

Sélénium, sélénoprotéines : une autre lecture du code génétique

Le sélénium est un élément présent à l'état de trace, trace dont l'importance physiologique n'a été appréciée à sa juste valeur que dans un passé récent. Sa forme biologique consiste essentiellement en l'acide aminé sélénocystéine, composé n'existant pas naturellement à l'état libre dans la cellule. Une machinerie complexe mais originale, mettant en œuvre plusieurs produits géniques, insère cet acide aminé de manière cotraductionnelle. Parmi les sélénoenzymes identifiées à l'heure actuelle chez les mammifères, les glutathion peroxydases constituent une des lignes de défense contre les agressions par les radicaux libres oxygénés ; la tétra-iodothyronine-5'-désiodinase, pour sa part, active l'hormone thyroïdienne. Ces deux exemples mettent clairement en exergue l'importance cruciale du sélénium, aussi bien dans la prévention des dommages causés aux macromolécules biologiques qu'au cours du développement.

Christine
Sturchler-Pierrat
Philippe Carbon
Alain Krol

ADRESSE

C. Sturchler-Pierrat : étudiante en thèse, boursière de l'ARC. P. Carbon : professeur à l'université Louis-Pasteur de Strasbourg. A. Krol : directeur de recherche au Cnrs. Unité propre de recherche du Cnrs, structure des macromolécules biologiques et mécanismes de reconnaissance, Institut de biologie moléculaire et cellulaire, 15, rue René-Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

m/s n° 8, vol. 11, août 95

Un phénomène surprenant attend Marco Polo à son entrée en Chine par l'ouest, en 1295. Au bout de quelques semaines, ses chevaux perdent progressivement leurs sabots, ce qui ralentit leur déplacement et les conduit à une mort inéluctable, faute de pouvoir s'alimenter correctement. Pourtant, les chevaux locaux ont l'air de bien se porter, mais une observation attentive de leur régime alimentaire révèle qu'ils se méfient et évitent l'absorption d'une plante dangereuse, l'astragale, alors que les chevaux de Marco Polo, non adaptés à cet écosystème, ne s'en méfient pas.

Cette anecdote historique constitue le premier exemple relatif à l'éven-

tuelle toxicité du sélénium lorsque celui-ci est présent en dose trop élevée dans un régime alimentaire. En effet, bien des années plus tard, il a été établi que les sols des régions de l'ouest de la Chine (Turkestan chinois) étaient fortement sélénifères et les plantes du genre *Astragale* des accumulatrices de sélénium. Le sélénium a ainsi été longtemps considéré comme un élément toxique pour l'homme et l'animal.

Ce n'est qu'en 1957 que Schwartz et Foltz ont établi l'importance du sélénium pour les espèces animales en démontrant qu'une carence en cet élément pouvait entraîner des troubles plus ou moins graves selon l'espèce, touchant principalement les muscles, le cœur ou le foie [1].

RÉFÉRENCES

- Schwartz K, Foltz C. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 3292-3.
- Böck A, Stadtman TC. Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. *Biofactors* 1988; 1: 245-50.
- Stadtman TC. Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 111-27
- Enoch HG, Lester RL. The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1975; 250: 6693-705.
- Sawers G, Heider J, Zehelein E, Böck A. Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J Bacteriol* 1991; 173: 4983-93.
- Yamazaki S. A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*. Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue. *J Biol Chem* 1982; 257: 7926-9.
- Cone EJ, Martin Del Rio R, Davis JN, Stadtman TC. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2659-63.
- Burk RF, Gregory PE. Some characteristics of $^{75}\text{Se-P}$, a selenoprotein found in rat liver and plasma, and comparison of it with selenogluthathione peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1982; 213: 73-80.
- Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 1991; 266: 10050-3.
- Hill KE, Lloyd RS, Burk RF. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 537-41.
- Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Barofski E, Whanger PD. Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* 1993; 268: 17103-7.
- Karimpour I, Cutler M, Shih D, Smith J, Kleene KC. Sequence of the gene encoding the mitochondrial capsule selenoprotein of mouse sperm: identification of three in-phase TGA selenocysteine codons. *DNA Cell Biol* 1992; 11: 693-9.
- Berry MJ, Banu L, Larsen R. Type I iodothyronines' deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 1991; 349: 438-40.

Élément toxique lorsque trop abondant dans la ration alimentaire, mais nécessaire comme le prouvent les effets dramatiques engendrés par une carence, le sélénium est aujourd'hui considéré comme un élément trace absolument indispensable à l'homme. Les besoins journaliers en sélénium d'un être humain s'élèvent de 50 à 200 µg et le corps d'un adulte contient environ 6 à 12 mg de sélénium.

Le sélénium se trouve principalement incorporé dans notre organisme sous forme d'un acide aminé: la sélénocystéine (figure 1). Son mécanisme d'incorporation est extrêmement spécifique et cette revue a pour objectif d'en expliciter les différentes étapes.

