



Étude fonctionnelle et structurale des spectrines - Découverte de l'hepcidine, une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer

Gaël Nicolas

► To cite this version:

Gaël Nicolas. Étude fonctionnelle et structurale des spectrines - Découverte de l'hepcidine, une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. tel-00285035

HAL Id: tel-00285035

<https://theses.hal.science/tel-00285035>

Submitted on 4 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

NOTICE DE TITRES ET TRAVAUX

en vue de l'obtention de

L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

présentée et soutenue publiquement
le 22 mai 2008

par

Gaël NICOLAS

chargé de recherche à l'INSERM

Étude fonctionnelle et structurale des spectrines
Découverte de l'hepcidine,
une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer

JURY

P^r Patrick VICART, *Président*
D^r Faouzi BAKLOUTI, *Rapporteur*
P^r Olivier HERMINE, *Rapporteur*
D^r Carole BEAUMONT, *Examineur*
D^r Sophie VAULONT, *Examineur*

Unité 665 de l'INSERM
GIP INTS
6, RUE ALEXANDRE CABANEL
75739 PARIS CEDEX 15
gael.nicolas@inserm.f

REMERCIEMENTS

Je remercie les directeurs des laboratoires et les responsables d'équipes qui m'ont accueilli, fait confiance et soutenu : Carole BEAUMONT, Yves COLIN, Nicolette FARMAN, Bernard GRANDCHAMP, Axel KAHN, Marie-Christine LECOMTE, Caroline LE VAN KIM et Sophie VAULONT.

Je remercie les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger mon parcours scientifique.

Je remercie les nombreux collègues chercheurs, techniciens, ingénieurs et étudiants qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire avec toujours beaucoup de sympathie ou fait partager leur compétence dans de nombreux domaines et permis de toujours progresser.

À Sandrine, mon épouse.

À mes parents.

« Merci » aux milliers de souris sacrifiées « pour » ces recherches...

Résumé

Mes premiers travaux de recherche, me permettant de soutenir une thèse de doctorat en décembre 1999, ont été effectués au sein du laboratoire du professeur Bernard GRANDCHAMP (unité 409 de l'INSERM) sous la direction du docteur Marie-Christine LECOMTE. Mon travail s'est intégré dans l'étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes, principalement le site de tétramérisation et le domaine SH3. Concernant la tétramérisation de la spectrine érythroïde j'ai identifié les régions minimales nécessaires et suffisantes pour former le tétramère puis j'ai mis en évidence une relation entre certaines mutations de la spectrine associées à des anomalies membranaires du globule rouge et la sévérité du défaut de formation du tétramère. J'ai ensuite identifié plusieurs ligands du domaine SH3 de la spectrine non érythroïde. L'un d'entre eux m'a permis de définir une régulation de la protéolyse ciblée de cette spectrine faisant intervenir un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Ma formation initiale fut donc celle d'un biochimiste que j'ai étendue peu à peu vers la biologie moléculaire et la biologie cellulaire.

Puis, souhaitant acquérir les connaissances nécessaires au développement de modèles murins, j'ai décidé d'effectuer mon stage post-doctoral à l'Institut COCHIN (unité 567 de l'INSERM) dans une équipe co-dirigée par le docteur Sophie VAULONT et le professeur Axel KAHN. Je me suis ainsi familiarisé avec la souris comme « outil » de recherche (gestion d'un élevage, établissement de nouvelles lignées, génotypage, phénotypage). Je travaillais initialement sur le métabolisme du glucose mais j'ai complètement réorienté ma thématique de recherche au bout d'un an pour finalement identifier et caractériser une hormone, l'hepcidine, contrôlant l'homéostasie du fer.

J'ai été nommé chargé de recherche de grade 2 dans l'unité 409 de l'INSERM en octobre 2002 pour y développer une souche de souris exprimant une spectrine non érythroïde résistante à des mécanismes de protéolyse ciblée. Il s'agit donc toujours d'appréhender certaines fonctions des spectrines mais dans un contexte *in vivo*. En janvier 2005 j'ai intégré l'unité 665 de l'INSERM dirigée par Yves COLIN afin de poursuivre ce projet. Aujourd'hui, je suis chargé de recherche de grade 1.

Le chapitre scientifique de ce mémoire est divisé en deux parties distinctes : la première traite de mon travail sur la spectrine tandis que la seconde porte sur l'hepcidine. Chaque partie est composée d'une introduction au sujet suivie d'un résumé des travaux que j'ai effectués et/ou dirigés. J'aborde également dans ce chapitre un nouveau projet que je développe et qui concerne la protéine Lu/B-CAM.

Rapport sur le dossier de Monsieur NICOLAS Gaël en vue de l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches de l'Université Paris-Diderot.

Monsieur Nicolas Gaël est âgé de 37 ans et a obtenu sa thèse de doctorat d'Université à Paris 7 en 1999 dans la spécialité « Biologie des cellules sanguines » avec la mention très honorable avec félicitations du jury.

Monsieur Nicolas a débuté ses travaux de recherche en 1993 au sein du laboratoire U409 de l'INSERM dirigée par le Pr B. Grandchamp sous la direction de Marie-Christine Lecomte jusqu'en 1999. Ses travaux de recherche ont porté sur l'étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non-érythroïdes : site de tétramérisation et domaine SH3. Au cours de ce travail, le candidat a identifié les régions minimales nécessaires à la tétramérisation et a mis en évidence une relation entre des mutations de la spectrine associées à des anomalies membranaires du globule rouge et la sévérité du défaut de formation du tétramère. Puis Monsieur Nicolas a déterminé plusieurs ligands du domaine SH3 de la spectrine non-érythroïde dont l'état de phosphorylation régule l'activité d'une calpaïne. L'ensemble des travaux effectués par le candidat ont nécessité le recours à des approches expérimentales dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire ainsi que différentes approches de Biochimie.

De 1999 à 2002, Monsieur Nicolas Gaël a rejoint l'Unité INSERM U 567 dirigée par le Pr Axel Kahn et a travaillé sur l'identification de l'hepcidine en tant qu'hormone régulant l'homéostasie du fer chez les mammifères. Au cours de ce post doc, Monsieur Nicolas Gaël s'est initié à l'utilisation des modèles animaux et notamment de la souris afin de développer une thématique de recherche sur le contrôle de l'homéostasie du fer. Au cours de ce travail, le candidat initialement focalisé sur la fonction du facteur de transcription USF2 dans un modèle de souris invalidée pour ce facteur a remarqué que les animaux KO avaient un foie et une rate complètement noirs à 18 mois alors que ces organes chez les animaux témoins ont une coloration rosée. Il a alors été démontré que ces souris KO ont une surcharge en fer hépatique et pancréatique mais une absence de fer splénique qui sont des phénotypes caractéristiques de l'hémochromatose génétique. L'utilisation de banques soustractives a permis au candidat de mettre en évidence que le foie des souris KO n'exprimait plus du tout une protéine l'Hepcidine qui avait été publiée par une autre équipe comme agent antimicrobien. Monsieur Gaël Nicolas a finalement démontré que cette protéine est en fait une hormone contrôlant l'homéostasie du fer. Ce post doc a donc permis au candidat d'acquérir une formation dans l'utilisation des modèles animaux.

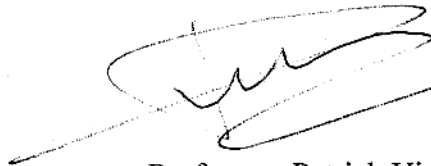
De 2002 à 2005, Monsieur Nicolas est nommé CR2 à l'INSERM et rejoint son laboratoire de thèse l'Unité INSERM 409 au sein duquel il développe un sujet de recherche sur l'étude in vivo de la dynamique du squelette membranaire de spectrine. Le sujet développé par monsieur Nicolas concerne la réalisation d'une souche de souris exprimant une spectrine non-érythroïde résistante à des mécanismes de protéolyse ciblée. Ce travail est la continuation du projet de thèse mais avec une approche sur modèle murin. Depuis 2005, Monsieur Nicolas a rejoint l'Unité INSERM U665 dirigée par Mr Yves Colin et continue son travail de recherche sur la spectrine.

Il est à noter que l'ensemble des travaux présentés par le candidat ont donné lieu à 25 publications dans des revues internationales à comité de lecture de bon ou très bon niveau dont 11 sont signées en premier auteur par Monsieur Nicolas. D'autre par, le candidat a

encadré différents étudiants de DEA ou de M2 avec lesquels il cosigne un certain nombre d'articles.

En conclusion, Monsieur Gaël Nicolas remplit donc toutes les conditions pour postuler à l'Habilitation à Diriger les Travaux de recherche et je donne donc un avis très favorable à cette candidature.

Paris le 11 Mars 2008

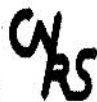


Professeur Patrick Vicart





Lyon 1



CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



CGMC; CNRS UMR 5534
Bat. Gregor Mendel
Université Lyon 1
16, rue R. Dubois
69622 Villeurbanne Cedex
France

F. BAKLOUTI, Ph.D.
Tel.: (33) 4 72 43 29 28
Fax: (33) 4 72 44 26 85
e-mail: faouzi.baklouti@univ-lyon1.fr
<http://www.cgmc.univ-lyon1.fr>

Rapport sur le mémoire du Dr. Gaël NICOLAS pour l'obtention du Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

Titre: Etude fonctionnelle et structurale des spectrines

Découverte de l'hepcidine, une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer

Dr. Gaël NICOLAS présente ses travaux et projets en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches. Dr. NICOLAS est Chargé de Recherche 1^{ère} classe à l'INSERM. Il a été recruté dans l'équipe dirigée par le Dr. Marie-Christine LECOMTE, équipe évoluant aujourd'hui au sein de l'unité INSERM #665, dirigée par le Dr. Yves COLIN. Dr. NICOLAS a choisi depuis peu d'infléchir son projet de recherche, et de rejoindre une autre équipe de la même unité, dirigée par le Dr. Caroline LE VAN KIM.

Dans une 1^{ère} partie, Dr. NICOLAS expose son cursus universitaire, ses activités de recherche, d'enseignement et d'encadrement, et sa liste de productions scientifiques. Dr. NICOLAS a effectué son DEA puis sa Thèse de Doctorat sous la direction du Dr. Marie-Christine LECOMTE. Cette période l'a confronté aux aspects indissociables de la recherche fondamentale et de la recherche médicale. Il a réussi à décortiquer l'effet de mutations pathologiques sur la fonction de tétramérisation de la spectrine érythrocytaire. Ensuite, il s'est penché sur la fonction des spectrines dans les cellules nucléées. L'approche du double hybride introduite dans l'équipe de Dr. Marie-Christine LECOMTE, lui permit d'identifier une interaction entre la tyrosine phosphatase LMPTP et le domaine SH3 de la spectrine α II. Cette interaction semble moduler le clivage de la spectrine par les calpaïnes. Il contribua à la caractérisation d'autres partenaires des régions SH3 et CCC de la spectrine. Dr. NICOLAS co-signa pas moins d'une dizaine d'articles, publiés dans les meilleures revues de biochimie et d'hématologie. Il participa par ailleurs aux enseignements théoriques dans le cadre d'une formation continue sur l'approche "double hybride", pilotée par Dr. Marie-Christine LECOMTE.

Après sa Thèse, Dr. NICOLAS effectue un stage post-doctoral sous la direction du Dr. Sophie VAULONT. Lors de ce stage, il installe son approche de prédilection, les modèles "*knockin*" et "*knockout*" de souris. Voulant au départ étudier le rôle du facteur de transcription USF2, il se trouve accidentellement face à des souris invalidées pour l'expression de l'hepcidine et



Lyon 1

CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUECGMC; CNRS UMR 5534
Bat. Gregor Mendel
Université Lyon 1
16, rue R. Dubois
69622 Villeurbanne Cedex
FranceF. BAKLOUTI, Ph.D.
Tel.: (33) 4 72 43 29 28
Fax: (33) 4 72 44 26 85
e-mail: faouzi.baklouti@univ-lyon1.fr
<http://www.cgmc.univ-lyon1.fr>

développant plutôt un tableau d'hémochromatose sévère et précoce. Son travail est dès lors recentré autour du mécanisme moléculaire entraînant une surcharge en fer chez ces souris et, plus largement, autour du rôle de l'hepcidine dans l'homéostasie du fer. Des découvertes majeures ont jalonné ce stage post-doctoral: l'hepcidine agirait en inhibant le transport du fer au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal et du placenta, et en inhibant son recyclage par les macrophages. Ces fonctions seraient dose-dépendantes. Son expression serait activée lors d'épisodes inflammatoires engendrant des anémies secondaires. Des expériences de transfert de gène *in vivo* chez les mêmes souris accidentellement déficientes en cette protéine, rétablit l'homéostasie du fer. Ces travaux ont été confrontés aux études menées sur les hémochromatoses humaines, ce qui a permis de placer les défauts de l'hepcidine au coeur des bases moléculaires des hémochromatoses. Reste à comprendre l'expression différentielle de l'hepcidine dans des tissus non hépatiques des souris *usf2*^{-/-}. L'ensemble de ce travail a été publié et reconnu par des revues prestigieuses.

Fort de son savoir faire en transgénèse, Dr. NICOLAS retourne dans l'équipe du Dr. Marie-Christine LECOMTE, défend un projet centré sur un modèle murin invalidé pour la région portant les sites de protéolyse par les calpaïnes et la caspases et le site de liaison à la calmoduline, et obtient pour ce projet un poste de Chargé de Recherche INSERM. Malgré un travail d'une grande minutie et de rigueur, les souris invalidées ne laissent pas apparaître de phénotype particulier, outre les phénotypes biochimiques attendus: résistance à la protéolyse. Ce travail fût l'occasion pour le Dr. NICOLAS d'encadrer un travail de Thèse. Une publication majeure rassemble les données obtenues dans cette étude; Dr. NICOLAS y apparaît en dernier signataire.

Loin d'abandonner la piste d'un rôle physiologique de ce peptide CCC, Dr. NICOLAS propose, entre autres, un projet en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris, pour tester l'hypothèse d'un défaut de mémorisation. Par ailleurs, il propose la création d'un autre modèle murin par introduction d'une mutation ponctuelle au niveau du domaine SH3. Cette mutation abolit les interactions de ce domaine avec ses partenaires dans des expériences *in vitro*, mais on voit mal la pertinence d'un tel modèle par rapport à un modèle où tout le domaine SH3 est retiré de la spectrine.

Toujours armé de la technologie "transgénèse", Dr. NICOLAS propose de caractériser le rôle de l'antigène Lu/B-CAM dans les cellules non érythroïdes, en particulier dans le rein et l'intestin. En effet, les souris *Lu*^{-/-} présentent des anomalies structurales au niveau des membranes basales



Lyon 1

CNRS

CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



CGMC; CNRS UMR 5534
Bat. Gregor Mendel
Université Lyon 1
16, rue R. Dubois
69622 Villeurbanne Cedex
France

F. BAKLOUTI, Ph.D.
Tel.: (33) 4 72 43 29 28
Fax: (33) 4 72 44 26 85
e-mail: faouzi.baklouti@univ-lyon1.fr
<http://www.cgmc.univ-lyon1.fr>

exprimant la laminine 521. Le rôle in vivo et ex vivo sur l'adhérence, ainsi que la recherche des partenaires de Lu/B-CAM dans les cellules non érythroïdes seront parmi les problématiques abordés dans ce projet. Dr. NICOLAS intègre une nouvelle équipe d'accueil (dirigée par le Dr. Caroline LE VAN KIM) et présente un projet qui cadre avec les thématiques de cette équipe. Reste à éclaircir le cadre dans lequel le projet sur la spectrine sera mené.

En conclusion, Dr. NICOLAS réunit tous les critères d'excellence, de capacité de conception et de réalisation d'un projet de recherche, de rigueur et de curiosité scientifiques. Il possède une connaissance d'expert dans les 2 thématiques "spectrine" et "hepcidine". En témoignent des recueils bibliographiques bien ciblés, bien rédigés et où les données scientifiques ne sont pas simplement rapportées mais aussi bien commentées. Il a prouvé par ailleurs ses capacités d'encadrement. C'est donc sans hésitation que j'émetts un avis favorable à la soutenance publique des travaux du Dr. NICOLAS, en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches.

Villeurbanne le
Faouzi BAKLOUTI

le 02. 2008



**GROUPE HÔPITALIER
NECKER-ENFANTS MALADES**
149, rue de Sèvres
75743 PARIS Cedex 15
Tél. : 33 1.44 49 40 00
Bâtiment Sèvres (Secteur violet)
Porte 1 hospitalisation
Porte : 3 consultation (rez de chaussée)

**SERVICE
HEMATOLOGIE ADULTE
CENTRE AGREE DE GREFFES DE
MOELLE**

**CENTRE DE REFERENCE DES
MASTOCYTOSES
CENTRE DE REFERENCE DES DEFICITS
IMMUNITAIRES**

PR BRUNO VARET, chef de service.
Secrétariat Médical : 01.44.49.52.82
Secrétariat universitaire : 01.44.38.15.67
Télécopie : 01.44.49.52.80
Pr Agnès BUZYN
Dr Felipe SUAREZ
Dr Natacha MAILLARD
Secrétariat 01.44.49.52.86
Dr Olivia CHANDESRI
Pr Olivier HERMINE
Secrétariat 01.44.49.52.83
Dr Richard DELARUE
Dr Marie-Thérèse RUBIO
Dr Benedicte DEAU-FISCHER
Secrétariat 01.44.49.52.96

Consultant RDV au 01.44.49.54.16
Dr Achille AOUBA
Dr Coralie BELANGER
Dr François LEFRERE
Dr Vassili SOUMELIS

Mme Evelyne GERAUD-COMPAIN
Psychologue
01.44.49.44.76
Mme Françoise PEIGNEY
Cadre Supérieur Infirmier
01.44.49.52.85
Mme Claude TOURE
Assistante sociale
01.44.49.52.89

SOINS INTENSIFS :
Accueil : 01.44.49.52.99
Poste de soins : 01.44.49.52.99
Cadre Infirmier
Philippe FACCHINETTI
01.44.49.52.95
HEMATOLOGIE GENERALE
Accueil 01.44.49.52.87
Poste de soins 01.44.49.52.88
Cadre Infirmier
Valérie GALAND
01.44.49.51.99
HOPITAL DE SEMAINE et JOUR
Télécopie : 01.44.49.52.90
Accueil 01.44.49.52.97
Cadre Infirmier : Mme Chantal
BAUCHETET
01.44.49.52.98

Consultation 01.44.49.54.16
Mail : rdv.hematologie@nck.aphp.fr

RAPPORT DE MEMOIRE D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES DU DOCTEUR GAËL NICOLAS.

Etudes fonctionnelles et structurales des spectrines, découverte de l'Hepcidine une nouvelle hormone de l'homéostasie du fer.

Monsieur Gaël Nicolas âgé de 38 ans a reçu une formation universitaire de recherche à l'Université de Paris VII couronnée par une thèse de sciences suivie d'un stage post doctoral à l'institut Cochin. Il a été recruté en 2002 à l'INSERM comme chargé de recherches de deuxième classe, et a été promu première classe en 2006.

Au cours de ce cursus, le docteur Nicolas a montré une activité de recherche originale et productive. De façon remarquable, Monsieur Nicolas a su adapter ses orientations scientifiques en fonction des résultats expérimentaux obtenus qui n'étaient pas toujours en faveur des hypothèses posées initialement.

En résumé, ses sujets de recherches ont d'un premier temps porté sur les fonctions de la spectrine dans les érythrocytes, puis sur dans les cellules nucléées. Ce travail a essentiellement porté sur les caractéristiques fonctionnelles et structurales des spectrines notamment sur le site de tétramérisation et le domaine SH3. Ce travail a permis d'identifier des régions importantes dont les mutations sont responsables d'anomalies des membranes des globules rouges. La deuxième partie du travail a permis de montrer que le domaine SH3 est capable d'interagir avec une tyrosine phosphatase qui module le clivage de cette spectrine par les calpaines et les caspases.

Au retour de son travail post doctoral, ce travail a été poursuivi avec des études in-vivo, pour étudier l'importance des sites de protéolyse de la spectrine, en étudiant des souris invalidées pour ces sites. Les résultats ont pu montrer l'absence de phénotype in-vivo. Cependant le docteur Gaël Nicolas fait l'hypothèse que, les modifications phénotypiques pourraient être dévoilées sur des aspects plus subtils notamment du fonctionnement cérébral, et en particulier de la mémoire. Un projet est en cours pour tester cette hypothèse.

