1.4.5.4. Régulation par des polymorphismes mononucléotidiques

Les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) sont des variations de séquences génétiques qui se produisent lorsqu'un seul nucléotide dans la séquence du génome est modifié. Les SNPs représentent environ 90 % de toutes les variations génétiques humaines et se produisent tous les 100 à 300 bases le long du génome humain de trois milliards de paires de bases. Deux SNPs sur trois impliquent le remplacement de la cytosine (C) avec la thymine (T). Beaucoup de ces SNP n'ont aucun effet sur le métabolisme, mais d'autres semblent jouer un rôle important en tant que modificateurs de la fonction des cellules, en particulier en ce qui concerne l'interaction gènes-nutriments.

On pense, par exemple, que les SNPs peuvent être responsables de la façon dont les individus utilisent le sélénium alimentaire disponible pour la synthèse des sélénoprotéines. L'analyse des séquences du gène GSHPx4 a identifié un SNP commun dans une partie de la région 3'UTR à proximité de la région SECIS. La mutation a été trouvée dans une variation T / C à la position 718. La répartition de la SNP dans la population écossaise étudiée est de 34 % CC, 25 % TT, et 41 % TC. La signification fonctionnelle des SNPs n'est pas tout à fait comprise, mais leur incidence laisse présager un rôle très important, en particulier en ce qui concerne les différences dans la réponse des individus à la supplémentation en sélénium (Hesketh et al., 2002). Le SNP T/C 718 a été trouvé comme étant associé à des différences dans le métabolisme de la lipoxigénase, concordant avec la preuve que GSHPx4 joue un rôle dans cette voie. Des

différences significatives de métabolites dans la voie de la lipoxygénase ont été trouvées chez les individus avec différents génotypes C718. Il n'y avait aucune preuve que les différences de niveaux en sélénium expliqueraient les différences dans les produits de la voie de la lipoxygénase entre les groupes de génotypes. Ces résultats ont été interprétés comme fournissant un exemple de l'interaction complexe entre la constitution génétique, la nutrition et l'état physiologique (Villette et al., 2002).

En conclusion, encore aujourd'hui bien peu d'informations sont disponibles sur les bases génétiques de l'adaptation au niveau du sélénium alimentaire chez les humains et d'autres espèces. L'identification des processus moléculaires pour l'adaptation dans les régions codantes et régulatrices des gènes des sélénoprotéines, et aussi dans les gènes impliqués dans le métabolisme du sélénium, est la première étape pour mieux comprendre le mécanisme (Sun et al., 1999).

## **1.5. Les effets sur la santé chez l'homme liés au sélénium**

La littérature a longtemps surnommé le Se comme étant le poison essentiel puisqu'en trop grande quantité dans l'alimentation il peut être toxique, cependant en infime quantité, il peut entraîner des maladies chroniques, et parfois fatales dues à une carence. Aujourd'hui au Canada, comme dans la plupart des autres pays, le Se apparaît comme élément trace pour lesquels un « Apport Nutritionnel Conseillé » (ANC) a été mis en place. Durant cette même période, il a été déclaré par la *Food and Drug Administration (FDA)* comme élément cancérigène et interdit comme additif dans les aliments (Hartikainen, 2005; Rayman, 2008).

Depuis la découverte du Se, plusieurs études ont paru dans la littérature sur la gravité du danger du Se pour l'environnement et pour la santé animale. Dans les grandes régions de la Chine, la toxicité du Se est effectivement un danger endémique pour les habitants qui dépendent de cultures du sol très riche en Se. Pourtant, au Royaume-Uni et dans d'autres pays de l'Europe, les craintes se situent plutôt au niveau d'une quantité de Se insuffisante dans les cultures (Rayman et al., 2008). Un résumé des effets des sélénoprotéines et de leurs conséquences sur la santé ainsi que des maladies reliées à un polymorphisme chez l'humain est présenté dans le Tableau I.

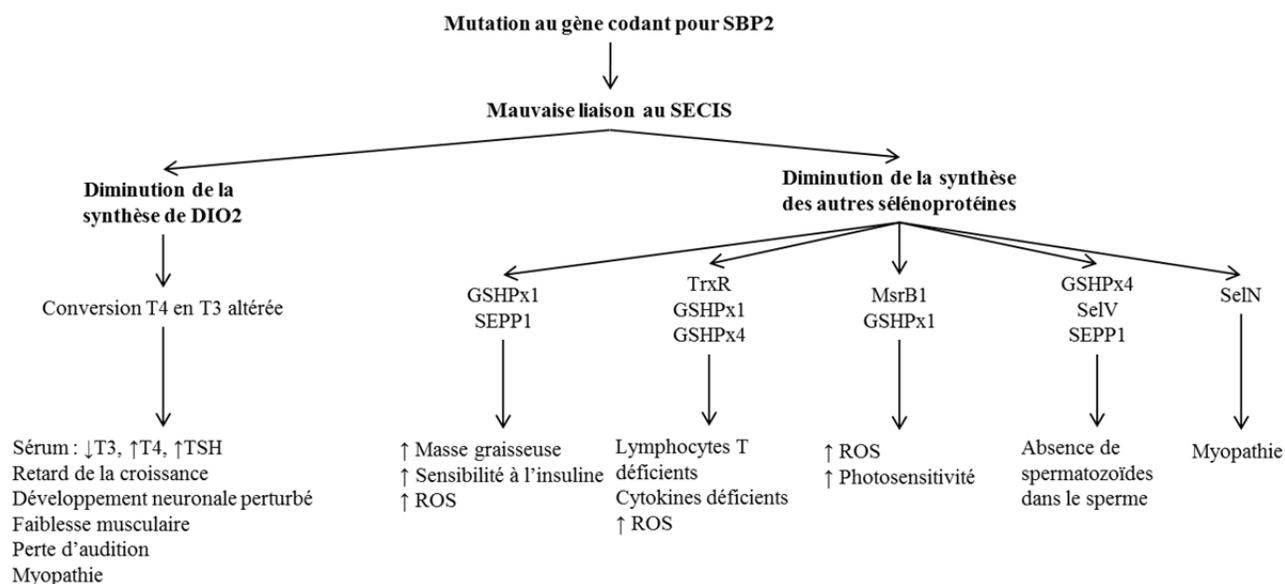
**Tableau I : Liste des protéines impliquées dans la biologie du sélénium avec des fonctions connues ou des effets associés relatifs à la santé chez l'humain.** Tableau modifié de (Rayman, 2012).

	Protéines	Rôle et fonction/effets sur la santé	Effets sur la santé associés à des polymorphismes dans le gène
<b>Glutathione Peroxidases (GSHPx)</b>	<b>GSHPx1</b> (Cytosolique)	Réduction des radicaux libres (ROS); action complémentaire à la vitamine E.	<b>Effets cardiométaboliques:</b> syndrome métabolique, maladies cardiovasculaires, maladies coronariennes, effet sur la pression artérielle, sténose, calcification artérielle coronarienne, maladie vasculaire périphérique, anévrisme de l'aorte thoracique, hémorragie intracérébrale.  <b>Cancer :</b> Poumon, Prostate, Vessie, Foie
		Limite la virulence rétrovirale en prévenant les mutations des virus;	
		GSHPx1 <sup>-/-</sup> induit des cardiomyopathies.	
	<b>GSHPx2</b> (Gastrointestinale)	Antioxydant, réduit les lipides hydroperoxydés ingérés. Fonction antiapoptotique dans les foci du côlon et aide à maintenir l'intégrité de la muqueuse intestinale.	--
<b>Iodothyronine Desiodases (DIO)</b>	<b>GSHPx3</b> (Plasma)	Seul GSHPx dans les fluides extracellulaires, protège la thyroïde des ROS <sup>1</sup>	AVC ischémique, cancer de la thyroïde.
	<b>GSHPx4</b> (Phospholipide)	Associé à la membrane cellulaire, surtout présente dans les glandes séminales pour la mobilité et viabilité des cellules germinales.	Adénome rectolique, cancer colorectal, cancer du sein
	<b>DIO1</b> (Thyroïde, Foie, Rein)	Production de l'hormone thyroïdienne active T <sub>3</sub>	Perte de forces musculaires, faible masse corporelle
		<b>DIO2</b> (Cerveau, hypophyse, muscle, cœur)	Production de l'hormone thyroïdienne active T <sub>3</sub> dans les tissus périphériques (adipeux, musculaires)
<b>DIO3</b> (Cortex cérébral, épiderme, placenta, utérus)			Production de l'hormone T <sub>3</sub> inverse.

<b>Thioredoxine Réductases (TrxR)</b>	<b>TrxR1</b> (cytoplasmique, nucléaire)	<p>Activité redox, utilisant plusieurs substrats comme la thioredoxine, requise pour la synthèse d'ADN</p> <p>Contrôle l'activité des facteurs de transcription, prolifération cellulaire, l'apoptose;</p> <p>Une baisse d'expression ralentit la croissance des cellules tumorales.</p>	Adénome colorectal, facteur génétique familial à la base de la sclérose latérale amyotrophique (SLA)
	<b>TrxR2</b> (Mitochondriale)	<p>Activité redox indispensable pour la viabilité des cardiomyocytes.</p>	Cancer gastro-intestinal
	<b>TrxR3</b> (Glandes séminales)	<p>Activité redox dans la spermiogenèse</p>	--
<b>Sélinoprotéine P (SEPP1)</b>	<p>Fonction antioxydante, contient 10 résidus Sec, impliqués dans le transport du Se plasmique;</p> <p>Transporte Se via le plasma dans: le foie, le cerveau, les glandes séminales et les reins;</p> <p>Carence de la spasticité, mouvements anormaux et des crises spontanées chez la souris;</p> <p>Essentiel pour la fertilité masculine, carence provoque l'infertilité avec des spermatozoïdes entortillés et hypomotiles;</p> <p>Corrélation avec la glycémie à jeun.</p>	Cancer de la prostate, réduit le niveau de Se plasmique, réduit l'expression des sélinoprotéines, cancer colorectal.	
<b>Sélinoprotéine S (SEPS1)</b>	<p>Anti-inflammatoire, localisé dans le réticulum endoplasmique (RE), protège la cellule contre l'apoptose induite par un stress du RE, impliqué dans la métabolisation du glucose et de l'insuline.</p>	Augmente les risques de prééclampsie, de maladies coronariennes, rapport taille-hanche débalancé; Augmente les risques de cancers gastriques, rectaux et colorectaux.	
<b>15 kDa sélinoprotéine (SEP15)</b>	<p>Localisé dans le RE, affecte le repliement des glycoprotéines.</p>	Cancer de la prostate, du poumon et du rectum.	
<b>Sélinoprotéine N (SEPN1)</b>	<p>Localisé dans le RE,</p> <p>Régule le transport du calcium pour le développement des muscles</p>	Myopathies	

<b>Sélososome</b>	<b>SBP2</b>	Régulateur de la synthèse de sélénoprotéine; Rôle très important pour la traduction sélénoprotéique.	Nombre de lymphocytes réduit dans l'organisme ainsi qu'une baisse de leur prolifération marquée après une stimulation à un antigène polyclonal (Figure 8)
	<b>SepSecS</b>	Catalyseur dans la synthèse de la Sec à partir de la Ser sur l'ARNt <sup>[Ser]Sec</sup> .	Atrophie cérébrale progressive et autres troubles neurologiques, Maladie de Crohn,

<sup>1</sup> (Barrett et al., 2013)



**Figure 8. Des variants de SBP2 conduisent à une synthèse des sélénoprotéines altérées résultant en une variété de troubles cliniques.**

### 1.5.1. Dans le système immunitaire

Les études sont nombreuses sur les effets du Se dans l'immunité liées à des analyses en laboratoire tant *in vitro* que sur des modèles animaux. Cependant, il y a eu peu d'essais cliniques chez l'humain. Par contre, l'effet est indéniable, le Se est un immunostimulant dans l'organisme (Hoffmann, P. R., 2007; Carlson et al., 2010; Hoffmann, F. W. et al., 2010). Trois études récentes majeures énoncent des conclusions qui varient entre l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T, l'augmentation de l'activité cytotoxique tumorale et une plus grande activité des cellules *Natural Killer* (NK) (Kiremidjian-Schumacher et al., 2000; Wood et al., 2000; Hawkes et al., 2001; Broome et al., 2004).

L'explication moléculaire de ce phénomène viendrait du rôle même des sélénoprotéines qui est essentiel pour activer les lymphocytes T. Ces dernières sont très sensibles au stress oxydatif rendant leur prolifération impossible pour les cellules avec un niveau faible en sélénoprotéine, ou ayant un polymorphisme dans le gène d'un des constituants de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines comme celui de la protéine SBP2 (Tableau I) (Schoenmakers et al., 2010). L'incapacité d'une cellule lymphocytaire T de répondre à sa propre production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, aussi appelé *ROS* pour *Reactive Oxygen Species*), fait varier le pH intracellulaire et inhibe ainsi la division cellulaire. Ces cellules ne peuvent ainsi plus répondre à l'activité immunitaire lorsqu'une prolifération, suite à une activation par un antigène, est nécessaire (Saito et al., 2003; Kawatani et al., 2011).

#### **1.5.1.1. Dans les infections virales**

De manière réciproque, en ce qui a trait à l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T lors d'une augmentation de l'apport en Se, le phénomène s'explique par l'interaction entre l'interleukine 2 (IL2) et son récepteur à la surface des cellules T (Hoffmann, F. W. et al., 2010). Ces effets combinés favorisent, à court terme, la réponse immunitaire antivirale et antitumorale qui dépend de l'immunité liée aux cellules Th1.

Une carence en Se a été liée à une augmentation ou à une réduction de l'incidence, de la virulence ou de la progression d'autres maladies causées par des infections virales (Broome et al., 2004). De plus, il a été démontré que la carence en Se chez la souris, causant une activité faible ou nulle de la GSHPx1, provoque des mutations dans des virus à ARN qui conduisent à l'apparition de souches virulentes (Beck et al., 2004). Cette découverte pourrait expliquer les mutations induisant des myocardites par le virus de Cocksackie qui est à la base des cardiomyopathies venant de la maladie de Keshan (Beck et al., 2003; Lei, C. et al., 2009).

#### **1.5.2. Dans les maladies inflammatoires et le stress oxydatif**

Il devient de plus en plus évident que la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et d'azote par les cellules immunitaires entraîne un stress oxydatif et joue un rôle de premier plan dans plusieurs états pathologiques, où l'inflammation est le

dénominateur commun des cancers, de l'athérosclérose, des maladies auto-immunes, du diabète et des maladies neurodégénératives (Huang et al., 2012).

Dans le cadre d'une réponse biologique complexe, l'inflammation constitue la première ligne de défense contre les stimuli nocifs, les infections et les invasions de pathogènes et, par conséquent, peut être considérée comme un mal nécessaire. Une variété de médiateurs spécifiques sont libérés à partir de tissus et de cellules qui migrent en réponse au stress venant des radicaux libres, et en réponse aux infections activatrices des voies inflammatoires (Shchedrina et al., 2010). Le sélénium est un antioxydant reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires en modulant un certain nombre de voies de signalisation cellulaire comme la voie Cox/Lox, NF- $\kappa$ B et, bien sûr, la voie des ROS.

### **1.5.3. Dans le système de reproduction humaine**

Le Se est connu pour jouer un rôle tant chez le mâle que chez la femelle pour la reproduction (Underwood, 1977; Hidirolou, 1979). En effet, un faible taux sanguin de Se a été associé à des fausses couches chez les bovins et les porcins (Stuart et al., 1982). Il est connu que le Se sérique est significativement plus faible chez les femmes qui ont eu des fausses couches (Barrington et al., 1997; Abdulah et al., 2013). Le niveau de Se diminue habituellement pendant la grossesse, en partie en raison de l'augmentation du volume plasmatique, mais l'inflammation excessive, une caractéristique probable d'une fausse couche, diminue également la circulation de Se (Nichol et al., 1998; Hesse-Bahr et al., 2000).

L'importance du rôle du Se pour la fécondité est plus probante pour les hommes que pour les femmes. Il a été démontré que le Se est un élément essentiel pour la synthèse de la testostérone et le développement normal des spermatozoïdes (Behne et al., 1996). En l'absence d'une quantité de Se appropriée, des anomalies structurelles se produisent dans le sperme et leur motilité est affectée (Wu, S. H. et al., 1973). Chez l'homme, la sélénoprotéine GSHPx4 est retrouvée dans les mitochondries situées dans l'enveloppe de la queue des cellules spermatiques. Dans la phase précoce de la spermiogenèse, l'effet antioxydant de GSHPx4 venant de son action de peroxydase protège les spermatozoïdes en formation. Durant la phase de maturation, GSHPx4 se lie

à des protéines de structures afin de former une gaine autour du flagelle de la cellule germinale. Ainsi, une saine maturation du flagelle est essentielle pour la motilité du spermatozoïde (Ursini et al., 1999).

#### **1.5.4. Dans la régulation cérébrale et la neurodégénérescence**

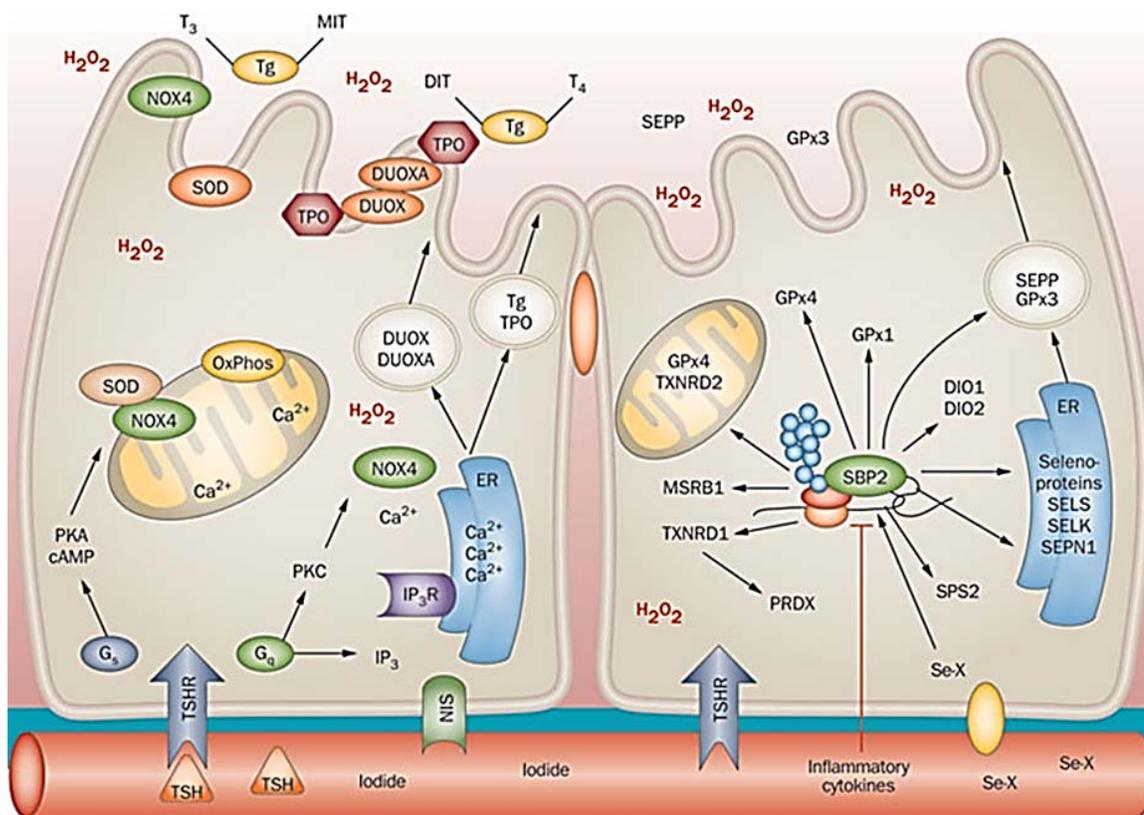
Le sélénium est essentiel pour le cerveau. Lors d'une absence de source disponible de cet atome, les niveaux de Se sont maintenus dans le cerveau au détriment d'autres tissus dans le corps alors qu'une carence totale en Se provoque des lésions irréversibles au cerveau (Berr et al., 2012). La sélénoprotéine P (SEPP1) a un rôle particulier dans la livraison du Se au cerveau en se liant à un récepteur de surface, ApoER2, qui est un membre de la famille des récepteurs lipoprotéiques. Les souris qui ne peuvent pas synthétiser SEPP1 développent de la spasticité, des mouvements anormaux et des crises spontanées (Schomburg et al., 2004; Schweizer et al., 2004). Les résultats des études chez l'homme suggèrent un rôle pour le Se dans la motricité, la maladie de Parkinson, et le déclin cognitif (Ashrafi et al., 2007a; Ashrafi et al., 2007b). Un faible Se sanguin a été observé chez les enfants et les adultes souffrant de crises d'épilepsie et chez les enfants qui ont eu des convulsions fébriles (Amiri et al., 2010).

SEPP1 a un rôle de protection pour le système nerveux en agissant comme promoteur de la survie cellulaire des neurones et en prévenant la mort cellulaire par apoptose en réponse oxydative induite par l'amyloïde  $\beta$  (Takemoto et al., 2010). L'explication plausible au niveau moléculaire viendrait du rôle de GSHPx3 dans le plasma sanguin. Une faible concentration en Se, pouvant être causée par une insuffisance rénale par exemple due à la vieillesse, entraîne une baisse de production de GSHPx3 ou une plus faible synthèse de sélénoprotéines aussi causée par l'action des cytokines inflammatoires comme IL-2 comme énoncé précédemment (Schiavon et al., 1994). Une insuffisance rénale entraîne aussi une fuite d'homocystéine dans le système sanguin qui représente un facteur très connu pour causer la démence (Ravaglia et al., 2003).

### 1.5.5. Dans le métabolisme thyroïdien

De ce que l'on connaît désormais à propos du rôle des différentes sélénoprotéines dans le métabolisme de la glande thyroïde, des études confirment que le Se est un acteur majeur dans la relation entre le goitre et ses diverses manifestations. La glande thyroïde a la plus grande concentration en Se de tous les tissus chez l'humain (Schomburg et al., 2008). Comme il a été rapporté dans la section 1.4.4.3, le rôle du Se se traduit principalement par l'action des DIO et de la catalyse des réactions de la T4, T3 et rT3. Plus précisément, l'hormone thyroïdienne T3 régule une variété de processus tels la croissance, le développement, et le métabolisme basal. Pour produire ces effets, T3 entre dans le noyau de la cellule et se lie à des récepteurs de l'hormone thyroïdienne qui, à son tour, se lie à des promoteurs spécifiques au niveau des gènes sensibles à T3, régulant la transcription à la fois d'une manière positive et négative (Yen, 2001). Cependant, la glande thyroïde produit principalement la T4, laquelle a une activité biologique intrinsèquement faible, ayant environ une affinité dix fois plus faible pour les récepteurs de l'hormone thyroïdienne que T3 (Larsen et al., 1979). Ainsi, l'élimination enzymatique d'un atome d'iode lié à un cycle aromatique de T4 catalysé par DIO1 et DIO2 produit la T3 est une étape essentielle dans le métabolisme et dans la santé humaine (Bianco et al., 2002; Gereben et al., 2008).