Les sélénoprotéines à sélénocystéine

Huit types de sélénoprotéines à sélénocystéine ont été identifiés à ce jour [2, 3] (Tableau 1). Chez les proca-

ryotes, les sélénoprotéines constituent trois grands groupes. (1) Les formiate déshydrogénases sont trouvées sous trois formes chez *E. coli*. La première enzyme (FDH_N) est liée au complexe nitrite réductase par l'ubiquinone. Sa structure oligomérique de type $\alpha_4\beta_4\gamma_2$ a été étudiée par Enoch et Lester (1975) qui ont mis en évidence un atome de sélénium par sous-unité α [4]. La deuxième formiate déshydrogénase (FDH_H) appartient au complexe formiate déshydrogénase-hydrogénase connu sous le nom de formiate-hydrogène lyase et contient un sélénopolypeptide de 80 kDa. Plus récemment enfin, une troisième formiate déshydrogénase (FDH_O) de 110 kDa contenant une sélénocystéine a été identifiée [5]. (2) Les hydrogénases existent sous deux formes chez *Methanococcus vannielii* [6]. La première est représentée par une enzyme de 340 kDa, de structure oligomérique $\alpha_2\beta_4\gamma_2$. Chaque sous-unité β contient une sélénocystéine. La deuxième forme,

Tableau I

LES DIFFÉRENTES SÉLÉNOPROTÉINES CONNUES A CE JOUR

Sélénoprotéines procaryotes

Formiate déshydrogénase H
Formiate déshydrogénase N
Formiate déshydrogénase O
Sélénoprotéine A du complexe glycine réductase
Hydrogénases

Sélénoprotéines eucaryotes

Glutathion peroxydases
Tétra-iodothyronine 5' désiodinase
Sélénoprotéine P
Sélénoprotéine W
Sélénoprotéine de la capsule mitochondriale du spermatozoïde de souris

Sélénocystéine

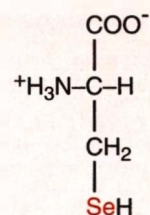


Figure 1. L'acide aminé sélénocystéine est la forme principale d'assimilation de sélénium dans les sélénoprotéines.

plus grande, est un agrégat, probablement un tétramère de l'espèce de 340 kDa. (3) La sélénoprotéine A du complexe glycine réductase des *Clostridia* a fait l'objet d'études intéressantes sur le mécanisme d'incorporation de sélénocystéine puisque c'est grâce à cette protéine qu'il a été démontré pour la première fois que le sélénium était présent sous forme de sélénocystéine [7].

Cinq sélénoprotéines ont été répertoriées chez les eucaryotes. (1) La sélénoprotéine P a été isolée du foie de rat. Cette glycoprotéine de 57 kDa est présente essentiellement dans le plasma [8] et contient dix sélénocystéines, ce qui la rend unique parmi toutes les sélénoprotéines [9, 10]. Son rôle n'est malheureusement pas connu. (2) La sélénoprotéine W, dont le gène n'est pas encore cloné, a été purifiée à partir de muscle de rat [11]. (3) La sélénoprotéine de la capsule mitochondriale du spermatozoïde contient trois sélénocystéines et joue vraisemblablement un rôle structural en permettant la formation de la gaine hélicoïdale mitochondriale autour du flagelle du spermatozoïde [12]. (4) La tétra-iodothyronine 5'-désiodinase ou 5' DI est une protéine monomérique de 27 kDa, présente en grande quantité dans le foie, les reins et la glande thyroïde. Elle contient une sélénocystéine dans son site actif [13]. Cette enzyme catalyse la désiodination de la prohormone inactive thyroxine ou 3, 5, 3', 5'-tétra-iodothyronine T4 en 3, 5, 3' triiodothyronine T3, par laquelle sont transmis tous les effets métaboliques et sur le développement de la glande thyroïde. (5) Enfin, dernier groupe, représenté par la famille nombreuse des glutathion peroxydases sur laquelle nous allons nous étendre un peu plus longuement parce qu'elles jouent un rôle très important chez les eucaryotes.

Les glutathion peroxydases et la lutte contre les radicaux libres oxygénés

Les radicaux libres oxygénés sont des molécules possédant un électron célibataire sur leur orbitale externe. Très réactifs, ils cherchent à réagir avec d'autres molécules de façon à appaier leur électron isolé. Leur demi-vie est très brève (de l'ordre de 10^{-7} secondes) mais variable d'un radical

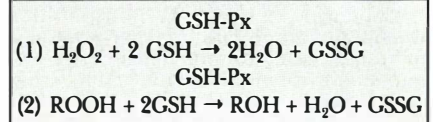
à l'autre. Les réactions engendrées par ces radicaux très instables se font généralement en chaîne, conduisant souvent à des lésions cellulaires graves. L'apparition de ces radicaux oxygénés peut être programmée par la cellule. Il en est ainsi de la réponse de phase aiguë déclenchée lors d'une réaction inflammatoire et qui produit par l'intermédiaire des phagocytes (macrophages et polynucléaires) le radical superoxyde O_2^- , de l'eau oxygénée et l'anion hypochlorite $HClO^-$, permettant la destruction des bactéries et parasites infectant la cellule.

Cependant, la production de ces radicaux est généralement indésirable et très nocive pour l'organisme. Ils peuvent être la conséquence de la respiration mitochondriale et plus généralement de tous les métabolismes mettant en jeu des transports d'électrons. Leur formation entraîne l'oxydation des lipides membranaires, la dégradation de macromolécules (ADN, protéines), la perturbation et le déclin du système immunitaire (altération des fonctions leucocytaires et lymphocytaires). Ces radicaux libres oxygénés jouent très vraisemblablement un rôle prépondérant dans l'apparition de certains types de cancers, de maladies cardiovasculaires, des cataractes et du vieillissement cellulaire.