Au cours de son travail de post doctorant effectué sous la codirection du Docteur Sophie Vaultont, et du Docteur Axel Khan il a pu mettre en évidence le rôle majeur de l'Hepcidine dans l'homéostasie du fer. Cette découverte tout à fait remarquable a eu un impact majeur sur la physiologie, et la physiopathologie humaine. De façon notable la découverte de l'hepcidine a été faite suite à une observation inattendue et de souris invalidée pour le gène USF2, initialement fabriqué pour étudier la régulation de la glycémie et qui en fait étaient délaitées du gène de l'Hepcidine. L'invalidation accidentelle de l'Hepcidine dans ce model murin a donc permis cette découverte. Ce travail a

EN CAS D'URGENCE
Hématologue de garde 24h /24h
01.44.49.40.00 BIP 741



**GROUPE HOSPITALIER
NECKER-ENFANTS MALADES**
149, rue de Sèvres
75743 PARIS Cedex 15
Tél. : 33 1.44 49 40 00
Bâtiment Sèvres (Secteur violet)
Porte 1 hospitalisation
Porte : 3 consultation (rez de chaussée)

**SERVICE
HEMATOLOGIE ADULTE
CENTRE AGREE DE GREFFES DE
MOELLE**

**CENTRE DE REFERENCE DES
MASTOCYTOSES
CENTRE DE REFERENCE DES DEFICITS
IMMUNITAIRES**

PR BRUNO VARET, chef de service.
Secrétariat Médical : 01.44.49.52.82
Secrétariat universitaire : 01.44.38.15.67
Télécopie : 01.44.49.52.80
Pr Agnès BUZYN
Dr Felipe SUAREZ
Dr Natacha MAILLARD
Secrétariat 01.44.49.52.86
Dr Olivia CHANDESRIS
Pr Olivier HERMINE
Secrétariat 01.44.49.52.83
Dr Richard DELARUE
Dr Marie-Thérèse RUBIO
Dr Benedicte DEAU-FISCHER
Secrétariat 01.44.49.52.96

Consultant RDV au 01.44.49.54.16
Dr Achille AOUBA
Dr Coralie BELANGER
Dr François LEFRERE
Dr Vassili SOUMELIS

Mme Evelyne GERAUD-COMPAIN
Psychologue
01.44.49.44.76
Mme Françoise PEIGNEY
Cadre Supérieur Infirmier
01.44.49.52.85
Mme Claude TOURE
Assistante sociale
01.44.49.52.89

SOINS INTENSIFS :
Accueil : 01.44.49.52.99
Poste de soins : 01.44.49.52.99
Cadre Infirmier
Philippe FACCHINETTI
01.44.49.52.95
HEMATOLOGIE GENERALE
Accueil 01.44.49.52.87
Poste de soins 01.44.49.52.88
Cadre Infirmier
Valérie GALAND
01.44.49.51.99
HOPITAL DE SEMAINE et JOUR
Télécopie : 01.44.49.52.90
Accueil 01.44.49.52.97
Cadre Infirmier : Mme Chantal
BAUCHETET
01.44.49.52.98

Consultation 01.44.49.54.16
Mail : rdv.hematologie@nck.aphp.fr

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS

été extrêmement bien exploité d'un point de vue physiopathologique, et thérapeutique dans des modèles murins.

Grace à ses connaissances fondamentales biochimiques, de biologie cellulaire et d'analyses de souris transgéniques, Monsieur Gaël Nicolas se propose dans l'avenir d'étudier au sein de l'unité du Docteur Yves Colin INSERM U665 dans le groupe de Caroline Le Van Kim, le rôle de la protéine LU/B-CAM dans les cellules non érythroïdes. Ce projet de recherche s'inscrit à la fois dans la continuité des travaux initiaux sur les spectrines érythroïdes, et non érythroïdes. L'antigène LU est en effet exprimé sur les globules rouges, mais aussi sur des cellules en dehors du compartiment érythroïde, et en particulier le rein et l'intestin. Le phénotype de ces souris montre des anomalies structurales au niveau des membranes basales, des cellules rénales et intestinales. Ce projet se propose de mieux caractériser ces anomalies phénotypique, et d'en déterminer les mécanismes moléculaires.

Tous ces projets de recherche ont permis de nombreuses publications (24) d'excellente qualité avec un impact moyen corrigé en fonction de la position de Monsieur Gaël Nicolas à 48,5. Dix publications sont signées en premier auteur, et une publication en dernier auteur. L'impact facteur moyen de ces publications est très élevé à 9,3.

Ces activités de recherche se sont toujours intégrées dans un travail d'équipe où Monsieur Gaël Nicolas a eu un rôle d'encadrant d'étudiants à différents niveaux de leur cursus : techniciens, DESS d'ingénierie, DEA de physiologie, ingénieurs de recherche, M2 de Master de sciences, et de santé.

Au total, l'activité scientifique de Monsieur Gaël Nicolas est originale et bien qu'ayant portée sur des sujets différents, reste très cohérente. Le bagage expérimentale, est très complet touchant aux aspects de biochimie fondamentale la physiologie, et de physiopathologie in-vivo chez la souris. Le projet de recherche d'avenir est prometteur sur le rôle des protéines de la membrane du globule rouge dans les tissus non érythroïdes. Il ne fait aucun doute que les capacités d'encadrement de Monsieur Nicolas permettront la formation d'étudiants en thèse et de stagiaire post doctorant.

Au total j'approuve sans retenue la candidature de Monsieur Gaël Nicolas à la soutenance de son habilité à diriger des recherches.

Paris le 13 mars 2008

Professeur Olivier HERMINE
Service d'Hématologie
HOPITAL NECKER - ENFANTS MALADES
149, rue de Sèvres
Télécopie : 01 44 49 52 83
Secrétariat : 01 44 49 52 83
Hématologue de garde 24h/24h
01.44.49.40.00 BIP 741

SOMMAIRE

Chapitre 1 Titres, activités & publications	5
1. Curriculum Vitæ	5
1.1. Diplômes et titres universitaires.....	5
1.2. Expériences de recherche	5
1.3. Laboratoires d'accueil et thèmes de recherche.....	6
2. Activités d'encadrement	6
3. Activités d'enseignement	7
4. Articles – Ouvrages – Communications	7
4.1. Revues scientifiques à comité de lecture	7
4.2. Autres publications	9
4.3. Brevets d'invention	12
4.4. Communiqués de presse.....	12
4.5. Communications orales ou affichées à des réunions nationales et internationales.....	12
4.6. Prix.....	13
Chapitre 2 – Travaux	14
Première partie – À propos de la spectrine	15
1. Introduction sur le squelette membranaire et les spectrines.....	15
1.1. Définition du squelette membranaire.....	15
1.2. Le squelette membranaire dans le globule rouge : un modèle simple.....	15
1.3. Stabilité et propriétés dynamiques du squelette érythrocytaire.....	16
1.4. Structure générale	17
1.5. Les spectrines dans les cellules nucléées	21
1.6. Les spectrines des cellules nucléées ont de nombreux partenaires.....	22
1.7. La spectrine non érythroïde est spécifiquement dégradée par des protéases	22
1.8. Les fonctions proposées au clivage de la spectrine non érythroïde... ..	24
1.9. Un pré-requis pour l'endocytose ?	25
1.10. Le développement neuronal	25
1.11. La spectrine et l'ischémie.....	25
1.12. Spectrine et maladie de Gougerot-Sjögren	26
1.13. Pathologies liées aux mutations des spectrines	26

2. Résultats	30
2.1. Étude fonctionnelle et structurale du site de tétramérisation de la spectrine : effet de mutations associées à des elliptocytoses héréditaires	30
2.2. Étude fonctionnelle du domaine SH3 de la spectrine α II	32
2.3. Étude in vivo de la dynamique du squelette membranaire de spectrine.....	34
3. Projets et perspectives.....	37
3.1. Les souris Spna2 R/R peuvent-elles avoir un défaut de mémorisation ?	38
3.2. Effet hypomorphe de l'allèle L3	39
3.3. Compensation par la chaîne β	39
3.4. Maladie de Gougerot-Sjögren	39
3.5. Le rôle in vivo du domaine SH3	40
3.6. Le rôle ex vivo du domaine SH3	40
3.7. Infection par une souche d'E. coli entéro-agrégative	41
3.8. Exploration de la fonction rénale des souris mutantes.....	41
Deuxième partie – À propos de l'hepcidine	43
1. Introduction sur l'homéostasie du fer	43
1.1. Mécanismes de l'absorption du fer alimentaire	44
1.2. Le devenir du fer entérocytaire.....	44
1.3. Régulation de l'absorption intestinale de fer	45
1.4. Le modèle de régulation de l'absorption intestinale de fer par programmation des cellules de la crypte	46
1.5. Régulation post-transcriptionnelle par les système IRE/IRP.....	47
1.6. L'hémochromatose, une absorption de fer mal contrôlée	48
2. Résultats	49
2.1. Première hypothèse	49
2.2. Un coup de pouce du hasard	50
2.3. Finalement... le rôle régulateur de l'hepcidine	51
2.4. L'hepcidine comme traitement des surcharges en fer	54
2.5. Hpcidine et pénétrance de l'hémochromatose	55
2.6. Le modèle de régulation de l'absorption intestinale de fer par l'entérocyte mature via l'hepcidine.....	55
2.7. Conclusions	56
Nouvelle thématique – Rôle de Lu/BCAM dans l'organisation des tissus à l'aide d'un modèle murin d'inactivation du gène Lu.....	58
Rôle fonctionnel de Lu/BCAM dans le rein	59
Rôle de l'interaction Lu avec la laminine 521.....	59
Une forme sécrétée de Lu ?.....	59
Financement de nos recherches.....	60

Références	62
Annexe Principales publications sélectionnées	69
Article 1.....	69
Article 2.....	81
Article 3.....	93
Article 4.....	107
Article 5.....	115

FIGURES

Figure 1 <i>Image du squelette membranaire de globule rouge en microscopie électronique</i>	16
Figure 2 <i>Représentation schématique de la membrane érythrocytaire et du squelette membranaire</i>	17
Figure 3 <i>Architecture générale de la spectrine αII</i>	18
Figure 4 <i>Formation du dimère $\alpha\beta$ et du tétramère de spectrine $(\alpha\beta)_2$</i>	20
Figure 5 <i>Représentation schématique du site de tétramérisation</i>	21
Figure 6 <i>Représentation schématique des unités répétitives 9 et 10 de la chaîne αII</i>	23
Figure 7 <i>L'absorption du fer a lieu au niveau des entérocytes situés au sommet des villosités duodénales</i>	45
Figure 8 <i>Schéma simplifié de l'absorption du fer alimentaire par l'entérocyte mature</i>	46
Figure 9 <i>Régulation post-transcriptionnelle par les protéines IRP</i>	48
Figure 10 <i>Surcharge en fer des souris $Usl2^{-/-}$</i>	50
Figure 11 <i>L'hépcidine agit sur les entérocytes et les macrophages</i>	51
Figure 12 <i>Rôle de l'hépcidine dans l'homéostasie des mouvements de fer</i>	57

Chapitre 1

TITRES, ACTIVITÉS & PUBLICATIONS

1. CURRICULUM VITÆ

Gaël NICOLAS, PhD :

né le 21 avril 1971 à PARIS 12^e arrondissement.

Adresse : INSERM U665
GIP INTS
6 RUE ALEXANDRE CABANEL
75739 PARIS CEDEX 15

Téléphone : 01 44 49 30 00 (poste 32 02)

Télécopie : 01 43 06 50 19

Courriel : gael.nicolas@inserm.fr

1.1. ***DIPLÔMES ET TITRES UNIVERSITAIRES***

- 1999** DOCTORAT de l'université PARIS 7 : mention très honorable avec les félicitations du jury
Spécialité : biologie des cellules sanguines
Sujet : Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes – site de tétramérisation et domaine SH3
Direction : Marie-Christine LECOMTE.
- 1994** DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES de l'université PARIS 7 : mention très bien et major de la promotion
Spécialité : biologie des cellules sanguines
Direction : Marie-Christine LECOMTE.

1.2. ***EXPÉRIENCES DE RECHERCHE***

- 2006** Chargé de recherche de grade 1.
- 2002** Chargé de recherche de grade 2.
- 1999-2002** Post-doctorat à l'Institut COCHIN (PARIS).
- 1995-1999** Thèse de doctorat de l'université PARIS 7 (interruption d'une année pour le service national).

1.3. LABORATOIRES D'ACCUEIL ET THÈMES DE RECHERCHE

- 2005-2008** Unité de recherche n°665 de l'INSERM (directeur : Yves COLIN)
Étude *in vivo* de la dynamique du squelette membranaire de spectrine.
- 2002-2005** Unité de recherche n°409 de l'INSERM (directeur : Bernard GRANDCHAMP)
Étude *in vivo* de la dynamique du squelette membranaire de spectrine.
- 1999-2002** Unité de recherche n°567 de l'INSERM (directeur : Axel KAHN)
Identification de l'hepcidine en tant qu'hormone réglant l'homéostasie du fer des mammifères.
- 1993-1999** Unité de recherche n°409 de l'INSERM (directeur : Bernard GRANDCHAMP)
Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes : site de tétramérisation et domaine SH3.

2. ACTIVITÉS D'ENCADREMENT

Je suis dans les laboratoires de recherche INSERM à plein temps depuis 1993 (avec un an d'interruption pour effectuer mon service national). Dès mon travail de doctorat j'ai commencé un travail de codirection :

1. Luca GALLUZZI (directeur d'encadrement : Marie-Christine LECOMTE) est venu d'Italie pour s'initier à la biologie moléculaire et à l'expression de peptides recombinants. J'ai assuré la partie liée à la biologie moléculaire. Nous cosignons deux articles ensemble (1, 2).
2. Sandrine MATIVET (responsable de stage : Sophie VAULONT), lors de son DESS Ingénierie Génomique fonctionnelle (Universités Paris VII et Évry), a travaillé avec moi sur la caractérisation des souris transgéniques surexprimant l'hepcidine (3).
3. Lydie VIATTE (responsable de stage : Sophie VAULONT), lors de son DEA de Physiologie du développement et de la différenciation fonctionnelle (Université Paris Diderot Paris VII) sur l'hepcidine. Nous cosignons ensemble sept publications (4-10).
4. Colette GALAND, ingénieur de recherche à l'INSERM que j'ai dirigée pour fabriquer la construction qui a servi à introduire la délétion de la région CCC dans la spectrine α II. Colette GALAND, aujourd'hui à la retraite, n'a pas souhaité être signataire de l'article princeps sur ce modèle (11) après son départ.
5. Fleur MEARY, lors de son M2 du Master Sciences Santé et Applications de l'Université Paris VII-Paris V (M2 mention Génétique). Le classement obtenu lors de son stage – 14^e sur 74 – lui a permis de décrocher une bourse de thèse. De plus nous cosignons la publication sur le modèle murin spectrine (11).
6. Christophe FERREIRA, animalier à la faculté de médecine Xavier BICHAT (11).
7. Éric COUCHI, animalier à la faculté de médecine Xavier BICHAT. Éric travaille actuellement avec moi sur le projet d'étude de la mémorisation et du comportement des souris exprimant une spectrine mutée dans la région CCC.

Il est donc à noter que tous les travaux que j'ai encadrés ont donné lieu à des publications. Par ailleurs ils ont toujours été particulièrement fructueux et enrichissants d'un point de vue humain.

3. ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Depuis 2006 Formation continue à l'INTS – UV15/initiation à la biologie moléculaire.

Depuis 2005 Enseignement : M2 de génétique – cours sur le métabolisme du fer et sa régulation.

2000-2002 Formation continue de l'INSERM – la technique du double hybride.

4. ARTICLES – OUVRAGES – COMMUNICATIONS

4.1. REVUES SCIENTIFIQUES À COMITÉ DE LECTURE

Analyse bibliométrique

(source INSERM – 24 octobre 2007)

- Nombre de citations PubMed entre 1997 et 2007 : 24
- Nombre total d'articles citant l'une de ces 24 publications : 1324
- ICm¹ : 55,17
- ICm corrigé selon la position de Nicolas G sur chaque article² : 48,56
- Indicateur moyen de position sur chaque article³ : 0,64
- « *Impact Factor* » moyen⁴ : 7,921
- « *Impact Factor* » moyen des publications avec Nicolas G en première ou dernière position⁴ : 9,333 (10 publications)
- Nombre d'articles dans le top 1 % de PubMed : 4
- Nombre d'articles dans le top 10 % de PubMed : 7
- Nombre d'articles dans le top 20 % de PubMed : 2
- Nombre d'articles dans le top 50 % de PubMed : 7
- Nombre d'articles sous la médiane : 4
- Facteur H depuis 1997⁵ : 13

¹ Calculé par le nombre total de citations / nombre total de publications.

² Calculé par la moyenne des IC x indice de position de Nicolas G sur chaque publication.

³ Une valeur de 1 correspond à la première ou à la dernière position sur la publication référencée ; une valeur de 0,5 correspond à la deuxième ou à l'avant dernière position sur la publication référencée ; une valeur de 0,25 correspond à toute autre position sur la publication référencée.

⁴ Attention l'IF utilisé pour ce calcul est celui de 2005 quelle que soit l'année de publication de l'article. Les résultats doivent être pris à titre indicatif.

⁵ Calculé par ISI Web of Science depuis 1981. Il correspond au nombre maximum d'articles qu'un chercheur a publié avec le maximum de citations.

Publications en premier ou en dernier auteur

1. MEARY F, METRAL S, FERREIRA S, ELADARI D, COLIN Y, LECOMTE MC et [NICOLAS G](#) (2007). Mice with a mutant α II-spectrin designed to resist to calpain cleavage question the importance of this process in vivo. *J. Biol. Chem.* **282**, 14226-14237.
2. [NICOLAS G](#), VAULONT S et KAHN A. Use of hepcidin for preparing a medicament for treating disorders of iron homeostasis. *Titre Officiel de Brevet* accordé le 30 janvier 2007 aux USA sous le n° 7 169 758.

3. NICOLAS G, ANDREWS NC, KAHN A et VAULONT S (2004). Heparin, a candidate modifier of the hemochromatosis phenotype in mice. *Blood*. **103**, 2841-2843.
4. NICOLAS G, VIATTE L, LOU DQ, BENNOUN M, BEAUMONT C, KAHN A, ANDREWS NC et VAULONT S (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat. Genet.* **34**, 97-101.
5. NICOLAS G, VIATTE L, BENNOUN M, BEAUMONT C, KAHN A, VAULONT S (2003). Heparin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol. Dis.* **29**, 327-335.
6. NICOLAS G, CHAUVET C, VIATTE L, DANAN JL, BIGARD X, DEVAUX I, BEAUMONT C, KAHN A et VAULONT (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* **110**, 1037-1044.
7. NICOLAS G, FOURNIER CM, GALAND C, MALBERT-COLAS L, BOURNIER O, KROVIARSKI Y, BOURGEOIS M, CAMONIS JH, DHERMY D, GRANDCHAMP B et LECOMTE MC (2002). Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3527-3536.
8. NICOLAS G, BENNOUN M, PORTEU A, MATIVET S, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, SIRITO M, SAWADOGO M, KAHN A, VAULONT S (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (Track II)* **99**, 4596-4601.
9. NICOLAS G, BENNOUN M, DEVAUX I, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, KAHN A et VAULONT S (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (Track II)* **98**, 8780-8785.
10. NICOLAS G, PEDRONI S, FOURNIER C, GAUTERO H, CRAESCU C, DHERMY D et LECOMTE MC (1998) The spectrin self-association site : characterization and study of β -spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis. *Biochem. J.* **332**, 81-89.
11. NICOLAS G, PEDRONI S, FOURNIER C, GAUTERO H et LECOMTE MC (1997) Method of site-directed mutagenesis using long primer-unique site elimination and exonuclease III. *BioTechniques*. **22**, 430-434.

Publications en deuxième auteur

12. VIATTE L, NICOLAS G, LOU DQ, BENNOUN M, LESBORDES-BRION JC, CANONNE-HERGAUX F, SCHONIG K, BUJARD H, KAHN A, ANDREWS NC et VAULONT S (2006). Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the cellular iron accumulation in hemochromatic mice. *Blood*. **107**, 2952-2958.
13. MARTIN ME, NICOLAS G, HETET G, VAULONT S, GRANDCHAMP B et BEAUMONT C (2004). Transferrin receptor 1 mRNA is downregulated in placenta of hepcidin transgenic embryos. *FEBS Letters*. **574**, 187-191.
14. LOU DQ, NICOLAS G, LESBORDES J, VIATTE L, GRIMBER G, SZAJNERT MF, KAHN A et VAULONT S (2004). Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. **103**, 2816-2821.
15. MALBERT-COLAS L, NICOLAS G, GALAND C, LECOMTE MC et DHERMY D (2003). Identification of new partners of the epithelial sodium channel alpha subunit. : *C R Biol.* **326**, 615-624.
16. GALLUZZI L, NICOLAS G, PAIARDINI M, MAGNANI M et LECOMTE MC (2000). Identification of ubiquitinated repeats in human erythroid α -spectrin. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2812-2819.
17. LECOMTE MC, NICOLAS G, DHERMY D, PINDER JC et GRATZER WB (1999). Properties of normal and mutant polypeptide fragments from the dimer self-association sites of human red cell spectrin. *Eur. Biophys. J.* **28**: 208-215.

18. FOURNIER CM, NICOLAS G, GALLAGHER PG, DHERMY D, GRANDCHAMP B et LECOMTE MC (1997). Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human α -spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia. *Blood*. **89**, 4584-4590.