Plusieurs autres sélénoprotéines peuvent aussi être associées au métabolisme des hormones thyroïdiennes. Même si elles ne sont pas aussi centrales que les DIOs, elles ont néanmoins une importance considérable. Il s'agit notamment des GSHPx qui offrent une protection intra et extra cellulaire contre les peroxydes lipidiques qui peuvent endommager la glande thyroïde et interférer avec ses fonctions (Arthur et al., 1996). Les TrxR contribuent également à l'action antioxydante cellulaire (Howie et al., 1998), tandis que SEPP1 peut fournir une action antioxydante extracellulaire (Burk et al., 1995) (Arthur et al., 1999). Ainsi, les TrxR, SEPP1 et, éventuellement, d'autres sélénoprotéines, en plus des GSHPx, peuvent être considérés comme ayant un rôle dans la protection de la glande thyroïde contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en plus de la régulation des taux de T3 par les trois désiodases (Figure 9).



**Figure 9. Voies impliquées dans la production de peroxyde thyroïdien (à gauche) et la protection de la cellule sélénium-dépendante (à droite).** Figure tirée de (Schomburg, 2012).

Parmi plusieurs stimuli physiologiques, le contrôle principal de la production du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est provoqué par l'alimentation en iode et par les signaux de TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) avec la phosphorylation oxydative des mitochondries (OxPhos) et l'activité NOX4 (**cellule de gauche**). La stimulation des récepteurs de TSH (TSHR) active deux protéines G intracellulaires (G<sub>s</sub> et G<sub>q</sub>) et des protéines kinases (PKA et PKC) et favorise la biosynthèse du cotransporteur de sodium / iode (NIS), la thyroglobuline (Tg) et les enzymes d'iodation. En comparaison, la biosynthèse pour les sélénoprotéines de protection est principalement affectée par le génotype, la disponibilité des sources de Se (SE-X) et des stimuli inflammatoires (**cellule de droite**). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire sert à des fins de signalisation. Les iodothyronines désiodases de type I et II (DIO1, DIO2), GPX1 et GPX4, la méthionine sulfoxyde réductase B1 (MSRB1), la sélénophosphate synthétase 2 (SPS2) et la thiorédoxine réductase 1 (TXNRD1) sont des sélénoenzymes intracellulaires, alors que TXNRD2 et l'isoforme de GPX4 sont localisés dans les mitochondries et GPX3 et SEPP1 sont extracellulaires. SBP2 est un facteur de contrôle de la vitesse de traduction des sélénoprotéines qui est affecté négativement par les cytokines inflammatoires.

### **1.5.6. Dans le système cardiovasculaire**

Il existe des évidences qu'un niveau bas d'antioxydants dans l'organisme augmenterait les risques de développer des maladies cardiovasculaires (MCV). Ainsi, par son rôle central dans les sélénoprotéines, le Se aurait un effet marqué dans l'incidence des MCV au sein d'une population. Les bénéfices cardiovasculaires potentiels du Se sont appuyés par des preuves que les sélénoprotéines empêchent la modification oxydative des lipides, inhibent l'agrégation plaquettaire et réduisent l'inflammation en plus des nombreux effets cardiométaboliques qui ont été liés à des polymorphismes dans GSHPx1, GSHPx3, DIO2 et SEPP1 (Tableau I).

Il est considéré que le stress oxydatif issu des radicaux libres joue un rôle majeur dans le développement de la maladie cardiaque (Ozer et al., 1995). L'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) favorise l'accumulation de plaques dans les artères coronaires. La sélénoprotéine GSHPx4 réduit les hydroperoxydes associés à des lipoprotéines et pourrait donc réduire l'accumulation de LDL oxydée dans la paroi de l'artère (Lapenna et al., 1998). Autre indication intéressante, les hydroperoxydes produits dans la synthèse des acides gras polyinsaturés, comme l'acide arachidonique, par les voies de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase, peuvent inhiber l'enzyme prostacycline-synthétase. Ainsi, la production de prostacycline vasodilatatrice se voit réduite en même temps qu'une stimulation de la production de thromboxane, qui est associée à une vasoconstriction et l'agrégation des plaquettes (Neve, 1996). Les GSHPx sont capables d'empêcher une accumulation de ces hydroperoxydes et d'éviter ainsi la formation de caillots sanguins (Rees et al., 2013).

### **1.5.7. Dans les cancers**

Bien qu'à un certain moment, le sélénium a été officiellement reconnu comme agent cancérogène (Frost, 1972), son éventuelle efficacité dans la thérapie de cette maladie a été considérée dès 1910. L'utilisation thérapeutique du sélénium dans le traitement du cancer a été signalée dans un article publié en 1915 (Walker et al., 1915).

Un certain nombre d'hypothèses ont été avancées pour expliquer les données expérimentales, ce qui indique que les formes du sélénium ont des propriétés

cancérostatiques, c'est-à-dire pouvant ralentir ou arrêter la croissance d'un carcinome. Cinq d'entre elles sont: (1) rôle antioxydant du sélénium, (2) sa capacité à renforcer l'immunité, (3) l'effet sur le métabolisme des agents cancérigènes, (4) son rôle dans la synthèse des protéines et la division cellulaire; et (5) la formation de métabolites de sélénium anticancéreux (Rayman, 2007). Par exemple, le sélénite de sodium induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate principalement par la voie mitochondriale, mais aussi par le stress du RE et la voie moléculaire HIF-1 $\alpha$  (Chen, P. et al., 2013).

## 1.6. Hypothèses et Objectifs

Le séquençage du génome humain a amené à la recherche des informations prépondérantes dans l'objectif d'introduire de nouveaux médicaments pour l'humanité. Cependant, les retombées d'une telle découverte se font toujours attendre (Cirulli et al., 2010). Bien que cruciale, la carte génomique ne permet pas de conclure le rôle d'une protéine, ou encore comment celle-ci est impliquée, dans la machinerie moléculaire ou dans les voies de signalisation qui déterminent le comportement d'une cellule (Gavin et al., 2002). Les découvertes biochimiques importantes doivent donc provenir de nouvelles stratégies de recherche. L'état modulaire des protéines et la flexibilité de leur liaison ont contribué à l'évolution des voies de signalisation. De manière réciproque, les interactions aberrantes ont contribué à des comportements cellulaires anormaux et le développement de maladies (Pawson et al., 2003). Ainsi, les interactions protéine-protéine et les méthodes pour les étudier et comprendre leur dynamique dans les organismes vivants sont une approche valide pour répondre aux grands défis de la recherche biomédicale. Les études protéomiques permettent pas seulement de déterminer le niveau d'expression basale d'une protéine ou les interactions statiques de celle-ci, mais elles permettent aussi d'étudier la dynamique des interrelations protéiques menant à l'assemblage de complexes macromoléculaires et à la formation d'un interactome (Michnick et al., 2007). L'étude de ces complexes multiprotéiques, aussi appelés supramoléculaires, est un domaine comprenant beaucoup de difficultés, mais qui s'avère très important dans la compréhension du comportement cellulaire et pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. L'application de cette stratégie de

recherche à la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines est une approche logique afin de faire avancer nos connaissances dans ce domaine, et de mieux comprendre la forte implication de ce système dans la santé humaine.

### **1.6.1. Objectif 1 – Établissement de l'essai *in vivo* pour étudier les interactions protéine-protéine au sein du sélénosome**

Le premier objectif de nos recherches était d'abord d'adapter des techniques d'analyse protéine-protéine pour le système de la biosynthèse des sélénocystéines et de leur insertion dans les sélénoprotéines. Le choix de la technique de *Protein-fragment Complementation Assay* (PCA) s'est avéré le plus logique considérant ses possibilités et ses caractéristiques. La PCA-hRLuc est technique d'analyse d'interactions protéine-protéine développée et très bien maîtrisée au Département de biochimie de l'Université de Montréal (Michnick et al., 2007). Cette technique permet d'étudier des interactions protéine-protéine *in vivo*, ce qui n'a jamais été réalisé dans le cas du sélénosome auparavant. De plus, aucun intermédiaire comme un régulateur transcriptionnel ou une protéase ubiquitine-spécifique ne sont pas nécessaire pour générer un signal.

La technique PCA-hRLuc utilisée pour cette étude, consiste à scinder le gène de la protéine rapporteuse *Renilla reniformis Luciferase* en deux fragments (hRLuc-F[1], acides aminés 1 à 110 et hRLuc-F[2], acides aminés 111 à 311) puis en fusionnant ces fragments à deux protéines d'intérêt. Quand les gènes recombinants sont exprimés, et si les deux protéines de fusion interagissent l'une avec l'autre, les fragments de hRLuc sont à proximité et se replient pour générer l'activité native de la protéine (Stefan et al., 2007). Avec l'utilisation du réactif, coelentérazine H, la détection du signal de luminescence de la luciférase est très sensible. La coelentérazine H est le substrat principal de la luciférase qui l'oxyde donnant une luminescence au milieu. Ce système ne permet cependant pas de faire une normalisation standard des données entre les expériences dues à la grande variabilité du signal causé par plusieurs facteurs comme le nombre de cellules, le milieu et la concentration du réactif. Une normalisation avec un gène codant pour la *Firefly Luciferase* permettrait de quantifier l'efficacité de la transfection transitoire et le signal pour chaque condition. En effet la *Firefly Luciferase*,

n'étant pas scindée en deux fragments, peut réagir avec la Coelentérazine H, mais émet à une longueur d'onde différente de celle-ci (Solberg et al., 2013). Un éventail de techniques alternatives de l'essai PCA est disponible et offre une variété de lectures, dont la survie, la fluorescence, la luminescence et la colorimétrie (Remy et al., 1999). Cependant, l'approche par PCA-hRLuc a prouvé son utilité puisqu'elle permet la détection d'interactions transitoires sans contraindre deux protéines par l'interaction des fragments de fusion venant des fragments des Luciférases.

De ce fait, le premier objectif que nous nous étions fixé était de faire bénéficier l'étude de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines de l'utilisation d'une approche protéomique *in vivo* permettant une analyse des interactions de ses constituants dans son ensemble et de manière détaillée. Les protéines SepSecS, SECp43, RPL30, SPS1, SPS2, SPS2 Se60C, eEFSec et SBP2 ont été sélectionnées pour cette recherche. En effet, beaucoup d'informations sont actuellement disponibles dans la littérature sur les interactions entre ces 8 protéines candidates. Il est donc possible de comparer les données obtenues avec celles de la littérature pour témoigner de l'impact d'une approche protéomique à ce système étudié jusqu'à aujourd'hui de manière *in vitro*.

Les gènes de certains constituants discutés ci-dessus n'ont pas fait l'objet d'une analyse dans le cadre de ce projet. Les résultats des clones d'eEFSec en fusion N-terminal avec hRLuc-F[1] ou hRLuc-F[2] (F[1]-eEFSec et F[2]-eEFSec) ainsi que les constructions de la variante SPS2 Se60C en fusion avec les fragments hRLuc-F[1] et hRLuc-F[2] en N- et C-terminal ne sont pas présentés.

### **1.6.2. Objectif 2 – Analyse protéomique par PCA-hRLuc des interactions *in vivo* entre les différents constituants du sélénosome**

Pour la seconde partie des recherches, nous voulions analyser et quantifier les interactions des constituants actuellement connus de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines. Ainsi, nous avons été en mesure d'analyser partiellement l'assemblage de cette machinerie et d'en déterminer l'effet probable sur la synthèse des sélénoprotéines. Une hiérarchie dans l'assemblage de la machinerie reste encore à confirmer considérant les différentes données de la littérature. Ainsi, nous avons utilisé le système d'étude par PCA pour confirmer des interactions et ainsi développé notre propre modèle des interactions moléculaires au sein de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines. Éventuellement, une étude en protéomique permettra de trouver de nouveaux interacteurs des éléments clés de la machinerie. Ainsi, nos recherches permettront de dévoiler une approche *in vivo* pour identifier les cascades d'interaction menant à la formation de complexes multiprotéiques de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines.

Ainsi, au cours des trois dernières années, je me suis penché sur l'hypothèse voulant que des constituants centraux du sélénosome soient à la base de la formation du complexe menant à la biosynthèse et l'incorporation de la sélénocystéine *in vivo*. Notre hypothèse prend en considération que la hiérarchie d'assemblage des constituants du sélénosome est au cœur du mécanisme de régulation de la biosynthèse et l'incorporation de la Sec dans la biosynthèse des sélénoprotéines. La voie moléculaire de la traduction est aussi constituée de grands complexes supramoléculaires similaires pour coordonner l'insertion des ARNt avec la traduction dans ribosome. Cependant, la biosynthèse et l'insertion de la Sec nécessitent une régulation spatiale et temporelle précise plus complexe. Les résultats de la présente étude remettent en doute le modèle proposé par (Bellinger et al., 2009) (Figure 2) en suggérant de nouvelles interactions entre des composantes du sélénosome ainsi qu'en démontrant une variabilité dans l'intensité des interactions dépendamment de l'orientation de la fusion au gène d'intérêt du fragment luciférase.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HEK293T BCM3 et NIH 3T3 ont été obtenues de Dr Michel Bouvier, inventaire du Département de biochimie et médecine moléculaire et fourni par Louise Cournoyer. Les NIH 3T3 et les HEK293T ont été maintenues en culture dans le milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*) high glucose de Wisent cat. 319-015 (Saint-Bruno, QC) contenant 10 % de sérum bovin foetal à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Anticorps et plasmides

L'anticorps anti-hRLuc-F[2] *Renilla Luciferase*, clone 5B11.2 (Cat. MAB4400) et l'anticorps anti-hRLuc-F[1] Mouse Anti-*Renilla Luciferase* (Cat. MAB4410) ont été achetés de Millipore (Billerica, MA). L'anticorps pour le contrôle d'expression protéique totale dans les cellules, anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5316) provient de Sigma (Mississauga, ON), gracieuseté du Laboratoire de Dr James Omichinski du Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal.

Les plasmides pDNR-Dual-NSEP1 (HscD00001799), pDNR-Dual-RPL30 (HscD00001761), pANT7-cGST-eEFSec (HscD00077644), pANT7-cGST-SEPHS1 (HscD00077688), pDNR-Dual-SEPHS2 (HscD00021572), pDONR201-SBP2 (HscD00081427) ont été obtenus de DNASU (Tempe, AZ). Le plasmide pOTB7-SPS2mRNA (HscD00322296) provient de Plasmid Harvard Database (Cambridge, MA). Les plasmides pTT5-SECp43 et pANT7-SepSecS ont été obtenus de Dr Dieter Söll (Yale University). Les plasmides PKACat-F[1], PKAREg-F[1], PKACat-F[2], IL21 $\beta$ R1, IL23 et pcDNA3.1-Empty Vector sont une gracieuseté de Dr Stephen Michnick (Département de Biochimie, Université de Montréal).

### 2.3. Clonage et mutagenèse dirigée

Tous les oligonucléotides (Tableau III) ont été commandés d'Invitrogen (Carlsbad, CA). Le design expérimental a été réalisé au moyen du logiciel Lasergene 9 SeqBuilder. Les alignements de séquences ont été réalisés grâce au logiciel Lasergene 9 MegAlign avec la méthode ClustalW Protocol. La validité des vecteurs a été vérifiée par séquençage à l'Institut en Immunologie et Cancérologie (IRIC, Montréal) et par digestion diagnostique, puis par électrophorèse sur gel agarose 1 % avec bromure éthidium.

Les plasmides pcDNA3.1-SPS2.Se60C.hRLuc-F[1], pcDNA3.1-SPS2.Se60C.hRLuc-F[2], pcDNA3.1-eEFSec.hRLuc-F[1] et pcDNA3.1-eEFSec.hRLuc-F[2] ont été obtenus par mutagenèse dirigée en utilisant le kit et le protocole du QuikChange II site-directed mutagenesis de Stratagene (La Jolla, CA). 10 ng de plasmide ont été mis en présence de la polymérase KOD Ultra pour une durée de 30 cycles (30 secondes à 95 °C, 15 secondes à 60 °C et 120 secondes à 68 °C). Puis, une digestion à la DPN1 a été réalisée durant 1 h à 37 °C avec le but d'éliminer l'ADN méthylé, ayant servi de *backbone* pour la réaction de mutagenèse et non issue de l'amplification par PCR. Les produits de la mutagenèse dirigée (10 µl et 40 µl) ont été transformés dans les bactéries chimiquement compétentes XL1-blue par choc thermique.

**Tableau II : Liste des plasmides et techniques de clonage.**

Plasmide	Description
SECp43-F[1] / SECp43-F[2]	Gène amplifié avec amorces SECp43 Sens et SECp43 ASens de pTT5-SECp43 cloné NotI/ClaI dans pcDNA3.1-PKACat-F[1] ou pcDNA3.1-PKACat-F[2]
F[1]-SECp43 / F[2]-SECp43	Gène amplifié avec amorces hRLuc-Linker Sens et SECp43-linker ASens de pTT5-SECp43 cloné NotI/XbaI, dans pcDNA3.1
SepSecS-F[1] / SepSecS-F[2]	Gène amplifié avec amorces SepSecS NotI Sens et SepSecS ClaI ASens à partir de pANT7-SepSecS cloné dans PKACat-F[1] ou PKACat-F[2]
F[1]-SepSecS / F[2]-SepSecS	Gène amplifié avec amorces SepSecS BspEI Sens et SepSecS XbaI ASens à partir de SepSecS-F[1] cloné dans F[1]-SECp43 ou F[2]-SECp43
SPS1-F[1] / SPS1-F[2]	Gène amplifié avec amorces SPS1 NotI FW et SPS1 ClaI RV à partir de pANT7-cGST-SEPHS1 cloné dans PKACat-F[1] ou PKACat-F[2]
F[1]-SPS1 / F[2]-SPS1	Gène amplifié avec amorces SPS1 BspEI FW et SPS1 XbaI RV à partir de pANT7-cGST-SEPHS1 cloné dans F[1]-SECp43 ou F[2]-SECp43
SPS2-F[1] / SPS2-F[2]	Gène amplifié avec amorces SPS2 NotI FW et SPS2 ClaI RV à partir de pOTB7-SPS2mRNA cloné dans PKACat-F[1] ou PKACat-F[2]

F[1]-SPS2 / F[1]-SPS2	Gène amplifié avec amorces SPS2 BspEI FW et SPS2 XbaI RV à partir de pcDNA3.1-SPS2-F[1] cloné dans F[1]-SECp43 ou F[2]-SECp43
RPL30-F[1] / RPL30-F[2]	Gène amplifié avec amorces RPL30 NotI FW et RPL30 ClaI RV à partir de pDNR-Dual-RPL30 cloné dans PKACat-F[1] ou PKACat-F[2]
F[1]-RPL30 / F[2]-RPL30	Gène amplifié avec amorces RPL30 BspEI FW et RPL30 XbaI RV à partir de pDNR-Dual-RPL30 cloné dans F[1]-SECp43 ou F[2]-SECp43
SBP2-F[1] / SBP2-F[2]	Gène amplifié avec amorces SBP2 NotI FW et SBP2 ClaI RV à partir de pDONR201-SBP2 cloné dans PKACat-F[1] ou PKACat-F[2]
F[1]-SBP2 / F[2]-SBP2	Gène amplifié avec amorces SBP2 BspEI FW et SBP2 XbaI RV à partir de pDONR201-SBP2 cloné dans F[1]-SECp43 ou F[2]-SECp43
eEFSec-F[1] / eEFSec-F[2]	Gène amplifié avec amorces eEFSec BamHI FW et eEFSec NotI Fusion RV à partir de pANT7-cGST-eEFSec cloné dans EV-hRLuc-F[1]-10aa et EV-hRLuc-F[2]-10aa
SPS2 Se60C-F[1] / SPS2 Se60C-F[2]	Mutagenèse sur SPS2-F[1] et SPS2-F[2] avec amorces SPS2 Se60C FW et SPS2 Se60C RV
SECp43	Construction dans pTT5 déjà présente au laboratoire, gracieuseté de D. Söll.
SepSecS	Gène amplifié avec amorces SepSecS NotI FW et SepSecS XbaI RV à partir de pANT7-SepSecS cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
RPL30	Gène amplifié avec amorces RPL30 NotI FW et RPL30 XbaI RV à partir de pDNR-Dual-RPL30 cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
SBP2	Gène amplifié avec amorces SBP2 NotI FW et SBP2 XbaI RV à partir de pDONR201-SBP2 cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
eEFSec	Gène amplifié avec amorces eEFSec BamHI FW et RPL30 NotI RV à partir de pANT7-cGST-eEFSec cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
SPS1	Gène amplifié avec amorces SPS1 NotI Sens et SPS1 XbaI ASens à partir de pANT7-cGST-SEPHS1 cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
SPS2 Se60C	Gène amplifié avec amorces SPS2 Sens et SPS2-B ASens à partir de SPS2 Se60C-F[1] cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
hRLuc-F[1]	Gène amplifié avec amorces hRLuc-F[1] NotI FW et hRLuc-F[1] XbaI RV à partir de PKACat-hRLuc-F[1] cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector
hRLuc-F[2]	Gène amplifié avec amorces hRLuc-F[2] NotI FW et hRLuc-F[2] XbaI RV à partir de PKACat-hRLuc-F[2] cloné dans pcDNA3.1 – Empty Vector

**Tableau III : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la production des plasmides de l'essai PCA ainsi que pour la mutagenèse dirigée.**

Nom de l'amorce	Séquence de l'oligonucléotide
SepSecS NotI Sens	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGAACCGCGAGAGCTTCGC
SepSecS ClaI ASens	CCATCGATTGAAGAAGCATCCTGGTATGTGTCAA
SepSecS BspEI N-Term Sens	CCTCCGAAACCGCGAGAGCTTCGCGG
SepSecS XbaI N-Term ASens	CTAGTCTAGATTATGAAGAAGCATCCTGGTATGTGTCAA