Fort heureusement, de nombreux mécanismes de défense contre les radicaux libres oxygénés se trouvent en état d'alerte permanente dans la cellule [14, 15]. Les antioxydants y figurent en bonne place et comprennent en fait une variété de molécules différentes parmi lesquelles, et de manière non exhaustive, agissent la vitamine E et les caroténoïdes, protecteurs des membranes cellulaires car solubles dans les graisses, l'acide urique et la vitamine C, le glutathion mais aussi des protéines chélatrices de métaux (fer, cuivre) telles que la ferritine, la transferrine ou la céruloplasmine qui réduisent la possibilité de réactions chimiques particulières mettant en jeu les ions ferreux et l'eau oxygénée et connues sous le nom de réaction de Fenton. Des systèmes enzymatiques participent également à la chasse aux radicaux libres oxygénés. Ils incluent la superoxyde dismutase, les catalases et les glutathion peroxydases. Outre ces molécules antioxydantes, la cellule dispose

de systèmes de réparation performants: l'ADN oxydé peut être réparé par des glycosylases spécifiques; les protéines oxydées sont dégradées par des protéases. Cependant, ces mécanismes deviennent de moins en moins performants avec l'âge, expliquant ainsi l'action délétère des radicaux libres qui peuvent alors pénétrer les lignes de défense.

Les glutathion peroxydases sont des sélénoenzymes particulièrement étudiées car elles luttent, en association avec le glutathion, d'une part, contre la formation du peroxyde d'hydrogène et, d'autre part, contre la lipido-peroxydation selon les réactions:



Quatre isoenzymes de glutathion peroxydases sont purifiées et caractérisées à l'heure actuelle. La GSHPx-I est la glutathion peroxydase cellulaire, la mieux connue de toutes. Elle est présente en abondance dans les érythrocytes, les reins et le foie et métabolise efficacement l'eau oxygénée et les hydroperoxydes des acides gras, mais très mal les hydroperoxydes phospholipidiques et ceux du cholestérol. Il s'agit d'un tétramère de 85 kDa contenant un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine située dans le site actif de chacune de ses sous-unités de 20 kDa [16].

La phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase ou PHGPx est purifiée à partir de foie de porc, de cœur ou de cerveau et se trouve très abondante dans les testicules où elle est exprimée après la puberté [17]. Il s'agit d'une enzyme cytosolique et monomérique de 21 kDa, ayant différentes spécificités de substrat. Elle catalyse, en effet, la réduction des hydroperoxydes des phospholipides, des acides gras, du cholestérol, du cumène et du peroxyde de t-butyl. Cette enzyme contient un atome de sélénium dans son site actif.

La glutathion peroxydase plasmaticque ou GSHPx-P est un tétramère de 100 kDa formé de sous-unités de 23 kDa et contenant quatre atomes de sélénium par mole de protéine [18]. Cette sélénoglycoprotéine catalyse la réduction des peroxydes du t-butyl et de l'hydrogène.

RÉFÉRENCES

14. Dodet B. La chasse aux radicaux libres oxygénés. *Biofutur* 1991; 101: 23-34.
15. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-9.
16. Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* 1978; 17: 2639-44.
17. Roveri A, Casasco A, Mairino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* 1992; 267: 6142-6.
18. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohens H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 677-86.
19. Chu FF, Doroshov JW, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571-6.
20. Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology* 1992; 131: 1848-52.
21. Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W, Böck A. Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3156-60.
22. Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4650-4.
23. Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 463-7.
24. Böck A, Forchhammer K, Heider J, Leinfelder W, Sawers C, Veprek B, Zinoni F. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 1991; 5: 515-20.
25. Baron C, Westhof E, Böck A, Giegé R. Solution structure of selenocysteine tRNA^{Sec} from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA^{Sec}. *J Mol Biol* 1993; 231: 274-92.
26. Forchhammer K, Böck A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J Biol Chem* 1991; 266: 6324-8.
- La glutathion peroxydase du tractus gastro-intestinal (GSHPx-GI) a été isolée à partir du foie humain et existe essentiellement dans le tractus gastro-intestinal. Il s'agit d'un tétramère localisé dans le cytosol [19] catalysant la réduction de H₂O₂, des hydroperoxydes du t-butyl, du cumène et de l'acide linoléique mais pas de la phosphatidylcholine.

Avantage d'un groupement sélénol sur un groupement thiol

La cellule ayant développé un mécanisme spécifique d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines, nous pouvons nous demander quel avantage fonctionnel peut procurer une sélénocystéine par rapport à une cystéine dans une protéine donnée. Un élément de réponse peut être apporté par les expériences de Berry *et al.* sur la tétra-iodothyronine 5' désiodinase [20]. Des mutants de substitution de cette protéine, dans lesquels la sélénocystéine est remplacée par une cystéine, révèlent l'avantage catalytique du groupement sélénol (-SeH) sur le groupement thiol (-SH) puisque l'enzyme mutante perd 90 % de son activité.

Des expériences réalisées sur la formiate déshydrogénase bactérienne, dans laquelle la sélénocystéine a été remplacée par une cystéine, mettent également en évidence l'avantage du groupement sélénol par rapport au groupement thiol puisque le gain catalytique avoisine les 300 fois pour la sélénoprotéine [21].