Autres positions

19. BOURNIER O, KROVIARSKI Y, ROTTER B, NICOLAS G, LECOMTE MC et DHERMY D (2006). Spectrin interacts with EVL (Ena/Vasodilator stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerisation. *Biol Cell*. **98**, 279-293.
20. VIATTE L, LESBORDES-BRION JC, LOU DQ, BENNOUN M, NICOLAS G, KAHN A, CANONNE-HERGAUX F et VAULONT S (2005). Dereglulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*. **105**, 1861-4864.
21. ROTTER B, BOURNIER O, NICOLAS G, DHERMY D et LECOMTE MC (2005). α II spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts. *Biochem. J.* **388**, 631-638.
22. LOU DQ, LESBORDES JC, NICOLAS G, VIATTE L, BENNOUN M, VAN ROOIJEN N, KAHN A, RENIA L et VAULONT S (2005). Iron-and inflammation-induced hepcidin gene expression *in vivo* are not mediated by Kupffer cells. *Hepatology*. **41**, 1056-1064.
23. ROTTER B, KROVIARSKI Y, NICOLAS G, DHERMY D et LECOMTE MC (2004). α II-spectrin is an *in vitro* target for caspase-2 and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem. J.* **378**, 161-168.
24. VIOLLET B, ANDREELLI F, JØRGENSEN SB, PERRIN C, GELOEN A, FLAMEZ D, MU J, LENZNER C, BAUD O, BENNOUN M, GOMAS E, NICOLAS G, WOJTASZEWSKI JFP, KAHN A, CARLING D, SCHUIT FC, BIRNBAUM MJ, RICHTER EA, BURCELIN R et VAULONT S (2003). The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **111**, 91-98.
25. GALLUZZI L, PAIARDINI M, MAGNANI M, NICOLAS G, LECOMTE MC, HARPER S et SPEICHER DW (1999). cDNA sequence of the human erythroid-spectrin: identification of a base deletion in the sequence database. *Blood*. **93**: 2421-2422.

4.2. AUTRES PUBLICATIONS

1. NICOLAS G et VAULONT S (2005). Le mécanisme d'action de l'hepcidine déchiffré. *Médecine/Sciences*. **21**: 7-9.
2. NICOLAS G, VAULONT S et BEAUMONT C (2004). Mécanismes impliqués dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. *Cab. Nutr. Diét.* **39**: 195-201.
3. NICOLAS G, KAHN A et VAULONT S (2003). L'hepcidine, chef d'orchestre de l'homéostasie du fer. *Presse Médicale*. N°32, pages 1395-1396.
4. BEAUMONT C, NICOLAS G et VAULONT S (2003). L'hepcidine, un régulateur majeur du métabolisme du fer. *Hématologie*. **9**: 27-36.
5. NICOLAS G, KAHN A et VAULONT S (2003). L'hepcidine, une molécule majeure pour régler l'homéostasie du fer. *Biotech Médecine*. N°26, pages 1-2.
6. NICOLAS G, KAHN A et VAULONT S (2003). Médecine - Régulation du métabolisme du fer : l'hepcidine. *Encyclopædia Universalis*. (+ mise à jour en 2005).
7. NICOLAS G et VAULONT S (2002). L'hepcidine, un contrôle essentiel de l'absorption du fer. *Médecine/Sciences*. **18**: 270-271.

	1 ^{er} auteur	Année de publication	Journal	Catégorie	IF du journal	Nb de citations	Domaine	Place de Nicolas G	Nb de coauteurs	Indicateur de la place du signataire
1	Nicolas G	1997	<i>Biotechniques</i>	Article	2,286	5	Biology & Biochemistry	1	5	1
2	Fournier C	1997	<i>Blood</i>	Article	10,131	12	Clinical Medicine	2	6	0,5
3	Nicolas G	1998	<i>Biochem. J.</i>	Article	4,224	24	Biology & Biochemistry	1	7	1
4	Galluzzi L	1999	<i>Blood</i>	Letter	10,131	1	Clinical Medicine	4	7	0,25
5	Lecomte MC	1999	<i>Eur. Biophys. J.</i>	Article	1,811	13	Biology & Biochemistry	2	5	0,5
6	Galluzzi L	2000	<i>Eur. J. Biochem.</i>	Article	3,164	8	Biology & Biochemistry	2	5	0,5
7	Nicolas G	2001	<i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i>	Article	10,231	341	Clinical Medicine	1	7	1
8	Nicolas G	2002	<i>J. Clin. Invest.</i>	Article	15,053	250	Clinical Medicine	1	9	1
9	Nicolas G	2002	<i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i>	Article	10,231	238	Clinical Medicine	1	10	1
10	Nicolas G	2002	<i>Blood Cells Molecules Dis.</i>	Article	2,427	60	Clinical Medicine	1	6	1
11	Nicolas G	2002	<i>Mol. Cell Biol.</i>	Article	7,093	28	Molecular Biology & Genetics	1	11	1
12	Malbert-Colas L	2003	<i>C. R. Biol.</i>	Article	1,199	8	Biology & Biochemistry	2	5	0,5

	1 ^{er} auteur	Année de publication	Journal	Catégorie	IF du journal	Nb de citations	Domaine	Place de Nicolas G	Nb de coauteurs	Indicateur de la place du signataire
13	Viollet B	2003	<i>J. Clin. Invest.</i>	Article	15,053	97	Clinical Medicine	12	20	0,25
14	Nicolas G	2003	<i>Nat. Genet.</i>	Article	25,797	109	Molecular Biology & Genetics	1	8	1
15	Martin ME	2004	<i>Febs Lett.</i>	Article	3,415	1	Biology & Biochemistry	2	6	0,5
16	Lou DQ	2004	<i>Blood</i>	Article	10,131	30	Clinical Medicine	2	8	0,5
17	Rotter B	2004	<i>Biochem. J.</i>	Article	4,224	17	Biology & Biochemistry	3	5	0,25
18	Nicolas G	2004	<i>Blood</i>	Article	10,131	31	Clinical Medicine	1	4	1
19	Rotter B	2005	<i>Biochem. J.</i>	Article	4,224	6	Biology & Biochemistry	3	5	0,25
20	Lou DQ	2005	<i>Hepatology</i>	Article	9,792	15	Clinical Medicine	3	9	0,25
21	Viatte L	2005	<i>Blood</i>	Article	10,131	21	Clinical Medicine	5	8	0,25
22	Bournier O	2006	<i>Biol. Cell</i>	Article	3,232	1	Molecular Biology & Genetics	4	6	0,25
23	Viatte L	2006	<i>Blood</i>	Article	10,131	8	Clinical Medicine	2	11	0,5
24	Meary F	2007	<i>J. Biol. Chem.</i>	Article	5,854	0	Biology & Biochemistry	7	7	1

– Analyse bibliométrique des publications (source INSERM – 24 octobre 2007) –

4.3. BREVETS D'INVENTION

NICOLAS G, KAHN A et VAULONT S (2003). Use of hepcidin for preparing a medicament for treating disorders of iron homeostasis. **Patent** n° WO 02098444-A.

Priorités :

- EUROPE – n° 01401377.5 du 25 mai 2001 : acceptée ;
- EUROPE – n° 01401537.4 du 14 juin 2001 : acceptée ;
- EUROPE – n° 02290795.0 du 29 mars 2002 : acceptée ;
- U.S.A. - n° 10/478,987 du 24 mai 2002 : Titre Officiel du Brevet accordé le 30 janvier 2007 sous le n° 7 169 758 – valable jusqu'au 24 mai 2022.

4.4. COMMUNIQUÉS DE PRESSE

6 avril 2006 – Combattre l'hémochromatose : la piste prometteuse de l'hepcidine.

http://www.inserm.fr/fr/presse/CP_scientifiques/2006/att00003878/hemochromatose_6avril2006.pdf

22 avril 2003 – Hecidine : Le métabolisme du fer et ses maladies.

http://www.inserm.fr/fr/presse/dossiers_presse/att00000407/22avril2003.pdf

4 avril 2002 – Découverte d'une hormone recherchée depuis 40 ans, contrôlant le métabolisme du fer chez les mammifères.

http://www.inserm.fr/fr/presse/CP_scientifiques/2002/att00000417/4avril2002.pdf

4.5. COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHÉES À DES RÉUNIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES

1. MEARY F, METRAL S, FERREIRA C, ELADARI D, COLIN Y, LECOMTE MC et NICOLAS G. Red Cell Gordon Conferences du 20 au 25 mai 2007 – Aussois, France : A mutant α II-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process *in vivo*.
2. NICOLAS G. IV^e colloque de protéolyse cellulaire de la SFBBM – 12 au 14 décembre 2005 – Aussois, France : étude de la protéolyse de la spectrine dans le remodelage du squelette membranaire.
3. NICOLAS G. UFR de médecine de Brest (en tant qu'orateur invité) – 20 octobre 2003 – Brest, France : approches nouvelles dans l'étude de la régulation de l'homéostasie du fer.
4. NICOLAS G. XX^e journée Jean-Claude Dreyfus de l'Institut Cochin (en tant qu'orateur invité) – 19 septembre 2003 – Paris, France : l'hepcidine, un régulateur clé de l'homéostasie du fer.
5. NICOLAS G. IFR Xavier Bichat, Paris, France (en tant qu'orateur invité). – Septembre 2002 – Paris, France : identification et caractérisation de l'hepcidine, un nouveau régulateur de l'homéostasie du fer chez les mammifères.
6. NICOLAS G, BENNOUN M, DEVAUX I, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, KAHN A et VAULONT S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in Upstream Stimulatory Factor 2 (USF2) knockout mice. BioIron, Australie, 18-23 août 2001.
7. NICOLAS G, FOURNIER C, GALAND C, MALBERT-COLAS et LECOMTE MC. Identification d'un ligand pour le domaine SH3 des spectrines-fodrine par la technique du double-hybride. Journée de la Recherche, Faculté de médecine Xavier-Bichat, 23 septembre 1998.
8. NICOLAS G, MALBERT-COLAS L, GAUTERO H, FOURNIER C et LECOMTE MC. Tissue-distribution of two alpha fodrin isoforms: characterization and study of their sensitivity to calpain.

Membrane skeleton. Regulatory function in normal and abnormal cells. Pologne, 13 juin 1998 – (*résumé publié* dans *Cell Mol. Biol. Lett.*, 6, abstract n°216).

9. FOURNIER C, NICOLAS G, GALLAGHER PG, DHERMY D, GRANDCHAMP B et LECOMTE MC. Épissage aberrant lié à une mutation dans le gène de l'alpha spectrine et conduisant à une poikilocytose sévère à l'état homozygote. XVIth Congress of the French Society of Haematology, Paris, France, 6-7 février 1997 - (**résumé publié** dans *Hématologie* (1997), 3, abstract n°24).
10. FOURNIER C, NICOLAS G, GALLAGHER PG, DHERMY D et LECOMTE MC. Épissage aberrant lié à une mutation dans le gène de l'α-spectrine et conduisant à une poikilocytose sévère à l'état homozygote.
 - Journée de la Recherche, Faculté de médecine Xavier-Bichat, 17 septembre 1996.
 - Journée des étudiants de l'institut fédératif de recherche Xavier-Bichat, 10 septembre 1996.
11. NICOLAS G, LECOMTE MC, GARBARZ M, GALAND C, BOURNIER O et DHERMY D. Relations génotype-phénotype et structure-fonction dans les elliptocytoses héréditaires : exemple du variant Sp αI/74. XIVth Congress of the French Society of Haematology, Paris, France, 3-4 février 1995 - (**résumé publié** dans *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* - Journal of Experimental and Clinical Hematology (1995), 37, abstract n°31).
12. NICOLAS G, LECOMTE MC, PEDRONI S, GAUTERO H et DHERMY D. Site de tétramérisation de la spectrine érythrocytaire : études fonctionnelles et structurales à l'aide de peptides recombinants.
 - Journée de la Recherche, Faculté de médecine Xavier-Bichat, septembre 1994.
 - Forum des Jeunes Chercheurs, Reims, France, 5-8 juillet 1994.
13. LECOMTE MC, NICOLAS G, PEDRONI S, GAUTERO H et DHERMY D. Structural and functional characterization of tetramer binding site of red cell spectrin using recombinant peptides. First Meeting of the European Haematology Association, Brussels, Belgium, 2-5 June 1994 - (*résumé publié* dans *Brit. J. Haematol.* (1994), 87, suppl. 1, abstract n°571).
14. LECOMTE MC, PEDRONI S, NICOLAS G, GAUTERO H et DHERMY D. Étude du site de tétramérisation de la spectrine érythrocytaire à partir de peptides obtenus dans *E. coli*: recherche des peptides nécessaires et suffisants. XIIIth Congress of the French Society of Haematology, Paris, France, 4-5 février 1994 - (**résumé publié** dans *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*-Journal of Experimental and Clinical Hematology (1994), 36, abstract n°55).
15. LECOMTE MC, NICOLAS G, PEDRONI S, GAUTERO H, FOURNIER C, DHERMY D et GRANDCHAMP B. Studies of the tetramerisation site using recombinant α and β spectrin peptides: effect of two β-spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis (HE). ASH 36th annual meeting, Nashville, USA, december 1994 - (**résumé publié** dans *Blood* (1994), 84, suppl.1 6a).

4.6. PRIX

En 2002 l'Association Hémochromatose France m'a remis un prix personnel de 3 800 € pour la découverte du rôle de l'hepcidine.

Chapitre 2 – TRAVAUX

Résumé

Mes premiers travaux de recherche, me permettant de soutenir une thèse de doctorat en décembre 1999, ont été effectués au sein du laboratoire du professeur Bernard GRANDCHAMP (unité 409 de l'INSERM) sous la direction du docteur Marie-Christine LECOMTE. Mon travail s'est intégré dans l'étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes, principalement le site de tétramérisation et le domaine SH3. Concernant la tétramérisation de la spectrine érythroïde j'ai identifié les régions minimales nécessaires et suffisantes pour former le tétramère puis j'ai mis en évidence une relation entre certaines mutations de la spectrine associées à des anomalies membranaires du globule rouge et la sévérité du défaut de formation du tétramère. J'ai ensuite identifié plusieurs ligands du domaine SH3 de la spectrine non érythroïde. L'un d'entre eux m'a permis de définir une régulation de la protéolyse ciblée de cette spectrine faisant intervenir un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Ma formation initiale fut donc celle d'un biochimiste que j'ai étendue peu à peu vers la biologie moléculaire et la biologie cellulaire.

Puis, souhaitant acquérir les connaissances nécessaires au développement de modèles murins, j'ai décidé d'effectuer mon stage post-doctoral à l'Institut COCHIN (unité 567 de l'INSERM) dans une équipe co-dirigée par le docteur Sophie VAULONT et le professeur Axel KAHN. Je me suis ainsi familiarisé avec la souris comme « outil » de recherche (gestion d'un élevage, établissement de nouvelles lignées, génotypage, phénotypage). Je travaillais initialement sur le métabolisme du glucose mais j'ai complètement réorienté ma thématique de recherche au bout d'un an pour finalement identifier et caractériser une hormone, l'hépcidine, contrôlant l'homéostasie du fer.

J'ai été nommé chargé de recherche de grade 2 dans l'unité 409 de l'INSERM en octobre 2002 pour y développer une souche de souris exprimant une spectrine non érythroïde résistante à des mécanismes de protéolyse ciblée. Il s'agit donc toujours d'appréhender certaines fonctions des spectrines mais dans un contexte *in vivo*. En janvier 2005 j'ai intégré l'unité 665 de l'INSERM dirigée par Yves COLIN afin de poursuivre ce projet. Aujourd'hui, je suis chargé de recherche de grade 1.

Ce chapitre est divisé en deux parties distinctes : la première traite de mon travail sur la spectrine tandis que la seconde porte sur l'hépcidine. Chaque partie est composée d'une introduction au sujet suivie d'un résumé des travaux que j'ai effectués et/ou dirigés.

J'aborde également dans ce chapitre un nouveau projet que je développe et qui concerne la protéine Lu/B-CAM.

PREMIÈRE PARTIE – À PROPOS DE LA SPECTRINE

1. INTRODUCTION SUR LE SQUELETTE MEMBRANAIRE ET LES SPECTRINES

1.1. DÉFINITION DU SQUELETTE MEMBRANAIRE

Au cours de leur évolution, les organismes multicellulaires ont développé des membranes plasmiques complexes capables de séparer à la fois le milieu extracellulaire des milieux intracellulaires mais également les différents compartiments cellulaires leur conférant ainsi leurs fonctions spécifiques. Ces bicouches lipidiques sont néanmoins relativement fragiles et l'évolution a mis en place un réseau multiprotéique localisé directement sous la bicouche lipidique assurant ainsi une certaine cohésion membranaire. Il s'agit des **squelettes membranaires** qui forment des structures à la fois souples et résistantes. Le squelette membranaire doit être distingué du cytosquelette d'actine.

C'est dans le globule rouge que ce réseau fût caractérisé pour la première fois, d'une part parce que son squelette est simple comparé à ceux que l'on trouve dans les cellules nucléées, et d'autre part parce que les globules rouges sont facilement accessibles en grande quantité pour des approches expérimentales biochimiques, biophysiques et microscopiques. Le squelette membranaire fût ainsi défini comme le résidu protéique insoluble obtenu après traitement des membranes plasmiques par un détergent non ionique (12). Il apparaît en microscopie électronique, comme un maillage, composé essentiellement de formes hexagonales : de longs filaments protéiques (200 nm) sont connectés par des amas protéiques formant les nœuds de ce réseau (voir Figure 1 page 16). Le squelette membranaire érythrocytaire, de par ses propriétés de robustesse et de déformabilité, est largement impliqué dans la forme particulière du globule rouge ainsi que dans ses propriétés dynamiques telles que la déformabilité et la résistance au stress de la circulation sanguine.

1.2. LE SQUELETTE MEMBRANAIRE DANS LE GLOBULE ROUGE : UN MODÈLE SIMPLE

Les différents composants majoritaires du squelette membranaire ont été purifiés et caractérisés à partir de ce modèle érythroïde : au nombre de 200 000 copies par globule rouge, la spectrine représente environ 25 % de la masse totale des protéines sous membranaires. Elle est composée de deux longues chaînes flexibles nommées α et β , associées côte à côte de façon antiparallèle, pour former des hétérodimères $\alpha\beta$. Chacun d'eux est ainsi une molécule orientée avec une « tête » incluant les extrémités N-terminale et C-terminale des chaînes α et β respectivement et une « queue » incluant les extrémités C-terminale et N-terminale des chaînes α et β respectivement. Deux hétérodimères s'associent tête-à-tête, pour former des tétramères $(\alpha\beta)_2$ qui sont les filaments du maillage (voir Figure 2 page 17) (13-15). L'association tête-à-tête des dimères laisse disponible chaque extrémité caudale pour des interactions avec les autres protéines du squelette membranaire qui forment les nœuds du maillage appelés « complexes de jonction » : l'actine et d'autres protéines comme la protéine 4.1 et la dématine (protéine 4.9), l'adducine, la tropomyosine et la tropomoduline qui modulent l'interaction entre la spectrine et l'actine. Le squelette membranaire s'articule et se stabilise sous la membrane par l'intermédiaire de différentes interactions de la chaîne β de la spectrine avec des protéines transmembranaires, telles que l'échangeur anionique AE1, par l'intermédiaire d'une protéine d'ancrage appelée ankyrine, ou encore la protéine 4.1, elle-même liée à la glycophorine C pour ce qui concerne le globule rouge (voir Figure 2 page 17). Ce mécanisme de stabilisation du squelette membranaire est conservé dans les autres cellules mais il fait intervenir des protéines transmembranaires supplémentaires.

Les spectrines constituent avec la dystrophine et l' α -actinine, la superfamille Spectrine. La principale caractéristique de ces protéines est leur structure linéaire formée d'une succession d'unités répétitives adoptant une conformation α -trihélicoïdale (voir architecture générale). Les spectrines non érythroïdes ont été nommées « fodrine ». Néanmoins cette dénomination est moins utilisée depuis que l'on sait que des spectrines initialement étiquetées comme « érythroïdes » sont exprimées dans des cellules non érythroïdes. Dès lors il devient plus délicat que ces produits issus de l'expression d'un seul gène portent plusieurs noms (spectrine et fodrine). On parle donc plus aisément de spectrine érythroïde et de spectrine non érythroïde. Néanmoins la dénomination « fodrine » est encore utilisée dans certaines publications.

Il s'avère aujourd'hui que les spectrines sont des composants cellulaires ubiquitaires que l'on trouve tant chez les vertébrés (les mammifères, les oiseaux, le xénope) que chez les invertébrés (la drosophile, l'oursin, le nématode *Caenorhabditis elegans*, les amibes primitives) ainsi que dans les plantes.

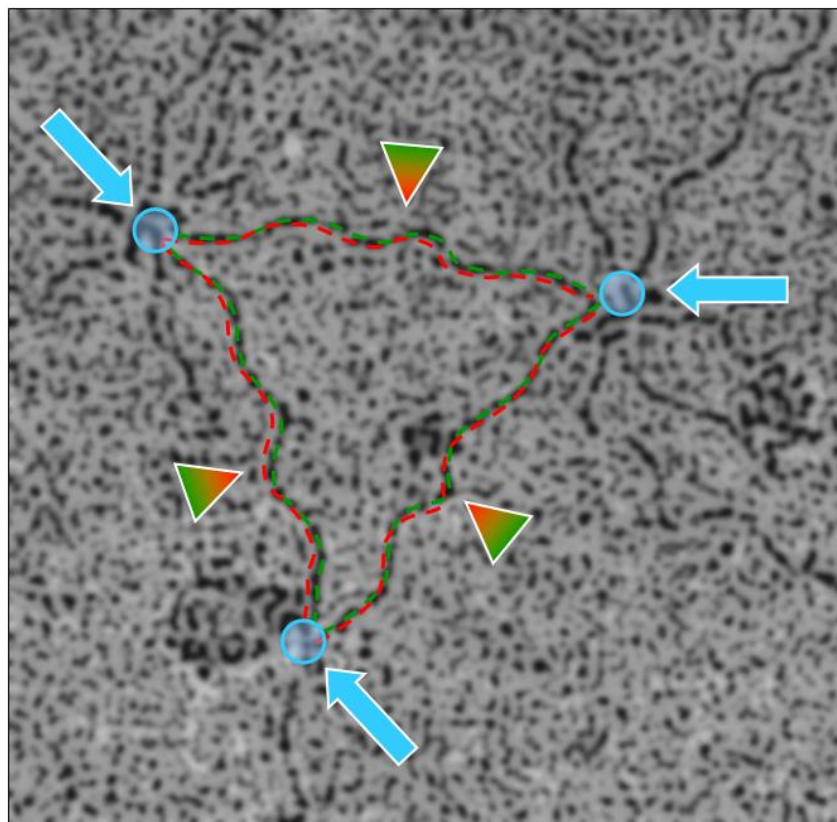


Figure 1

Image du squelette membranaire de globule rouge en microscopie électronique

Sur ce cliché de microscopie électronique (16) on distingue le réseau formé par le squelette membranaire. De longs filaments constitués des chaînes spectrine α et β (surlignées en vert et en rouge) sont connectés entre eux par des complexes de jonction (en bleu).