SepSecS Interne FW	TAAATCCATGATCACTGCAG
SepSecS Interne RV	CGATGCTTTTTACCAGACAG
SECp43 Sens	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGGCGGCCAGCCTGTGGAT
SECp43 ASens	CCATCGATCATCATGGCAGGGATCTCTGAAGACA
SECp43-Linker ASens	ACAGGCTGGCCGCCATTCCGGAGGACCCACCACCTCCAGAGCCAC
hRLuc-Linker Sens	GAGCTGCTGAACCTTATCGATGGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTG
hRLuc-F[1]-NotI Sens	AAGGAAAAAAGCGGCCGCACCATGGCTTCCAAGGTGTACG
SECp43-XbaI ASens	CTAGTCTAGATTACATCATGGCAGGGATCTC
hRLuc-F[2] N-Term Sens	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGCCAAAGAAAATCATCTTTG
hRLuc-F[2] N-Term ASens	CCATCGATCTGCTCGTTCTTCAGCACG
NotI-SBP2 FW	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGGTTAGAGTCCTCAGAAGC
ClaI-SBP2 RV	CCATCGATTAAATTCAAATTCATCATTTGAG
BspEI-SBP2 FW	CCTCCGGAGTTAGAGTCCTCAGAAGCATGT
XbaI-SBP2 RV	CTAGTCTAGATCAATTCAAATTCATCATTTGAG
SPS1-NotI FW	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGTCTACGCGGGAGTCCTTTAAC
SPS1-ClaI RV	CCATCGATCAAAGAGGTGGCCCCGGG
SPS1-BspEI FW	CCTCCGGATCTACGCGGGAGTCCTTTAACC
SPS1-XbaI RV	CTAGTCTAGATTACAAAGAGGTGGCCCCG
SPS2 Sens	ATGGCGGAAGCCTCGGCGACGGG
SPS2-B ASens	TCACGAGCTAGGCTCAGAGGAGGCATTTGAACTGTCAG
SPS2 mRNA Sens	GCCGTGGGTCTGACGGCTTGAGTAG
SPS2 mRNA ASens	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTTTTTCAACAAGGTTTCT
SPS2-NotI FW	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGGCGGAAGCCTCGGCG
SPS2-ClaI RV	CCATCGATCGAGCTAGGCTCAGAGGAGGCAT
SPS2-BspEI FW	CCTCCGGAGCGGAAGCCTCGGCGACG
SPS2-XbaI RV	CTAGTCTAGACTACGAGCTAGGCTCAGAGGAGGCATTTG
SPS2 Se60C FW	GGCATGAAGGGCTG <u>T</u> GGCTGCAAGGTCCCGCAG
SPS2 Se60C RV	GCGGGACCTTGCAGCC <u>A</u> CAGCCCTTCATGCCGGAG
RPL30-NotI FW	ATAAGAATGCGGCCGCACCATGGTGGCCGCAAAGAAGA
RPL30-ClaI RV	CCATCGATCTTTTCACCAGTCTGTTCTGGCA
RPL30-BspEI FW	CCTCCGGAGTGGCCGCAAAGAAGACG
RPL30-XbaI RV	CTAGTCTAGATTACTTTTCACCAGTCTGTTCTGG
EEFSec-BamHI FW	CGGGATCCACCATGGCATCTGCTCCACCG
EEFSec-NotI RV	TTTTCCTTTTTCGGCCGCTCAGGGAGACTGAACCATGCG
EEFSec-NotI Fusion RV	TTTTGCGGCCCGCCGGGAGACTGAACCATGCGCTTG

EEFSec-XhoI FW	GGATCCCTCGAGGCATCCTGCTCCACCG
EEFSec-XbaI RV	GACTCGACTCTAGACTCAGGGAGACTGAACCATGCG
EEFSec-10 Mut FW	GGTTCAGTCTCCCC <u>G</u> GCGGCCGCGGTGGC
EEFSec-10 Mut RV	GCCACCGCGGCCG <u>C</u> GGGAGACTGAACC
EEFSec-20 Mut FW	GGTTCAGTCTCCCC <u>G</u> GCGGCCGCGGAGGGG
EEFSec-20 Mut RV	CCCCTCCGCGGCCG <u>C</u> GGGAGACTGAACC
hRLuc-F[1]-NotI FW	AGGTGGCGGCCGCACCATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCC
hRLuc-F[1]-XbaI RV	CCCTCTAGATTAAAGGTTTCAGCAGCTCGAACCAAG
hRLuc-F[2]-NotI FW	GGTGGCGGCCGCACCATGCCAAAGAAAATCATCTTTGTGG
hRLuc-F[2]-XbaI RV	CCTCTAGATTACTGCTCGTTCTTCAGCACGC
hRLuc-F[1]-BamHI FW	GTGGGGATCCCACCATGGCTTCCAAGGTGTACGACCC
hRLuc-F[1]-NotI RV	GGGCCC GCGGCCGCAAAGGTTTCAGCAGCTCGAACCC
hRLuc-F[2]-BamHI FW	GGTGGATCCACCATGCCAAAGAAAATCATCTTTGTGGGCC
hRLuc-F[2]-NotI RV	GCCCCGCGGCCGCACTGCTCGTTCTTCAGC
BGH Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Le site des mutations est souligné s'il y a lieu.

## 2.4. Immunobuvardage de Type Western

Les cellules HEK29T et NIH3T3 transfectées dans des plaques 6 puits ont été recueillis et lavés dans 250 µL de PBS. Les extraits cellulaires ont ensuite été lysés dans 250 – 300 µL de tampon Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100) complémenté d'une tablette Roche cOmplete-Mini EDTA Free, Cat. 04693159001 (Mississauga, ON) dilué dans 7-10 mL de tampon. Le contenu de protéines de tous les extraits cellulaires a été quantifié par la méthode de Bradford dans un volume final de 1 mL. Ensuite, 40 à 60 µg de protéines ont été séparés sur gel de polyacrylamide 7,5 % ou 10 % SDS-PAGE pendant 4 h à 45 mA ou 16 h à 5 mA. Suite à la migration, ces protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant deux heures à 4 °C dans un tampon de transfert avec méthanol (14,4 g/L de glycine, 3,0 g/L de TRIS et 20 % méthanol). Ensuite, la membrane a été bloquée pendant une heure dans une solution de TBS 0,1 % Tween 20 contenant 5 % de poudre de lait, puis incubés avec un anticorps primaire. La membrane a ensuite été lavée cinq fois 5 minutes dans du TBS 1 % Tween 20, puis incubée deux heures avec l'anticorps secondaire, anti-mouse ou anti-rabbit dépendamment de l'anticorps primaire.

La membrane a ensuite été lavée cinq fois pour 5 minutes dans du TBS 1 % Tween 20, puis la présence des protéines d'intérêt a été révélée par l'utilisation de Bio-Rad ECL selon les spécifications du fabricant (Hercules, CA).

## **2.5. Transfection**

Les cellules HEK293T et les NIH3T3 ont été transfectées par phosphate de calcium selon le protocole de (Chen, C. et al., 1987) ou avec le réactif Fugene HD de Promega (San Luis Obispo, CA) cat. E2312 entre 24 et 48 heures de croissance. Certaines modifications ont été apportées au protocole de transfection par FuGENE contrairement au guide fourni par Promega (San Luis Obispo, CA). Selon le protocole, la confluence des cellules devait être de 50 - 80 % de l'espace du pétri. Une heure avant la transfection transitoire, le milieu des cellules a été changé pour du milieu sans sérum. Le ratio FuGENE ( $\mu\text{l}$ ) : ADN ( $\mu\text{g}$ ) pour les cellules HEK293T a été de 3:1 et de 6:1 dans le cas des NIH3T3. Les concentrations stock d'ADN ont été diluées à 0,250  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ensuite, 100  $\mu\text{l}$  de milieu sans sérum a été ajouté dans un eppendorf, puis complétées par le volume en  $\mu\text{l}$  de FuGENE dépendamment du ratio utilisé. 5 minutes après, 1  $\mu\text{g}$  ou 2  $\mu\text{g}$  d'ADN a été ajouté dans l'eppendorf de manière stérile et incubé 15 minutes à 22 °C. Ensuite, le contenu FuGENE:ADN totalisant 100  $\mu\text{l}$  ou 250  $\mu\text{l}$  a été ajouté aux cellules puis incubé 24-48 h à 37 °C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. 3-8 h post-transfection, 10 % de sérum a été ajouté aux cellules. La transfection transitoire par phosphate de calcium a été effectuée en utilisant du CaCl<sub>2</sub> (0,25 M) et de l'HeBS 2X (350 mM NaCl, 62,5 mM HEPES, 1,86 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05).

## **2.6. Protein-Fragment Complementation Assay (PCA)**

Le protocole a été adapté de Stefan et al. (2007). 250 000 cellules HEK293T ou 135 000 cellules NIH 3T3 ont été déposées dans des puits à 35 mm de diamètre afin d'obtenir une confluence de 40 %. Dans le cas d'un essai de plaque à 96 puits, 25 000 cellules HEK293T ou 11 000 cellules NIH 3T3 ont été déposées dans des puits à 10 mm de diamètre afin d'obtenir une confluence de 40 %. Ces cellules ont ensuite été transfectées 12 - 24 heures plus tard en utilisant l'agent de transfection Fugene HD de Promega ou le

calcium-phosphate. Dans tous les cas, le contrôle positif a été réalisé avec PKAReg-F[1] et PKACat-F[2] et le contrôle négatif avec PKAReg-F[1] et SPS1-F[2]. Par la suite, 24 à 48 heures post-transfection, le milieu des cellules a été retiré, et les puits ont été rincé avec 2 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1 mM) + 1 mM glucose. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 mL de PBS + 1 mM glucose et transférées dans un eppendorf, puis centrifugées pendant 5 minutes à 200 g. Le milieu PBS a été retiré, puis les cellules ont été resuspendues dans 200-500 µL de PBS stérile. 20 µL de chaque expérience a été dosé par Bradford pour standardiser la quantité de protéines comme équivalente au nombre de cellules. Les volumes ont été ajustés pour avoir 30 µg de protéines par 100 µL de chaque condition, ce qui équivaut à 100 000 cellules par 100 µl. 100 µl de chaque expérience a ensuite été chargé dans un puits d'une plaque Opti-Plate 96 puits de Perkin-Elmer blanche en triplicata ou quadruplicata, puis a été introduit dans l'appareil Perkin Elmer EnVision Multiplate Reader. Une solution stock de 1mg ou 500 µg de coelenterazine H (CoelH) Nano-Light Technologies (Cat. #301) (Pinetop, AZ) a été dilué dans de l'éthanol 100 % pour obtenir une concentration finale de 2mM de CoelH. Le programme de lecture de l'absorbance de la luminescence du EnVision a été programmé pour créer une vibration de 1 minute sur la plaque, puis une injection de 100 µl du réactif CoelH 100 µM (250 µl de CoelH 2 mM diluée dans 4,75 mL de PBS + 1 mM glucose) a été effectué dans chaque puits. Le réactif a été incubé durant une minute, puis la lecture de chaque puits a été prise aux longueurs d'onde de 300 à 700 nm. L'analyse des résultats a été effectuée par le logiciel EnVision en plaçant le maximum du signal sur l'activité luciférase du contrôle positif et le minimum sur l'activité luciférase du contrôle négatif.

## 2.7. Analyse Statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel GraphPad Prism 5 pour PC de GraphPad Software (San Diego, CA). Les données statistiques significatives ont été validées par une analyse de *Student* à une valeur de P sous 0,05 (N = le nombre d'expériences indépendantes effectuées). La normalisation des résultats en fraction correspondante a été effectuée en prenant le contrôle positif comme limite de 100 % et le contrôle négatif comme 0 % pour chaque expérience.

## **Chapitre 3 : Résultats**

### **3.1. Objectif 1 – Établissement de l'essai pour étudier les interactions protéines-protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines**

#### **3.1.1. Mise en place d'un protocole pour adapter le système PCA pour plaque à 96 puits**

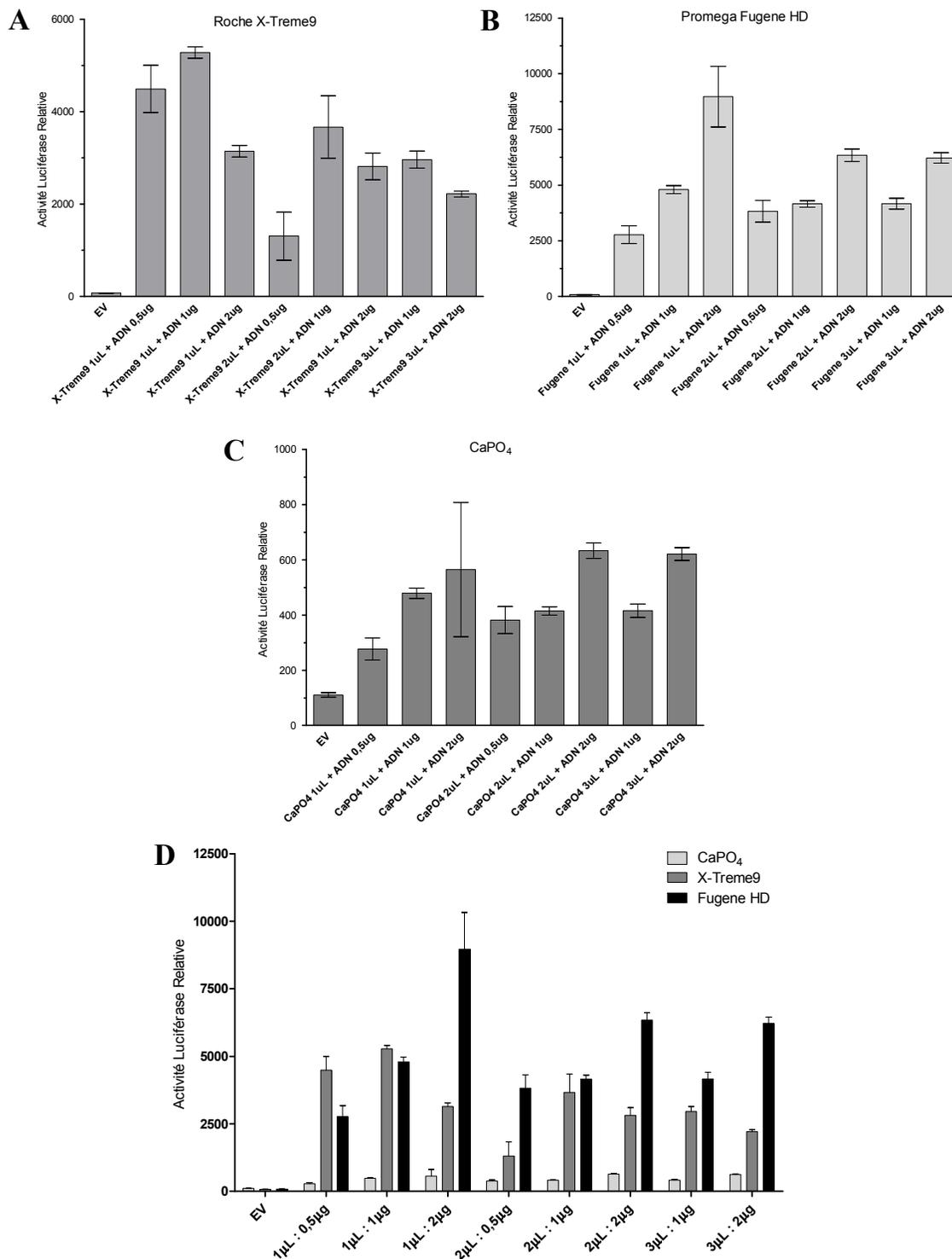
Le premier objectif de ce projet consistait à identifier une technique en mesure d'étudier les interactions protéine-protéines du sélénosome de manière *in vivo* et semi-quantitative. Aucune étude *in vivo* avec une approche protéomique n'avait été réalisée à ce jour sur ce complexe. Ainsi, la technique de l'essai PCA représentait le meilleur choix pour ce projet. Au départ, une optimisation a été nécessaire afin de l'adapter au laboratoire du Dr Baron. Ainsi, uniquement les résultats les plus pertinents de ce projet, pouvant par exemple expliquer la variabilité des résultats ainsi que ceux contribuant à l'efficacité de la technique, sont présentés.

Le type de cellule, le milieu de culture, la technique de culture, le type de coelenterazine H, le temps alloué pour l'expression des gènes transfectés, le nombre de cellules et surtout le type d'appareil utilisé et les filtres d'absorption de la luminescence sont des facteurs pouvant contribuer à l'efficacité et à la sensibilité de la technique de l'essai PCA. Chacune de ces variables a été analysée et testée selon différents protocoles développés en collaboration avec Dre Durga Silvanesan du laboratoire de Dr Stephen Michnick. La comparaison de plusieurs méthodes pour analyser le signal de l'essai PCA a révélé des avantages et inconvénients pour l'ensemble des méthodes. Les approches par lyse cellulaire, par analyse dans des plaques à 96 puits, dans des puits à 35 mm de diamètre avec BSA et 1 mM glucose ou par dosage des cellules via Bradford, sont les principales méthodes permises des mesures efficaces. Cependant, uniquement les méthodes d'analyse dans les plaques à 96 puits et dans les puits à 35 mm de diamètre sont décrites dans le cadre de ce mémoire. Ce sont ces deux approches qui ont été jugées

les plus reproductibles tirant avantage de la sensibilité de l'appareil Perkin Elmer EnVision.

De manière plus importante, la première analyse consistait à déterminer la technique permettant d'obtenir la meilleure efficacité de transfection de manière transitoire. Le système de contrôle utilisé afin d'optimiser l'efficacité de transfection était basé sur l'utilisation de vecteurs codant pour les protéines PKAReg et PKACat. Ces protéines ont déjà été démontrées comme étant des interacteurs importants (Pierce et al., 2002). Les deux sous-unités ont été largement caractérisées et étudiées pour leur interaction basale dans la cellule, qui est inhibée par la présence d'AMPc. L'utilisation de ce contrôle dans le système de la technique PCA-hRLuc a aussi été largement caractérisée par Stefan et al. (2007), permettant de considérer l'interaction de ces deux sous-unités comme un contrôle positif dans le cadre de l'ensemble de ce projet (Smith et al., 2006). Le contrôle négatif utilisé a été la construction du gène de SepSecS-F[1] exprimé avec le fragment complémentaire fusionné à PKACat, soit le vecteur PKACat-F[2], prouvant ainsi que l'interaction n'est pas causée par une affinité entre les domaines de la luciférase. À partir de ces vecteurs, nous avons considéré différents ratios optimaux entre ADN et différents réactifs de transfection (FuGENE, X-Treme9 et phosphate de calcium) donnant la meilleure efficacité pour l'expression des plasmides. Pour chaque expérience une condition comprenant un *empty-vector* (EV) a été utilisée afin de tester l'effet du réactif de transfection (FuGENE, X-Treme9 ou phosphate de calcium) ainsi que de la présence d'ADN sur le signal de luminescence sans présence de luciférase dans la cellule. Le ratio de 1  $\mu$ L de réactif Fugene HD de Promega pour 2  $\mu$ g d'ADN pour 250 000 cellules a été déterminé comme le ratio avec la meilleure efficacité de la transfection transitoire (Figure 10). En effet, cette combinaison donne une luminescence issue de l'activité luciférase relative qui est approximativement 3 fois plus élevée que pour le X-Treme9 et de 10 fois plus élevée que pour le phosphate de calcium.

Chaque expérience a été suivie avec une analyse au bleu de trypan et avec un comptage des cellules vivantes à l'hémacytomètre afin de normaliser en fonction du taux de survie cellulaire. Les données statistiques significatives ont été validées par une analyse de *Student*.

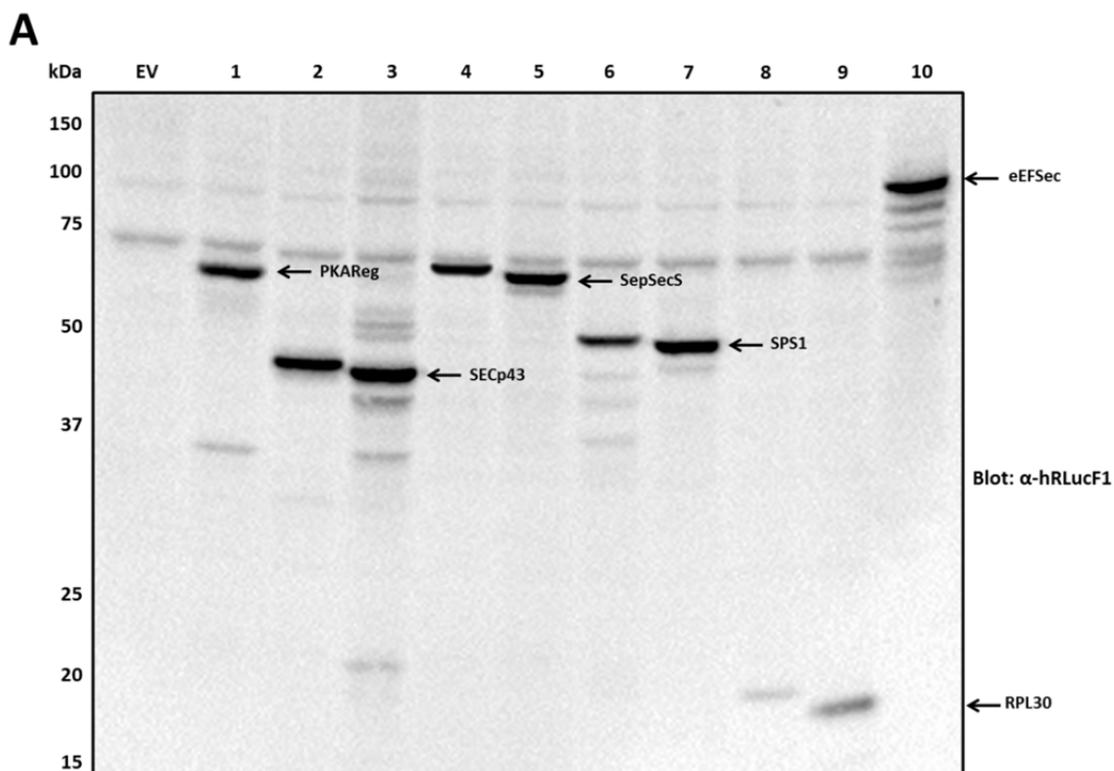


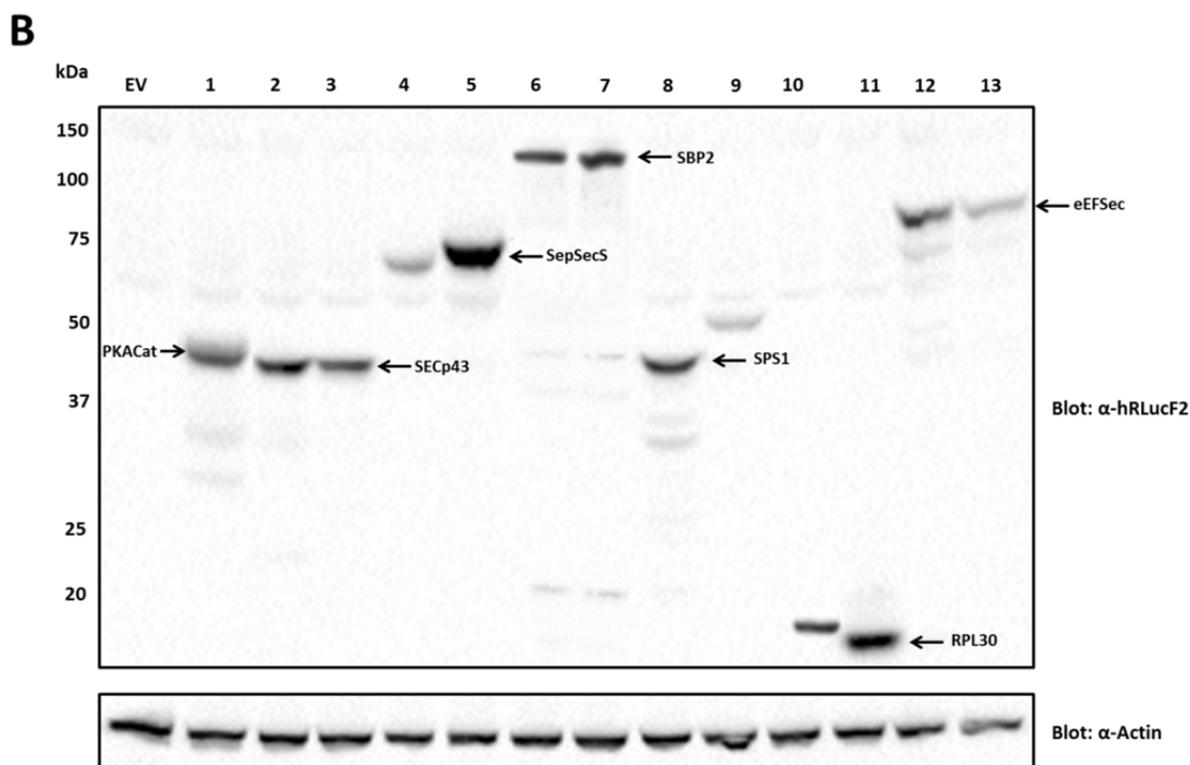
**Figure 10. Détermination de l'efficacité de la transfection transitoire selon la technique, le réactif et la quantité d'ADN (Réactif:ADN) pour la technique de PCA sur plaques à 96 puits avec des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T ont été mises en culture puis cotransfectées à différents ratios d'ADN avec les réactifs (A) Roche X-Treme9, (B) Promega Fugene HD ou (C) CaPO<sub>4</sub> en utilisant PKAReg-F[1] et PKACat-F[2] à quantité et concentration égale selon la quantité totale d'ADN. Le graphique (D) est la comparaison des résultats des expériences (A) (B) et (C). La condition identifiée comme EV indique la transfection du vecteur vide pcDNA3.1 codant pour aucun gène d'intérêt. Ces résultats sont représentatifs des résultats obtenus de 3 expériences réalisées indépendamment.