Métabolisme du sélénium chez les procaryotes

La première originalité du système d'incorporation du sélénium sous forme de sélénocystéine dans les sélénoenzymes réside dans le fait qu'un codon UGA, qui est habituellement un des trois codons employés pour la terminaison de la traduction, code pour cet acide aminé (*m/s n° 6, vol. 4, p. 392*). Les premiers séquençages de gènes codant pour des protéines à sélénocystéines ont révélé un fait surprenant: un codon TGA interrompait la phase ouverte de lecture. Cependant, l'observation d'une exacte coïncidence entre la position du

codon TGA dans le gène et la position de la sélénocystéine dans la séquence protéique laissait deviner que ce codon (UGA dans l'ARN messager) dirigeait l'insertion de sélénocystéine dans ces enzymes. Des expériences génétiques élégantes ont définitivement confirmé l'existence et la nécessité d'un codon UGA pour le décodage de la sélénocystéine [21, 22]. Il est désormais admis qu'un codon UGA en phase dans la séquence codante de l'ARN messager dirige l'insertion de sélénocystéine dans les sélénoprotéines. La découverte que ce codon, normalement utilisé comme un des trois codons stop de la terminaison de la traduction, dirige l'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines a éveillé l'intérêt de nombreux biologistes moléculaires: il semblait tentant d'imaginer que l'utilisation originale de ce codon UGA devait être corrélée à l'existence d'un système biologique spécifique faisant intervenir des facteurs non identifiés. Aujourd'hui, ce mécanisme d'assimilation de sélénium est bien connu chez les procaryotes et met en jeu quatre produits génétiques, un ARN de transfert et trois protéines, dénommés produits SELA, B, C, D [23, 24].

Le produit du gène *selC* est un ARN de transfert

Des tests de complémentation d'une souche d'*E. coli* portant la mutation *selC* à l'aide d'une banque cosmétique d'ADN chromosomique d'*E. coli* ont permis de découvrir que le gène *selC* portait l'information codante pour une molécule d'ARNt putative. L'existence fonctionnelle de cet ARNt, nommé ARNt^{Sec} pour ARNt sélénocystéine, est confortée par tout un faisceau de résultats expérimentaux convergents. Les structures primaire et secondaire de l'ARNt^{Sec} présentent des caractéristiques originales [25] (*figure 2A*), notamment: (1) la séquence de l'anticodon UCA est complémentaire du codon sélénocystéine UGA; (2) une longueur exceptionnelle de 95 nucléotides, ce qui en fait l'ARNt le plus grand connu à l'heure actuelle; (3) une hélice acceptrice de 8 paires de bases (au lieu de 7 dans un ARNt élongateur classique). La sérine est chargée dans un premier temps sur