1.3. STABILITÉ ET PROPRIÉTÉS DYNAMIQUES DU SQUELETTE ÉRYTHROCYTAIRE

Du fait de sa structure flexible et de ses nombreuses interactions avec d'autres protéines, la spectrine présente une position clé au sein du squelette membranaire. La fonction de la spectrine a été clairement définie dans le globule rouge grâce à la caractérisation de mutations associées à des anémies hémolytiques héréditaires. Ces anomalies siègent le plus fréquemment sur les

extrémités N- et C-terminales des chaînes α et β respectivement, qui contiennent les sites d'interaction des deux dimères pour la formation du tétramère. Ainsi, ces anomalies moléculaires des chaînes α et β , affectant la formation des tétramères de spectrine, sont-elles directement responsables de la fragilité membranaire conduisant à des anémies hémolytiques plus ou moins sévères : l'elliptocytose héréditaire et la pyropoïkilocytose héréditaire (pour revue, voir (17)). Enfin, des défauts quantitatifs de spectrine peuvent être responsables d'un autre phénotype d'anémie hémolytique : la sphérocytose héréditaire. Je décrirai plus loin une partie de mon travail de doctorat qui a porté à la fois sur la structure et la fonction du site de tétramérisation de la spectrine érythroïde ainsi que sur l'étude de mutations associées à des défauts de tétramérisation et responsables d'une elliptocytose héréditaire.

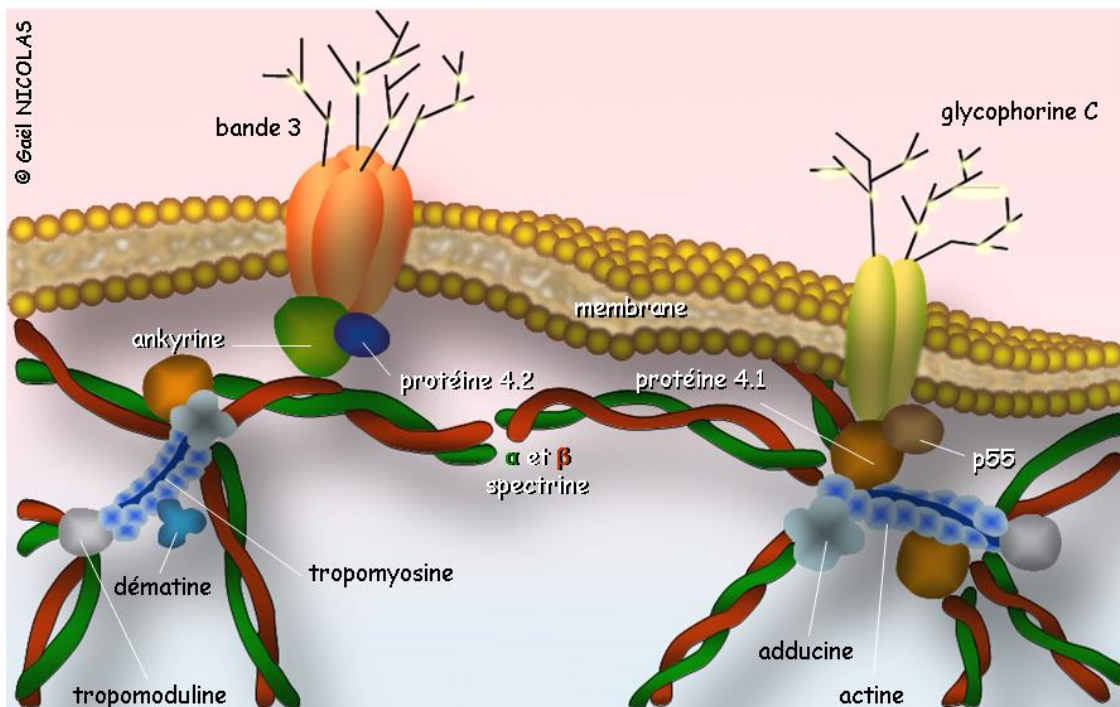


Figure 2

Représentation schématique de la membrane érythrocytaire et du squelette membranaire

Le squelette membranaire est un réseau multiprotéique localisé sous la bicouche lipidique. Les filaments de ce réseau sont constitués par des tétramères de spectrine ($\alpha\beta$)₂. Aux extrémités caudales des tétramères se trouvent des complexes de jonction (microfilaments d'actine, adducine, dématine, tropomyosine, tropomoduline). L'ankyrine fixe le squelette membranaire sous la bicouche lipidique par l'intermédiaire d'une interaction avec la bande 3. La protéine 4.1 joue un rôle similaire via une interaction avec la glycophorine C.

1.4. STRUCTURE GÉNÉRALE

1.4.1 LES UNITÉS RÉPÉTITIVES

Malgré la diversité des spectrines, celles-ci présentent la même organisation structurale. Chaque chaîne α ou β est constituée d'une succession de modules protéiques de 106 acides aminés plus

ou moins conservés, appelés « unité répétitive » (ur). Chacun de ces modules possède trois hélices α (appelées A, B et C) repliées les unes sur les autres pour former une structure compacte (voir Figure 3 ci-dessous). Cette architecture spéciale confère aux chaînes spectrine des propriétés de flexibilité importante, un peu à l'instar d'un ressort (18). Aux extrémités N- et C-terminales des chaînes α et β mais aussi au milieu des chaînes α , sont insérés d'autres modules particuliers tels qu'un domaine SH3 (il est inséré entre les hélices B et C de la neuvième unité répétitive), un domaine de liaison de la calmoduline (dans la dixième unité répétitive) ou encore des domaines *EF-hand* capables de lier le calcium (voir Figure 3 ci-dessous).

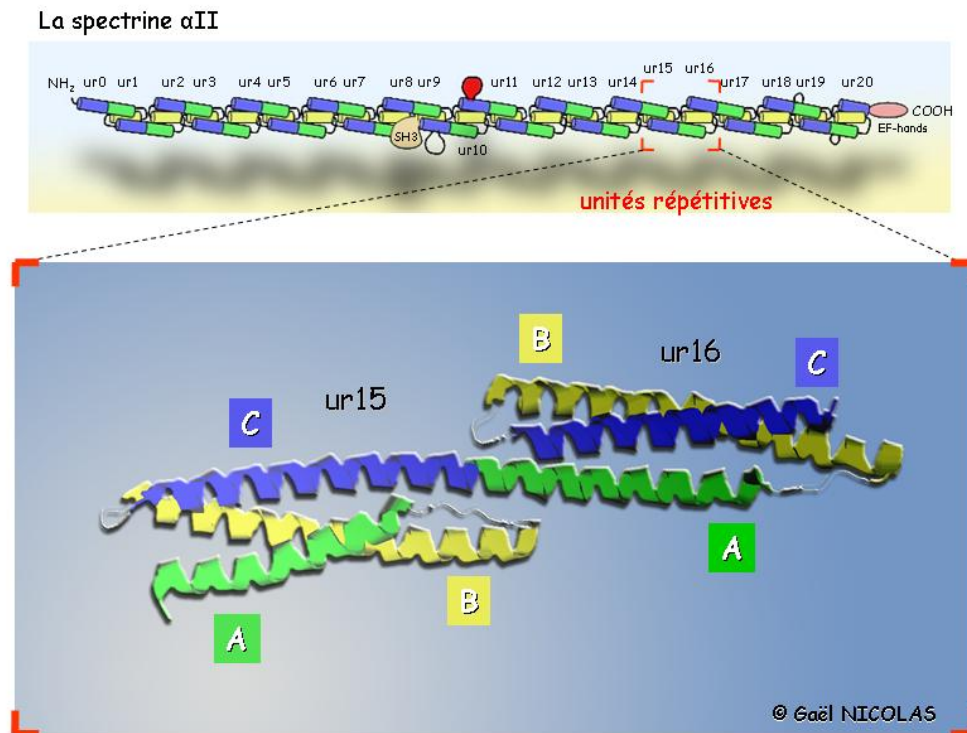


Figure 3
Architecture générale de la spectrine α II

En haut : la chaîne α II est constituée d'une succession de vingt unités répétitives (nommées ici ur1 à ur20 ; « ur » pour « unité répétitive ») constituées de trois hélices α nommées A, B et C (en vert, jaune et bleu). La grande hélice CA relie deux unités répétitives. Les hélices sont reliées les unes aux autres par de courtes boucles. À l'extrémité NH₂ on trouve une unité incomplète (nommée « ur0 ») formée uniquement d'une hélice C isolée. À l'extrémité COOH on trouve des domaines EF-hands (en rose). Au centre de la molécule se trouvent des domaines insérés dans les unités répétitives : un domaine SH3, une région (en rouge) contenant des sites de coupure par des protéases ainsi qu'un domaine de fixation pour la calmoduline.

En bas : représentation de deux unités répétitives d'après les données obtenues à partir d'un cristal des 15^e et 16^e unités répétitives de la spectrine alpha de cerveau de poulet (19).

1.4.2 FORMATION DU DIMÈRE $\alpha\beta$: LE SITE DE NUCLÉATION

L'assemblage des chaînes α et β de la spectrine en hétérodimères $\alpha\beta$ implique l'extrémité C-terminale de la chaîne α et l'extrémité N-terminale de la chaîne β (voir Figure 4 page 20). Les régions minimales impliquées dans cette interaction définissent ce que l'on appelle le site de nucléation de la spectrine (20, 21). Quatre des unités répétitives impliquées (ur19 et ur20 sur α ;

ur1 et ur2 sur β) ont la particularité de posséder une insertion de huit acides aminés dans la grande hélice C-A par rapport à la séquence canonique de 106 résidus. La perte ou la duplication de ces octamères abolissent l'interaction entre les deux chaînes (22). Ces insertions pourraient conférer des propriétés conformationnelles particulières permettant la formation de l'hétérodimère $\alpha\beta$. Les études *in vitro* montrent que la présence des unités conformationnelles adjacentes augmente l'affinité entre les deux chaînes α et β (21). L'interaction entre les deux chaînes α et β pour former le dimère est initiée au niveau du site de nucléation puis renforcée sur toute la longueur des deux chaînes grâce à une propagation de l'interaction tout le long des deux molécules à l'image d'une fermeture éclair. Le site de nucléation de la spectrine érythroïde est le seul à avoir été étudié. Cependant, les courtes insertions dans les unités répétitives sont retrouvées sur les chaînes α et β codées par les autres gènes, suggérant la conservation du mécanisme.

1.4.3 FORMATION DU TÉTRAMÈRE $(\alpha\beta)_2$: LE SITE DE TÉTRAMÉRISATION

Dans la membrane du globule rouge, les filaments de spectrine se trouvent sous la forme de tétramères $(\alpha\beta)_2$ formés par l'association tête-à-tête de deux hétérodimères. Cette interaction implique l'extrémité N-terminale de la chaîne α et l'extrémité C-terminale de la chaîne β (voir Figure 4 page 20). Le K_d de l'interaction est d'environ 1 μ M. Comme pour le site de nucléation, le site de tétramérisation, principalement étudié sur la spectrine érythroïde, serait conservé car les séquences impliquées sont retrouvées sur les chaînes α et β codées par les autres gènes.

L'étude du site de tétramérisation a d'abord reposé :

- sur les données fournies par la pathologie de la spectrine associée aux EH. Les expériences indiquaient que certaines mutations de la chaîne β de la spectrine modifient le profil de la protéolyse modérée de la chaîne α par la trypsine. Cela suggérerait qu'un défaut d'interaction entre les deux chaînes, due à la mutation sur la chaîne β , pouvait expliquer la susceptibilité de la chaîne α à la protéolyse (23) ;
- sur les analyses par alignement de séquence des ADNc qui montrent que l'extrémité N-terminale de la chaîne α commence par une hélice C isolée (unité incomplète α ur0) et que l'extrémité C-terminale de la chaîne β se termine par deux hélices A et B (unité incomplète β ur17).

À partir de ces différentes données, un modèle du site de tétramérisation a été proposé : les hélices A et B de la chaîne β se replient l'une sur l'autre de façon antiparallèle et forment un sillon qui pourrait accueillir l'hélice C isolée de la chaîne α et constituer ainsi une unité conformationnelle semblable à celles que l'on retrouve tout le long de la protéine native (23) (voir Figure 5 page 21). Cette fonction de tétramérisation entre les hétérodimères de spectrine est absolument fondamentale pour la stabilité du squelette membranaire. Ce modèle a ensuite été conforté par le fait qu'il existe une relation directe entre la localisation des mutations et la sévérité du défaut d'interaction des deux chaînes α et β (24). Les mutations situées sur les trois hélices présumées impliquées dans le site de tétramérisation de la spectrine ont un retentissement sévère sur l'interaction, ce qui se manifeste chez le patient par des pourcentages élevés de spectrine dimérique alors que la spectrine doit être essentiellement tétramérique. Chez des sujets homozygotes pour une telle mutation, on observe jusqu'à 90 % de dimères de spectrine dans la membrane (23). En revanche, les mutations localisées en dehors de ces trois hélices affectent moins l'interaction dimère-dimère. Chez certains sujets homozygotes pour une mutation localisée loin des premières hélices, on observe encore la présence de tétramères dans la membrane – entre 40 et 70 %.

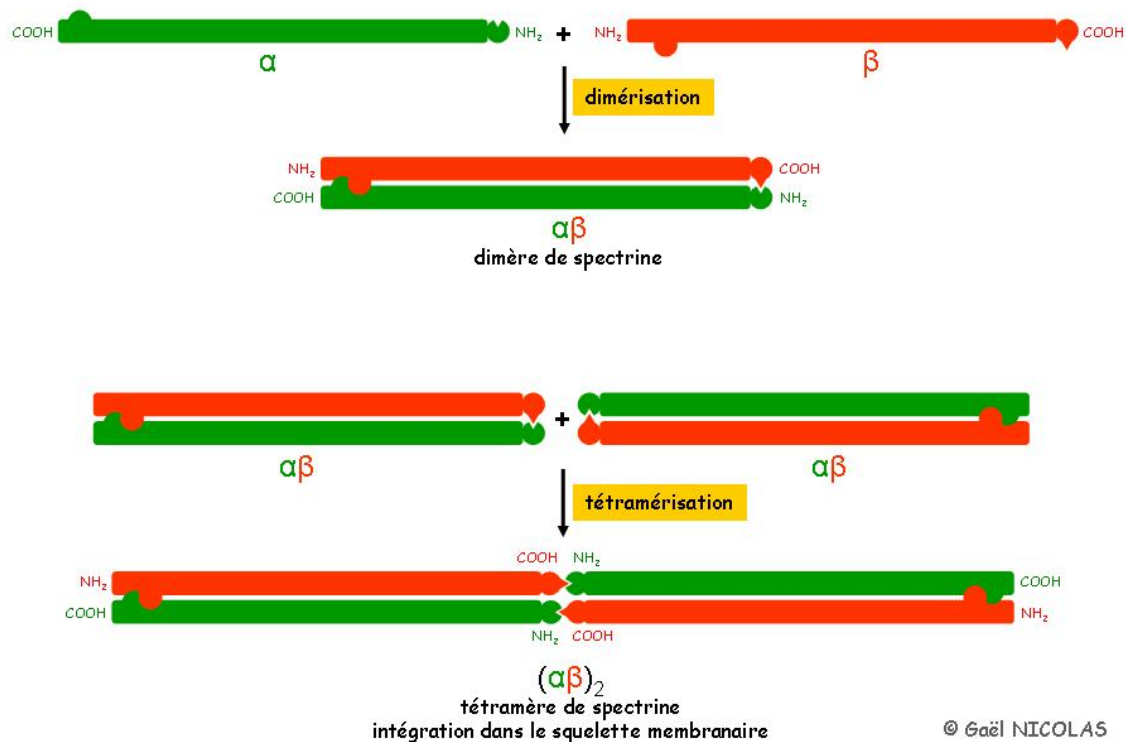


Figure 4
Formation du dimère $\alpha\beta$ et du tétramère de spectrine ($\alpha\beta$)₂

La cohésion du dimère $\alpha\beta$ est initiée via une interaction impliquant l'extrémité COOH de la chaîne α et l'extrémité NH₂ de la chaîne β . Deux dimères s'associent via l'extrémité NH₂ de la chaîne α et l'extrémité COOH de la chaîne β pour former un tétramère ($\alpha\beta$)₂ qui s'intégrera au sein du squelette membranaire.

1.4.4 LE DOMAINE SH3

La neuvième unité répétitive de toutes les chaînes α contient un domaine SH3 situé entre deux hélices B et C (voir Figure 6 page 23). Le domaine SH3 de la chaîne α II est extrêmement conservé au cours de l'évolution (100 % d'acides aminés identiques entre l'homme, le rat, le poulet et le xénope), ce qui suggère une pression de sélection importante. Les domaines SH3 des spectrine α I et α II possèdent 74 % d'identité de séquence.

Malgré une faible identité de séquences entre eux, les domaines SH3 issus de protéines différentes possèdent une structure similaire : deux feuilletts β contenant chacun trois brins β sont repliés l'un sur l'autre de façon antiparallèle. Il en résulte un sillon hydrophobe bordé par deux boucles appelées RT-*Srv* et n-*Srv*. La plupart des acides aminés impliqués dans la formation de ce sillon sont fortement conservés. Un tour d'hélice connecte deux brins β d'un des feuilletts. La majorité des ligands des domaines SH3 viennent se loger dans le sillon hydrophobe grâce à une séquence riche en proline PxxPxR ou RxPxxP (où x représente n'importe quel acide aminé) adoptant une conformation protéique particulière en hélice polyproline de type II : il s'agit d'une hélice avec un enroulement gauche ayant trois acides aminés par tour. La spécificité des interactions serait assurée par les contacts formés entre les ligands et les résidus variables des deux boucles variables RT-*Srv* et n-*Srv*. De plus en plus d'études montrent cependant l'existence de protéines interagissant avec des domaines SH3 par l'intermédiaire de motifs sans proline (deux exemples :

(25, 26)). La structure du domaine SH3 de la spectrine α II a été établie à la fois par diffraction aux rayons X (27) et par RMN (28).

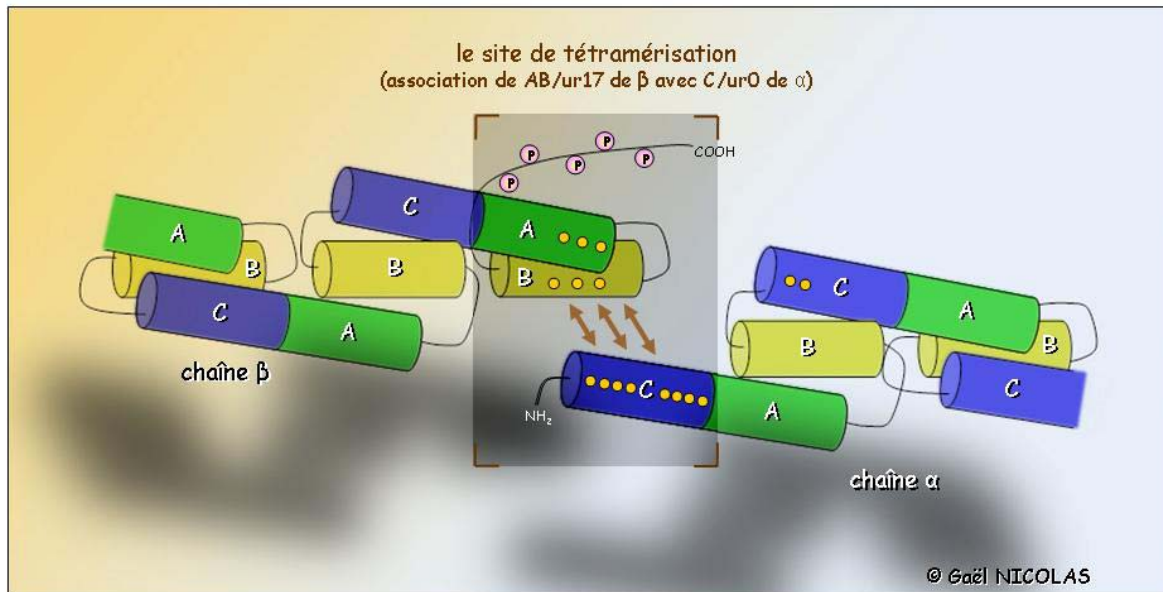


Figure 5
Représentation schématique du site de tétramérisation

L'hélice C de la chaîne α (unité répétitive incomplète ur0) et les hélices A et B de la chaîne β (unité répétitive incomplète ur17) impliquées dans l'auto-association des dimères de spectrine sont situées dans la fenêtre grise du schéma. Les mutations associées à une élliptocytose héréditaire sont indiquées par des ronds jaunes et sont le plus fréquemment localisées dans l'une des trois hélices α du site de tétramérisation. Des sites de phosphorylation présumés sur l'extrémité C-terminale de la chaîne β sont indiqués par un P.