### 3.1.2. Clonage et expression de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines dans les cellules HEK293T

L'expression des gènes des composantes du système de biosynthèse des sélénoprotéines fusionnées au gène de la luciférase a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (Figure 11). Nous avons ainsi analysé les différentes protéines produites après transfection de manière transitoire des constructions faites à partir de hRLuc-F[1] et hRLuc-F[2]. Il nous a donc été possible d'attester de la qualité des 28 constructions des gènes de nos protéines d'intérêts fusionnés à la luciférase qui sont décrites au Tableau II.





**Figure 11. Détection de l'expression des protéines de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines (A) exprimées en fusion avec hRLuc-F[1] et (B) hRLuc-F[2] par immunobuvardage de type Western.**

Des cellules HEK293T ont été transfectées en présence de Fugene HD avec 1 µg d'ADN correspondant aux constructions (A) EV- pcDNA3.1, 1- PKAReg-F[1], 2- SECp43-F[1], 3- F[1]-SECp43, 4- SepSecS-F[1], 5- F[1]-SepSecS, 6- SPS1-F[1], 7- F[1]-SPS1, 8- RPL30-F[1], 9- F[1]-RPL30, 10- eEFSec-F[1] et (B) 1- PKACat-F[2], 2- SECp43-F[2], 3- F[2]-SECp43, 4- SepSecS-F[2], 5- F[2]-SepSecS, 6- SBP2-F[2], 7- F[2]-SBP2, 8- SPS1-F[2], 9- F[2]-SPS1, 10- RPL30-F[2], 11- F[2]-RPL30, 12- eEFSec-F[2], 13- F[2]-eEFSec. Les immunobuvardages ont été réalisés avec l'anticorps anti-hRLuc-F[1] (MAB4410) (A) et avec l'anticorps anti-hRLuc-F[2] (MAB4400) (B). 36 h post-transfection les cellules ont été lysées puis séparées par SDS-PAGE 10 %. Le contrôle est effectué avec un anticorps anti-actine.

Tous les vecteurs transfectés expriment les protéines recombinantes correspondantes aux poids moléculaires attendus prenant en compte l'ajout de 13 à 18 kDa selon le fragment de luciférase hRLuc-F[1] ou hRLuc-F[2] fusionné. Le vecteur F[2]-SPS1 semble exprimer une protéine d'un poids moléculaire différent du vecteur équivalent fusionné en C-terminal (Figure 11B, #8 vs #9). Ceci est attribué au fait qu'un vecteur contenant une région de clonage (*multi cloning site* ou MCS) différente des autres et un *linker* de 20 acides aminés au lieu de 10, a été utilisé pour ce clonage pour

des raisons de compatibilité avec les enzymes de restriction. Uniquement les vecteurs SBP2-F[1] et F[1]-SBP2 n'ont pas pu être analysés dans le cadre de cette expérience puisque leur clonage n'a pu être réalisé qu'ultérieurement.

### **3.1.3. Application du système PCA-hRLuc à l'étude des interactions *in vivo* des protéines du sélénosome**

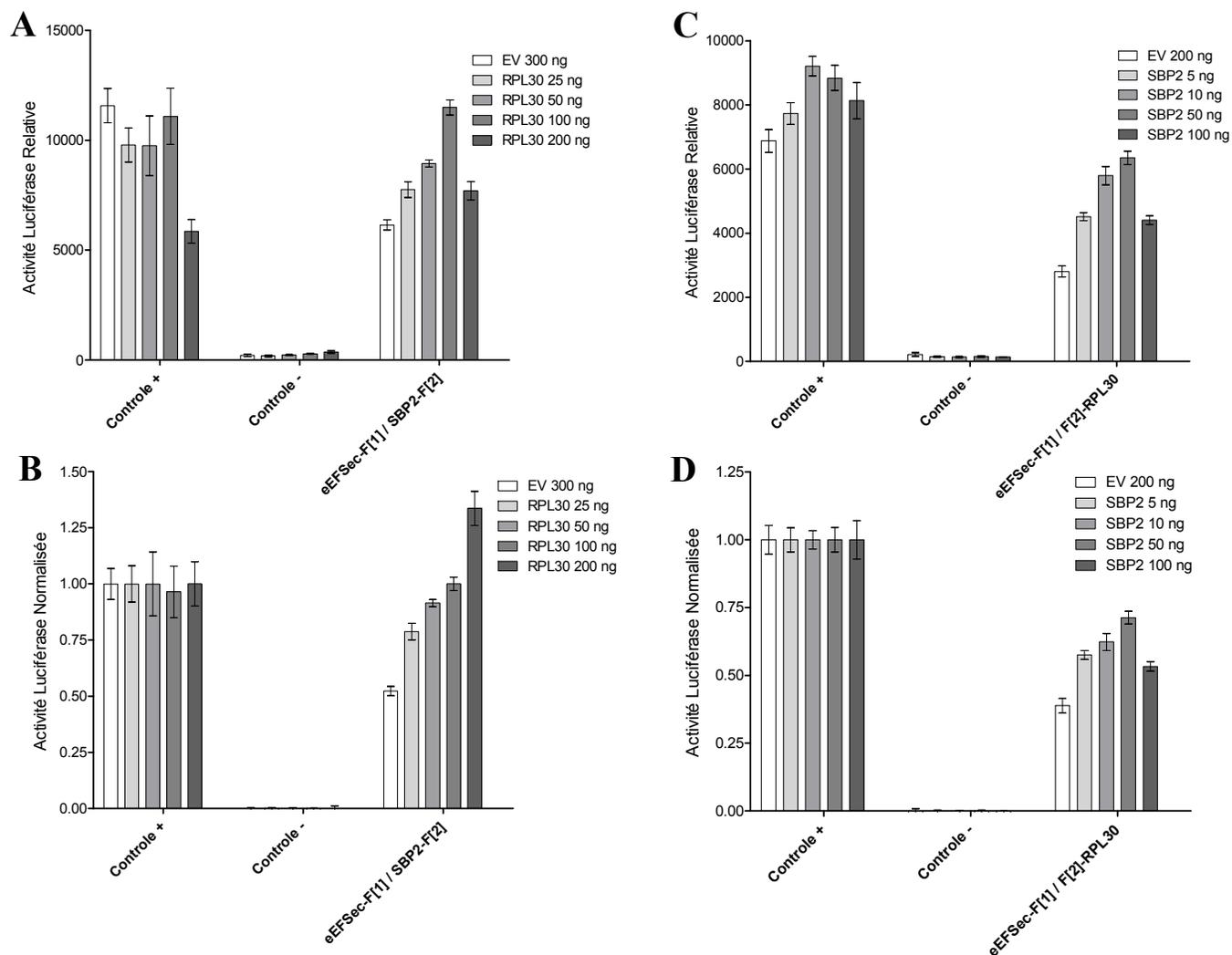
Ensuite, nous avons utilisé l'application de l'essai PCA pour l'analyse des interactions avec les vecteurs codant les protéines de fusion avec les fragments hRLuc. Tout d'abord, les cellules ont été transfectées avec des plasmides en concentration égale. Afin de conserver une efficacité de transfection comparable entre les conditions, la même quantité d'ADN a été transfectée dans chaque puits en utilisant le vecteur vide pcDNA3.1 pour compléter. Par la suite, pour chaque condition, la même quantité de cellules est analysée pour chaque expérience permettant une comparaison des résultats et une analyse croisée au moyen d'un test one-way ANOVA suivi d'un test Bonferroni.

Dans un premier temps, nous avons testé les interactions entre les trois constituants principaux de la machinerie associée au SecIS (eEFSec, RPL30 et SBP2) afin de voir si les résultats obtenus concordent non seulement avec ceux dans la littérature, mais s'ils amenaient aussi de nouvelles informations. Les cellules HEK293T ont été cotransfectées avec soit la combinaison de eEFSec-F[1] et SBP2-F[2] avec RPL30 en dose croissante (Figure 12 A et B) ou avec eEFSec-F[1] et F[2]-RPL30 avec SBP2 aussi en dose croissante (Figure 12 C et D). L'objectif de cette expérience était de mesurer les interactions SBP2, RPL30 et eEFSec qui sont connues pour lier le SecIS dans un système naturel. L'utilisation de dose croissante vise à démontrer un effet synergique de RPL30 et SBP2 sur les interactions ciblées, mais non une cinétique. Le contrôle positif était l'interaction entre PKAReg-F[1] et PKACat-F[2] et le contrôle négatif est eEFSec-F[1] avec PKACat-F[2]. La normalisation des résultats a été effectuée en prenant le contrôle positif comme limite de 100 % et le contrôle négatif comme 0 % pour chaque expérience.

Les résultats montrent qu'il y a une interaction entre eEFSec et SBP2, qui est stimulée de manière synergique par la présence de RPL30 en concentration croissante

jusqu'à la dose de 200 ng du plasmide. De plus, on remarque que SBP2 peut aussi stimuler l'interaction entre eEFSec et RPL30 lorsqu'exprimé en concentration croissante (Figure 12 C et D).

Ainsi les résultats présentés à la Figure 12 permettent d'affirmer que le système de la technique PCA-hRLuc tel qu'appliqué dans le cadre de cette recherche permet l'étude des interactions *in vivo* entre les composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines, comme jamais il n'a été réalisé auparavant pour l'étude de ce complexe. L'essai a une sensibilité suffisante pour étudier la variation dans les interactions protéine-protéine entre les constituants. En effet, les données de la littérature suggèrent, par des analyses de filtration sur gel et de chromatographie d'affinité d'ARN, une affinité plus grande de RPL30 pour le SecIS et l'interaction avec eEFSec lorsque SBP2 y est déjà lié (Chavatte et al., 2005; Gonzalez-Flores et al., 2012; Bifano et al., 2013). De plus, l'interaction n'est pas stimulée par la fusion aux fragments luciférase puisqu'il a déjà été prouvé que les deux fragments de la luciférase n'affectent pas les complexes protéiques puisque la cinétique de dissociation du complexe de protéine nécessiterait une énergie libre plus grande que pour les fragments de la luciférase. L'enzyme hRLuc déroule sa structure quaternaire plus rapidement qu'une interaction entre deux protéines qui se dissocient (Michnick et al., 2007).



**Figure 12. Application de la technique de l'essai PCA par hRLuc pour l'étude du comportement des constituants de liaison au SecIS de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines *in vivo*. Effet de la surexpression de (A) RPL30 et de (C) SBP2 sur l'interaction d'eEFSec avec SBP2 ou RPL30.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec 750 ng d'ADN de PKAReg-F[1] / PKACat-F[2], pour le contrôle positif ainsi que PKAReg-F[1]/SBP2-F[2], pour le contrôle négatif (A-D) pour un total de 2 µg d'ADN par condition. eEFSec-F[1] et SBP2-F[2] ont été transfectés avec un ajout croissant de RPL30 (A et B). eEFSec-F[1] et F[2]-RPL30 ont été transfectés avec un ajout croissant de SBP2 (C et D). Le vecteur vide pcDNA3.1 est utilisé pour normaliser la quantité d'ADN entre les conditions. Ces résultats représentent deux expériences indépendantes.

### 3.2. Objectif 2 – Analyses des interactions *in vivo* des constituants du sélénosome

L'objectif du second objectif de ce projet était de comparer les interactions entre elles afin de (i) vérifier les interactions déjà démontrées dans la littérature, (ii) identifier de nouvelles interactions potentielles, et finalement (iii) comprendre la hiérarchie d'assemblage du sélénosome. Dans le but de mieux comprendre les interactions dans le complexe supramoléculaire de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines, nous avons analysé les interactions de toutes les combinaisons possibles des 7 candidats sélectionnés (SECp43, SepSecS, RPL30, SPS1, SPS2, eEFSec et SBP2). Tel que mentionné précédemment, les gènes des protéines d'intérêts ont été clonés pour créer des protéines de fusion avec des fragments de la protéine luciférase. Ainsi, 4 constructions ont été créées pour chaque gène exprimant la protéine dans toutes les orientations possibles de fusion.

Dans un premier temps, nous avons analysé les interactions avec une cotransfection de deux plasmides dans les cellules afin d'obtenir une matrice d'interactions (Figure 13). Par la suite, afin de vérifier s'il y a un effet des protéines endogènes, une comparaison de la technique PCA dans les cellules HEK293T avec les cellules NIH 3T3 a été effectuée (Figure 14). Les cellules NIH3T3 sont des cellules de sarcome fibroblastiques d'embryon de souris, contrairement aux HEK293T qui sont des cellules d'embryons de reins humains. Ainsi, nous avons pu tester l'expression de protéines d'*Homo sapiens* dans un système murin *Mus musculus*.

Dans un second temps, chaque combinaison de protéines, selon les différents vecteurs clonés, a été testée en présence d'un troisième vecteur exprimant un gène d'une composante du sélénosome non fusionné à un fragment luciférase (Figure 15 à 21). Aucune expérience n'a été réalisée avec l'ajout de la protéine SPS2 contenant une Sec, puisque plusieurs expériences dans la littérature ont montré l'impossibilité de sa surexpression due à la présence de son codon UGA (Small-Howard et al., 2006; Xu et al., 2007a).

Dans tous les cas d'expériences de PCA en plaque à 96 puits, nous avons normalisé les résultats, comme présenté à la Figure 12. Un signal ayant la même intensité que le contrôle positif ou plus a donc une activité luciférase normalisée de 1 ou plus. Le contrôle négatif fixe le seuil du 0 et les signaux sont ainsi répartis sur une échelle semi-quantitative de force d'interactions allant de « Aucune » ( $>0$ , mais  $<0,1$ ) à une interaction « Très Forte » ( $>0,8$ ). L'échelle comprend aussi les interactions « Très Faible » ( $>0,1$ , mais  $<0,25$ ), « Faible » ( $>0,25$ , mais  $<0,4$ ), « Moyenne » ( $>0,4$ , mais  $<0,6$ ) et « Forte » ( $>0,6$ , mais  $<0,8$ ). L'attribution de la force du signal de la luminescence émise par la luciférase recombinée *in vivo* dans les cellules a été réalisée automatiquement par le logiciel EnVision lors de la révélation de l'expérience. Un code de couleur associé à la force de l'interaction a été généré en fonction des résultats obtenus. Il en ressort ainsi une matrice semi-quantitative d'interactions avec laquelle nous pouvons comparer l'intensité des interactions homo- ou hétérodimériques. Certains vecteurs n'ont pas été clonés à temps ou testés avec une reproductibilité suffisante pour être présentée dans ce mémoire. Ainsi, l'attribution du terme « À déterminer » a été attribuée pour ces interactions et ils sont indiqués uniquement dans la Figure 13.

### **3.2.1. Identification des interactions protéine-protéine dans un système à deux protéines dans les cellules HEK293T et NIH3T3**

Les résultats des essais PCA (Figure 13) montrent un signal d'interaction « Fort » de dimérisation de SepSecS et de SPS1 ou de l'interaction eEFSec-SBP2. D'autres interactions moins fortes qui ont été mesurées sont par exemple l'interaction de SepSecS avec SPS1, eEFSec-SBP2 ou de l'homodimérisation de SepSecS ou de SPS1 en fusion inverse. On retrouve aussi dans cette catégorie d'intensité d'interactions l'homodimère de SECp43. Enfin, des interactions faibles, mais reproductibles sont les interactions SepSecS-SBP2, RPL30-RPL30, RPL30-SepSecS, SBP2-SECp43 ou SECp43-RPL30.

Certaines interactions entre des protéines d'intérêts n'ont jamais pu être détectées malgré les différentes constructions et le type cellulaire utilisé. Plus précisément, aucune interaction avec SPS2 n'a été détectée, mais à cause du codon Sec il n'est pas sûr si la protéine a été exprimée. La confirmation par immunobuvardage de type Western permettra de répondre à cette question. Ensuite, dans aucune expérience nous avons été

en mesure de détecter une interaction entre SepSecS/eEFSec, SepSecS/SECp43, SBP2/SBP2, SBP2/RPL30, SPS1/RPL30, SPS1/eEFSec et finalement, eEFSec/SECp43.

+ pcDNA3.1	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	F2-eEFSec	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2	<i>F2-SPS2</i> <i>Se60C</i>	<i>SPS2</i> <i>Se60C-F2</i>
F1-SepSecS	X	X				X	X				X				X	X
SepSecS-F1	X	X			X		X	X	X	X	X				X	X
F1-SECp43					X						X				X	X
SECp43-F1				X					X		X				X	X
F1-SBP2			X	X							X				X	X
SBP2-F1											X	X			X	X
F1-SPS1							X	X			X				X	X
SPS1-F1					X	X	X	X			X				X	X
F1-RPL30											X				X	X
RPL30-F1									X		X				X	X
F1-eEFSec	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
eEFSec-F1					X	X			X		X				X	X
F1-SPS2											X				X	X
SPS2-F1											X				X	X
<i>F1-SPS2</i> <i>Se60C</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>SPS2</i> <i>Se60C-F1</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 13. Matrice d'interactions protéine-protéine des composants de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines détectée par PCA-hRLuc dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

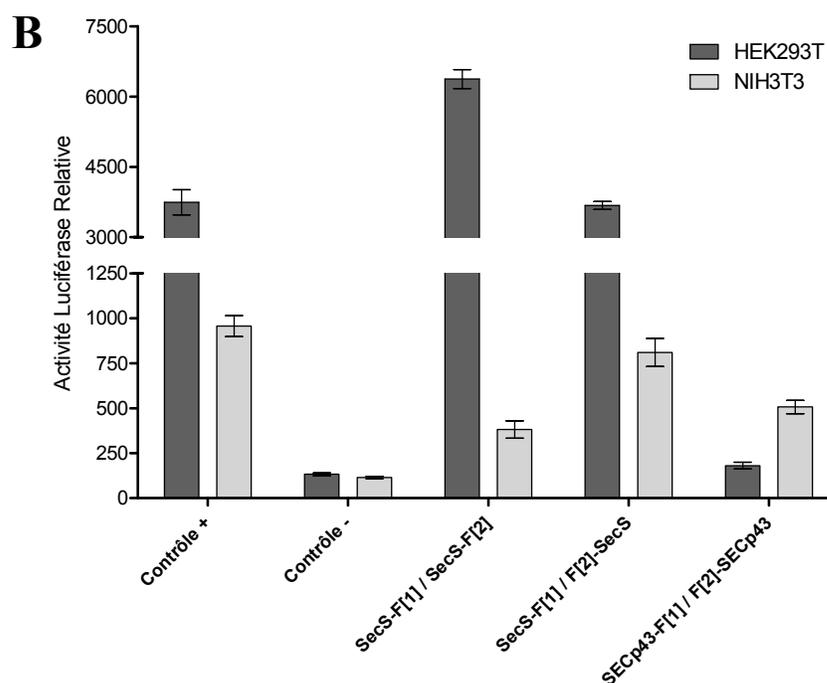
### **3.2.2. Comparaison des interactions protéines-protéines *in vivo* des constituants du séléosome dans les cellules NIH3T3 vs HEK293T**

L'analyse comparative montre qu'en exprimant les vecteurs d'expressions des gènes des constituants du séléosome dans un système de cellules NIH3T3, le patron de la matrice des interactions est légèrement différent de celui obtenu avec des cellules HEK293T (Figure 13 vs Figure 14A). Cependant, en comparant les signaux de l'essai PCA dans les cellules HEK293T avec ceux dans les cellules NIH 3T3, il est possible de remarquer un facteur de 5 à 10 de différence. Ainsi, il est possible d'affirmer que les cellules NIH3T3 expriment moins les protéines de fusion ou qu'elles sont moins adaptées pour des analyses de luminescence par PCA. Ces cellules sont plus volumineuses et plus difficilement transfectables de manière transitoire que les HEK293T, mais le signal non spécifique du contrôle négatif est aussi fort que pour les HEK293T. Par conséquent, il est plus difficile de détecter les interactions dans ce type cellulaire.