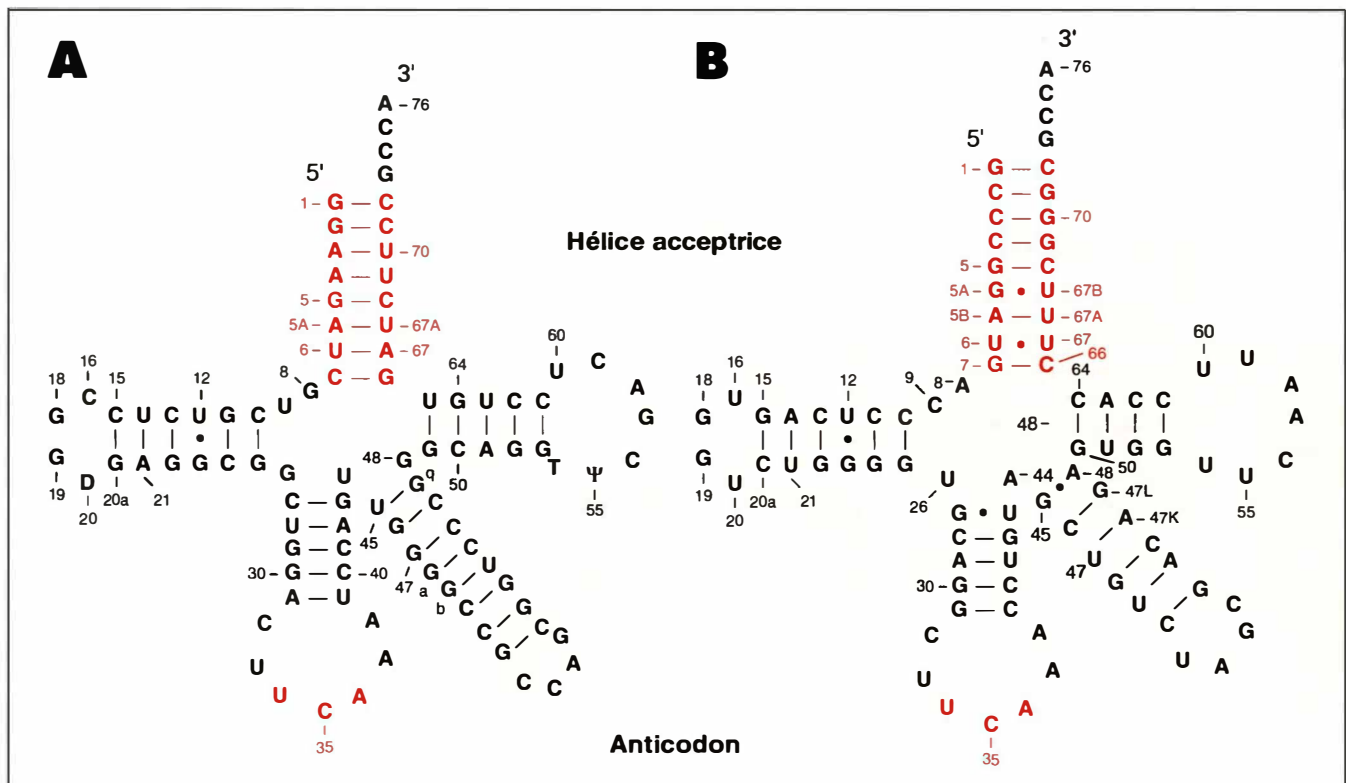


Figure 2. **A. Structure secondaire de l'ARNt sélénocystéine procaryote [25]. B. Structure secondaire de l'ARNt sélénocystéine eucaryote [30]. En rouge, l'anticodon UCA et l'hélice acceptatrice de l'acide aminé.**

l'ARNt^{Sec} par la séryl-ARNt synthétase avant de subir les étapes décrites ci-dessous.

Le produit du gène *selA* est une protéine : la sélénocystéine synthase

La détermination de la séquence nucléotidique du gène *selA* d'*E. coli* et la purification de l'enzyme à partir d'une souche surproductrice d'*E. coli* ont permis de démontrer qu'il s'agit d'un complexe de poids moléculaire natif de 600 kDa, formé de sous-unités de 50 kDa et portant une molécule de phosphate de pyridoxal par sous-unité. Cette enzyme catalyse la conversion sur l'ARNt^{Sec} de la sérine en sélénocystéine. Le mécanisme réactionnel est bien déterminé, qui met en jeu un intermédiaire aminoacrylyl-ARNt (*figure 3*). Le passage aminoacrylyl-ARNt en sélénocystéyl-ARNt est moins bien caractérisé. Il ne consiste pas en la simple addition d'un groupement HSe- mais d'un intermédiaire activé don-

neur de sélénium (phosphosélénnoate H₂PO₃SeH). Une mole d'ARNt^{Sec} est fixée par dimère (2 x 50 kDa). La protéine SELA distingue le séryl-ARNt^{Ser} du séryl-ARNt^{Sec}. Elle forme d'ailleurs un complexe très stable avec le séryl-ARNt^{Sec} mais ne reconnaît pas l'ARNt^{Sec} non chargé par la sérine [26]. L'étude de la conformation de l'enzyme par microscopie électronique révèle une symétrie de type 5. La protéine SELA, décamerique, est en effet constituée de 10 monomères assemblés en dimères et rangés sur deux anneaux concentriques. L'enzyme a un diamètre de 19 nm et le trou au centre des anneaux possède un diamètre d'environ 4 nm. L'enzyme peut fixer cinq molécules d'ARNt^{Sec} [27].

Le produit du gène *selD* permet la formation d'une forme active de sélénium

Comme décrit dans le paragraphe précédent, la protéine SELA catalyse la réaction de conversion de l'entité

sérine en sélénocystéine sur l'ARNt sélénocystéine. L'atome de sélénium requis pour cette réaction n'est pas directement prélevé parmi les formes libres circulantes dans la cellule mais est activé lors d'une réaction catalysée par le produit SELD.

SELD a un poids moléculaire de 37 kDa et est constituée de 347 acides aminés. L'étude du mécanisme de la réaction catalysée par SELD montre qu'il s'agit d'une protéine tout à fait originale qui non seulement hydrolyse l'ATP en AMP et pyrophosphate mais clive également le pyrophosphate en deux phosphates. Un des phosphates engendrés sera utilisé pour activer le sélénium présent dans la cellule sous forme de Se²⁻ (sélélide) ou de SeO₃⁻ (anion sélénite). L'énergie nécessaire à cette réaction est apportée par le clivage du pyrophosphate. Il se forme une molécule donneuse de sélénium activé, le phosphosélénnoate H₂PO₃SeH que nous avons mentionné ci-dessus.

RÉFÉRENCES

27. Engelhardt H, Forchhammer K, Müller S, Goldie KN, Böck A. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA^{Sec}-enzyme complex. *Mol Microbiol* 1992; 6: 3461-7.
28. Forchhammer K, Leinfelder W, Böck A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 1989; 342: 453-6.
29. Baron C, Heider J, Böck A. Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4181-5.
30. Sturchler C, Westhof E, Carbon P, Krol A. Unique secondary and tertiary structural features of the eukaryotic selenocysteine tRNA^{Sec}. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1073-9.
31. Carbon P, Krol A. Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA^{(Ser)Sec} gene: a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *EMBO J* 1991; 10: 599-607.
32. Myslinski E, Schuster C, Huet J, Sentenac A, Krol A, Carbon P. Point mutations 5' to the tRNA selenocysteine TATA box alter RNA polymerase III transcription by affecting the binding of TBP. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5852-8.
33. Mizutani T, Kurata H, Yamada K, Totsuka T. Some properties of murine selenocysteine synthase. *Biochem J* 1992; 284: 827-34.
34. Gelpi C, Sontheimer EJ, Rodriguez-Sanchez JL. Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 537-41.
35. Yamada K, Mizutani T, Ejiri SL, Totsuka T. A factor protecting mammalian (⁷⁵Se)SeCys-tRNA is different from EF-1α. *FEBS Lett* 1994; 347: 137-42.
36. Heider J, Baron C, Böck A. Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J* 1992; 11: 3759-66.
37. Ringquist S, Schneider D, Gibson T, Baron C, Böck A, Gold L. Recognition of the mRNA selenocysteine insertion sequence by the specialized translational elongation factor SELB. *Genes Dev* 1994; 8: 376-85.
38. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J* 1993; 12: 3315-22.