1.5. LES SPECTRINES DANS LES CELLULES NUCLÉÉES

La découverte d'analogues des principaux constituants du squelette membranaire et en particulier de la spectrine dans toutes les cellules nucléées au niveau des membranes plasmiques et de la plupart des membranes des organelles intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mais également dans le noyau) a ouvert de nouveaux champs d'investigation prometteurs de la biologie cellulaire. Au sein de ces structures, le rôle essentiel des spectrines a été démontré chez le nématode et la drosophile chez lesquels l'invalidation des gènes est létale avec des altérations précoces du développement. Plus récemment des rôles plus spécifiques ont été établis pour certaines chaînes spectrine chez l'homme, la souris ou le poisson. Mais les fonctions des spectrines sont loin d'être complètement définies et pourraient être plus complexes que les fonctions simplement structurales caractérisées dans le globule rouge. Toute recherche dans ce domaine doit intégrer la multiplicité des gènes et la diversité de leurs produits : deux gènes codant les chaînes α (α I et α II) et cinq gènes codant les chaînes β (β I à β V). Dans le globule rouge ne sont présents que les produits des gènes α I et β I tandis que les autres types cellulaires contiennent plusieurs produits (isoformes) des différents gènes. De plus, la distribution des spectrines peut être dynamique avec une redistribution entre les différents compartiments. Par exemple lors de la mitose on peut observer qu'une partie de la spectrine passe de la zone sous membranaire vers le cytoplasme. La distribution des spectrines pourrait être contrôlée par

différentes modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations et des clivages par des protéases de type calpaïnes (des protéases à cystéine dont l'activité est dépendante du calcium) et caspases.

1.6. LES SPECTRINES DES CELLULES NUCLÉÉES ONT DE NOMBREUX PARTENAIRES

Les hypothèses relatives aux fonctions des spectrines dans les cellules non érythroïdes sont surtout émises à partir des données obtenues sur leurs localisations et leurs interactions avec d'autres protéines. La présence de spectrines dans des vésicules d'endocytose ou dans l'appareil de Golgi ainsi que des interactions avec des protéines moteur (kinésine/dynéine/dynactine) évoquent un rôle dans l'endocytose, la sécrétion, le tri et le trafic cellulaires des protéines. Dans des cellules épithéliales, la spectrine est localisée entre autre au niveau des contacts cellule-cellule et cellule-matrice. La chaîne β II lie avec une forte affinité l' α -caténine, l'une des protéines des jonctions adhérentes (formées entre autre d'E-cadherine et de α et β -caténine) (29). La spectrine est présente dans les jonctions serrées avec les protéines 4.1, ZO-1, ZO-2 et l'occludine. L'interaction spectrine/ZO-1 est contrôlée par les concentrations d'ATP et de calcium (30, 31). L'une des particularités de la polarité cellulaire est la distribution spécifique, à un pôle ou à un autre, de protéines telles que des transporteurs membranaires ou des canaux. La spectrine est impliquée dans l'adressage et surtout dans le maintien de protéines transmembranaires (voir « Pathologies liées aux mutations des spectrines », page 26). Par exemple, la Na^+/K^+ -ATPase est adressée au niveau de la membrane basolatérale par l'intermédiaire d'un complexe Na^+/K^+ -ATPase/ankyrine/spectrine (32, 33). D'ailleurs, dans les cellules de mammifères Caco2 (colon), la surexpression des domaines de liaison pour l'actine et l'ankyrine de la spectrine β II modifie l'adressage de la Na^+/K^+ -ATPase mais aussi de l'ankyrine et de l'adducine, et conduit progressivement à une perte de la morphologie et de la polarité des cellules qui deviennent multinucléées (34). Des études plus récentes réalisées sur différents modèles animaux qui ont des mutations dans un gène spectrine ont enfin permis d'aborder les fonctions des spectrines dans le contexte d'un organisme entier (*in vivo*).

1.7. LA SPECTRINE NON ÉRYTHROÏDE EST SPÉCIFIQUEMENT DÉGRADÉE PAR DES PROTÉASES

Les chaînes α I et α II se ressemblent énormément du point de vue de l'analyse des séquences primaires et il est fort probable que la ressemblance existe également au point de vue de la structure globale. Cependant, on trouve insérée dans le milieu de la chaîne α II une région courte (36 acides aminés) qu'on ne trouve pas dans la chaîne α I. Cette région porte deux sites distincts reconnus par des protéases de la famille des calpaïnes et des caspases. **Cela confère à la chaîne α II des propriétés de protéolyse ciblée.** En outre la région contient un site de liaison de forte affinité pour la calmoduline. Dans la suite de ce document je la nommerai « région CCC » (pour Calpaïne, Caspase, Calmoduline). La région CCC est insérée dans l'hélice C de la dixième unité répétitive (voir Figure 6 page 23).

1.7.1 COUPURE DE LA CHAÎNE α II PAR LES CALPAÏNES

Les calpaïnes m et μ coupent la spectrine d'abord dans la région CCC (acide aminé α II/Tyr₁₁₇₆) puis dans la partie carboxy terminale de la chaîne β II. Le site de clivage sur la chaîne α II est adjacent au site de fixation de haute affinité pour la calmoduline. La liaison de la calmoduline sur la chaîne α II augmente considérablement la coupure de cette chaîne par les calpaïnes. Il a été

démontré *in vitro* que la spectrine clivée par les calpaïnes a une affinité très diminuée pour l'actine (35). La coupure par les calpaïnes serait alors un moyen pour déstructurer le squelette membranaire.

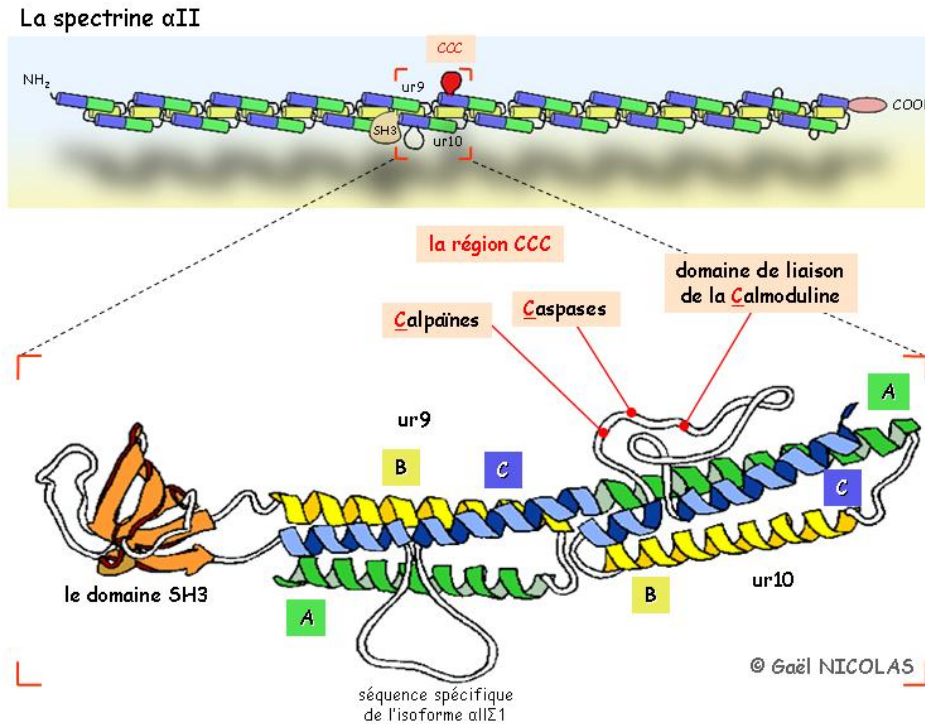


Figure 6
Représentation schématique des unités répétitives 9 et 10 de la chaîne αII

Le domaine SH3 (72 acides aminés) est inséré dans la neuvième unité répétitive entre les hélices B et C. La région CCC (34 acides aminés) est insérée dans l'hélice C de la dixième unité répétitive. Cette région porte un site de coupure des calpaïnes, des caspases et un site de fixation pour la calmoduline. Dans l'hélice C de la dixième unité répétitive est insérée une séquence de vingt acides aminés qui peut être éliminée (par épissage alternatif de l'exon codant cette séquence).

1.7.2 COUPURE DE LA CHAÎNE αII PAR LES CASPASES

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une forme de mort cellulaire avec un certain nombre de caractéristiques spécifiques comme la condensation du noyau, la fragmentation de la chromatine en nucléosomes, le bourgeonnement de la membrane et la formation d'un corps apoptotique. L'apoptose intervient soit dans le développement de l'organisme (morphogenèse), dans la différenciation et la maturation d'une cellule (par exemple la sélection des lymphocytes T) mais peut également être déclenchée par un stimulus extérieur (exposition à une toxine, hypoxie, action de certaines hormones de croissance). Il a été démontré que la spectrine non érythroïde est protéolysée au cours de l'apoptose induite par différents stimuli cellulaires à cause de l'action de différentes caspases (36-42). Comme pour les calpaïnes, la spectrine clivée par les caspases pourrait être incapable d'interagir avec l'actine. Il a été proposé que ce processus, en induisant un réarrangement important du squelette membranaire par une déstabilisation de ses interactions avec la spectrine, permettrait le bourgeonnement de la membrane classiquement observé sur les cellules en apoptose. Le modèle murin que j'ai développé a permis de répondre sur ce point. La

protéolyse de la spectrine est un phénomène très précoce qui intervient avant la protéolyse d'autres substrats tels que la polymérase poly-(ADP-ribose), la sous-unité de 70 kDa de la ribonucléoprotéine U1 ou encore la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (37).

Le clivage de la spectrine par la caspase 3 se produit sur les deux chaînes de manière séquentielle sur plusieurs sites de coupure, deux sites principaux sur α et trois sur β . Le premier site de la chaîne α est localisé entre les résidus α II/Asp₁₁₈₅ et α II/Ser₁₁₈₆. Les caspases 3 coupe la spectrine α II, au niveau de ce site, ce qui conduit à la production de deux fragments de taille similaire. Le deuxième site se trouve entre les résidus α II/Asp₁₄₇₈ et α II/Ser₁₄₇₉, sans doute dans une boucle située entre les hélices A et B de la treizième unité conformationnelle et pourrait être spécifiquement clivé par la caspase 3 (43, 44).

1.7.3 AUTRE CLIVAGE DE LA CHAÎNE α II

En 2003 une équipe mexicaine a identifié une nouvelle protéase, Pet, produite par une souche *E. coli* entéro-aggrégative pathogène (responsable de diarrhées sévères) qui coupe spécifiquement la spectrine α II dans la région CCC. Les auteurs démontrent que Pet pénètre dans la cellule et qu'elle clive la spectrine. De façon concomitante une déstabilisation du réseau d'actine est observée. Il est proposé que la déstabilisation du squelette membranaire par Pet est responsable de la déstructuration de l'épithélium intestinal provoqué par cette bactérie (45). Ce travail est intéressant – bien qu'il soit indirect – puisqu'il suggère le lien entre le clivage de la spectrine et le maintien de l'intégrité cellulaire.

1.7.4 COUPURE DE β II

Le clivage sur la chaîne β est plus complexe. À la différence de ce qui se produit pour les calpaïnes, la caspase 3 coupe la chaîne β rapidement et de manière concomitante à la chaîne α . Le site de coupure initial se situe entre les résidus β II/Asp₁₄₅₇ et β II/Ser₁₄₅₈, à proximité d'un site de coupure pour les calpaïnes. Les sites de coupure suivants sont situés entre les résidus β II/Asp₁₂₅₄- β II/Asp₁₂₅₅ et β II/Asp₂₁₄₆- β II/Thr₂₁₄₇. D'autres sites de coupure existent sur la chaîne β mais ils sont sans doute minoritaires.

1.8. LES FONCTIONS PROPOSÉES AU CLIVAGE DE LA SPECTRINE NON ÉRYTHROÏDE...

... ou pourquoi la spectrine du globule rouge est-elle très stable ?

Les spectrines des cellules nucléées sont soumises à un *turn-over* rapide d'une vingtaine de minutes à un maximum de quelques heures (cette étude a été réalisée à partir de culture de neurones d'hippocampe de rat) (46) et sont redistribuées entre le cytosol et la membrane selon l'état de la cellule. Cette redistribution entre les différents compartiments cellulaires pourrait être liée à des clivages spécifiques par les calpaïnes et les caspases. La coupure de la spectrine par ces protéases suggère qu'elle pourrait être impliquée dans le changement de morphologie cellulaire. Au contraire la spectrine du globule rouge doit rester intacte tout au long de la vie du globule rouge (quatre mois en moyenne) sans que celui-ci puisse assurer une néo-synthèse de spectrine puisqu'il a perdu son noyau. De plus le cytosol du globule rouge contient une grande quantité de calpaïnes actives. La chaîne α II, si elle était présente ici, serait rapidement dégradée et non renouvelée. L'interaction entre les dimères de spectrine du globule rouge (α I β I) est cent fois plus faible que l'affinité des dimères de spectrine des autres cellules (α II β II) (47). On peut aisément concevoir que le globule rouge doit posséder un squelette membranaire plus souple afin de pouvoir se

déformer facilement en se faufilant dans les capillaires étroits. Cette souplesse serait notamment assurée par la possibilité de dissocier plus facilement les tétramères de spectrine en dimères.

Dans les cellules nucléées, si le squelette membranaire est plus stable, il doit exister un processus pour déstructurer celui-ci lorsque la cellule doit par exemple se différencier ou réaliser des phénomènes de remaniement membranaire (endocytose, exocytose, formation de filopodes et de lamellipodes). **Notre hypothèse est que la déstabilisation du squelette membranaire non érythroïde passe alors par le clivage ciblé de la spectrine.** Il est intéressant de noter que les oiseaux possèdent une unique chaîne α qui porte une région CCC. Leurs globules rouges expriment donc cette spectrine. Or la particularité des globules rouges des oiseaux est qu'ils possèdent encore un noyau qui pourrait assurer une synthèse continue de spectrine lorsque celle-ci est dégradée par les protéases érythroïdes.

1.9. UN PRÉ-REQUIS POUR L'ENDOCYTOSE ?

Le squelette membranaire et en particulier la spectrine sont peut-être impliqués dans les phénomènes d'endocytose dépendante de la clathrine et une déstructuration locale du squelette membranaire serait une étape préliminaire à la formation des vésicules de bourgeonnement. Il existe une perte de spectrine au niveau des sites de bourgeonnement dans des fibroblastes en culture et des anticorps anti-spectrine sont capables de bloquer l'endocytose (48), mais également l'exocytose (49). Pour fragiliser le squelette sous-membranaire dont l'architecture principale est, rappelons-le, assurée par la spectrine, l'une des étapes initiales pourrait être un clivage spécifique de la spectrine par la calpaïne. Des inhibiteurs de la calpaïne bloquent effectivement l'endocytose (48). De plus, la calpaïne μ est co-purifiée avec les vésicules de clathrine (50). Il a été démontré que la spectrine interagit avec l'annexine VI, une protéine liant le calcium et les lipides et impliquée dans l'endocytose *via* des vésicules à clathrine. Cette protéine est nécessaire au bourgeonnement des vésicules recouvertes de clathrine. Cette interaction annexine VI/spectrine permet probablement le recrutement des calpaïnes, lesquelles vont ensuite pouvoir cliver la spectrine, ce qui entraîne la fragilisation locale du squelette membranaire (48).

1.10. LE DÉVELOPPEMENT NEURONAL

Plusieurs études ont démontré que le réseau de spectrine était localement déstructuré par coupure avec les calpaïnes lors de l'amputation de l'axone (51-53). Ce remodelage est indispensable pour permettre au neurone de faire croître son axone. Le clivage dépendant de la calpaïne serait donc impliqué dans la régénération des neurones. À l'inverse un clivage trop important serait responsable d'une déstructuration excessive du squelette membranaire et interviendrait dans les processus pathologiques de dégénérescence neuronale. On retrouve notamment un clivage augmenté de la spectrine dans la maladie d'Alzheimer mais il n'est pas établi s'il s'agit d'un événement primaire ou secondaire à la maladie.

1.11. LA SPECTRINE ET L'ISCHÉMIE

De nombreuses pathologies d'organes s'accompagnent d'une ischémie tissulaire (résultat d'un arrêt de la circulation sanguine, par exemple par obstruction artérielle ou lors d'une transplantation d'organes). Les effets de l'ischémie sur les cellules épithéliales sont variés et dépendent de l'organe et du type cellulaire touchés. L'ischémie entraîne des modifications de l'architecture des cellules par désorganisation du cytosquelette et des altérations de fonctions par modification de l'expression des gènes qui peut aller jusqu'à la mort cellulaire. Dans le rein, la

région la plus sensible à l'ischémie est le tubule proximal. Il est observé une perte des microvillosités, une altération des microtubules, une déstabilisation des complexes jonctionnels (cellule-cellule et cellule-matrice). Il s'ensuit une anomalie du transport vectoriel (natriurèse et protéinurie). Notamment, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ se redistribue de la membrane basolatérale vers le pôle apical contribuant à la diminution de l'extrusion du sodium de la cellule. Les cellules tubulaires proximales perdent ainsi leur polarité et l'intégrité des jonctions serrées, conséquence probable de l'altération du réseau d'actine, le cytosquelette microtubulaire et le squelette membranaire. La protéolyse de la spectrine qui se produit au cours de l'ischémie pourrait expliquer non seulement une partie de ces altérations cellulaires mais également la délocalisation de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ du squelette membranaire (54). Les calpaïnes sont probablement des effecteurs importants de l'ischémie puisque des inhibiteurs de ces enzymes sont capables d'apporter un effet protecteur contre l'ischémie (pour revue, voir (55)).

Enfin, la déstructuration du squelette dépendant de la spectrine est également largement décrite dans l'ischémie du cerveau. Certaines équipes cherchent même à mettre au point les produits de clivage de la spectrine αII dans le fluide cérébrospinal comme marqueur des accidents vasculaires cérébraux (55).

1.12. SPECTRINE ET MALADIE DE GOUGEROT-SJÖGREN

La maladie de Gougerot-Sjögren est un syndrome auto-immun dans lequel on observe une destruction des glandes exocrines telles que les glandes salivaires ou lacrymales. En 1997, une équipe japonaise décrivait la présence d'auto-anticorps anti-spectrine αII chez des patients atteints de cette maladie (56). Les auteurs proposent que l'auto-réactivité des anticorps anti- αII serait l'élément primaire conduisant à la destruction des tissus. Dans une étude les auteurs immunisent des souris avec un peptide recombinant de spectrine αII recouvrant une région auto-antigénique identifiée dans le syndrome de Gougerot-Sjögren. Ils démontrent que les animaux développent une immunité contre ce peptide suivie des symptômes de type Gougerot-Sjögren (57).

1.13. PATHOLOGIES LIÉES AUX MUTATIONS DES SPECTRINES

1.13.1 PATHOLOGIES HUMAINES ((ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN : OMIM™)

SPECTRINES αI (OMIM™ 182860) ET βI (OMIM™ 182870)

La fonction de la spectrine a été clairement définie dans le globule rouge grâce aux données fournies par l'étude de certaines anémies hémolytiques héréditaires. Les anomalies identifiées siègent le plus fréquemment sur les extrémités N- et C-terminales des chaînes α et β respectivement. Ces extrémités portent, nous l'avons vu, les sites d'interaction sur les deux dimères pour la formation du tétramère (voir Figure 5 page 21). Ainsi, ces anomalies moléculaires des chaînes α et β , en empêchant la formation des tétramères de spectrine, sont-elles directement responsables des conséquences physiopathologiques chez les patients porteurs de ces mutations : une instabilité membranaire conduisant à une déformation elliptocytaire permanente des globules rouges appelée elliptocytose héréditaire (EH). Chez certains patients, les érythrocytes sont tellement fragiles qu'ils subissent une hémolyse importante (pyropoikilocytose héréditaire) nécessitant alors une splénectomie pour limiter la destruction accrue de ces globules rouges abîmés. Des cas extrêmes d'anarsaques fœtoplacentaires ont été rapportées, conséquences d'hémolyse prénatale intense due à des mutations également situées dans le site de tétramérisation (58, 59). Enfin, des défauts quantitatifs de spectrine peuvent être responsables de la forme

sphérique des globules rouges (sphérocytose héréditaire) par diminution de leur surface membranaire.

D'autres mutations de la spectrine, associées à un phénotype d'elliptocytose sévère à l'état homozygote, ont également été identifiées sans qu'un défaut de tétramérisation ait été mis en évidence (60, 61).