<b>A</b>	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS													
SepSecS-F1	X	X			X								
F1-SECp43													
SECp43-F1			X	X				X	X				
F1-SBP2													
SBP2-F1						X					X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1	X	X			X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1						X			X	X			
F1-SPS2													
SPS2-F1													

<b>Légende</b>	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer



**Figure 14. Comparaison des résultats des essais PCA-hRLuc dans des cellules de reins d'embryons humains HEK293T et de sarcome fibroblastiques d'embryon de souris NIH3T3.**

(A) Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines détectée par PCA dans des cellules NIH3T3. (B) Comparaison de l'efficacité de la détection des interactions par PCA entre les cellules HEK293T et NIH3T3. Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer

Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### **3.2.3. Effet de la surexpression de SECp43 sur les interactions *in vivo* du sélénosome**

L'objectif de la surexpression de SECp43, en cotransfectant le vecteur codant pour le gène de la protéine aux essais PCA à deux protéines, était d'identifier son rôle potentiel sur l'intensité des interactions détectées par luminescence dans le patron de la matrice des interactions du sélénosome. Avec l'analyse du patron obtenu dans le cadre de cette expérience, on remarque peu de changements dans le patron de la matrice des interactions (Figure 13 vs Figure 15). Plus précisément, deux interactions de SBP2 (F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) n'apparaissaient plus sur la matrice, alors qu'une homodimérisation (SECp43-F[1] / SECp43-F[2]) a été notée comme étant plus faible. Cet effet est probablement dû à la forte présence de SECp43 dans la cellule qui est à la fois fusionnée à un fragment de la luciférase et à la fois surexprimée de manière native. Ainsi, les interactions de SECp43-hRLuc sont en compétition avec la forme SECp43 native pour lier ses interacteurs. Ensuite le signal d'une interaction entre SepSecS et SPS1 est identifiée comme étant plus forte (F[1]-SepSecS / F[2]-SPS1) indiquant que SECp43 pourrait stimuler cette interaction.

+ pcDNA3.1 SECp43	F2- SepSecS	SepSecS- F2	F2- SECp43	SECp43- F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2- RPL30	RPL30- F2	eEFSec- F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X				X	X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X	X	X			
F1-SECp43					X								
SECp43-F1				X					X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1													

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 15. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SECp43 détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.4. Effet de la surexpression de SepSecS sur les interactions *in vivo* du sélénosome

Tout comme l'expérience précédente, l'objectif de la surexpression de SepSecS, en cotransfectant le vecteur codant pour le gène de la protéine aux essais PCA, était d'identifier son rôle potentiel sur l'intensité des interactions détectées par luminescence dans le patron de la matrice des interactions du sélénosome. L'ajout du vecteur codant pour la protéine SepSecS aux essais PCA amène peu de changements dans le patron de la matrice des interactions. Cependant, on remarque que trois interactions entre SECp43 et SBP2 (F[1]-SECp43 / F[2]-SBP2, F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) n'étaient plus détectables (Figure 16). Considérant qu'il s'agit d'interactions spécifiques qui sont affectées par l'ajout de SepSecS, il est possible de déduire un rôle de SECp43 ou de SBP2 pour un complexe impliquant la protéine SepSecS. L'intensité

de la luminescence de ces interactions étant en dessous de 0,25, il est possible que l'ajout de SepSecS ait diminué légèrement l'intensité du signal rendant ces interactions non-détectable après l'analyse. Le patron des autres interactions est exactement le même que celui montré à la Figure 13.

+ pcDNA3.1 - SepSecS	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X				X	X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X	X	X			
F1-SECp43													
SECp43-F1				X					X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1											X		

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 16. Matrice d'interactions protéine-protéine des composants de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SepSecS détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.5. Effet de la surexpression de SPS1 sur les interactions *in vivo* du sélénosome

L'objectif de la surexpression de SPS1, en cotransfectant le vecteur codant pour le gène de la protéine aux essais PCA, était d'identifier son rôle potentiel sur l'intensité des interactions détectées par luminescence dans le patron de la matrice des interactions du sélénosome. L'ajout du vecteur codant pour la protéine SPS1 aux essais PCA amène

un changement relativement marqué dans le patron de la matrice des interactions (Figure 17). Deux interactions de SBP2 (F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) ne sont plus détectables et certaines homodimérisations de SepSecS (F[1]-SepSecS / F[2]-SepSecS, SepSecS-F[1] / F[2]-SepSecS, SepSecS-F[1] / SepSecS-F[2]) ainsi que de SPS1 ont un signal plus faible. Dans le cas des interactions d'homodimérisation de SPS1, l'explication vient du fait que les interactions de SPS1-hRLuc sont en compétition avec la forme SPS1 native dans la cellule. Dans le même sens, l'effet de SPS1 sur des interactions de SepSecS est compatible avec l'interaction SepSecS-SPS1 détectée par PCA. Finalement, une configuration d'interaction homodimérique de SECp43 n'est détectable qu'en présence de SPS1 (SECp43-F[1] / F[2]-SECp43).

+ pcDNA3.1 - SPS1	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X				X	X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X	X	X			
F1-SECp43					X								
SECp43-F1			X	X					X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1													

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 17. Matrice d'interactions protéine-protéine des composants de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SPS1 détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.6. Effet de la surexpression de SBP2 sur les interactions *in vivo* du sélénosome

L'objectif de la surexpression de SBP2, en cotransfectant le vecteur codant pour le gène de la protéine aux essais PCA, était d'identifier son rôle potentiel sur l'intensité des interactions détectées par luminescence dans le patron de la matrice des interactions du sélénosome. L'ajout du vecteur codant pour la protéine SBP2 aux essais PCA présente beaucoup de changement dans le patron de la matrice des interactions (Figure 18). Trois interactions de SECp43 (F[1]-SECp43 / F[2]-SBP2, F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) ne sont plus détectables, tout comme une interaction SepSecS / SBP2 (F[1]-SepSecS / SBP2-F[2]) et une interaction SepSecS / RPL30 (SepSecS-F[1] / F[2]-RPL30). De plus, deux interactions d'homodimérisation de SepSecS (F[1]-SepSecS / F[2]-SepSecS et SepSecS-F[1] / SepSecS-F[2]) sont plus faibles. Le résultat le plus notable est la détection de deux interactions entre SECp43 et SPS1 qui ne sont pas détectables en absence de la surexpression de SBP2.

+ pcDNA3.1 - SBP2	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X					X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X		X			
F1-SECp43													
SECp43-F1				X			X	X	X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1													X

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 18. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SBP2 détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader.

Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### **3.2.7. Effet de la surexpression de RPL30 sur les interactions *in vivo* du sélénosome**

L'ajout du vecteur codant pour la protéine RPL30 aux essais PCA résulte surtout à des changements des interactions impliquant SECp43 par rapport au patron initial de la matrice des interactions (Figure 19 vs Figure 13). Deux interactions impliquant F[2]-SECp43 (SECp43-F[1] / F[2]-SECp43 et SPS1-F[2] / F[2]-SECp43), ainsi que SECp43-F[1] / SPS1-F[2] sont détectées uniquement en présence de RPL30. Deux interactions avec SBP2 (F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) ne sont plus détectables. Les interactions impliquant SepSecS, soit F[1]-SepSecS / F[2]-SepSecS, SepSecS-F[1] / SepSecS-F[2], F[1]-SepSecS / SBP2-F[2] et SepSecS-F[1] / F[2]-RPL30, sont plus faibles ou non détectées en présence de RPL30. Finalement, l'interaction d'eEFSec-F[1] / SBP2-F[2] est largement plus forte et donc favorisée dans la cellule lorsque RPL30 était surexprimé.

+ pcDNA3.1 - RPL30	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X					X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X		X			
F1-SECp43					X								
SECp43-F1			X	X				X	X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1			X		X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1											X		

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 19. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de RPL30 détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.8. Effet de la surexpression de eEFSec sur les interactions *in vivo* du sélénosome

L'ajout du vecteur codant pour la protéine eEFSec aux essais PCA résulte en une matrice presque identique à celle obtenue avec la surexpression de RPL30 (Figure 19 vs Figure 20). L'interaction de SECp43-F[1] / F[2]-SPS1 est détectée comme dans la matrice montrant la surexpression de SBP2 (Figure 18). De plus, l'interaction eEFSec-F[1] / F[2]-RPL30 n'est plus détectable. La surexpression d'eEFSec dans la cellule semble ainsi favoriser des événements moléculaires augmentant la liaison de partenaires impliqués dans la liaison au SecIS et a des effets similaires à la protéine RPL30 qui est liée au ribosome. Ainsi, tout porte à croire que la protéine eEFSec seule n'influence pas beaucoup d'interactions de la matrice de manière aussi marquée que d'autres protéines

comme SPS1 ou SECp43. Le patron des interactions *in vivo* des composantes du sélénosome est sensiblement le même avec l'ajout d'eEFSec.

+ pcDNA3.1 - eEFSec	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X					X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X		X			
F1-SECp43					X								
SECp43-F1			X	X			X	X	X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X							
F1-SPS2													
SPS2-F1													

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 20. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence d'eEFSec détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.2.9. Effet de la surexpression de SPS2 Se60C sur les interactions *in vivo* du sélénosome

L'ajout du vecteur codant pour la protéine SPS2 Se60C aux essais PCA démontre des changements des interactions impliquant SECp43 par rapport au patron initial de la matrice des interactions (Figure 21 vs Figure 13). Deux interactions impliquant SECp43-F[1] (SECp43-F[1] / F[2]-SECp43 et F[2]-SPS1 / SECp43-F[1]), ainsi que F[1]-SECp43 / SECp43-F[2] et F[1]-SECp43 / SPS1-F[2] sont détectées uniquement en présence de SPS2 Se60C. Trois interactions avec SBP2 (F[1]-SBP2 / F[2]-SECp43, F[1]-SECp43 / F[2]-SBP2 et F[1]-SBP2 / SECp43-F[2]) ne sont plus

déTECTABLES. Une interaction impliquant SepSecS, soit SepSecS-F[1] / F[2]-SepSecS est plus faible en présence de SPS2 Se60C. Finalement, l'interaction de SBP2-F[1] / eEFSec-F[2] et eEFSec-F[1] / F[2]-RPL30 ont un signal plus faible lorsque SPS2 Se60C est surexprimé.

+ pcDNA3.1 - SPS2 Se60C	F2-SepSecS	SepSecS-F2	F2-SECp43	SECp43-F2	F2-SBP2	SBP2-F2	F2-SPS1	SPS1-F2	F2-RPL30	RPL30-F2	eEFSec-F2	F2-SPS2	SPS2-F2
F1-SepSecS	X	X				X	X						
SepSecS-F1	X	X			X		X	X	X	X			
F1-SECp43				X				X					
SECp43-F1			X	X			X		X				
F1-SBP2													
SBP2-F1											X		
F1-SPS1							X	X					
SPS1-F1					X	X	X	X					
F1-RPL30													
RPL30-F1										X			
eEFSec-F1					X	X			X				
F1-SPS2													
SPS2-F1													

Légende	
X	Très forte (>0,8)
X	Forte (0,6 - 0,8)
X	Moyenne (0,4 - 0,6)
X	Faible (0,25 - 0,4)
X	Très Faible (0,1 - 0,25)
	Aucune (0 - 0,1)
X	À déterminer

**Figure 21. Matrice d'interactions protéine-protéine des composantes de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines en présence de SPS2 Se60C détectée par PCA dans des cellules HEK293T.**

Des cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs PCA codants pour chaque protéine identifiée dans la matrice, et l'interaction est quantifiée à partir de 100 000 cellules et l'ajout de CoelH dans le lecteur de plaques Perkin Elmer Multiplate Reader. Les couleurs indiquent la force relative du signal de luminescence issu des interactions calculé avec le logiciel EnVision. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Finalement, l'ensemble des interactions découvertes par l'essai PCA sont résumés à la Figure 22 sous forme de tableau résumé, permettant ainsi d'établir un premier pas dans l'analyse d'une dynamique des interactions de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines. Cette dernière permet de constater l'ampleur des découvertes réalisées dans cette recherche par rapport aux interactions connues dans la littérature. Il est possible de remarquer qu'uniquement les interactions de SECp43 avec SepSecS et d'eEFSec avec SECp43 n'ont pas été reproduites dans cette étude par rapport à ce qui était déjà démontré dans la littérature. De plus, plusieurs interactions

comme SepSecS-RPL30, SECp43-RPL30, SECp43-SECp43, RPL30-RPL30 et SepSecS-SBP2 ont été identifiés en plus des interactions présentées dans la littérature.

	SepSecS	SBP2	SPS1	SPS2	eEFSec	RPL30	SECp43
SECp43	[1, 3]	[3]	[3] (+SBP2)		[3]		
RPL30					[3, 5]		
eEFSec		[2, 3, 4]				[3, 5]	[3]
SPS2							
SPS1	[3]	[3]	[7]				[3] (+SBP2)
SBP2			[3]		[2, 3, 4]		[3]
SepSecS	[6]		[3]				[1, 3]

Légende	
	Littérature + Expérience
	Expérience uniquement
	Littérature uniquement
	Aucune

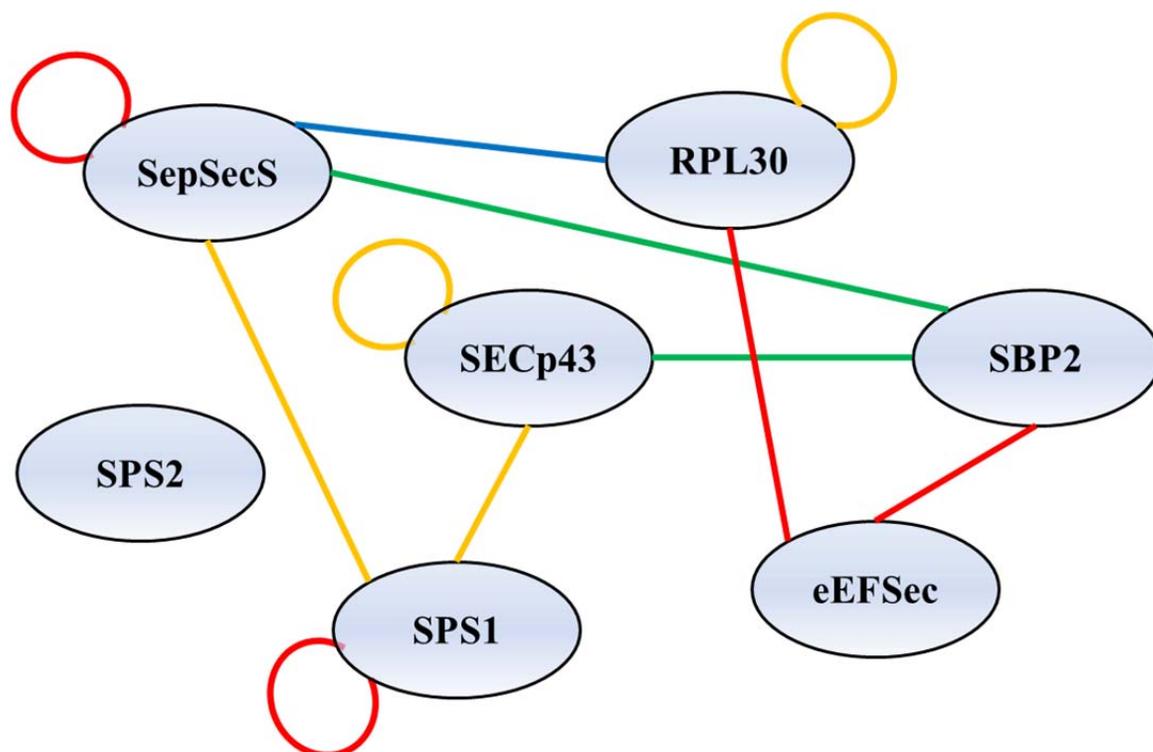
**Figure 22. Tableau résumé des interactions protéines-protéines dans le sélénosome selon les résultats obtenus dans cette étude (représenté en jaune), les interactions déjà identifiées dans la littérature (représenté en bleu) et celles identifiées dans cette étude de même que dans la littérature (représenté en rouge).**

[1] (Xu et al., 2005); [2] (Tujebajeva et al., 2000); [3] (Small-Howard et al., 2006); [4] (de Jesus et al., 2006); [5] (Chavatte et al., 2005); [6] (Palioura et al., 2009); [7] (Lobanov et al., 2008b)

## Chapitre 4 : Discussion

Le rôle du sélénium et des sélénoprotéines dans la santé chez l'humain ne fait plus aucun doute. La question qui demeure cependant est : pourquoi des organismes comme l'humain ont-ils conservé ce système très complexe et énergivore dans l'évolution alors que d'autres, comme les plantes, l'ont perdu ou ne l'ont jamais développé? Les forces dans l'évolution qui ont permis l'utilisation de la Sec, et l'équilibre entre les processus qui permettent de maintenir, d'acquérir ou de perdre ce système ne sont pas comprises. Il a déjà été postulé que l'avantage sélectif fourni par les sélénoprotéines comparativement aux homologues avec une Cys au lieu d'une Sec, pourrait devenir un inconvénient si le sélénium est limitant pour un organisme (Copeland, 2005). Considérant cette situation, les humains vivants dans des régions à faible apport en sélénium auraient pu se retrouver avec des enzymes homologues contenant une Cys à la place de la Sec, et perdre ce système ou bien tout simplement d'avoir les deux formes dans la cellule, permettant aux organismes d'utiliser le Se de manière facultative (Rother et al., 2003). Néanmoins, cette alternative n'a jamais été confirmée dans aucun organisme eucaryote indiquant que le système des sélénoprotéines a créé une pression importante dans l'évolution afin d'être conservé.

Beaucoup d'informations quant aux mécanismes moléculaires menant à l'incorporation de la Sec restent encore indéterminées. Afin de bien comprendre comment un ensemble unique de facteurs spécifiques à la Sec sont capables de modifier la machinerie moléculaire responsable de la synthèse des protéines, des nouvelles stratégies de recherche sont nécessaires. Néanmoins, tel qu'il est démontré à la Figure 23, la composition des interactions *in vivo* identifiées dans ce projet avec des intensités variables selon la couleur permet de constater qu'un ensemble d'interactions très bien coordonnées est au cœur du sélénosome.



**Figure 23. Interactions dans la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines détectées par PCA dans des cellules HEK293T.** Les interactions représentées par la couleur rouge sont des interactions « très forte ou forte », jaune représente des interactions « moyenne », vert représente des interactions « faible » et bleu représente des interactions « très faible ».

L'analyse de la dynamique des interactions au sein de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines nous permet d'avoir des données biologiques très précieuses dans l'étude de ce complexe. Les essais *in vitro*, largement utilisés jusqu'à maintenant pour l'étude de ce système, ne permettaient pas d'étudier la dynamique des interactions de ce complexe et d'étudier les interactions entre les composantes individuelles, comme il était prévu pour ce projet. Entre autres, ces tests étaient non-quantitatifs et non représentatifs des changements subtils dans les interactions au sein de ce complexe multiprotéique. Ainsi, en choisissant d'appliquer la technique de l'essai PCA, nous avons ciblé la compréhension des interactions au sein de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines d'un point de vue de la dynamique des interactions des constituants. Nous avons été en mesure d'identifier des changements des interactions en réponse aux facteurs clés comme SBP2 et SepSecS, mais aussi de proposer un modèle

alternatif des événements de la biosynthèse de la Sec puis de son insertion dans les protéines, tel que présenté aux Figures 24 et 25.

Bien sûr, notre étude comporte également des limitations, soit inhérente à la technique employée, soit des faiblesses intrinsèques aux systèmes étudiés. Nous discuterons donc ici des limites et des perspectives envisageables pour l'avenir de cette recherche.

Dans un premier temps, le choix du type cellulaire et de l'agent de transfection a été fait selon la technique décrite dans la littérature (Stefan et al., 2007), mais une adaptation de la technique et une optimisation pour le système étudié était nécessaire. Notre compréhension des mécanismes de la biosynthèse des sélénoprotéines et des niveaux d'ARNm nécessaire pour assembler la machinerie est encore limitée parce qu'il y a souvent un écart entre le sélénium chez les modèles animaux versus les modèles en culture cellulaire. La surexpression d'ARNm de sélénoprotéines dans des cellules en culture entraîne généralement un dédoublement de la quantité de la sélénoprotéine ciblée et il est très difficile de contrôler les niveaux de Se nécessaire pour une biosynthèse consistante (Weiss et al., 1998).

La stœchiométrie peut être parfois dérégulée dans un système de cellule en culture avec une surexpression des composantes du sélénosome. Afin de pallier au problème de la présence endogène des facteurs dans une cellule humaine lors d'une transfection dans les HEK293T, une comparaison avec les cellules NIH3T3 et HEK293T a été faite, puisqu'il s'agit de cellules de souris versus des cellules humaines. Cependant, comme on peut voir à la Figure 14, ce système s'est avéré moins sensible et plus difficile à transfecter que les cellules HEK293T. La variabilité entre les résultats et la faible expression des protéines empêchaient l'analyse de l'expression par immunobuvardage de type Western et par conséquent, nous avons décidé de travailler avec les cellules HEK293T pour la suite du projet. Les analyses de l'expression des protéines dans les cellules HEK293T par immunobuvardage de type Western ont permis de conclure que les protéines exprimées avaient le poids moléculaire attendu, ce qui avait été impossible de vérifier dans les cellules NIH3T3.

Une fois notre protocole de base établi, nous avons comme objectif d'identifier les interactions clés de la biosynthèse des sélénoprotéines durant l'étape de biosynthèse de la Sec. L'hypothèse de départ du projet était que l'interaction entre SepSecS et SECp43 était un élément central pour l'assemblage du sélénosome et que l'interaction entre les deux constituants était très forte. La découverte de l'interaction entre SepSecS et SECp43 a été une étape clé dans la compréhension de la biosynthèse des sélénoprotéines. Deux nouveaux constituants venaient se joindre au complexe protéique se liant à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> et permettaient enfin de comparer de façon plus approfondie le système de biosynthèse des sélénoprotéines eucaryotes à celui des procaryotes (Xu et al., 2005; Palioura et al., 2009). Prenant en compte que SepSecS est un partenaire de SPS1 et se lie à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> et que SECp43 se lie aussi à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> ainsi que de former un complexe, ARN/eEFSec/SECp43, en plus de favoriser l'interaction eEFSec/SBP2 et SepSecS/SPS1, tout porte à croire que SepSecS et SECp43 jouent un rôle dans la formation et dans la stabilité du sélénosome. L'association avec SECp43 semble nécessaire pour que SepSecS joue son rôle de catalyseur dans la formation des Sec et soit ségréguée au noyau pour s'associer à la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines. Cependant, nos données ne soutiennent pas l'hypothèse d'une interaction entre SepSecS et SECp43, impliquant l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> comme composante centrale de leur interaction (Figure 13). Nos résultats de PCA ne démontrent pas une interaction entre ces deux constituants qui soit dans la limite de détection de la PCA. Ainsi, ces deux protéines semblent avoir une distance supérieure à ce qui avait été avancé précédemment dans la littérature par Xu et al., (2005).