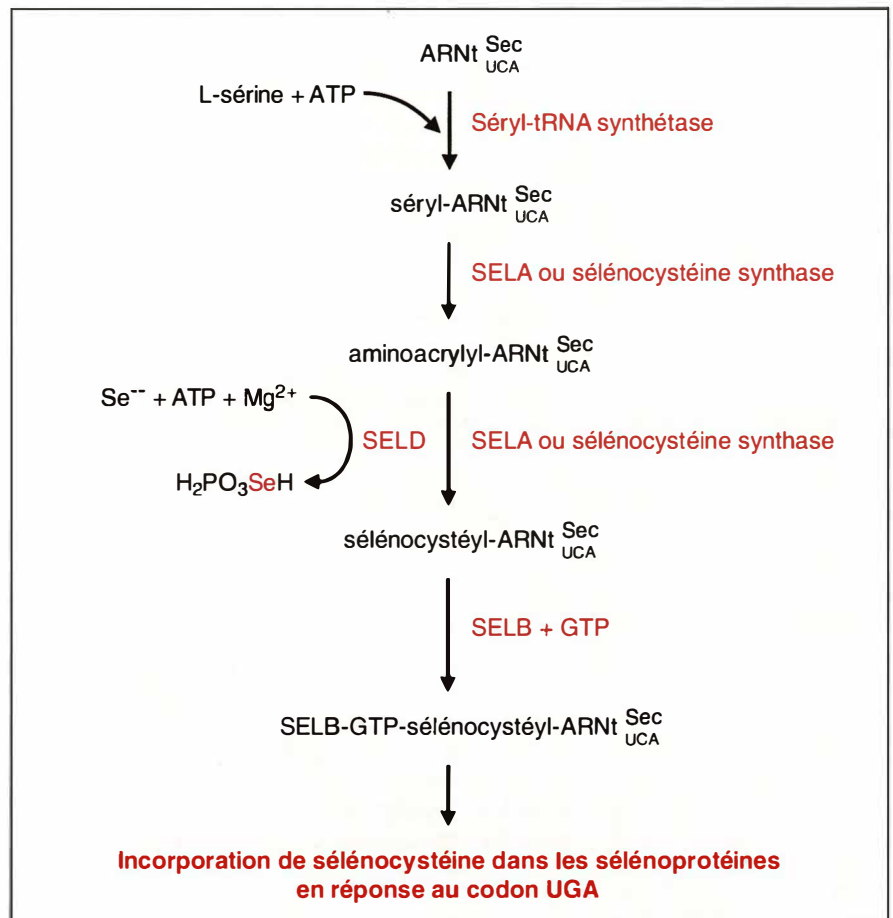


Figure 3. Mécanisme d'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines procaryotes.

Le produit du gène *selB* est un facteur d'élongation de la traduction particulier

Les ARNt canoniques chargés par l'un des vingt acides aminés standards vont former un complexe ternaire avec le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu et le GTP, conduisant au transfert de l'acide aminé sur le site A du ribosome. L'acide aminé est alors incorporé dans la chaîne peptidique naissante. Dans le cas de l'ARNt sélénocystéine, il apparaît à ce stade du mécanisme d'assimilation de sélénocystéine une nouvelle originalité du système. L'ARNt^{Sec} ne suit pas la voie classique mais est reconnu par un facteur d'élongation spécifique, produit du gène *selB*. Le facteur protéique SELB a un poids moléculaire de 69 kDa et est constitué de 614 acides aminés. Comme tous les facteurs d'élonga-

tion, il s'agit d'une protéine fixatrice de GTP, dans le rapport d'une molécule de GTP fixée par molécule de SELB. Les 244 acides aminés de son extrémité N-terminale présentent de fortes similitudes de séquence avec la région homologue de EF-Tu. SELB présente également des caractéristiques particulières. L'extrémité C-terminale additionnelle, très chargée et légèrement acide, est propre au facteur SELB, ce qui explique que son poids moléculaire soit supérieur de 25 kDa à celui de EF-Tu [28].