La mutation α^{LELY} provoque une délétion de six acides aminés dans l'hélice A de la vingtième unité répétitive. Cette délétion diminue l'affinité des deux chaînes au site de nucléation et a pour conséquence de privilégier le recrutement à la membrane du dimère $\alpha\beta$ normal par rapport au dimère $\alpha^{\text{LELY}}/\beta$ car les dimères normaux sont recrutés majoritairement par rapport aux dimères mutants (62). Chez les sujets sains comme chez les sujets homozygotes pour l'allèle α^{LELY} , il n'existe pas de déficit quantitatif de spectrine recrutée dans le squelette membranaire car la chaîne α est synthétisée en large excès par rapport à la chaîne β (63). En revanche, en présence d'un allèle porteur d'une mutation spectrine, chez un sujet EH, on observera des conséquences sur le phénotype clinique. Si l'allèle α^{LELY} est associé en *trans* à un allèle muté, responsable d'une EH, la présence de l'allèle α^{LELY} favorisera le recrutement dans la membrane du produit du gène portant la mutation EH, ce qui aura des conséquences aggravantes du phénotype clinique. Inversement, si l'allèle α^{LELY} est associé en *cis* à un allèle muté, le produit de ce gène muté sera moins recruté à la membrane, ce qui diminuera la sévérité du phénotype clinique. Ces résultats ont ainsi permis d'apporter une explication moléculaire cohérente des données cliniques hétérogènes observées chez les patients atteints d'EH.

SPECTRINE βIII (OMIM™ 604985)

L'ataxie spino-cérébelleuse est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par une atrophie du cervelet et la mort des cellules de Purkinje. Une étude montre que des mutations de la spectrine βIII entraînent le développement de la maladie (64). Les expériences démontrent que cette spectrine est impliquée dans la stabilisation du transporteur de glutamate EAAT4 (*Excitatory Amino Acid Transporters 4*) et de la sous-unité GluR δ 2 du récepteur du glutamate sensible à l'alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolpropionate (AMPA). Par exemple la transfection de la spectrine βIII limite les mouvements intracellulaires de la protéine EAAT4 fusionnée à la GFP. La même protéine diffuse beaucoup plus librement au sein de la cellule en présence de la spectrine βIII mutante. La perte de localisation de EAAT4 et GluR δ 2 dans des zones spécifiques des cellules de Purkinje serait responsable de cette ataxie. Ces résultats démontrent et confirment que les réseaux de spectrine sont impliqués dans le maintien de protéines membranaires.

1.13.2 PATHOLOGIES MURINES

LES SPECTRINES αI ET βI

Les invalidations des gènes αI et βI de la spectrine ont complété les données fournies par les expériences *in vitro* et la pathologie humaine. Chez la souris, les invalidations des gènes αI (*Spna1^{sph}/Spna1^{sph}* ou *sph/sph*) ou βI (*Spnb1^{ja}/Spnb1^{ja}* ou *ja/ja*) conduisent à un déficit très important de la spectrine dans les globules rouges avec une anémie hémolytique sévère (65-67). Au-delà de ce phénotype primaire attendu, un certain nombre d'observations supplémentaires ont été apportées. À partir des souris *sph/sph*, Dahl *et al.* (68) ont établi une lignée érythroleucémique présentant des formes anormales et une extrême fragilité en culture. Ils ont démontré que le coiffage des glycoprotéines par les lectines ou les anticorps se produit plus rapidement dans les cellules *sph/sph* que dans les cellules érythroleucémiques « normales ». Ces

données confirment d'une part la fonction essentielle de la spectrine dans l'organisation des structures membranaires et d'autre part sa capacité à limiter la mobilité des protéines intégrales dans la membrane. Des études ont montré que les souris *sph/sph* adultes développaient des lésions thrombotiques et que les cellules hématopoïétiques déficitaires en spectrine β I étaient directement responsables de la mise en place de ces accidents thrombotiques (69, 70).

LA PROTÉINE ELF

Les travaux de Mishra *et al.* portent sur une chaîne β -spectrine qu'ils ont clonée à partir du foie fœtal de souris. Pour cette raison cette chaîne fut nommée ELF (*Embryonic Liver Fodrin*). Les séquences des gènes *Spnb2* (codant β II) et *Elf3* (codant ELF) sont très similaires si bien qu'il n'est pas clair s'il s'agit d'un gène unique ou de deux gènes distincts très proches sur le même chromosome. Plusieurs données suggèrent qu'il pourrait s'agir de deux gènes distincts. Tout d'abord les deux ADNc ont une similarité de 89 % et les deux protéines codées par ceux-ci ont une similarité de 95 % (71). Des protéines de taille correspondante à ELF (200 kDa) et à la spectrine β II (240 kDa) peuvent être reconnues par des anticorps anti- β II dans le lysat protéique d'embryons normaux. À l'inverse la protéine ELF n'est plus reconnue dans le lysat des embryons *Elf*^{-/-} alors qu'une protéine de la taille de β II est toujours reconnue par les anticorps anti- β II (Figure 10 de (72)). Par ailleurs Hayes *et al.* montrent par des études par Northern blot que la taille des ARNm codant β II et ELF diffère ainsi que leur distribution tissulaire. Par exemple on voit une très forte expression des ARN ELF dans le rein (Figure 4 de (71)) alors qu'une sonde β II ne montre aucune expression dans cet organe (Figure 3 de (73)). Enfin, une étude réalisée à l'aide de marqueurs génétiques montre que, bien qu'étant situés dans la même région sur le chromosome 11 murin, les gènes *Elf3* et *Spnb2* n'ont pas la même localisation génétique (71). Sans autre explication ces arguments sont en faveur de l'hypothèse de deux gènes différents. Il serait assez simple de définir des oligonucléotides spécifiques pour voir s'il est possible de détecter les deux types d'ARNm dans une même cellule.

Les embryons *Elf*^{-/-} présentent des anomalies morphologiques à partir du stade E9.5. Ces défauts qui touchent le système gastro-intestinal, le foie, le cerveau et le cœur sont incompatibles avec la vie (74). Le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) induit un signal sur la cellule réceptrice partant au niveau des récepteurs à activité kinase sur résidus sérine ou thréonine pour aboutir aux médiateurs intracellulaires spécifiques, les protéines SMAD (*Smad and MAD-related proteins*). L'activation des protéines SMAD provoque leur translocation vers le noyau dans lequel elles sont capables d'activer l'expression de gènes cibles. Les embryons *Elf*^{-/-} ont des phénotypes similaires à ceux des embryons *Smad2*^{+/-} *Smad3*^{+/-}. Des fibroblastes embryonnaires dérivés des embryons *Elf*^{-/-} ne répondent pas au TGF- β mais répondent au PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). La protéine ELF forme un complexe avec les protéines SMAD3 et SMAD4 seulement après stimulation par le TGF- β 1. Les auteurs proposent le modèle suivant : le TGF- β 1 déclenche une phosphorylation de ELF qui subit par ce biais un changement conformationnel, ce qui a pour conséquence de diminuer son affinité pour ses partenaires du squelette membranaire (ankyrine B, tropomyosine) et facilite son association avec SMAD3 et SMAD4, puis sa translocation vers le noyau. L'absence de ELF provoque une mauvaise localisation des protéines SMAD3 et SMAD4 qui ne permet pas une bonne signalisation *via* le TGF β .

Ces travaux de grande qualité forment la première démonstration de l'implication d'une chaîne spectrine dans la transduction de signaux.

Par la suite les auteurs ont démontré que la protéine ELF est impliquée dans le développement de tumeurs. Notamment :

- des lignées humaines de cancer gastrique ou des biopsies de tumeurs ont une diminution des protéines ELF et de SMAD4 (75) ;

- des carcinomes hépatiques se développent chez les souris *Elf*⁺/₋ (75, 76). Des carcinomes coliques et des tumeurs gastriques se développent chez les souris *Elf*⁺/₋ *Smad4*⁺/₋ (77).

LA SPECTRINE β IV

Des mutations naturelles du gène β IV ont été identifiées chez la souris (souris *qv*¹, *qv*^{2j}, *qv*^{3j}, *qv*^{Ind} et *qv*^{Ind2j}) et associées à un syndrome de tremblement (problèmes auditifs et moteurs) dû à une mauvaise localisation du canal potassique dépendant du voltage KCNA1 (78) ou du canal sodique dépendant du voltage VGSC (79).

AUTRES

Notons qu'il a été montré que l'haploinsuffisance d'ankyrine de type 2, qui est une protéine majeure des squelettes membranaires non érythroïdes et associée avec la spectrine, entraîne une arythmie cardiaque aussi bien chez l'homme que chez la souris. Le phénotype est associé à une mauvaise localisation de pompes à sodium (Na⁺/K⁺-ATPase de type 1 et 2), d'échangeur sodium/calcium et de récepteur d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) (80).

Citons également un modèle particulier : des souris possédant une mutation du gène *Klotho*, codant une protéine impliquée dans la régulation du métabolisme calcique et phosphatasique, présentent un vieillissement prématuré. L'un des événements précoces de ce processus pathologique est l'activation des calpaïnes qui clivent alors de manière excessive la spectrine α II (81).

À ce jour aucune mutation du gène α II n'a été décrite chez la souris.

Ainsi l'ensemble de ces données obtenues *in vivo* ou *ex vivo* démontre-t-il un rôle direct de la spectrine et de ses partenaires dans le maintien de multiples protéines dans la membrane et/ou dans des zones cellulaires précises.

1.13.3 MUTATIONS DES GÈNES α -SPECTRINE CHEZ D'AUTRES ANIMAUX

Citons que l'invalidation du gène unique α -spectrine est létale chez la mouche *Drosophila melanogaster* (drosophile) et le ver *Caenorhabditis elegans* (82-84).

Une mutation naturelle (st60) du gène α II a été identifiée chez le poisson zèbre (85). Il s'agit d'une mutation non sens située dans la treizième unité répétitive. Les embryons homozygotes pour cette mutation sont normaux au jour 4 dpf (après fertilisation). À partir du cinquième jour ils présentent un œdème péricardiaque et une nécrose du foie. Les embryons meurent au quinzième jour. Les auteurs se focalisent sur une anomalie des nœuds de Ranvier dans les axones contenant de la myéline. On peut également tirer la conclusion suivante à partir de cette étude : puisque les embryons mutants sont normaux au jour 4 dpf cela signifie que la spectrine entière n'est pas indispensable lors de la mitose auquel cas un phénotype beaucoup plus précoce et généralisé aurait dû être observé.

2. RÉSULTATS

Les sections 0 et 2.2 ci-après résument les résultats concernant l'étude fonctionnelle et structurale du site de tétramérisation de la spectrine que j'ai obtenus pendant mon doctorat sous la direction de Marie-Christine LECOMTE.

2.1. ÉTUDE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DU SITE DE TÉTRAMÉRISATION DE LA SPECTRINE : EFFET DE MUTATIONS ASSOCIÉES À DES ELLIPTOCYTOSES HÉRÉDITAIRES

**VOIR L'ARTICLE 1 PRÉSENTÉ EN ANNEXE :
NICOLAS *et al.* 1998, BIOCHEMICAL JOURNAL**

2.1.1 DÉFINITION DES PEPTIDES α ET β IMPLIQUÉS DANS LE SITE DE TÉTRAMÉRISATION

L'auto-association des chaînes α - et β -spectrine est une fonction particulièrement importante pour la stabilité du squelette membranaire comme l'ont montré les défauts fonctionnels associés à des mutations présentes dans les elliptocytoses héréditaires.

Rappelons que le modèle proposé pour le site d'auto-association de la spectrine impliquant la première hélice C isolée de la chaîne α pourrait s'associer aux deux dernières hélices A et B de la chaîne β pour reconstituer une unité conformationnelle trihélicoïdale semblable à celles observées le long de la molécule. Les mutations localisées dans les trois hélices probablement impliquées dans le site d'auto-association de la spectrine sont associées à un défaut d'interaction important, à l'inverse des autres mutations localisées en dehors du site présumé (voir Figure 5 page 21).

Au cours de mon doctorat, j'ai d'abord cherché à définir, sur les chaînes α et β de la spectrine érythroïde humaine, les régions nécessaires et suffisantes pour l'interaction entre les deux chaînes. Ce travail a été réalisé à l'aide de peptides recombinants (protéines de fusion couplées à la GST purifiées après expression dans *E. coli*). Quatre peptides recombinants de l'extrémité C-terminale de la chaîne α et quatre de la chaîne β ont été exprimés (voir Article 1, Figure 1). Les peptides obtenus en qualité et en quantité suffisante ont été testés pour leur capacité à se lier à leurs partenaires respectifs. Les peptides β ont d'abord été utilisés sous la forme de protéines de fusion, c'est-à-dire couplées à la GST, alors que les peptides α ont été débarrassés de la GST, après clivage par la thrombine. Après interaction, les peptides α réassociés ou non aux protéines de fusion GST- β fixées à des billes de sépharose CL-4B-glutathion ont été séparés par électrophorèse dénaturante. Nous avons ainsi démontré que les peptides correspondant aux deux dernières hélices A et B de la chaîne β ou aux 50 premiers résidus de la chaîne α (hélice C) ne peuvent se réassocier que s'ils sont assemblés à l'unité conformationnelle trihélicoïdale adjacente (voir Article 1, Figure 3).

2.1.2 APPROFONDISSEMENT DES DONNÉES BIOCHIMIQUES DE L'INTERACTION

Nous avons ensuite travaillé avec des peptides α et β débarrassés de la GST, après clivage par la thrombine. Les études par dichroïsme circulaire ont montré que les peptides obtenus possédaient une structure fortement hélicoïdale (75-80 %) similaire à celle de la spectrine native (voir Article 1, Figure 2). Après réassociation, les différentes espèces ont été séparées par électrophorèse non dénaturante rapide à 4°C (système PhastSystem de Pharmacia). Les peptides utilisés étaient pleinement fonctionnels car capables de se lier :

1. À leur partenaire recombinant respectif (voir Article 1, Figure 4) ;
2. À la spectrine native à 30°C et d'inhiber la formation du tétramère (voir Article 1, Figure 5).

Les interactions réalisées après marquage des peptides α avec ^{125}I ont permis d'établir précisément la constante de dissociation de l'interaction (K_D). Celle-ci est identique à celle observée dans la molécule native (1 μM , voir Article 1, Figure 6). L'extrémité COOH non homologue de la chaîne β n'est pas nécessaire pour l'interaction avec le partenaire α . Cependant, les courbes de Scatchard, démontrant la présence de deux populations de complexe α/β , suggèrent que cette région pourrait stabiliser soit les hélices A et B de la chaîne β , soit le complexe α/β (voir Article 1, Figure 6).

2.1.3 CONSÉQUENCES STRUCTURALES DE LA TÉTRAMÉRISATION

Nous avons complété ce travail en étudiant la stabilité structurale des peptides recombinants α et β réassociés en collaboration avec l'équipe de Walter Gratzer (*Medical Research Council Muscle and Cell Motility Unit, Randall Institute, King's College, Londres*). L'analyse structurale des peptides par dichroïsme circulaire couplée aux profils de dénaturation thermique a démontré que l'unité répétitive conformationnelle complète présente dans les peptides α et β étudiés possédait un repliement tertiaire stable, confirmant ainsi nos premières données de dichroïsme circulaire. L'étude du peptide αI contenant les cinquante premiers acides aminés a montré qu'il était particulièrement instable à cause d'une structure en feuillet β , ce qui engendrait une agrégation importante. Ceci permet d'expliquer pourquoi ce peptide ne se réassocie pas avec les partenaires β . En ce qui concerne les autres peptides, tous présentaient un pourcentage d'hélices α équivalent à celui que l'on observe dans la spectrine native. De plus, les études d'équilibre de sédimentation réalisées sur ces peptides ont montré qu'ils étaient principalement monomériques en solution et ne formaient pas d'homodimère comme cela a été observé lorsque les peptides sont très concentrés, par exemple pour les études de RMN et de diffraction des rayons X. Cependant une proportion des peptides, particulièrement pour les unités répétitives 16 et 17 suivies de la partie C-terminale non homologue, formait des agrégats de hauts poids moléculaires.

La constante d'association mesurée, $1-2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, était compatible à la fois avec celle de la spectrine native et avec celle que nous avons mesurée par établissement des courbes de Scatchard (voir Article 1, Figure 6). L'association n'était pas affectée par l'extrémité C-terminale non homologue de la chaîne β de la spectrine.

Les études d'équilibre de sédimentation ont démontré que des mélanges équimolaires de peptides α et β formaient des complexes 1/1. Les courbes de mélange, observées par dichroïsme circulaire ont montré que l'association des peptides α et β s'accompagnait d'une augmentation du pourcentage d'hélice α de 12 à 15 %, ce qui correspond à un nombre d'acides aminés acquérant une structure hélicoïdale compris entre 14 et 18 (à titre de comparaison, les hélices A, B et C sont composées de 29 à 32 acides aminés).

2.1.4 CONFIRMATION DU LIEN ENTRE MUTATIONS EH ET TÉTRAMÉRISATION

RETENTISSEMENT DES MUTATIONS EH SUR LA TÉTRAMÉRISATION

Le modèle étant bien établi, nous avons introduit trois mutations localisées dans ce site qui sont associées à des elliptocytoses héréditaires. Ces mutations sont situées sur la chaîne β de la spectrine bien que la majorité soit située dans la première hélice C de la chaîne α . L'une d'elle (W2024R) touche le tryptophane invariant présent dans toutes les unités répétitives des chaînes α et β de la spectrine mais également dans l' α -actinine et la dystrophine. Une autre mutation

(W2061R) affectait un résidu qui, par comparaison avec les structures biophysiques établies (RMN et cristallographie aux rayons X), semblait localisé dans le cœur hydrophobe formé par les trois hélices α . Enfin, la dernière mutation étudiée (A2023V) est à la fois conservative et semble située en dehors des zones présumées d'interaction. Nous souhaitions donc vérifier soit que cette mutation A2023V était bien responsable du défaut d'auto-association observée, soit qu'elle pouvait être considérée comme une mutation neutre pour cette fonction. Pour les trois mutations, nous avons pu établir que :

1. Ces mutations étaient bien responsables du défaut d'auto-association de la spectrine ;
2. L'intensité de ce défaut fonctionnel (estimé par la mesure des K_D) dépend de la nature et de la localisation de chaque mutation au sein du site, comme cela est observé dans la molécule native chez les patients.

Ainsi les mutations W2024R et W2061R affectent-elles très fortement l'auto-association. Nous avons estimé que les K_D étaient de 240 μ M et 130 μ M (1 μ M pour le peptide β non muté), respectivement. En ce qui concerne la mutation A2023V, nous avons montré que sa présence affectait peu l'auto-association avec le partenaire α . Cependant, la mesure du K_D indiquait une valeur de 8 μ M, ce qui confirmait que la mutation était bien responsable d'un défaut d'auto-association modéré (voir Article 1, Figure 8).

CONSÉQUENCES STRUCTURALES DES MUTATIONS HE

Enfin, nous avons poursuivi ce travail en étudiant le retentissement structural des trois mutations décrites précédemment, également en collaboration avec l'équipe de Walter Gratzer (86).

Les peptides β portant les mutations étudiées présentaient un pourcentage d'hélice α peu différent du peptide sans mutation. De manière inattendue, la stabilité structurale de l'unité conformationnelle complète adjacente était fortement affectée par la présence de l'une des trois mutations EH situées à la limite de la partie C-terminale de la protéine. La déstabilisation était particulièrement importante pour le peptide portant la mutation W2024R.

La réassociation des peptides α et β a été étudiée par dichroïsme circulaire comme précédemment. L'interaction entre le peptide β A2023V et le peptide α a démontré qu'il se produit également une augmentation du pourcentage d'hélice α mais que celle-ci est diminuée de 40 % comparé à celle générée par le peptide β sans mutation. En ce qui concerne les peptides W2024R et W2061R, aucune augmentation du pourcentage d'hélice α n'a été observée, ce qui démontre, une fois de plus, qu'ils sont incapables de s'associer au partenaire α .

Nous avons ainsi démontré, par des techniques biochimiques et biophysiques, les relations existantes entre les caractéristiques des mutations, l'intensité du défaut fonctionnel d'auto-association de la spectrine et la sévérité clinique observées chez les malades. Nous avons confirmé que chacune d'entre elles est bien responsable du défaut de tétramérisation et qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme protéique qui aurait pu être associé à un autre défaut moléculaire non identifié. De plus, nous avons démontré l'importance du résidu tryptophane très conservé dans les structures répétées trihélicoïdales des membres de la superfamille Spectrine.

Des travaux similaires ont largement confirmé nos résultats (87-89). La structure de la partie α du site de tétramérisation fût établie en 2002 par RMN (90, 91).

2.2. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE SH3 DE LA SPECTRINE α II

Forte de son succès sur le globule rouge – elle fût pionnière dans l'étude de la spectrine du globule rouge à la fois d'un point de vue fondamental mais également d'un point de vue clinique

et diagnostique – notre équipe a ensuite cherché à orienter sa thématique sur les spectrines des cellules nucléées. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la chaîne α II qui est ubiquitaire et qui subit une dynamique intracellulaire importante. Plusieurs équipes spécialisées dans l'étude du squelette membranaire ont suivi une démarche similaire à la nôtre : elles s'orientent aujourd'hui de plus en plus sur l'étude du squelette membranaire dans les cellules nucléées. Parmi ces équipes, citons celle de Jon MORROW (Université de Yale, USA) ou bien celle de Van BENETT (Université de Duke, USA).

J'ai décrit précédemment que les chaînes α des spectrines ont la particularité de porter un domaine SH3 dans leur région centrale. Ces courts motifs protéiques présents dans de nombreuses protéines sont impliqués dans des interactions protéiques avec des ligands riches en proline. Élucider la fonction d'un domaine SH3 revient en partie à identifier les protéines qui lui sont associées.