Nous avons été en mesure de détecter toutes les autres interactions mentionnées dans la littérature par la technique de l'essai PCA mise à part l'interaction SepSecS-SECp43 qui a été démontrée par coimmunoprécipitation et colocalisation par immunofluorescence (Xu et al., 2005). Une technique pour analyser les interactions *in vivo* n'a jamais été employée pour cette interaction. Ainsi, l'essai PCA qui est reconnu comme une technique de détection d'interaction dans un système cellulaire *in vivo* ne permet pas d'affirmer qu'il y a une interaction SepSecS-SECp43. Leur lien se fait probablement par un complexe avec d'autres facteurs cytoplasmiques, impliquant SPS1 et l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. La présence de SPS1 semble affecter le tétramère de SepSecS selon nos

résultats qui indiquent une baisse de son homodimérisation (Figure 13 et Figure 15). Les résultats suggèrent ainsi une ouverture de la protéine vers une conformation différente pouvant ainsi permettre sa liaison à SPS1 et la liaison de SECp43 à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> qui est protégé par le tétramère de SepSecS. Par contre, il reste encore à déterminer si l'association se produit avant l'entrée au noyau ou après.

Plusieurs groupes ont identifié des interactions entre les 8 constituants de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines. Par contre, aucun groupe n'a été en mesure d'affirmer quelle interaction est à la base de la formation de cette machinerie (Small-Howard et al., 2006). La grande partie des études semblent suggérer que l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> ainsi que SBP2 sont les constituants centraux (Mariotti et al., 2012; Gupta et al., 2013). L'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> serait l'élément central permettant la liaison de tous les facteurs nécessaires pour la biosynthèse de la Sec, tandis que SBP2 serait l'élément central des facteurs impliqués dans l'insertion de la Sec au ribosome. Ainsi, la biosynthèse des sélénoprotéines comprendrait deux réactions distinctes impliquant des protéines présentes dans les deux sous-complexes, mais n'ayant pas les mêmes mécanismes de régulation cellulaire, les mêmes déclencheurs et les mêmes éléments clés. Cette hypothèse de deux complexes distincts, allant à l'encontre du modèle proposé par Bellinger et al. (Figure 2), s'appuie sur le fait que l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> interagit avec une partie des protéines au noyau, probablement afin de contrôler la machinerie impliquée pour l'étape d'insertion de la Sec durant la traduction. Cette étape marque un arrêt puisque l'ARNm peut subir une dégradation par la voie NMD à sa sortie du noyau ou la traduction peut être inhibée pendant un certain temps par la protéine R2TP (de Jesus et al., 2006; Sunde et al., 2011).

Notre dernier objectif était de caractériser chaque interaction au sein de la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines et d'étudier l'effet d'un troisième facteur sur chaque combinaison. De cette manière nous avons pu suggérer un rôle pour SBP2 et eEFSec comme facteur favorisant l'interaction entre SECp43 et SPS1. Cette interaction avait été largement caractérisée dans la littérature comme étant l'élément permettant la coimmunoprécipitation du complexe SPS1/SepSecS *in vivo* (Small-Howard et al., 2006).

Nos résultats montrent aussi que SPS1, SECp43, RPL30 et SepSecS sont tous des protéines dimérisant, mais uniquement SepSecS avait été identifiée dans la littérature.

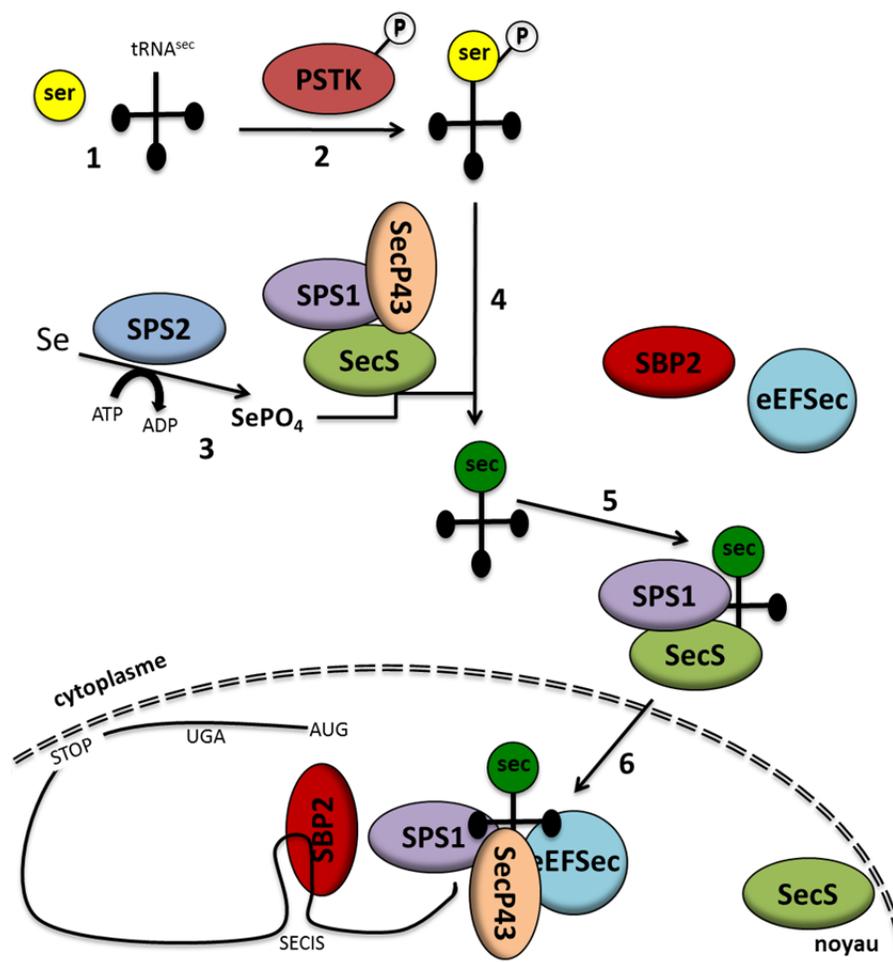
Par la suite, nous avons été en mesure d'identifier deux combinaisons d'interactions d'eEFSec et de ses partenaires de liaison au SecIS qui étaient influencées par la cotransfection d'un troisième facteur. En effet, lors de la transfection d'eEFSec-F[1] avec SBP2-F[2] ou de eEFSec-F[1] avec F[2]-RPL30, l'interaction variait selon la présence de RPL30 ou de SBP2, respectivement. Nous avons donc exploité la technique de PCA pour analyser ces interactions avec un troisième interacteur, permettant d'établir l'identification d'une certaine synergie ou compétition entre les protéines du complexe.

Tout d'abord, nous avons remarqué que l'interaction entre eEFSec et SBP2 semblait plus forte que celle d'eEFSec avec RPL30 ce qui concordait avec le fait que eEFSec a besoin de SBP2 dans le noyau pour se lier au SecIS (Figure 12). Par contre, quand nous dépassions 200 ng de plasmide de RPL30, l'interaction entre SBP2 et eEFSec diminuait indiquant une compétition pour la liaison à eEFSec entre SBP2 et RPL30. Cette découverte suggère donc que RPL30 est tout de même en complexe avec le ribosome et la machinerie de biosynthèse des sélénoprotéines durant la biosynthèse de la Sec, mais que sa liaison au SecIS dépendrait uniquement de la liaison préalable de ce dernier avec SBP2. Certaines questions cruciales sur le mécanisme d'action de RPL30 demeurent sans réponses, malgré le modèle proposé par Chavatte et al., (2005) qui ne concorde pas avec les récentes découvertes de Bifano et al., (2013). Par exemple, est-ce que RPL30 peut se lier à eEFSec sans la présence du SecIS ? Est-ce que cette liaison se produit uniquement au ribosome ou est-ce que la présence de RPL30 cytoplasmique ou nucléaire peut engendrer la formation d'un tel complexe?

En conclusion, nos données permettent de remettre en cause certaines interactions prises pour acquises dans la littérature qui n'avaient pas fait l'objet d'une analyse plus approfondie, mis à part dans plusieurs *review* (Hatfield et al., 2006b; Allmang et al., 2009; Lobanov et al., 2010; Xu et al., 2010; Stock et al., 2011). Ainsi, nous proposons un nouveau modèle des événements menant à la biosynthèse des sélénoprotéines qui est cependant scindé en deux étapes bien distinctes. Premièrement, on retrouve la machinerie impliquée dans la biosynthèse de la Sec qui implique les

protéines SerRS, PSTK, SepSecS, SECp43, SPS1 et SPS2 liée à l'ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Figure 24). La liaison de SPS1 avec SepSecS serait nécessaire pour permettre à SECp43 de se joindre au complexe. La liaison de SPS1 permet de changer la conformation du tétramère de SepSecS et de terminer la dernière étape de la synthèse de la Sec. SPS1 étant une sélénophosphate synthase, il ne serait pas étonnant que celle-ci prenne le monosélénophosphate fourni par SPS2 pour l'amener en complexe avec SepSecS. Une fois SepSecS/SPS1/SECp43 en complexe, la Sec est synthétisée et la méthylation de l'ARNt par SECp43 peut avoir lieu. La présence de SECp43 constituerait une première étape de régulation de biosynthèse d'un type de sélénoprotéine. Considérant nos résultats où SECp43 fusionné en C-terminal avec hRLuc-F[1] interagit plus fortement avec SPS1, sa présence est donc plus centrale dans le complexe SepSecS/SPS1/SECp43. Ainsi, la méthylation de l'ARNt est plus accessible d'un point de vue spatial pour SECp43 que si la protéine n'était pas liée au complexe. Le domaine C-terminal de SECp43 jouerait ainsi un rôle de ségrégation de la protéine dans le complexe avec SepSecS et SPS1.

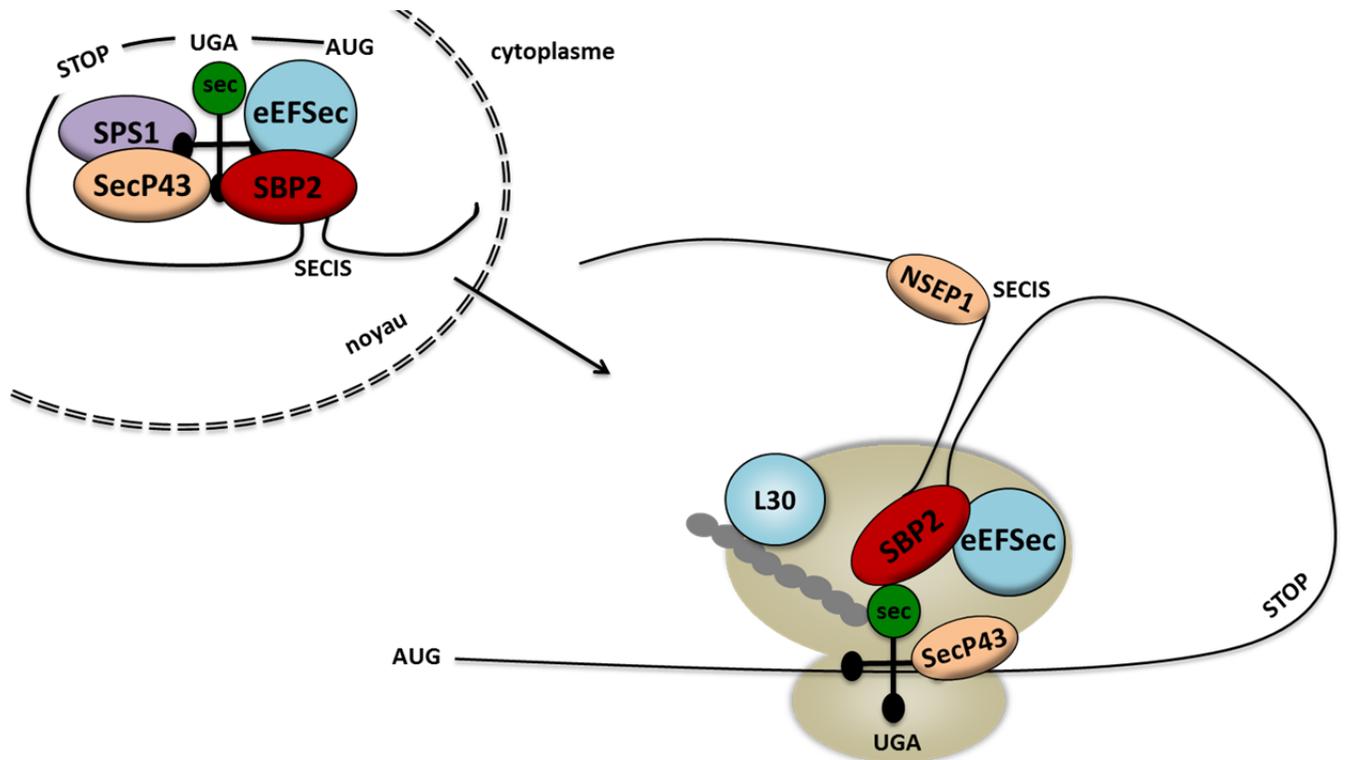
Par la suite, les composantes nécessaires pour la translocation au noyau restent inconnues. SECp43 se lie probablement à eEFSec afin de faciliter le transport nucléocytoplasmique, mais elle pourrait aussi bien agir au niveau du complexe SepSecS/SPS1/Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>. Une fois entré au noyau, SepSecS donnerait le Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> au complexe eEFSec/SECp43 ce qui serait favorisé par l'interaction SECp43/SPS1 qui aurait plus d'affinité en présence d'un Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> plutôt qu'avec l'*O*-phosphoseryl-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup> (Palioura et al., 2009). SepSecS sort ainsi du noyau pour aller catalyser une prochaine biosynthèse de Sec et le complexe Sec-ARNt<sup>[Ser]Sec</sup>/SBP2/eEFSec/SPS1/SECp43/SECIS est formé au noyau, marquant la fin de la biosynthèse de la Sec.



**Figure 24. Machinerie impliquée et événements moléculaires pour la biosynthèse de la sélénocystéine (étape 1 à 4) puis pour sa translocation au noyau (étape 5 et 6) chez les eucaryotes.**

Par la suite, l'incorporation de la Sec commence et implique uniquement les protéines SPS1, SECp43, eEFSec, SBP2 et RPL30 (Figure 25). Ce mécanisme est plus complexe et encore moins bien compris étant donné qu'il implique le ribosome. Le signal déterminant la sortie du noyau est encore inconnu, mais dès lors la liaison du ribosome serait probablement immédiate. La protéine RPL30 aiderait le ribosome à se positionner avec eEFSec et à permettre au SecIS de bien aligner la machinerie avec le UGA pour permettre le recodage. Une fois la Sec ajoutée au peptide en synthèse au site A du ribosome, RPL30 se lierait au SecIS à la place de SBP2, ce qui permet à la machinerie de sortir du ribosome et ainsi permettre à la traduction de procéder vers le

prochain codon de la protéine, en plus du domaine GTPase d'eEFSec qui catalyse aussi cette réaction.



**Figure 25. Machinerie impliquée et événements moléculaires pour l'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines chez les eucaryotes.**

## Conclusion

Ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que le modèle de la biosynthèse de la sélénocystéine et son incorporation dans les sélénoprotéines est un mécanisme complexe qui est sous l'influence de plusieurs facteurs de régulations. Les données de ce projet ont été les premières à prouver des interactions protéine-protéines *in vivo* au sein du complexe du sélénosome. L'approche expérimentale utilisée au cours de cette étude a permis de démontrer des interactions inconnues jusqu'à présent et de remettre en cause l'exactitude de certaines interactions démontrées dans la littérature de manière *in vitro*. L'analyse démontre aussi l'utilité d'un système pour analyser la dynamique des interactions *in vivo* pour caractériser les voies de signalisation qui régulent la biosynthèse des sélénoprotéines. Nos résultats soulèvent la possibilité que la surexpression de l'ensemble des protéines étudiées mène à l'activation des interactions des facteurs SPS1, SECp43 ou SBP2 et donc peuvent influencer sur les niveaux des sélénoprotéines. De plus, nos résultats ouvrent la voie afin d'identifier l'importance d'une certaine proximité entre les sélénosomes. Certaines interactions détectées peuvent avoir été le résultat d'une proximité entre les complexes plutôt qu'une interaction protéine-protéine au sein du même complexe.

Pour l'avenir, considérant que certains cancers ont la capacité d'exprimer des sélénoprotéines spécifiques, l'étude *in vivo* du sélénosome pourrait être utilisée en combinaison avec un autre système rapporteur afin d'analyser l'efficacité d'incorporation de la Sec au UGA (Calvo et al., 2002; Donovan et al., 2010). Il sera ainsi possible de caractériser l'intégrité générale de la voie de biosynthèse des sélénoprotéines dans certains cancers, ou avec une inhibition d'une interaction dans le sélénosome.

## Bibliographie

Abdulah, R., Noerjasin, H., Septiani, L., Mutakin, Defi, I. R., Suradji, E. W., Puspitasari, I. M., Barliana, M. I., Yamazaki, C., Nakazawa, M., et al. (2013). "Reduced serum selenium concentration in miscarriage incidence of Indonesian subjects." *Biol Trace Elem Res*, **154**(1): 1-6.

Adriano, D. C. (2001). "Trace elements in terrestrial environments : biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals". New York, Springer.

Allamand, V., Richard, P., Lescure, A., Ledeuil, C., Desjardin, D., Petit, N., Gartioux, C., Ferreira, A., Krol, A., Pellegrini, N., et al. (2006). "A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy." *EMBO Rep*, **7**(4): 450-454.

Allmang, C., Wurth, L. and Krol, A. (2009). "The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated." *Biochim Biophys Acta*, **1790**(11): 1415-1423.

Amiri, M., Farzin, L., Moassesi, M. E. and Sajadi, F. (2010). "Serum trace element levels in febrile convulsion." *Biol Trace Elem Res*, **135**(1-3): 38-44.

Andersen, G. R., Valente, L., Pedersen, L., Kinzy, T. G. and Nyborg, J. (2001). "Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1B $\alpha$  complex." *Nat Struct Biol*, **8**(6): 531-534.

Arner, E. S. and Holmgren, A. (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." *Eur J Biochem*, **267**(20): 6102-6109.

Arner, E. S. and Holmgren, A. (2001). "Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase." *Curr Protoc Toxicol*, **Chapter 7**: Unit 7 4.

Arteel, G. E., Briviba, K. and Sies, H. (1999). "Protection against peroxynitrite." *FEBS Lett*, **445**(2-3): 226-230.

Arthur, J. R., Beckett, G. J. and Mitchell, J. H. (1999). "The interactions between selenium and iodine deficiencies in man and animals." *Nutr Res Rev*, **12**(1): 55-73.

Arthur, J. R., Bermanno, G., Mitchell, J. H. and Hesketh, J. E. (1996). "Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism." *Biochem Soc Trans*, **24**(2): 384-388.

Arthur, J. R., Nicol, F. and Beckett, G. J. (1990). "Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium." *Biochem J*, **272**(2): 537-540.

Ashrafi, M. R., Shabani, R., Abbaskhanian, A., Nasirian, A., Ghofrani, M., Mohammadi, M., Zamani, G. R., Kayhanidoost, Z., Ebrahimi, S. and Pourpak, Z.

(2007a). "Selenium and intractable epilepsy: is there any correlation?" *Pediatr Neurol*, **36**(1): 25-29.

Ashrafi, M. R., Shams, S., Nouri, M., Mohseni, M., Shabaniyan, R., Yekaninejad, M. S., Chegini, N., Khodadad, A. and Safaralizadeh, R. (2007b). "A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis." *Epilepsia*, **48**(9): 1750-1755.

Barceloux, D. G. (1999). "Selenium." *J Toxicol Clin Toxicol*, **37**(2): 145-172.

Baron, C. and Bock, A. (1991). "The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA(Sec) of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu." *J Biol Chem*, **266**(30): 20375-20379.

Baron, C., Heider, J. and Bock, A. (1990). "Mutagenesis of selC, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in *E. coli*: effects on in vivo function." *Nucleic Acids Res*, **18**(23): 6761-6766.

Baron, C., Heider, J. and Bock, A. (1993a). "Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolyptide mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(9): 4181-4185.

Baron, C., Sturchler, C., Wu, X. Q., Gross, H. J., Krol, A. and Bock, A. (1994). "Eukaryotic selenocysteine inserting tRNA species support selenoprotein synthesis in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res*, **22**(12): 2228-2233.

Baron, C., Westhof, E., Bock, A. and Giege, R. (1993b). "Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA(Sec) from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA(Ser)." *J Mol Biol*, **231**(2): 274-292.

Barrett, C. W., Ning, W., Chen, X., Smith, J. J., Washington, M. K., Hill, K. E., Coburn, L. A., Peek, R. M., Chaturvedi, R., Wilson, K. T., et al. (2013). "Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase gpx3 in colitis-associated carcinoma." *Cancer Res*, **73**(3): 1245-1255.

Barrington, J. W., Taylor, M., Smith, S. and Bowen-Simpkins, P. (1997). "Selenium and recurrent miscarriage." *J Obstet Gynaecol*, **17**(2): 199-200.

Beck, M. A., Handy, J. and Levander, O. A. (2004). "Host nutritional status: the neglected virulence factor." *Trends Microbiol*, **12**(9): 417-423.

Beck, M. A., Levander, O. A. and Handy, J. (2003). "Selenium deficiency and viral infection." *J Nutr*, **133**(5 Suppl 1): 1463S-1467S.

Beckett, G. J., Beddows, S. E., Morrice, P. C., Nicol, F. and Arthur, J. R. (1987). "Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats." *Biochem J*, **248**(2): 443-447.

Behne, D. and Kyriakopoulos, A. (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." *Annu Rev Nutr*, **21**: 453-473.

Behne, D., Weiler, H. and Kyriakopoulos, A. (1996). "Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats." *J Reprod Fertil*, **106**(2): 291-297.

Bellinger, F. P., Raman, A. V., Reeves, M. A. and Berry, M. J. (2009). "Regulation and function of selenoproteins in human disease." *Biochem J*, **422**(1): 11-22.

Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R. and Hesketh, J. E. (1995). "Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats." *Biochem J*, **311** ( Pt 2): 425-430.

Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R. and Hesketh, J. E. (1996). "Selenoprotein gene expression during selenium-repletion of selenium-deficient rats." *Biol Trace Elem Res*, **51**(3): 211-223.

Berr, C., Arnaud, J. and Akbaraly, T. N. (2012). "Selenium and cognitive impairment: a brief-review based on results from the EVA study." *Biofactors*, **38**(2): 139-144.

Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y. Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1991a). "Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region." *Nature*, **353**(6341): 273-276.

Berry, M. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1991b). "Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase." *J Biol Chem*, **266**(22): 14155-14158.

Berry, M. J., Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Martin, G. W., 3rd, Low, S. C., Mansell, J. B., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., et al. (2001). "Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications." *Biofactors*, **14**(1-4): 17-24.

Berzelius, J. (1817). "General Views of the Composition of Animal Fluids." *Med Chir Trans*, **3**: 198-276.

Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J. and Larsen, P. R. (2002). "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." *Endocr Rev*, **23**(1): 38-89.

Bifano, A. L., Atassi, T., Ferrara, T. and Driscoll, D. M. (2013). "Identification of nucleotides and amino acids that mediate the interaction between ribosomal protein L30 and the SECIS element." *BMC Mol Biol*, **14**(1): 12.

Biou, V., Yaremchuk, A., Tukalo, M. and Cusack, S. (1994). "The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser)." *Science*, **263**(5152): 1404-1410.

Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. and Holmgren, A. (1994). "The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase." *J Biol Chem*, **269**(47): 29382-29384.

Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J. and Baron, C. (1991). "Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code." *Trends Biochem Sci*, **16**(12): 463-467.

Bouzaidi-Tiali, N., Aeby, E., Charriere, F., Pusnik, M. and Schneider, A. (2007). "Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*." *EMBO J*, **26**(20): 4302-4312.

Broome, C. S., McArdle, F., Kyle, J. A., Andrews, F., Lowe, N. M., Hart, C. A., Arthur, J. R. and Jackson, M. J. (2004). "An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status." *Am J Clin Nutr*, **80**(1): 154-162.

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., et al. (1996). "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*." *Science*, **273**(5278): 1058-1073.

Burk, R. F. and Hill, K. E. (1993). "Regulation of selenoproteins." *Annu Rev Nutr*, **13**: 65-81.

Burk, R. F. and Hill, K. E. (1999). "Orphan selenoproteins." *Bioessays*, **21**(3): 231-237.

Burk, R. F. and Hill, K. E. (2005). "Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis." *Annu Rev Nutr*, **25**: 215-235.

Burk, R. F., Hill, K. E., Awad, J. A., Morrow, J. D., Kato, T., Cockell, K. A. and Lyons, P. R. (1995). "Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P." *Hepatology*, **21**(2): 561-569.

Caban, K. and Copeland, P. R. (2006). "Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome." *Cell Mol Life Sci*, **63**(1): 73-81.

Calvo, A., Xiao, N., Kang, J., Best, C. J., Leiva, I., Emmert-Buck, M. R., Jorcyk, C. and Green, J. E. (2002). "Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors." *Cancer Res*, **62**(18): 5325-5335.

Carlson, B. A., Xu, X. M., Kryukov, G. V., Rao, M., Berry, M. J., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2004). "Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(35): 12848-12853.

Carlson, B. A., Yoo, M. H., Shrimali, R. K., Irons, R., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. and Park, J. M. (2010). "Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function." *Proc Nutr Soc*, **69**(3): 300-310.

Castellano, S., Lobanov, A. V., Chapple, C., Novoselov, S. V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V. N., et al. (2005). "Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(45): 16188-16193.

Castellano, S., Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Lescure, A., Blanco, E., Krol, A., Gladyshev, V. N. and Guigo, R. (2004). "Reconsidering the evolution of eukaryotic selenoproteins: a novel nonmammalian family with scattered phylogenetic distribution." *EMBO Rep*, **5**(1): 71-77.

Chavatte, L., Brown, B. A. and Driscoll, D. M. (2005). "Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes." *Nat Struct Mol Biol*, **12**(5): 408-416.

Chen, C. and Okayama, H. (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol*, **7**(8): 2745-2752.

Chen, P., Wang, L., Li, N., Liu, Q. and Ni, J. (2013). "Comparative proteomics analysis of sodium selenite-induced apoptosis in human prostate cancer cells." *Metallomics*, **5**(5): 541-550.

Chiba, S., Itoh, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. (2010). "Structural basis for the major role of O-phosphoserine-tRNA kinase in the UGA-specific encoding of selenocysteine." *Mol Cell*, **39**(3): 410-420.

Chittum, H. S., Baek, H. J., Diamond, A. M., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F., Ohama, T., Hatfield, D. L., Kuehn, M. and Lee, B. J. (1997). "Selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> levels and selenium-dependent glutathione peroxidase activity in mouse embryonic stem cells heterozygous for a targeted mutation in the tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> gene." *Biochemistry*, **36**(28): 8634-8639.

Cirulli, E. T. and Goldstein, D. B. (2010). "Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing." *Nat Rev Genet*, **11**(6): 415-425.

Clark, L. C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G. F., Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Witherington, R., Herlong, J. H., Janosko, E., Carpenter, D., et al. (1998). "Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial." *Br J Urol*, **81**(5): 730-734.

Commans, S. and Bock, A. (1999). "Selenocysteine inserting tRNAs: an overview." *FEMS Microbiol Rev*, **23**(3): 335-351.

Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S. G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A. K., Just, U., Sinowatz, F., et al. (2004). "Essential role for

mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function." *Mol Cell Biol*, **24**(21): 9414-9423.

Copeland, P. R. (2005). "Making sense of nonsense: the evolution of selenocysteine usage in proteins." *Genome Biol*, **6**(6): 221.

Copeland, P. R. and Driscoll, D. M. (1999). "Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis." *J Biol Chem*, **274**(36): 25447-25454.

Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. and Driscoll, D. M. (2000). "A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs." *EMBO J*, **19**(2): 306-314.

Copeland, P. R., Stepanik, V. A. and Driscoll, D. M. (2001). "Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2." *Mol Cell Biol*, **21**(5): 1491-1498.

Costa, M., Rodriguez-Sanchez, J. L., Czaja, A. J. and Gelpi, C. (2000). "Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis." *Clin Exp Immunol*, **121**(2): 364-374.

Dabeva, M. D. and Warner, J. R. (1993). "Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript." *J Biol Chem*, **268**(26): 19669-19674.

de Jesus, L. A., Hoffmann, P. R., Michaud, T., Forry, E. P., Small-Howard, A., Stillwell, R. J., Morozova, N., Harney, J. W. and Berry, M. J. (2006). "Nuclear assembly of UGA decoding complexes on selenoprotein mRNAs: a mechanism for eluding nonsense-mediated decay?" *Mol Cell Biol*, **26**(5): 1795-1805.

Diamond, A. M., Choi, I. S., Crain, P. F., Hashizume, T., Pomerantz, S. C., Cruz, R., Steer, C. J., Hill, K. E., Burk, R. F., McCloskey, J. A., et al. (1993). "Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec)." *J Biol Chem*, **268**(19): 14215-14223.

Ding, F. and Grabowski, P. J. (1999). "Identification of a protein component of a mammalian tRNA(Sec) complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine." *RNA*, **5**(12): 1561-1569.

Donovan, J., Caban, K., Ranaweera, R., Gonzalez-Flores, J. N. and Copeland, P. R. (2008). "A novel protein domain induces high affinity selenocysteine insertion sequence binding and elongation factor recruitment." *J Biol Chem*, **283**(50): 35129-35139.

Donovan, J. and Copeland, P. R. (2009). "Evolutionary history of selenocysteine incorporation from the perspective of SECIS binding proteins." *BMC Evol Biol*, **9**: 229.

Donovan, J. and Copeland, P. R. (2010). "The efficiency of selenocysteine incorporation is regulated by translation initiation factors." *J Mol Biol*, **400**(4): 659-664.

Dreosti, I. E. (1980). "Trace elements in nutrition." *Med J Aust*, **2**(3): 117-123.

Fagegaltier, D., Hubert, N., Carbon, P. and Krol, A. (2000a). "The selenocysteine insertion sequence binding protein SBP is different from the Y-box protein dbpB." *Biochimie*, **82**(2): 117-122.

Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P. and Krol, A. (2000b). "Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation." *EMBO J*, **19**(17): 4796-4805.

Fairweather-Tait, S. J. (1997). "Bioavailability of selenium." *Eur J Clin Nutr*, **51 Suppl 1**: S20-23.

Fisinin, V. I., Papazyan, T. T. and Surai, P. F. (2009). "Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population." *Crit Rev Biotechnol*, **29**(1): 18-28.

Fletcher, J. E., Copeland, P. R. and Driscoll, D. M. (2000). "Polysome distribution of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA: evidence for a block in elongation at the UGA/selenocysteine codon." *RNA*, **6**(11): 1573-1584.

Fomenko, D. E., Novoselov, S. V., Natarajan, S. K., Lee, B. C., Koc, A., Carlson, B. A., Lee, T. H., Kim, H. Y., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2009). "MsrB1 (methionine-R-sulfoxide reductase 1) knock-out mice: roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form." *J Biol Chem*, **284**(9): 5986-5993.

Forchhammer, K. and Bock, A. (1991a). "Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence." *J Biol Chem*, **266**(10): 6324-6328.

Forchhammer, K., Boesmiller, K. and Bock, A. (1991b). "The function of selenocysteine synthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine." *Biochimie*, **73**(12): 1481-1486.

Forchhammer, K., Leinfelder, W. and Bock, A. (1989). "Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein." *Nature*, **342**(6248): 453-456.

Forster, C., Ott, G., Forchhammer, K. and Sprinzl, M. (1990). "Interaction of a selenocysteine-incorporating tRNA with elongation factor Tu from *E.coli*." *Nucleic Acids Res*, **18**(3): 487-491.

Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S. and Woese, C. R. (1977). "Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(10): 4537-4541.

Frost, D. V. (1972). "The two faces of selenium--can selenophobia be cured?" *CRC Crit Rev Toxicol*, **1**(4): 467-514.

Fu, L. H., Wang, X. F., Eyal, Y., She, Y. M., Donald, L. J., Standing, K. G. and Ben-Hayyim, G. (2002). "A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase." *J Biol Chem*, **277**(29): 25983-25991.

Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., et al. (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature*, **415**(6868): 141-147.

Gelpi, C., Sontheimer, E. J. and Rodriguez-Sanchez, J. L. (1992). "Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(20): 9739-9743.

Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeold, A. and Bianco, A. C. (2008). "Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling." *Endocr Rev*, **29**(7): 898-938.

Gladyshev, V. N., Jeang, K. T. and Stadtman, T. C. (1996a). "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(12): 6146-6151.

Gladyshev, V. N., Jeang, K. T., Wootton, J. C. and Hatfield, D. L. (1998). "A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence." *J Biol Chem*, **273**(15): 8910-8915.

Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V. and Stadtman, T. C. (1994). "Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*: electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(1): 232-236.

Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V. and Stadtman, T. C. (1996b). "Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*." *Biochemistry*, **35**(1): 212-223.

Gladyshev, V. N., Krause, M., Xu, X. M., Korotkov, K. V., Kryukov, G. V., Sun, Q. A., Lee, B. J., Wootton, J. C. and Hatfield, D. L. (1999). "Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*." *Biochem Biophys Res Commun*, **259**(2): 244-249.

Gladyshev, V. N. and Kryukov, G. V. (2001). "Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins." *Biofactors*, **14**(1-4): 87-92.

Gladyshev, V. N., Kryukov, G. V., Fomenko, D. E. and Hatfield, D. L. (2004). "Identification of trace element-containing proteins in genomic databases." *Annu Rev Nutr*, **24**: 579-596.

Glass, R. S., Singh, W. P., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T. D. and Stadtman, T. C. (1993). "Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX." *Biochemistry*, **32**(47): 12555-12559.

Gonzalez-Flores, J. N., Gupta, N., Demong, L. W. and Copeland, P. R. (2012). "The selenocysteine-specific elongation factor contains a novel and multi-functional domain." *J Biol Chem*.

Gromer, S., Urig, S. and Becker, K. (2004). "The thioredoxin system--from science to clinic." *Med Res Rev*, **24**(1): 40-89.

Gromer, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R. H., Flohe, L. and Becker, K. (1998). "A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase." *Biochem J*, **332** ( Pt 2): 591-592.

Grundner-Culemann, E., Martin, G. W., 3rd, Tujebajeva, R., Harney, J. W. and Berry, M. J. (2001). "Interplay between termination and translation machinery in eukaryotic selenoprotein synthesis." *J Mol Biol*, **310**(4): 699-707.

Gu, Q. P., Beilstein, M. A., Barofsky, E., Ream, W. and Whanger, P. D. (1999). "Purification, characterization, and glutathione binding to selenoprotein W from monkey muscle." *Arch Biochem Biophys*, **361**(1): 25-33.

Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastelein, R. A., Bazan, J. F., et al. (1996). "Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(26): 15086-15091.

Gupta, N., Demong, L. W., Banda, S. and Copeland, P. R. (2013). "Reconstitution of Selenocysteine Incorporation Reveals Intrinsic Regulation by SECIS Elements." *J Mol Biol*, **425**(14): 2415-2422.

Hadley, K. B. and Sunde, R. A. (2001). "Selenium regulation of thioredoxin reductase activity and mRNA levels in rat liver." *J Nutr Biochem*, **12**(12): 693-702.

Hartikainen, H. (2005). "Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health." *J Trace Elem Med Biol*, **18**(4): 309-318.

Hatfield, D., Diamond, A. and Dudock, B. (1982). "Opal suppressor serine tRNAs from bovine liver form phosphoseryl-tRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**(20): 6215-6219.

- Hatfield, D., Lee, B. J., Hampton, L. and Diamond, A. M. (1991). "Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]<sup>Sec</sup> population in mammalian cells." *Nucleic Acids Res*, **19**(4): 939-943.
- Hatfield, D. and Portugal, F. H. (1970). "Seryl-tRNA in mammalian tissues: chromatographic differences in brain and liver and a specific response to the codon, UGA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**(3): 1200-1206.
- Hatfield, D. L., Berry, M. J. and Gladyshev, V. N. (2006a). Selenium its molecular biology and role in human health. New York, NY, Springer, : xxii, 419 p.
- Hatfield, D. L., Berry, M. J. and Gladyshev, V. N. (2012). Selenium its molecular biology and role in human health. New York, Springer,.
- Hatfield, D. L., Carlson, B. A., Xu, X. M., Mix, H. and Gladyshev, V. N. (2006b). "Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **81**: 97-142.
- Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2002). "How selenium has altered our understanding of the genetic code." *Mol Cell Biol*, **22**(11): 3565-3576.
- Hawkes, W. C., Kelley, D. S. and Taylor, P. C. (2001). "The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men." *Biol Trace Elem Res*, **81**(3): 189-213.
- Heider, J., Baron, C. and Bock, A. (1992). "Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein." *EMBO J*, **11**(10): 3759-3766.
- Hendrickson, E. L., Kaul, R., Zhou, Y., Bovee, D., Chapman, P., Chung, J., Conway de Macario, E., Dodsworth, J. A., Gillett, W., Graham, D. E., et al. (2004). "Complete genome sequence of the genetically tractable hydrogenotrophic methanogen *Methanococcus maripaludis*." *J Bacteriol*, **186**(20): 6956-6969.
- Herkel, J., Heidrich, B., Nieraad, N., Wies, I., Rother, M. and Lohse, A. W. (2002). "Fine specificity of autoantibodies to soluble liver antigen and liver/pancreas." *Hepatology*, **35**(2): 403-408.
- Hesketh, J. E. and Villette, S. (2002). "Intracellular trafficking of micronutrients: from gene regulation to nutrient requirements." *Proc Nutr Soc*, **61**(4): 405-414.
- Hesse-Bahr, K., Dreher, I. and Kohrle, J. (2000). "The influence of the cytokines Il-1beta and INFgamma on the expression of selenoproteins in the human hepatocarcinoma cell line HepG2." *Biofactors*, **11**(1-2): 83-85.
- Hidiroglou, M. (1979). "Trace element deficiencies and fertility in ruminants: a review." *J Dairy Sci*, **62**(8): 1195-1206.

Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. and Burk, R. F. (2003). "Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse." *J Biol Chem*, **278**(16): 13640-13646.

Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., Shafer, L. A., Dow, S., Berry, M. J. and Hoffmann, P. R. (2010). "Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols." *J Nutr*, **140**(6): 1155-1161.

Hoffmann, P. R. (2007). "Mechanisms by which selenium influences immune responses." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **55**(5): 289-297.

Howie, A. F., Arthur, J. R., Nicol, F., Walker, S. W., Beech, S. G. and Beckett, G. J. (1998). "Identification of a 57-kilodalton selenoprotein in human thyrocytes as thioredoxin reductase and evidence that its expression is regulated through the calcium-phosphoinositol signaling pathway." *J Clin Endocrinol Metab*, **83**(6): 2052-2058.

Huang, Z., Rose, A. H. and Hoffmann, P. R. (2012). "The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal*, **16**(7): 705-743.

Huttenhofer, A., Westhof, E. and Bock, A. (1996). "Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in Escherichia coli and their base-specific interaction with special elongation factor SELB." *RNA*, **2**(4): 354-366.

Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D. and Maquat, L. E. (2010). "UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps." *Mol Cell*, **39**(3): 396-409.

Itoh, Y., Chiba, S., Sekine, S. and Yokoyama, S. (2009a). "Crystal structure of human selenocysteine tRNA." *Nucleic Acids Res*, **37**(18): 6259-6268.

Itoh, Y., Sekine, S., Matsumoto, E., Akasaka, R., Takemoto, C., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2009b). "Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs." *J Mol Biol*, **385**(5): 1456-1469.

Jakupoglu, C., Przemeck, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., de Angelis, M. H., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Brielmeier, M., et al. (2005). "Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development." *Mol Cell Biol*, **25**(5): 1980-1988.

Jameson, R. R., Carlson, B. A., Butz, M., Esser, K., Hatfield, D. L. and Diamond, A. M. (2002). "Selenium influences the turnover of selenocysteine tRNA([Ser]Sec) in Chinese hamster ovary cells." *J Nutr*, **132**(7): 1830-1835.

Jameson, R. R. and Diamond, A. M. (2004). "A regulatory role for Sec tRNA[Ser]Sec in selenoprotein synthesis." *RNA*, **10**(7): 1142-1152.

Jenkins, K. J. and Hidioglou, M. (1972). "Comparative metabolism of <sup>75</sup>Se-selenite, <sup>75</sup>Se-selenate, and <sup>75</sup>Se-selenomethionine in bovine erythrocytes." *Can J Physiol Pharmacol*, **50**(10): 927-935.

Kaiser, J. T., Gromadski, K., Rother, M., Engelhardt, H., Rodnina, M. V. and Wahl, M. C. (2005). "Structural and functional investigation of a putative archaeal selenocysteine synthase." *Biochemistry*, **44**(40): 13315-13327.

Kaplan, M. M. (1984). "The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function." *Neuroendocrinology*, **38**(3): 254-260.

Kawatani, Y., Suzuki, T., Shimizu, R., Kelly, V. P. and Yamamoto, M. (2011). "Nrf2 and selenoproteins are essential for maintaining oxidative homeostasis in erythrocytes and protecting against hemolytic anemia." *Blood*, **117**(3): 986-996.

Kernebeck, T., Lohse, A. W. and Grotzinger, J. (2001). "A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas." *Hepatology*, **34**(2): 230-233.

Kim, H. Y. and Gladyshev, V. N. (2004). "Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases." *Mol Biol Cell*, **15**(3): 1055-1064.

Kim, L. K., Matsufuji, T., Matsufuji, S., Carlson, B. A., Kim, S. S., Hatfield, D. L. and Lee, B. J. (2000). "Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure." *RNA*, **6**(9): 1306-1315.

Kinzy, S. A., Caban, K. and Copeland, P. R. (2005). "Characterization of the SECIS binding protein 2 complex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals." *Nucleic Acids Res*, **33**(16): 5172-5180.

Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Glickman, R., Schneider, K., Rothstein, S., Cooper, J., Hochster, H., Kim, M. and Newman, R. (2000). "Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer." *Biol Trace Elem Res*, **73**(2): 97-111.

Klein, D. J., Schmeing, T. M., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2001). "The kink-turn: a new RNA secondary structure motif." *EMBO J*, **20**(15): 4214-4221.

Koonin, E. V., Bork, P. and Sander, C. (1994). "A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme?" *Nucleic Acids Res*, **22**(11): 2166-2167.

Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P. and Bock, A. (1996). "Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB." *J Mol Biol*, **262**(4): 413-420.

Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R. and Gladyshev, V. N. (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science*, **300**(5624): 1439-1443.

Kryukov, G. V. and Gladyshev, V. N. (2002a). "Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatics methods." *Methods Enzymol*, **347**: 84-100.

Kryukov, G. V. and Gladyshev, V. N. (2004). "The prokaryotic selenoproteome." *EMBO Rep*, **5**(5): 538-543.

Kryukov, G. V., Kryukov, V. M. and Gladyshev, V. N. (1999). "New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements." *J Biol Chem*, **274**(48): 33888-33897.

Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. and Gladyshev, V. N. (2002b). "Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(7): 4245-4250.

Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K. V., Kozyavkin, S., Hu, Y., Kwon, S. Y., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Berry, M. J., Lee, B. J., et al. (2000). "Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology." *J Biol Chem*, **275**(45): 35540-35547.

Kyriakopoulos, A., Bertelsmann, H., Graebert, A., Hoppe, B., Kuhbacher, M. and Behne, D. (2002). "Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat." *J Trace Elem Med Biol*, **16**(1): 57-62.

Kyriakopoulos, A., Rothlein, D., Pfeifer, H., Bertelsmann, H., Kappler, S. and Behne, D. (2000). "Detection of small selenium-containing proteins in tissues of the rat." *J Trace Elem Med Biol*, **14**(3): 179-183.

Lapenna, D., de Gioia, S., Ciofani, G., Bruno, C., Porreca, E., Pierdomenico, S. D. and Cuccurullo, F. (1998). "Antioxidant properties of ticlopidine on human low density lipoprotein oxidation." *FEBS Lett*, **436**(3): 357-360.

Larsen, P. R., Dick, T. E., Markovitz, B. P., Kaplan, M. M. and Gard, T. G. (1979). "Inhibition of intrapituitary thyroxine to 3.5.3'-triiodothyronine conversion prevents the acute suppression of thyrotropin release by thyroxine in hypothyroid rats." *J Clin Invest*, **64**(1): 117-128.

Larsen, P. R. and Zavacki, A. M. (2012). "The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action." *Eur Thyroid J*, **1**(4): 232-242.

Lee, B. C., Lobanov, A. V., Marino, S. M., Kaya, A., Seravalli, J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2011). "A 4-selenocysteine, 2-selenocysteine insertion sequence

(SECIS) element methionine sulfoxide reductase from *Metridium senile* reveals a non-catalytic function of selenocysteines." *J Biol Chem*, **286**(21): 18747-18755.

Lei, C., Niu, X., Wei, J., Zhu, J. and Zhu, Y. (2009). "Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy." *Clin Chim Acta*, **399**(1-2): 102-108.