Mécanisme général d'incorporation de sélénocystéine chez les procaryotes

L'étude des différents enzymes et facteurs protéiques procaryotes impliqués dans le mécanisme d'assimilation de sélénium sous forme de sélénocystéine a conduit à une com-

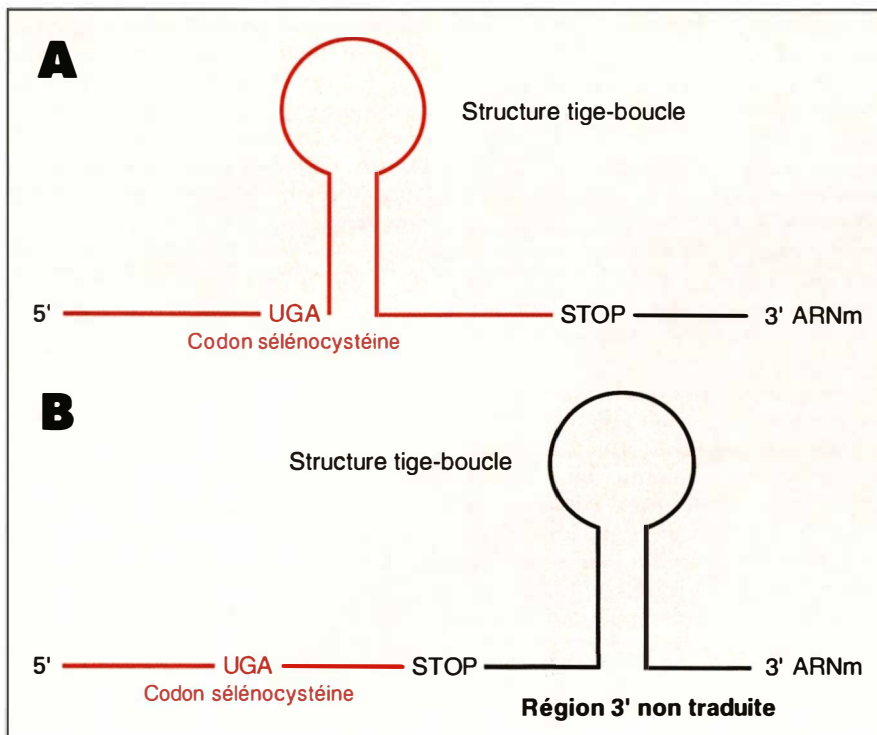


Figure 4. Localisation du motif d'insertion de sélénocystéine dans les ARN messagers de sélénoprotéines. A. Cas procaryote: le motif se trouve dans la région traduite de l'ARN messenger, directement en aval du codon UGA sélénocystéine. B. Cas eucaryote: le motif se trouve dans la région 3' non traduite de l'ARN messenger, à une distance pouvant se situer jusqu'à 1000 nucléotides du codon UGA sélénocystéine.

préhension assez précise des différentes étapes impliquées. La figure 3 les résume. L'acide aminé sérine est dans un premier temps chargé sur l'ARNt^{Scc} par la séryl-ARNt synthétase. La charge de l'ARNt sélénocystéine par la séryl-ARNt synthétase est cent fois moins efficace que celle d'un ARNt sérine [29], certainement en raison des caractéristiques structurales tout à fait particulières de cette molécule. Le résidu sérine fixé à l'ARNt^{Scc} est reconnu par la sélénocystéine synthase, produit du gène *selA* qui, avec l'aide d'une molécule de sélénium activée résultant d'une réaction catalysée par la protéine SELD, va transformer cet acide aminé en sélénocystéine. Finalement, un complexe ternaire GTP-SELB-sélénocystéyl-ARNt^{Scc} est formé, permettant l'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines en réponse au codon UGA.

m/s n° 8, vol. 11, août 95

Métabolisme du sélénium chez les eucaryotes supérieurs

Actuellement, le système eucaryote d'incorporation de sélénocystéine est loin d'être aussi bien déchiffré que celui des procaryotes. Cependant, quelques preuves énumérées ci-dessous valident la présence d'un système proche de celui mis en évidence chez les procaryotes. (1) Il existe un ARNt sélénocystéine eucaryote. Sa structure secondaire est connue et tout à fait originale [30], notamment par la longueur de l'hélice acceptrice et de l'hélice D (figure 2 B). Cet ARNt^{Scc} est ubiquitaire dans le règne animal, son gène est à copie unique et présente un mode de transcription particulier par l'ARN polymérase III [31, 32]. (2) Une sélénocystéine synthase de souris est partiellement purifiée à l'heure actuelle. De poids

moléculaire 500 kDa, elle semble être multimérique tout comme son homologue bactérienne [33]. (3) Des anticorps isolés chez des malades atteints d'une maladie autoimmune hépatique (hépatite chronique active) précipitent l'ARNt^{Scc} lié à une protéine de 48 kDa. Peut-être s'agit-il là du facteur d'élongation spécifique? [34]. Une protéine de 50 kDa, qui pourrait d'ailleurs être l'équivalent du facteur d'élongation SELB, a été partiellement purifiée à partir de foie de bœuf [35]. (4) Enfin, une protéine fonctionnellement équivalente à SELD a été obtenue lors de la purification de la sélénocystéine synthase et possède un poids moléculaire de 20 kDa [33].

Comment la cellule différencie-t-elle un codon UGA stop du codon UGA spécifiant l'acide aminé sélénocystéine ?

Chez *E. coli*, 28% des gènes se terminent par le codon TGA (UGA dans l'ARN messenger). Or, le génome de ce procaryote contient environ 1000 gènes. Il existe par conséquent 280 gènes se terminant par un codon TGA représentant 280 sites potentiels d'insertion de sélénocystéine. Comment la cellule différencie-t-elle un codon UGA stop du codon UGA spécifiant l'acide aminé sélénocystéine? En fait, la clé de l'énigme réside au niveau de la structure d'une région particulière des ARN messagers. Il a été démontré, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, que les ARN messagers de sélénoprotéines contiennent des régions structurées indispensables à l'insertion de sélénocystéine en réponse au codon UGA. La localisation de ces régions est cependant spécifique de chaque lignée évolutive.