Le nouvel objectif fût d'établir quelles sont les fonctions des spectrines dans les cellules nucléées. Nous avons initié ce travail :

1. En recherchant des partenaires du domaine SH3 de α II par la technique du double hybride ;
2. En étudiant la régulation de la coupure de la spectrine α II par les calpaïnes.

VOIR L'ARTICLE 2 PRÉSENTÉ EN ANNEXE :

NICOLAS *et al.* 2002, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Dans cet article nous rapportons qu'une petite protéine tyrosine phosphatase – la LMPTP (*Low Molecular weight Protein Tyrosine Phosphatase*) – interagit avec le domaine SH3 de la chaîne α II. La spécificité de l'interaction est démontrée par les expériences de double hybride suivantes (voir Article 2, Figure 2) :

- il n'y a pas d'interaction lorsqu'on remplace le domaine SH3 α II par le domaine SH3 α I ;
- L'interaction est perdue lorsque le domaine SH3 α II est muté soit sur le résidu Glu₉₈₅, soit sur le résidu Pro₁₀₁₇, tous deux conservés dans la quasi-totalité des domaines SH3 ;
- Il existe deux isoformes – A et B – de la LMPTP qui diffèrent par l'insertion exclusive d'un exon dans une isoforme et d'un autre exon dans l'autre isoforme. Seule l'isoforme A interagit avec le domaine SH3 α II.

Nous avons confirmé cette interaction *in vitro* mais nous avons dû utiliser un agent pontant pour stabiliser le complexe SH3/LMPTP (voir Article 2, Figure 3). Nous avons ensuite démontré que la chaîne α II est phosphorylée *ex vivo* sur la tyrosine 1176 par les kinases Src et Lck (voir Article 2, Figures 5 et 6). Il s'agit de la tyrosine localisée dans le site de clivage par les calpaïnes. Nous démontrons que la phosphorylation bloque la coupure par la calpaïne (voir Article 2, Figure 7). L'isoforme A de la LMPTP est capable de déphosphoryler *in vitro* la tyrosine 1176 phosphorylée. L'isoforme B a une activité de déphosphorylation de ce résidu beaucoup plus faible (voir Article 2, Figure 8).

Nous proposons donc un modèle dans lequel le clivage par les calpaïnes peut être modulé par un mécanisme de phospho/déphosphorylation. Des résultats similaires ont été publiés peu après par l'équipe de Jon MORROW (92).

Cet article est le premier que nous avons publié sur notre recherche de partenaires de la région centrale de la spectrine α II par double hybride. Plusieurs travaux de l'équipe ont ensuite été publiés. Ils sont listés ci-dessous. Je co-signe la totalité de ces articles :

1. Rotter *et al.* (41)

La caspase 2 a été identifiée dans un nouveau crible double hybride en utilisant une banque de rein humain. Elle clive la région CCC au même endroit que les autres caspases. Cet article démontre aussi *in vitro* que la liaison de la calmoduline inhibe la coupure par la caspase 2 ;

2. Rotter *et al.* (93) et Bournier *et al.* (94)

Ces deux derniers articles présentent l'identification des protéines Tes (testine) et EVL comme partenaire du domaine SH3 α II. La protéine EVL est impliquée dans la polymérisation de l'actine tandis que la testine est un gène suppresseur de tumeur (95, 96). Ces études se focalisent sur le crible double hybride, sur la confirmation de ces interactions (GST *pull down*, immunoprécipitation) ainsi que sur des analyses par microscopie confocale mais n'apportent pas de démonstration fonctionnelle sur ces interactions.

Pour réaliser l'ensemble de ces travaux, nous avons développé à l'époque les premiers cribles avec le système double-hybride dans l'IFR Xavier Bichat et nous avons construit une banque d'expression de rein de rat. De nombreuses équipes de l'IFR ou extérieures ont bénéficié de notre expérience et plus d'une vingtaine de cribles ont été réalisés avec notre collaboration. Marie-Christine LECOMTE a monté une formation permanente sur le double hybride à l'INSERM. J'ai assuré le cours sur la partie théorique de cette formation.

2.3. ÉTUDE IN VIVO DE LA DYNAMIQUE DU SQUELETTE MEMBRANAIRE DE SPECTRINE

Cette section résume mon projet de recrutement à l'INSERM.

VOIR L'ARTICLE 3 PRÉSENTÉ EN ANNEXE :

MEARY *et al.* 2007, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

Il est indispensable de replacer une fonction dans le contexte d'un organisme vivant. C'est le but que je me suis fixé concernant les fonctions de protéolyse de la spectrine α II. Mon projet majeur depuis 2002 a donc consisté à créer des souris exprimant une spectrine α II dépourvue de région CCC devenant ainsi résistante à la protéolyse ciblée. En d'autres termes je souhaitais analyser *in vivo* le retentissement que peut avoir la mise en place d'un squelette membranaire plus stable et établir ou non plus précisément le lien entre la spécificité du clivage de la spectrine et les fonctions cellulaires.

2.3.1 ORIGINALITÉ DU PROJET

Bien que les arguments soient nombreux pour suggérer que le clivage de la spectrine joue un rôle très important pour les différentes fonctions cellulaires, toutes ces hypothèses ne reposent que sur des modèles cellulaires et avec des démonstrations indirectes. Par exemple bien souvent les études réalisées utilisent des inhibiteurs des calpaïnes ou des caspases. Or ces protéases possèdent un grand nombre de substrats cellulaires. Il est donc difficile de démontrer la spécificité de la coupure de la spectrine.

Habituellement les invalidations par recombinaison homologue visent à détruire un gène afin de supprimer complètement la fabrication d'une protéine. Dans de rares cas une mutation ponctuelle est introduite par recombinaison homologue afin d'étudier son retentissement *in vivo*. Mon modèle murin est original car je ne détruis pas complètement la spectrine α II. Les sites de coupures par les calpaïnes et la caspase 3, de même que le domaine de liaison pour la calmoduline sont spécifiques de la chaîne α II et sont codés par trois exons adjacents (voir Article 3, Figure 1). En théorie il est donc possible de déléter ces exons sans altérer la phase de lecture et sans perturber la structure des unités répétitives. Cela permet de conserver tous les domaines nécessaires à l'intégration de la chaîne α II dans la membrane. Il est en effet très probable que la destruction complète de α II soit létale chez la souris. Par exemple, il existe dans la partie carboxy terminale de la chaîne α II des sites favorisant la dimérisation des chaînes α et β ainsi que des sites de liaison au calcium renforçant cette fonction de dimérisation (domaines *EF-hands*). Il a été démontré qu'une délétion des domaines *EF-hands* chez la drosophile entraîne une létalité précoce

des larves. Ainsi, est-il indispensable de conserver ces domaines qui ont probablement des fonctions similaires chez la souris.

J'ai donc souhaité créer une spectrine plus stable, proche de celle du globule rouge qui, je le rappelle, ne possède pas cette région CCC.

2.3.2 TRAVAIL INITIAL

Il était également important de vérifier que la suppression de la région de protéolyse ciblée conférerait bien une résistance accrue de la spectrine contre la protéolyse. J'ai donc cloné l'ADNc complet de la spectrine α II dans différents vecteurs d'expression eucaryotes. Les vecteurs codants la spectrine α II mutante ont été réalisés par mutagenèse dirigée. Ces constructions m'ont permis de démontrer *ex vivo* que la suppression de cette région induit bien une résistance au clivage même après la mort de la cellule (alors que la spectrine devrait être fortement clivée par les caspases). De plus j'ai démontré que la protéine mutante s'intégrait bien au squelette membranaire (imagerie confocale) et s'associait bien à son partenaire β (co-immunoprécipitation).

2.3.3 ÉTABLISSEMENT DU MODÈLE MURIN

En 2002, j'ai obtenu qu'une partie de ce projet soit financé par l'Institut de la Clinique de la Souris (Illkirch, France). Trois exons codent la région CCC. L'exon 24b code le site de coupure par les calpaïnes, l'exon 24c code le site de coupure par les caspases et l'exon 24d code le domaine de liaison de la calmoduline. Nous avons introduit par recombinaison homologe une cassette de sélection (gène de résistance à l'hygromycine sous le contrôle du promoteur *pgk1*) encadrée de deux sites loxP dans l'intron 24 et un troisième site loxP dans l'intron 24d (voir Article 3, Figure 1). Les trois exons codants la région CCC sont donc « pris en sandwich » entre deux sites loxP. Les cellules ES ayant intégré la construction au locus ciblé (*Spna2*, le gène de la spectrine α II) ont été sélectionnées et introduites dans des blastocystes de souris de façon à obtenir des souris chimères pour le locus muté intégrant les trois sites LoxP et la cassette de sélection. Ces souris sont ensuite croisées pour obtenir une descendance hétérozygote. Pour créer un allèle codant une spectrine sans région CCC il faut se débarrasser des trois exons 24b, 24c et 24d ainsi que de la cassette de sélection (voir Article 3, Figure 1). Cette étape a été réalisée en croisant les souris *Spna2* hétérozygotes avec des souris exprimant la recombinase Cre de façon très précoce (lignée MeuCre40MH aimablement fournie par Martin HOLZENBERGER, INSERM 515). Parmi la descendance de ces souris on obtient l'allèle attendu. Il est appelé *Spna2R* ou *R* car il code une spectrine Résistante à la protéolyse (voir plus loin). L'allèle sauvage est appelé *Spna2S* ou *S* car il code une spectrine Sensible à la protéolyse. L'étape suivante a consisté à croiser les souris *+/R* entre elles. Nous avons eu la surprise d'obtenir des souris *R/R* viables, en proportion mendélienne et sans phénotype apparent. La conclusion majeure est donc que **la région CCC n'est pas impliquée dans le développement de la souris. Les souris *R/R* vivent normalement sans région CCC.** Les plus âgées ont deux ans et ne sont pas discernables des souris *S/S* ou *S/R* du même âge.

Le système d'inactivation génique de type Cre/LoxP présenté ici permet de contrôler la délétion désirée (ici dans le gène *Spna2*) dans un tissu particulier (par exemple il suffit de placer la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique du foie pour obtenir la délétion dans cet organe seulement). Il est même possible de contrôler la délétion de façon temporelle en utilisant une recombinase Cre modifiée dont l'activité est sensible à un agent pharmacologique exogène. C'est parce que nous attendions un phénotype plus sévère que nous avions prévu d'utiliser ce système. Néanmoins, il est peu probable que ce système soit davantage utilisé par la suite étant donnée la viabilité des souris *R/R*.

2.3.4 VALIDATION DU MODÈLE

Face à ce résultat étonnant il était bien entendu indispensable de vérifier ce modèle murin.

- Tout d'abord la délétion des trois exons met bout à bout la partie distale de l'intron 24 avec la partie proximale de l'exon 24d (voir Article 3, Figure 1). Un nouvel intron chimérique a donc été créé au sein du gène *Spna2*. Avant de nous lancer dans l'établissement du modèle murin j'avais d'abord vérifié (en utilisant une stratégie de minigène transfecté dans des cellules fibroblastiques NIH-3T3) que cette séquence chimérique peut être épissée correctement. Néanmoins il fallait vérifier la fonctionnalité de cet intron chimérique *in vivo*. Par RT-PCR suivie du séquençage des amplicons j'ai démontré que l'allèle mutant exprime bien un ARNm privé des exons 24b, 24c et 24d. L'intron chimérique est donc épissé correctement. Nous n'avons pas détecté de variation de quantité d'ARN dans les organes étudiés dans cette expérience (le rein et le foie) (voir Article 3, Figures 2B & 2C).
- Un anticorps dirigé contre la région CCC révèle spécifiquement la spectrine sauvage. Il révèle la spectrine des souris S/S et S/R mais pas des souris R/R (voir Article 3, Figure 2D).
- Un anticorps dirigé contre la jonction protéique exprimée par la fusion entre les exons 24 et 25 révèle spécifiquement la spectrine mutante. Il révèle la spectrine des souris R/R et S/R mais pas des souris S/S et permet de confirmer la présence de la délétion attendue au niveau protéique (Article 3, Figure 2D).
- Un anticorps dirigé contre le domaine SH3 situé hors de la région CCC (voir Article 3, Figure 4A) révèle les spectrines mutantes et sauvages. Nous n'avons pas détecté de variation d'expression significative de la spectrine totale entre les souris (voir Article 3, Figure 2D).
- Enfin des expériences d'immunohistochimie démontrent que la spectrine mutante présente une localisation similaire à celle de la spectrine sauvage (cerveau, cœur, colon, duodénum, estomac, foie, poumon, rate et rein). Très majoritairement cette localisation est située dans les zones sous membranaires (colon, duodénum, estomac, foie, poumon et rein – voir l'exemple du rein sur la figure 3 de l'article 3) mais on trouve certains organes avec une localisation de la spectrine α II plus diffuse (dans le cerveau par exemple). Nous n'avons pas noté non plus de signe d'accumulation de α II chez les souris R/R.
- Nous avons ensuite étudié *in vitro* le clivage de α II et confirmé que la spectrine mutante est bien résistante à l'action des caspases et des calpaïnes (voir Article 3, Figures 4 & 5).

L'ensemble de ces résultats démontre que, comme nous l'avions prévu, la délétion de la région CCC n'affecte pas l'adressage de α II dans le squelette membranaire. Ainsi l'ensemble de ces résultats démontrent-ils d'une part la fonctionnalité du système et d'autre part que l'absence de phénotype incompatible avec la vie en animalerie n'est pas liée à un problème imprévu comme cela arrive parfois quand on modifie le génome d'un organisme (par exemple avec les souris ayant permis d'identifier le rôle de l'hepcidine).

Au cours de l'apoptose il se forme des bourgeonnements de la membrane (phénomène de « blebbing »). Plusieurs auteurs ont suggéré que le clivage de α II dans la région CCC pourrait être impliqué dans ce phénomène à l'instar de ce qui se passe dans le globule rouge dans lequel des mutations de certaines protéines du squelette membranaire sont responsables de fragilité membranaire. Nous avons dérivé des fibroblastes embryonnaires sauvages S/S ou mutants R/R. Nous n'avons identifié ni différence de croissance, ni phénotype visible dans les conditions de culture quotidiennes entre les deux lignées. Cela confirme que l'absence de région CCC n'est pas impliquée dans une fonction cellulaire cruciale pour la vie ou la prolifération de la cellule (en tout cas de ce type cellulaire). Lorsque nous déclenchons une apoptose (par irradiation aux UV ou avec de l'eau oxygénée) sur ces cellules nous observons que le bourgeonnement membranaire se produit normalement sur les cellules mutantes (voir Article 3, Figure 6). Nous pouvons donc conclure que la région CCC n'est pas impliquée dans le bourgeonnement membranaire observé lors de l'apoptose contrairement à ce qui est suggéré.

Bien que très surprenants nos résultats sont importants pour les équipes qui travaillent sur le squelette membranaire.

Pour le travail d'analyse j'ai encadré Fleur MEARY, une étudiante de M2 du Master Sciences Santé et Applications de l'Université Paris VII - Paris V (M2 mention Génétique). Ce travail lui a permis d'obtenir une bourse de thèse qu'elle effectue dans une autre unité.

Conditions de réalisation des recherches sur l'animal

J'ai passé le stage de formation à l'expérimentation animale de niveau 1 en novembre 2004 et je dispose de l'autorisation d'expérimenter. Nous ne disposons pas d'animalerie sur le site de notre unité ce qui constitue un handicap même si celui-ci reste mineur actuellement. Les lignées que j'étudie sont donc hébergées dans l'animalerie de la faculté de médecine Xavier Bichat en accord avec Carole BEAUMONT, responsable de l'animalerie.

3. PROJETS ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré que la région CCC est extrêmement conservée chez les vertébrés et subit une pression de sélection purifiante (voir Article 3, Table 2). Par exemple on la trouve pratiquement intacte chez les oiseaux (voir Article 3, Table 1), alors que l'homme s'est séparé des oiseaux il y a environ 300 millions d'années. Cela suggère donc l'existence d'au moins une fonction importante qui maintient la région CCC intacte chez les vertébrés. Les invertébrés ne possèdent pas cette région.

Nous pouvons affirmer que la région CCC n'a pas de rôle dans l'embryogenèse ou l'organogenèse. Les souris R/R (mutantes) les plus âgées ont deux ans et sont indiscernables de leurs frères et sœurs S/S (sauvages). Les souris R/R se reproduisent et donnent naissance à des souris sans altération visible. Nous ne pouvons pas exclure l'existence d'une altération mineure. Néanmoins si c'est le cas, cela n'affecte pas la survie des souris (au moins jusqu'à deux ans) et ne devrait pas expliquer le maintien de la région CCC.

Il est tout à fait possible que le phénotype n'apparaisse pas dans les conditions d'élevage en animalerie. En effet les souris vivent dans des cages relativement étroites. Elles n'ont pas à chercher leur nourriture et leur boisson qui se trouvent quelques centimètres au-dessus de leur tête. La nourriture est calibrée et disponible à volonté (pas de carence). Les souris sont soumises à très peu de stress. Par exemple elles vivent sous air climatisé et ne connaissent donc pas la canicule d'un été ou la rigueur d'un hiver. Elles ne rencontrent jamais de prédateur et ne sont pas en compétition pour la reproduction. L'accès au(x) partenaire(s) se fait exclusivement selon la bonne grâce du chercheur... Tout cela pour dire qu'il serait imprudent de conclure trop rapidement sur l'absence de phénotype dans ces conditions totalement artificielles. Si la mutation était placée dans un environnement plus « naturel » on verrait peut-être un phénotype. Un jour peut-être serons nous autorisés à lâcher une souris « knockoutée » dans ce genre d'environnement contrôlé. Bien entendu on ne peut pas exclure non plus que cette région CCC n'a aucune fonction.

Les souris sont soit sur un fond génétique pur 129/Sv, soit sur un fond mixte contenant une contribution de 129/Sv et de C57BL/6. De très nombreux exemples ont montré qu'un phénotype très sévère peut apparaître sur un fond et complètement disparaître sur un autre fond.

J'ai décrit comment les souris vivent dans un environnement confiné dans lequel elles n'ont pratiquement rien à mémoriser : la nourriture et la boisson se trouvent au-dessus de leur tête, l'endroit pour dormir est à quelques centimètres, de même que l'endroit qui sert de litière. Elles n'ont pas à se rappeler où se trouvent les prédateurs qui n'existent pas ici. Dans ces conditions il est impossible de voir si une souris a une bonne mémoire alors qu'elle serait rapidement éliminée

dans un environnement naturel. Des modèles d'invalidation génique ont été décrits dans lesquels les souris n'ont pas de phénotype visible mais une perturbation très importante de la mémorisation (un exemple (97)).

3.1. LES SOURIS *Spna2* R/R PEUVENT-ELLES AVOIR UN DÉFAUT DE MÉMORISATION ?

Les arguments bibliographiques listés ci-dessous suggèrent que le clivage de α II peut être impliqué dans la mémorisation.

- Des études ont démontré que le calcium augmente rapidement de façon irréversible le nombre de récepteurs au glutamate, un neurotransmetteur, dans les membranes synaptiques des neurones en activant les calpaïnes. Cette activation conduit au clivage spécifique de la spectrine α II qui aurait pour conséquence d'induire d'une part des changements structuraux importants au niveau de la membrane synaptique ainsi qu'une translocation des récepteurs au glutamate vers la membrane synaptique d'autre part. Tous ces changements structuraux irréversibles seraient responsables de la plasticité synaptique impliquée dans la mémorisation (*long term potentiation*) (98, 99).
- Il a été démontré que la spectrine α II β II interagit avec les parties cytoplasmiques des sous-unités NR1a, NR2A et NR2B d'une catégorie particulière de récepteurs au glutamate, activable par le NMDA (*N-Methyl-D-Aspartate*). Il existe donc un lien physique entre ces récepteurs et le squelette membranaire de spectrine dans les neurones (100). De nombreuses études ont démontré que le NMDA induit un clivage de la spectrine par les calpaïnes.
- La neurotransmission glutamatergique nécessite un processus d'exocytose impliquant l'interaction de vésicules synaptiques contenant le glutamate avec la membrane plasmique de la synapse. Il a été démontré que des fragments de α II, probablement issus du clivage par les calpaïnes, sont capables d'inhiber le transport du glutamate dans les vésicules synaptiques (101). La chaîne α II non clivée ne possède pas d'activité inhibitrice.

On peut donc s'attendre à observer une mauvaise neurotransmission glutamatergique soit par une absence d'augmentation du nombre de récepteurs après activation par le calcium dans les neurones des souris mutantes, soit par une mauvaise régulation au niveau de l'exocytose des vésicules synaptiques, soit encore par une anomalie de la plasticité membranaire. Au niveau phénotypique, cela pourrait se traduire par un défaut de mémorisation car l'apprentissage s'accompagne d'une augmentation du nombre de sites de liaison au glutamate dans l'hippocampe. Il est donc intéressant d'étudier le comportement et la mémorisation des souris mutantes. Néanmoins de telles études demandent l'utilisation d'un matériel sophistiqué que nous n'avons pas au laboratoire. Le fond génétique influence énormément ces études et nos souris étaient sur un fond génétique pur (129/Sv) qui n'est pas approprié pour ces tests (informations de l'Institut Clinique de la Souris). Il a été notamment démontré qu'il existe une mutation naturelle du gène *Disc1* dans le fond 129/Sv et que celle-ci influence le processus de mémorisation (102). Puisque la mutation spectrine se trouvait sur ce fond 129/Sv, nous avons donc entrepris auparavant des croisements (*backcross*) cinq fois sur un autre fond génétique (C57BL/6). Une cohorte de douze mâles sauvages et douze mâles mutants est en cours de production afin de faire une étude comportementale à l'Institut Clinique de la Souris. Les tests qui seront réalisés sur ces souris sont les suivants :

- le test « Morris Water maze » ;
- le test « object recognition » ;
- le test « Y-maze » ;
- le test « fear conditioning » ;
- le test « open-field » ;

- les observations cliniques.