Lei, X. G., Evenson, J. K., Thompson, K. M. and Sunde, R. A. (1995). "Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium." *J Nutr*, **125**(6): 1438-1446.

Leibundgut, M., Frick, C., Thanbichler, M., Bock, A. and Ban, N. (2005). "Selenocysteine tRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors." *EMBO J*, **24**(1): 11-22.

Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E. and Bock, A. (1990). "In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the selD gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(2): 543-547.

Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. A. and Bock, A. (1988a). "Escherichia coli genes whose products are involved in selenium metabolism." *J Bacteriol*, **170**(2): 540-546.

Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A. and Bock, A. (1988b). "Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine." *Nature*, **331**(6158): 723-725.

Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P. and Krol, A. (1999). "Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif." *J Biol Chem*, **274**(53): 38147-38154.

Lobanov, A. V., Delgado, C., Rahlfs, S., Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Gromer, S., Hatfield, D. L., Becker, K. and Gladyshev, V. N. (2006). "The Plasmodium selenoproteome." *Nucleic Acids Res*, **34**(2): 496-505.

Lobanov, A. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2008a). "Reduced reliance on the trace element selenium during evolution of mammals." *Genome Biol*, **9**(3): R62.

Lobanov, A. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2008b). "Selenoproteinless animals: selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis." *Protein Sci*, **17**(1): 176-182.

Lobanov, A. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2009). "Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes." *Biochim Biophys Acta*, **1790**(11): 1424-1428.

Lobanov, A. V., Turanov, A. A., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2010). "Dual functions of codons in the genetic code." *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **45**(4): 257-265.

- Low, S. C., Harney, J. W. and Berry, M. J. (1995). "Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis." *J Biol Chem*, **270**(37): 21659-21664.
- Lu, J., Zhong, L., Lonn, M. E., Burk, R. F., Hill, K. E. and Holmgren, A. (2009). "Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver." *FASEB J*, **23**(8): 2394-2402.
- Mao, H., White, S. A. and Williamson, J. R. (1999). "A novel loop-loop recognition motif in the yeast ribosomal protein L30 autoregulatory RNA complex." *Nat Struct Biol*, **6**(12): 1139-1147.
- Mariotti, M., Ridge, P. G., Zhang, Y., Lobanov, A. V., Pringle, T. H., Guigo, R., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2012). "Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes." *PLoS One*, **7**(3): e33066.
- Martin, G. W., 3rd, Harney, J. W. and Berry, M. J. (1998). "Functionality of mutations at conserved nucleotides in eukaryotic SECIS elements is determined by the identity of a single nonconserved nucleotide." *RNA*, **4**(1): 65-73.
- Matthaei, J. H., Voigt, H. P., Heller, G., Neth, R., Schoch, G., Kubler, H., Amelunxen, F., Sander, G. and Parmeggiani, A. (1966). "Specific interactions of ribosomes in decoding." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **31**: 25-38.
- Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maitra, R. K., DiCorleto, P. E. and Fox, P. L. (2003a). "Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control." *Cell*, **115**(2): 187-198.
- Mazumder, B., Seshadri, V. and Fox, P. L. (2003b). "Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means." *Trends Biochem Sci*, **28**(2): 91-98.
- Michnick, S. W., Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I. and Stefan, E. (2007). "Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays." *Nat Rev Drug Discov*, **6**(7): 569-582.
- Miniard, A. C., Middleton, L. M., Budiman, M. E., Gerber, C. A. and Driscoll, D. M. (2010). "Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression." *Nucleic Acids Res*, **38**(14): 4807-4820.
- Mizutani, T. and Tachibana, Y. (1986). "Possible incorporation of phosphoserine into globin readthrough protein via bovine opal suppressor phosphoseryl-tRNA." *FEBS Lett*, **207**(1): 162-166.
- Moriarty, P. M., Reddy, C. C. and Maquat, L. E. (1998). "Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA." *Mol Cell Biol*, **18**(5): 2932-2939.

Mortimer, R. H., Galligan, J. P., Cannell, G. R., Addison, R. S. and Roberts, M. S. (1996). "Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination." *J Clin Endocrinol Metab*, **81**(6): 2247-2249.

Moustafa, M. E., Carlson, B. A., El-Saadani, M. A., Kryukov, G. V., Sun, Q. A., Harney, J. W., Hill, K. E., Combs, G. F., Feigenbaum, L., Mansur, D. B., et al. (2001). "Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA." *Mol Cell Biol*, **21**(11): 3840-3852.

Mustacich, D. and Powis, G. (2000). "Thioredoxin reductase." *Biochem J*, **346 Pt 1**: 1-8.

Nagy, E. and Maquat, L. E. (1998). "A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance." *Trends Biochem Sci*, **23**(6): 198-199.

Neve, J. (1996). "Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases." *J Cardiovasc Risk*, **3**(1): 42-47.

Nichol, C., Herdman, J., Sattar, N., O'Dwyer, P. J., St, J. O. R. D., Littlejohn, D. and Fell, G. (1998). "Changes in the concentrations of plasma selenium and selenoproteins after minor elective surgery: further evidence for a negative acute phase response?" *Clin Chem*, **44**(8 Pt 1): 1764-1766.

Novoselov, S. V., Hua, D., Lobanov, A. V. and Gladyshev, V. N. (2006). "Identification and characterization of Fep15, a new selenocysteine-containing member of the Sep15 protein family." *Biochem J*, **394**(Pt 3): 575-579.

Novoselov, S. V., Rao, M., Onoshko, N. V., Zhi, H., Kryukov, G. V., Xiang, Y., Weeks, D. P., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2002). "Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*." *EMBO J*, **21**(14): 3681-3693.

Obata, T. and Shiraiwa, Y. (2005). "A novel eukaryotic selenoprotein in the haptophyte alga *Emiliana huxleyi*." *J Biol Chem*, **280**(18): 18462-18468.

Oldfield, J. E. (1987). "The two faces of selenium." *J Nutr*, **117**(12): 2002-2008.

Olson, G. E., Whitin, J. C., Hill, K. E., Winfrey, V. P., Motley, A. K., Austin, L. M., Deal, J., Cohen, H. J. and Burk, R. F. (2010). "Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells." *Am J Physiol Renal Physiol*, **298**(5): F1244-1253.

OMS et FAO (2002). Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a Joint WHO/FAO Expert Committee. Rome, World Health Organization/Food and Agricultural Organisation: 235-255.

- Oster, O., Schmiedel, G. and Prellwitz, W. (1988). "The organ distribution of selenium in German adults." *Biol Trace Elem Res*, **15**: 23-45.
- Ozer, N. K., Boscoboinik, D. and Azzi, A. (1995). "New roles of low density lipoproteins and vitamin E in the pathogenesis of atherosclerosis." *Biochem Mol Biol Int*, **35**(1): 117-124.
- Palioura, S., Herkel, J., Simonovic, M., Lohse, A. W. and Soll, D. (2010). "Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis." *Biol Chem*, **391**(7): 771-776.
- Palioura, S., Sherrer, R. L., Steitz, T. A., Soll, D. and Simonovic, M. (2009). "The human SepSecS-tRNASec complex reveals the mechanism of selenocysteine formation." *Science*, **325**(5938): 321-325.
- Papp, L. V., Lu, J., Striebel, F., Kennedy, D., Holmgren, A. and Khanna, K. K. (2006). "The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function." *Mol Cell Biol*, **26**(13): 4895-4910.
- Pawson, T. and Nash, P. (2003). "Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains." *Science*, **300**(5618): 445-452.
- Persson, B. C., Bock, A., Jackle, H. and Vorbruggen, G. (1997). "SelD homolog from *Drosophila* lacking selenide-dependent monoselenophosphate synthetase activity." *J Mol Biol*, **274**(2): 174-180.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(9): 639-650.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Muscari, A., Sacchetti, L., Arnone, G., Nativio, V., Talerico, T. and Mariani, E. (2003). "Homocysteine and cognitive function in healthy elderly community dwellers in Italy." *Am J Clin Nutr*, **77**(3): 668-673.
- Rayman, M. P. (2007). "Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action." *Proceedings of the Nutrition Society*, **64**(04): 527-542.
- Rayman, M. P. (2008). "Food-chain selenium and human health: emphasis on intake." *Br J Nutr*, **100**(2): 254-268.
- Rayman, M. P. (2012). "Selenium and human health." *Lancet*, **379**(9822): 1256-1268.
- Rayman, M. P., Infante, H. G. and Sargent, M. (2008). "Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation." *Br J Nutr*, **100**(2): 238-253.
- Rebbapragada, I. and Lykke-Andersen, J. (2009). "Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate?" *Curr Opin Cell Biol*, **21**(3): 394-402.

- Rees, K., Hartley, L., Day, C., Flowers, N., Clarke, A. and Stranges, S. (2013). "Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease." *Cochrane Database Syst Rev*, **1**: CD009671.
- Reeves, M. A. and Hoffmann, P. R. (2009). "The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation." *Cell Mol Life Sci*, **66**(15): 2457-2478.
- Reilly, C. (2006). "Selenium in food and health". New York, Springer.
- Remy, I. and Michnick, S. W. (1999). "Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 5394-5399.
- Rother, M., Mathes, I., Lottspeich, F. and Bock, A. (2003). "Inactivation of the selB gene in *Methanococcus maripaludis*: effect on synthesis of selenoproteins and their sulfur-containing homologs." *J Bacteriol*, **185**(1): 107-114.
- Rother, M., Resch, A., Gardner, W. L., Whitman, W. B. and Bock, A. (2001). "Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region." *Mol Microbiol*, **40**(4): 900-908.
- Rother, M., Wilting, R., Commans, S. and Bock, A. (2000). "Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*." *J Mol Biol*, **299**(2): 351-358.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G. (1973). "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." *Science*, **179**(73): 588-590.
- Rundlof, A. K., Janard, M., Miranda-Vizuete, A. and Arner, E. S. (2004). "Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1." *Free Radic Biol Med*, **36**(5): 641-656.
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K. and Niki, E. (2003). "Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants." *J Biol Chem*, **278**(41): 39428-39434.
- Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1996). "Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase." *Endocrinology*, **137**(8): 3308-3315.
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. and Schneider, G. (2001). "Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(17): 9533-9538.
- Sandholm, M. (1974). "Selenium carrier proteins in mouse plasma." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **35**(5): 424-428.

Schiavon, R., Guidi, G. C., Biasioli, S., De Fanti, E. and Targa, L. (1994). "Plasma glutathione peroxidase activity as an index of renal function." *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **32**(10): 759-765.

Schoenmakers, E., Agostini, M., Mitchell, C., Schoenmakers, N., Papp, L., Rajanayagam, O., Padidela, R., Ceron-Gutierrez, L., Doffinger, R., Prevosto, C., et al. (2010). "Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans." *J Clin Invest*, **120**(12): 4220-4235.

Schomburg, L. (2012). "Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease." *Nat Rev Endocrinol*, **8**(3): 160-171.

Schomburg, L. and Kohrle, J. (2008). "On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health." *Mol Nutr Food Res*, **52**(11): 1235-1246.

Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohe, L., Sendtner, M. and Kohrle, J. (2003). "Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues." *Biochem J*, **370**(Pt 2): 397-402.

Schomburg, L., Schweizer, U. and Kohrle, J. (2004). "Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic." *Cell Mol Life Sci*, **61**(16): 1988-1995.

Schwarz, K. and Foltz, C. M. (1999). "Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951." *Nutrition*, **15**(3): 255.

Schweizer, U., Brauer, A. U., Kohrle, J., Nitsch, R. and Savaskan, N. E. (2004). "Selenium and brain function: a poorly recognized liaison." *Brain Res Brain Res Rev*, **45**(3): 164-178.

Seiler, A., Schneider, M., Forster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Radmark, O., Wurst, W., et al. (2008). "Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death." *Cell Metab*, **8**(3): 237-248.

Shchedrina, V. A., Novoselov, S. V., Malinouski, M. Y. and Gladyshev, V. N. (2007). "Identification and characterization of a selenoprotein family containing a diselenide bond in a redox motif." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(35): 13919-13924.

Shchedrina, V. A., Zhang, Y., Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2010). "Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins." *Antioxid Redox Signal*, **12**(7): 839-849.

Shen, Q., Fan, L. and Newburger, P. E. (2006). "Nuclease sensitive element binding protein 1 associates with the selenocysteine insertion sequence and functions in mammalian selenoprotein translation." *J Cell Physiol*, **207**(3): 775-783.

Shen, Q., Wu, R., Leonard, J. L. and Newburger, P. E. (1998). "Identification and molecular cloning of a human selenocysteine insertion sequence-binding protein. A bifunctional role for DNA-binding protein B." *J Biol Chem*, **273**(10): 5443-5446.

Shils, M. E. and Shike, M. (2006). "Modern nutrition in health and disease". Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Singh, K., Laughlin, J., Kosinski, P. A. and Covey, L. R. (2004). "Nucleolin is a second component of the CD154 mRNA stability complex that regulates mRNA turnover in activated T cells." *J Immunol*, **173**(2): 976-985.

Small-Howard, A., Morozova, N., Stoytcheva, Z., Forry, E. P., Mansell, J. B., Harney, J. W., Carlson, B. A., Xu, X. M., Hatfield, D. L. and Berry, M. J. (2006). "Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo." *Mol Cell Biol*, **26**(6): 2337-2346.

Smith, F. D., Langeberg, L. K. and Scott, J. D. (2006). "The where's and when's of kinase anchoring." *Trends Biochem Sci*, **31**(6): 316-323.

Solberg, N. and Krauss, S. (2013). "Luciferase assay to study the activity of a cloned promoter DNA fragment." *Methods Mol Biol*, **977**: 65-78.

Squires, J. E. and Berry, M. J. (2008). "Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors." *IUBMB Life*, **60**(4): 232-235.

Squires, J. E., Stoytchev, I., Forry, E. P. and Berry, M. J. (2007). "SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay." *Mol Cell Biol*, **27**(22): 7848-7855.

Srinivasan, G., James, C. M. and Krzycki, J. A. (2002). "Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA." *Science*, **296**(5572): 1459-1462.

Srivastava, M. and Pollard, H. B. (1999). "Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights." *FASEB J*, **13**(14): 1911-1922.

Stadtman, T. C. (1990). "Selenium biochemistry." *Annu Rev Biochem*, **59**: 111-127.

Stadtman, T. C. (1996). "Selenocysteine." *Annu Rev Biochem*, **65**: 83-100.

Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C. R., Nyfeler, B., Bouvier, M. and Michnick, S. W. (2007). "Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(43): 16916-16921.

Stock, T., Selzer, M., Connery, S., Seyhan, D., Resch, A. and Rother, M. (2011). "Disruption and complementation of the selenocysteine biosynthesis pathway reveals a

hierarchy of selenoprotein gene expression in the archaeon *Methanococcus maripaludis*." *Mol Microbiol*, **82**(3): 734-747.

Stuart, L. D. and Oehme, F. W. (1982). "Environmental factors in bovine and porcine abortion." *Vet Hum Toxicol*, **24**(6): 435-441.

Su, D. and Gladyshev, V. N. (2004). "Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin-containing thioredoxin reductase 1." *Biochemistry*, **43**(38): 12177-12188.

Su, D., Novoselov, S. V., Sun, Q. A., Moustafa, M. E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2005). "Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation." *J Biol Chem*, **280**(28): 26491-26498.

Sun, Q. A., Kirnarsky, L., Sherman, S. and Gladyshev, V. N. (2001a). "Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(7): 3673-3678.

Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (1999). "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases." *J Biol Chem*, **274**(35): 24522-24530.

Sun, Q. A., Zappacosta, F., Factor, V. M., Wirth, P. J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2001b). "Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing." *J Biol Chem*, **276**(5): 3106-3114.

Sunde, R. A. (2010). "mRNA transcripts as molecular biomarkers in medicine and nutrition." *J Nutr Biochem*, **21**(8): 665-670.

Sunde, R. A. and Raines, A. M. (2011). "Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents." *Adv Nutr*, **2**(2): 138-150.

Takemoto, A. S., Berry, M. J. and Bellinger, F. P. (2010). "Role of selenoprotein P in Alzheimer's disease." *Ethn Dis*, **20**(1 Suppl 1): S1-92-95.

Takeuchi, A., Schmitt, D., Chapple, C., Babaylova, E., Karpova, G., Guigo, R., Krol, A. and Allmang, C. (2009). "A short motif in *Drosophila* SECIS Binding Protein 2 provides differential binding affinity to SECIS RNA hairpins." *Nucleic Acids Res*, **37**(7): 2126-2141.

Tamura, T., Yamamoto, S., Takahata, M., Sakaguchi, H., Tanaka, H., Stadtman, T. C. and Inagaki, K. (2004). "Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(46): 16162-16167.

Thanbichler, M. and Bock, A. (2001). "Functional analysis of prokaryotic SELB proteins." *Biofactors*, **14**(1-4): 53-59.

Thanbichler, M., Bock, A. and Goody, R. S. (2000). "Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA." *J Biol Chem*, **275**(27): 20458-20466.

Thomson, C. D. (1998). "Selenium speciation in human body fluids." *Analyst*, **123**(5): 827-831.

Tormay, P., Wilting, R., Lottspeich, F., Mehta, P. K., Christen, P. and Bock, A. (1998). "Bacterial selenocysteine synthase--structural and functional properties." *Eur J Biochem*, **254**(3): 655-661.

Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L. and Berry, M. J. (2000). "Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion." *EMBO Rep*, **1**(2): 158-163.

Turanov, A. A., Lobanov, A. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2013). "UGA codon position-dependent incorporation of selenocysteine into mammalian selenoproteins." *Nucleic Acids Res*.

Underwood, E. J. (1977). "Trace elements in human and animal nutrition". New York, Academic Press.

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L. (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." *Science*, **285**(5432): 1393-1396.

Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Chen, C. L., Jensen, O. N., Barofsky, E. and Whanger, P. D. (1993). "Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle." *J Biol Chem*, **268**(23): 17103-17107.

Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Yeh, J. Y., Ream, W. and Whanger, P. D. (1995). "Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(19): 8749-8753.

Veres, Z., Tsai, L., Scholz, T. D., Politino, M., Balaban, R. S. and Stadtman, T. C. (1992). "Synthesis of 5-methylaminomethyl-2-selenouridine in tRNAs: 31P NMR studies show the labile selenium donor synthesized by the selD gene product contains selenium bonded to phosphorus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(7): 2975-2979.

Vilardell, J., Chartrand, P., Singer, R. H. and Warner, J. R. (2000). "The odyssey of a regulated transcript." *RNA*, **6**(12): 1773-1780.

Vilardell, J. and Warner, J. R. (1994). "Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome." *Genes Dev*, **8**(2): 211-220.

Villette, S., Kyle, J. A., Brown, K. M., Pickard, K., Milne, J. S., Nicol, F., Arthur, J. R. and Hesketh, J. E. (2002). "A novel single nucleotide polymorphism in the 3'

untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism." *Blood Cells Mol Dis*, **29**(2): 174-178.

Walczak, R., Carbon, P. and Krol, A. (1998). "An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation." *RNA*, **4**(1): 74-84.

Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P. and Krol, A. (1996). "A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs." *RNA*, **2**(4): 367-379.

Walker, C. H. and Klein, F. (1915). Selenium - its therapeutic value, especially in cancer. *Trace elements in carcinogenesis*. A. Med. New York, Plenum. **2**: 219-244.

Weiss Sachdev, S. and Sunde, R. A. (2001). "Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver." *Biochem J*, **357**(Pt 3): 851-858.

Weiss, S. L. and Sunde, R. A. (1998). "Cis-acting elements are required for selenium regulation of glutathione peroxidase-1 mRNA levels." *RNA*, **4**(7): 816-827.

Wies, I., Brunner, S., Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Lohse, A. W. (2000). "Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis." *Lancet*, **355**(9214): 1510-1515.

Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C. and Bock, A. (1997). "Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion." *J Mol Biol*, **266**(4): 637-641.

Wood, S. M., Beckham, C., Yosioka, A., Darban, H. and Watson, R. R. (2000). "beta-Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans." *Integr Med*, **2**(2): 85-92.

Wu, R., Shen, Q. and Newburger, P. E. (2000). "Recognition and binding of the human selenocysteine insertion sequence by nucleolin." *J Cell Biochem*, **77**(3): 507-516.

Wu, S. H., Oldfield, J. E., Whanger, P. D. and Weswig, P. H. (1973). "Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats." *Biol Reprod*, **8**(5): 625-629.

Xu, X. M., Carlson, B. A., Irons, R., Mix, H., Zhong, N., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2007a). "Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis." *Biochem J*, **404**(1): 115-120.

Xu, X. M., Carlson, B. A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M. J., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2007b). "Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes." *PLoS Biol*, **5**(1): e4.

Xu, X. M., Mix, H., Carlson, B. A., Grabowski, P. J., Gladyshev, V. N., Berry, M. J. and Hatfield, D. L. (2005). "Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery." *J Biol Chem*, **280**(50): 41568-41575.

Xu, X. M., Turanov, A. A., Carlson, B. A., Yoo, M. H., Everley, R. A., Nandakumar, R., Sorokina, I., Gygi, S. P., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2010). "Targeted insertion of cysteine by decoding UGA codons with mammalian selenocysteine machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(50): 21430-21434.

Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." *Physiol Rev*, **81**(3): 1097-1142.

Young, P. A. and Kaiser, I. (1975). "Aminoacylation of Escherichia coli cysteine tRNA by selenocysteine." *Arch Biochem Biophys*, **171**(2): 483-489.

Young, V. R., Nahapetian, A. and Janghorbani, M. (1982). "Selenium bioavailability with reference to human nutrition." *Am J Clin Nutr*, **35**(5): 1076-1088.

Yuan, J., Hohn, M. J., Sherrer, R. L., Palioura, S., Su, D. and Soll, D. (2010a). "A tRNA-dependent cysteine biosynthesis enzyme recognizes the selenocysteine-specific tRNA in Escherichia coli." *FEBS Lett*, **584**(13): 2857-2861.

Yuan, J., O'Donoghue, P., Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., Sherrer, R. L., Palioura, S., Simonovic, M. and Soll, D. (2010b). "Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems." *FEBS Lett*, **584**(2): 342-349.

Yuan, J., Palioura, S., Salazar, J. C., Su, D., O'Donoghue, P., Hohn, M. J., Cardoso, A. M., Whitman, W. B. and Soll, D. (2006). "RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(50): 18923-18927.

Zavacki, A. M., Mansell, J. B., Chung, M., Klimovitsky, B., Harney, J. W. and Berry, M. J. (2003). "Coupled tRNA(Sec)-dependent assembly of the selenocysteine decoding apparatus." *Mol Cell*, **11**(3): 773-781.

Zhang, J., Tsapralis, G. and Bowden, G. T. (2008). "Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation." *Cancer Res*, **68**(4): 1046-1054.