Chez les procaryotes, le codon UGA sélénocystéine se trouve directement en amont d'une séquence particulière de 40 nucléotides qui adopte une structure secondaire en tige-boucle (figure 4). La séquence de la boucle est primordiale [36] puisque différentes expériences prouvent qu'elle interagit spécifiquement avec le facteur d'élongation SELB [29, 37].

En revanche, et de façon intéressante, l'incorporation de sélénocystéine chez les eucaryotes requiert la présence d'une séquence de 200 nucléotides localisée dans la région 3' non traduite des ARN messagers des sélénoprotéines (figure 4). Cette séquence se replie sous forme d'une tige-boucle qui diffère totalement en séquence et structure de l'élément tige-boucle procaryote (Walczak, Westhof, Carbon, Krol, manuscrit en préparation). Cependant, et de manière similaire à l'élément procaryote, des mutations dans la partie boucle de cette structure inhibent l'insertion de sélénocystéine [38].

Perspectives

Le rôle du sélénium, présent dans les glutathion peroxydases sous forme d'un acide aminé dont le mécanisme d'incorporation suit un mode tout à fait original, est indéniable dans la lutte contre les radicaux libres (impliqués notamment dans le vieillissement tissulaire ou le déclenchement présumé de certains cancers). L'administration médicale de sélénium se pratique déjà couramment. Un exemple frappant concerne la région du Keshan en Chine, caractérisée par une très faible teneur en sélénium dans les sols. Les enfants et les femmes enceintes furent les victimes principales d'une maladie foudroyante, une cardiomyopathie, qui a entraîné la mort de 10 millions d'individus en un siècle (80 % de mortalité parmi la population touchée par ce fléau) par suite d'une carence en sélénium dans leur régime alimentaire. A partir de 1978, une supplémentation systématique de l'alimentation en sélénite de sodium (Na_2SeO_3) a permis une éradication presque totale de la maladie. Un autre cas médical provenant d'observations pédiatriques relate de façon intéressante l'importance du sélénium. Des enfants atteints de phénylcétonurie, auxquels un régime appauvri en certains acides aminés doit être administré, présentaient alors un phénotype de carence en sélénium. Après maintes interrogations, il est apparu que l'alimentation quotidienne n'apportait plus la dose minimale de sélénium. Ces troubles sont désormais évités chez les enfants phénylcétonuriques par une supplé-

mentation systématique de leur régime en sélénium.

Le film de la biologie moléculaire de l'incorporation du sélénium que nous venons de voir se dérouler maintiendra encore un certain *suspense* chez les eucaryotes avant que ne soient connus tous les acteurs et l'attribution de leurs rôles respectifs. D'apparition récente dans l'évolution ou bien vestige des temps primordiaux où régnait une atmosphère terrestre réductrice propice à la stabilité du groupement séléniol très sensible à l'oxygène, il est actuellement difficile de trancher. En tout état de cause, cet aparté fascinant dans la synthèse protéique que constitue le transfert du sélénium dans les sélénoprotéines est le reflet, eu égard au nombre de gènes mis en jeu dans cette machinerie, de son rôle biologique crucial.

Gageons qu'à l'avenir, la compréhension de plus en plus précise de la machinerie d'incorporation de sélénocystéine permettra d'affiner les diagnostics médicaux des nombreuses maladies impliquant des radicaux libres et d'aider à leur disparition ■

TIRÉS À PART

A. Krol.

Summary

Selenium, selenoproteins: an alternate reading of the genetic code

Selenium is a trace element, the importance of which has become increasingly clear in the recent past. It is essentially found in proteins in the form of selenocysteine which is an aminoacid incorporated cotranslationally into proteins. Selenocysteine is not contained in the pool of natural aminoacids. Rather, its manufacturing and transfer to polypeptide chains are mediated by a complex, original machinery constituting a variation around the theme of protein synthesis. In bacteria, four gene products are involved to perform this function. These consist in: (1) an enzyme which activates the inorganic form of selenium into a phosphoselenoate compound acting as the selenium donor; (2) a selenocysteine tRNA which is charged by serine; (3) an enzyme which converts serine to selenocysteine on the tRNA; (4) lastly, a specific translation factor different from, but playing the role of elongation factor EF-Tu. In addition, and perhaps most fascinating, selenocysteine is encoded by a UGA codon (being

normally one of the three stop codons) lying immediately upstream from a stem-loop structure located in messenger RNAs coding for selenoproteins. In eukaryotes, much less is known. However, it looks as if the mechanism parallels that of bacteria, with the interesting peculiarity that the stem-loop structure resides in the 3' untranslated region of the mRNA, not within the coding region. Eight types of selenoproteins have been identified in prokaryotes and eukaryotes. In eukaryotes, they include the glutathione peroxidase family and the type I tetraiodothyronine 5'-deiodinase. The former constitutes antioxidant enzymes acting as scavengers against free radicals, the latter being involved in deiodination of thyroxine. These two examples, with more in the text, illustrate nicely the crucial role devoted to selenium in the protection of biological macromolecules against oxidative damages, on the one hand, and mediating metabolic and developmental effects, on the other.