Selon les résultats obtenus nous envisagerons d'établir une collaboration avec une équipe spécialisée en neurologie.

À la suite de la publication de ce travail, Jon MORROW (Université de Yale, USA), notre premier compétiteur, souhaite pouvoir travailler sur notre modèle murin. Il s'agit d'une bonne opportunité pour valoriser ce travail par l'intermédiaire d'une collaboration. Jon MORROW s'intéresse plus particulièrement au cerveau, un organe où la dynamique de la spectrine semble, comme nous l'avons vu, extrêmement importante notamment dans le processus d'ischémie (pour revue, voir (70)).

3.2. EFFET HYPOMORPHE DE L'ALLÈLE L3

On se pose évidemment la question de savoir si l'allèle possédant encore la cassette de sélection (« targeted Spna2 locus » sur la figure 1 de l'article 3) pourrait être un allèle hypomorphe (diminution de l'expression de α II) auquel cas cela permettrait de disposer de souris exprimant moins de spectrine α II. Il pourrait même s'agir d'un allèle « null » si la cassette de sélection perturbe complètement l'expression du gène α II. Les premières portées issues des croisements entre souris hétérozygotes pour cet allèle étaient dépourvues de souris homozygotes ce qui suggérait un effet hypomorphe. Toutefois nous avons perdu cet effet sur les générations suivantes, peut-être à cause d'une méthylation de la cassette de sélection. Les nouvelles souris homozygotes L3/L3 n'ont pas de phénotype et se reproduisent normalement.

3.3. COMPENSATION PAR LA CHAÎNE β

Il est intéressant de comprendre pourquoi les souris R/R vivent en fabriquant la spectrine mutante. Quels sont les phénomènes capables de compenser la mutation de la spectrine ? Il est peu probable que la chaîne α I intervienne dans une telle compensation car elle ne possède de toute façon pas de région CCC. Il est également peu probable qu'un gène α III existe, bien que cette hypothèse ne puisse pas être complètement écartée. Il est en revanche possible que la désorganisation du squelette membranaire puisse avoir lieu *via* la coupure de la chaîne β II qui est aussi la cible des calpaïnes et des caspases (43). Jusqu'à maintenant il était admis que α II était la cible principale de ces protéases mais en présence d'une chaîne α II anormalement résistante, β II pourrait prendre le relais. Certaines études démontraient même que la chaîne β II ne pouvait pas être clivée par les calpaïnes sans la liaison préalable de la calmoduline sur la chaîne α II (103, 104). Une compensation par une coupure accrue de β II serait donc inattendue car nous avons éliminé le site de liaison de la calmoduline de la chaîne α II mutante. Les études *in vitro* préliminaires démontrent que la chaîne β II des souris R/R est clivée autant que la chaîne β II des souris S/S mais nous n'avons pas réalisé de cinétique de digestion. En tout cas, s'il existe, un mécanisme de compensation *via* β II n'explique pas la pression de sélection purifiante exercée chez les vertébrés sur la région CCC. Les fibroblastes embryonnaires primaires issus des souris R/R et S/S sont adaptés pour étudier la cinétique de dégradation de la chaîne β II.

3.4. MALADIE DE GOUGEROT-SJÖGREN

Nous nous intéressons au développement de la maladie de Gougerot-Sjögren car elle pourrait être directement liée au clivage de la spectrine (sans doute *via* les caspases). Soit l'organisme produit des auto-anticorps anti- α II qui vont alors participer à la destruction des tissus cibles

comme les glandes lacrymales et salivaires. Soit ces tissus subissent une protéolyse plus importante de la spectrine, ce qui aboutit à leur destruction, puis à la production des anticorps anti- α II. Ces deux hypothèses ne sont pas forcément exclusives et il pourrait se former un cercle vicieux : la fragilité des tissus cibles participe à la formation des anticorps qui eux-mêmes contribuent encore à fragiliser ceux-ci. Notre modèle murin est particulièrement intéressant pour tester l'effet du clivage de la spectrine dans cette maladie. Le projet viserait à croiser nos souris avec une lignée de souris développant spontanément une maladie de type Gougerot-Sjögren ainsi qu'une immunité anti-spectrine (par exemple les souris NOD (105). Il pourrait s'agir également de souris femelles ovariectomisées (106). Sur ces souris nous étudierons la production d'auto-anticorps anti- α II. J'ai déjà mis au point des techniques ELISA permettant de révéler la présence de tels anticorps. Enfin nous évaluerons par histochimie classique les lésions des glandes lacrymales pour voir si la présence d'une spectrine mutante induit une protection chez ces souris.

3.5. LE RÔLE IN VIVO DU DOMAINE SH3

Nous avons vu qu'il est indispensable de replacer une fonction dans le contexte d'un organisme vivant (*in vivo*). J'ai décrit la surprise de constater que les souris vivent bien en exprimant une spectrine α II dépourvue de région CCC. Cela nous oblige à revoir un certain nombre de concepts. Dans le cadre de recherche de fonction du domaine SH3 nous avons caractérisé plusieurs partenaires interagissant spécifiquement avec celui-ci et proposé des fonctions en lien avec ces interactions. Par exemple nous avons démontré *ex vivo* que le domaine SH3 est impliqué dans un mécanisme de régulation du clivage par les calpaïnes, mécanisme qui fait intervenir la phosphorylation et la déphosphorylation du site de clivage. Nous souhaitons créer un nouveau modèle murin dans lequel une mutation ponctuelle serait introduite au sein du domaine SH3 (*knockin*). La mutation Pro₁₀₁₇>Leu dont nous avons montré qu'elle entraîne une perte d'interaction de tous les partenaires identifiés (94, 107, 93, 41) est parfaitement adaptée pour cela. Rappelons également que le domaine SH3 est le domaine le plus conservé au sein des chaînes α , aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Les acides aminés du domaine SH3 de la spectrine α II sont tous identiques entre l'humain, la souris, le rat, le poulet et le xénope. Aujourd'hui les nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent de créer une construction de recombinaison en quatre à six mois.

3.6. LE RÔLE EX VIVO DU DOMAINE SH3

Une autre alternative plus simple (mais pas forcément plus rapide qu'un *knockout* ou un *knockin*) peut être réalisée dans un contexte *ex vivo*. Elle consiste à transfecter des cellules humaines avec des siRNA ciblant la chaîne α II spectrine. La première étape consiste donc à choisir le modèle cellulaire en fonction de la fonction à étudier. Par exemple un modèle fibroblastique est bien adapté pour étudier les phénomènes de polymérisation de l'actine. L'étape suivante consiste à corriger le phénotype observé en co-transfectant un ADNc codant la chaîne α II murine entière. Il faut que le siRNA ne cible que la chaîne humaine et pas la spectrine murine. Il sera donc nécessaire de vérifier ce point technique en transfectant à la fois des lignées humaines et des lignées murines. L'étape suivante consistera à introduire par mutagenèse dirigée des mutations ponctuelles dans différents domaines de l'ADNc murin. Par exemple nos cribles de double hybride sur le domaine SH3 ont permis d'identifier des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine. Il serait donc judicieux de tester la polymérisation de l'actine en co-transfectant les siRNA spectrine en présence de l'ADNc codant la spectrine murine mutée dans le domaine SH3 (substitution Pro₁₀₁₇>Leu). Par exemple si le siRNA entraîne un défaut de polymérisation de l'actine (défaut de formation des lamellipodes ou des filopodes) et si cet

ADNc muté ne permet pas de corriger ce défaut alors que l'ADNc sauvage le permet, il sera possible de conclure à l'implication directe du domaine SH3. Une telle stratégie peut être étendue à un grand nombre de fonctions. J'ai déjà réalisé les constructions permettant d'exprimer la spectrine α II complète (285 kDa). L'expression spécifique du transgène peut être suivie spécifiquement soit à l'aide d'anticorps anti-FLAG soit par fluorescence directe avec la GFP, les deux types de constructions étant disponibles.

3.7. INFECTION PAR UNE SOUCHE D'E. COLI ENTÉRO-AGGRÉGATIVE

Je suis actuellement en contact avec Fernando NAVARRO-GARCÍA (Department of Cell Biology, Mexico, Mexique) pour établir une collaboration visant à vérifier *in vivo* l'action de la protéase Pet. Cette équipe a en effet démontré que celle-ci, produite par une souche *E. coli* entéro-aggrégative pathogène (responsable de diarrhées sévères) coupe spécifiquement la spectrine α II dans la région CCC. Les auteurs démontrent que Pet pénètre dans la cellule et qu'elle clive la spectrine. De façon concomitante une déstabilisation du réseau d'actine est observée. Il est proposé que la déstabilisation du squelette membranaire par Pet est responsable de la destruction de l'épithélium intestinal provoqué par cette bactérie (45). Ce travail est intéressant – bien qu'il soit indirect – puisqu'il suggère le lien entre le clivage de la spectrine et le maintien de l'intégrité cellulaire. Il serait donc intéressant de vérifier l'action de Pet sur notre spectrine qui ne possède plus de région CCC. Néanmoins nous devons préalablement établir si la souris peut être infectée par ce type de souche bactérienne. Si c'est le cas nous pourrions infecter directement les souris mutantes avec une souche d'*E. coli* produisant cette protéase. Une autre alternative serait d'établir des lignées primaires d'entérocytes de souris (mutants et sauvages) pour les infecter soit avec la souche bactérienne, soit directement avec la protéase recombinante. Mais là aussi nous devons préalablement valider ce type de modèle. Enfin ce travail sera complété par des expériences *in vitro* pour démontrer que cette protéase ne clive plus la spectrine mutante.

3.8. EXPLORATION DE LA FONCTION RÉNALE DES SOURIS MUTANTES

Des travaux démontrent que la spectrine est clivée lorsque le rein est lésé (54, 81). Ce travail sera réalisé en collaboration avec Christos CHATZIANTONIOU (unité 702 de l'INSERM, Hôpital Tenon, Paris) et Marie-Christine LECOMTE.

Il s'agira de produire une cohorte de souris mâles de plus de cinq mois : 8 à 12 souris de chaque groupe (sauvage ou mutantes). La masse à la naissance est identique entre les souriceaux mutants R/R et sauvages S/S. Comme il existe une corrélation entre le capital néphronique (nombre de néphrons) et cette masse on peut considérer que les souris mutantes ont le même capital néphronique que celui des souris sauvages. La probabilité d'une fragilité rénale lors d'une néphrectomie est donc, *a priori*, identique.

Des investigations non invasives seront réalisées à l'état basal : mesure de la pression systolique (à la veine de la queue) et micro- albuminurie (cage métabolique). Si ces premières explorations ne révèlent pas de différence importante entre les deux groupes d'animaux, nous réaliserons une étude en situation de stress.

- En situation d'hypertension provoquée par l'injection sous-cutanée (minipompe) d'angiotensine II (en débit en continu pendant une durée maximale de 30 jours). Cette approche est caractérisée par une inflammation vasculaire et glomérulaire, des lésions de la paroi vasculaire des microvaisseaux rénaux et une ischémie chronique rénale, conduisant à long terme au développement d'une fibrose glomérulaire, puis tubulaire.

- Après néphrectomie au 5/6 (ablation totale d'un rein et au 2/3 de l'autre rein). Cette approche est caractérisée par une hyperfiltration glomérulaire liée à la surcharge de filtration qui doit être assurée par les glomérules restants. Cela conduit à long terme à l'hypertrophie glomérulaire, à une protéinurie et une fibrose tubulointerstitielle.
- Après obstruction urétérale unilatérale. L'obstruction des uretères produit une apoptose et une inflammation tubulaire sévères. Nous réaliserons une étude cinétique du développement de la maladie (par exemple à 5 jours ou à 14 jours). Les effets produits par cette obstruction dépend très peu du fond génétique des animaux contrairement aux modèles cités ci-dessus.
- Étude des animaux après ischémie–reperfusion provoquée par obstruction de l'artère rénale. L'objectif est d'analyser la réaction du tissu rénal à l'hypoxie et sa réparation.
- Ces investigations fonctionnelles seront accompagnées d'une étude histologique du rein et du cœur ainsi que des études en immunohistochimie pour suivre la distribution de la spectrine.

En conclusion tous ces projets visent à étudier les fonctions que nous avons définies au cours des années précédentes dans un contexte plus physiologique, que ce soit dans des modèles cellulaires ou plus idéalement *in vivo* sur la souris. Ils visent également d'une part à exploiter le modèle murin déjà établi et d'autre part, à réaliser un nouveau modèle murin.

DEUXIÈME PARTIE – À PROPOS DE L'HEPCIDINE

Cette deuxième partie résume les travaux que j'ai effectués pendant mon stage post-doctoral et qui a permis l'identification et la caractérisation d'une hormone, l'hepcidine, régulant l'homéostasie des mouvements de fer dans l'organisme.

1. INTRODUCTION SUR L'HOMÉOSTASIE DU FER

Le fer est symbole de force et de santé (on utilise par exemple les expressions « diriger d'une main de fer » ou « avoir une santé de fer »). Si le précieux métal est indispensable aux organismes qui vivent dans un environnement riche en oxygène, son excès est paradoxalement délétère. Le fer agit en effet avec l'oxygène tel un catalyseur pour former des radicaux libres, lesquels attaquent diverses molécules dans la cellule, comme les protéines, les lipides et l'ADN ce qui perturbe la physiologie cellulaire. Les mammifères ne possèdent pas de moyen d'éliminer le fer en excès. C'est donc surtout au niveau de son absorption intestinale que l'homéostasie du fer est finement réglée. Ce n'est que depuis quelques années que les protéines impliquées dans l'absorption intestinale du fer et dans sa régulation ont été identifiées.

Présent en faible quantité dans l'organisme (35 à 45 mg/kg de masse corporelle), le fer joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la synthèse des acides nucléiques et des protéines, la régulation de l'expression des gènes, la prolifération et la différenciation cellulaire, le transport d'électrons et la respiration mitochondriale en participant à la constitution de nombreuses protéines héminiques (hémoglobine, cytochromes, myoglobines) ou non héminiques (ribonucléotide réductase). Présent dans la molécule d'hème, le fer joue un rôle prépondérant dans le transport de l'oxygène, la fraction de fer présent dans l'hémoglobine représentant jusqu'à 70 % du fer de l'organisme. Environ 20-30 % du fer se trouve sous forme de réserves, stockés dans le foie et les macrophages du système réticulo-endothélial. Enfin, 10 % du fer se trouvent dans la myoglobine.

Chaque jour, 20 mg de fer sont nécessaires pour assurer le renouvellement des globules rouges sénescents qui, après quatre mois, sont détruits par les macrophages (principalement ceux de la rate). La ration alimentaire journalière moyenne apporte 10 à 20 mg de fer. Cependant dans des conditions normales, seulement 0,5 à 2 mg de fer sont effectivement absorbés ce qui correspond aux pertes journalières (principalement par exfoliation des cellules intestinales, de celles de la peau et de l'appareil urinaire ainsi que par les pertes sanguines menstruelles chez la femme). La ration de fer absorbée étant très inférieure aux 20 mg requis quotidiennement, c'est en fait grâce aux macrophages qui recyclent le fer issu de la destruction de l'hémoglobine que 95 % des besoins en fer sont assurés (se référer à (115) pour une revue détaillée du recyclage du fer par les macrophages). On connaît depuis longtemps des situations physiologiques ou pathologiques dans lesquelles l'homéostasie du fer est modifiée. En cas de besoin en fer (par exemple si l'alimentation est pauvre en fer, lors d'une anémie secondaire due à une hémorragie, lors des maladies du globule rouge ou lors d'une insuffisance de leur production, d'une hypoxie, chez la femme enceinte, etc.), l'absorption intestinale de fer et la mobilisation des réserves provenant du foie et des macrophages des autres tissus est stimulée. À l'inverse, les situations inflammatoires (arthrite, infections chroniques, certains cancers) entraînent le plus souvent un blocage du recyclage du fer par les macrophages concomitants à la diminution de son absorption intestinale. La conséquence est la mise en place d'une anémie puisque le réservoir érythroïde n'est plus suffisamment alimenté en fer. Enfin il existe des maladies de surcharge en fer telle que l'hémochromatose liées à une absorption de fer trop importante par rapport aux réserves en fer déjà présentes dans l'organisme.

1.1. MÉCANISMES DE L'ABSORPTION DU FER ALIMENTAIRE

La muqueuse intestinale contient un grand nombre d'invaginations situées à la base des villosités et appelées cryptes de Lieberkühn. Au fond de celles-ci se niche une population de progéniteurs indifférenciés proliférant et migrant en quelques jours vers la lumière intestinale. Cette migration s'accompagne d'une différenciation vers le stade mature de l'entérocyte qui se met à acquérir la « machinerie moléculaire » permettant l'absorption du fer alimentaire. Les entérocytes matures situés au sommet de la villosité ont une durée de vie de quelques jours puis ils sont éliminés à la surface de l'épithélium par un processus apoptotique (voir Figure 7 page 45). L'épithélium intestinal est donc en perpétuel renouvellement. La majorité du fer alimentaire est non héminique (fruits, légumes, produits laitiers) et sa biodisponibilité dépend de la composition des repas. Une autre partie du fer provient du fer héminique des viandes. Ce dernier est absorbé de façon beaucoup plus efficace. L'absorption de fer non héminique se déroule au niveau des entérocytes matures du duodénum, la partie proximale de l'intestin. Le fer alimentaire est majoritairement présent sous sa forme ferrique insoluble Fe(III) non assimilable et doit subir une étape de réduction en sa forme ferreuse Fe(II) avant d'être absorbé. Ceci est assuré par une réductase appelée DCYTB (*Duodenal cytochrome b*) localisée à la membrane apicale de l'entérocyte (voir Figure 8 page 46) (116). Récemment l'invalidation de DCYTB révèle une absence de répercussion sur l'homéostasie du fer et questionne finalement sur le rôle de cette protéine. L'étape de réduction pourrait être compensée chez ces souris par une réductase non identifiée. Certains composants alimentaires sont capables de participer à la réduction du fer tels que l'acide ascorbique, le β -carotène, la cystéine ou l'histidine et stimulent de ce fait l'absorption de fer. Notons qu'à l'inverse, certains composés tels que les polyphénols (contenus notamment dans les tanins du thé), diminuent l'absorption du fer grâce à leur capacité de chélation du fer. Une fois réduit, le fer pénètre dans l'entérocyte par une protéine de transport nommée DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) ou NRAMP2 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) située aussi à la membrane apicale (pour revue, voir (117)). Le pH relativement bas présent à la surface des entérocytes fournit une source de protons essentielle pour le co-transport du fer *via* DMT1. L'importance de DMT1 dans l'absorption intestinale de fer a été mise en évidence grâce aux modèles *mk* (souris) et Belgrade (rat). Une mutation identique de DMT1 (la glycine 185 est substituée par une arginine) a été identifiée dans ces deux modèles de rongeurs ce qui conduit à une anémie microcytaire, conséquence du défaut d'absorption du fer. Une mauvaise localisation de la protéine au pôle apical pourrait être responsable de ce défaut.

1.2. LE DEVENIR DU FER ENTÉROCYTAIRE

Une fois présent dans l'entérocyte, le fer (délivré soit par DMT1 pour le fer non héminique, ou après action de l'hème oxygénase pour le fer héminique) est utilisé de deux façons différentes. Soit les stocks en fer de l'organisme (principalement hépatiques) sont suffisants. Dans ce cas la demande de transport de fer est limitée et le métal est alors stocké dans des coques protéiques composées de sous-unités légères et lourdes de ferritine, chaque coque pouvant contenir jusqu'à 4 000 atomes de fer. Cette fraction de fer sera alors perdue au bout de quelques jours lorsque les cellules entérocytaires seront exfoliées de leur villosité. Soit la demande en fer est forte ce qui entraîne une augmentation de l'absorption de fer. Dans ce cas, le fer est transporté au sein de l'entérocyte vers la membrane basolatérale dans ce que l'on nomme le « *pool* de fer libre » dont la nature chimique reste controversée. Le passage du fer au travers de la membrane basolatérale vers le plasma est assuré par un transporteur appelé ferroportine (118-120). L'efflux de fer par la ferroportine nécessite que le métal soit oxydé pour permettre son association sur la transferrine (qui ne fixe pas la forme réduite Fe(II)). L'héphaestine est une protéine homologue à la céruloplasmine qui oxyde probablement le fer de manière coordonnée à sa sortie *via* la

ferroportine. Il existe un modèle murin *sla* (*sex linked anaemia*) dans lequel le transport de fer apical par les entérocytes est normal mais qui présente un défaut de l'efflux de fer au niveau du pôle basolatéral avec blocage du fer au sein de la cellule entérocytaire, à la suite d'un défaut moléculaire de cette ferroxydase (121). Une fois le fer libéré dans la circulation sanguine, il est immédiatement pris en charge par la transferrine. Seul l'entérocyte possède une telle capacité de transport du fer alimentaire. Les autres cellules et notamment les précurseurs de la moelle osseuse acquièrent leur fer par un processus d'endocytose utilisant un récepteur pour la transferrine capable de lier la transferrine circulante chargée de fer.

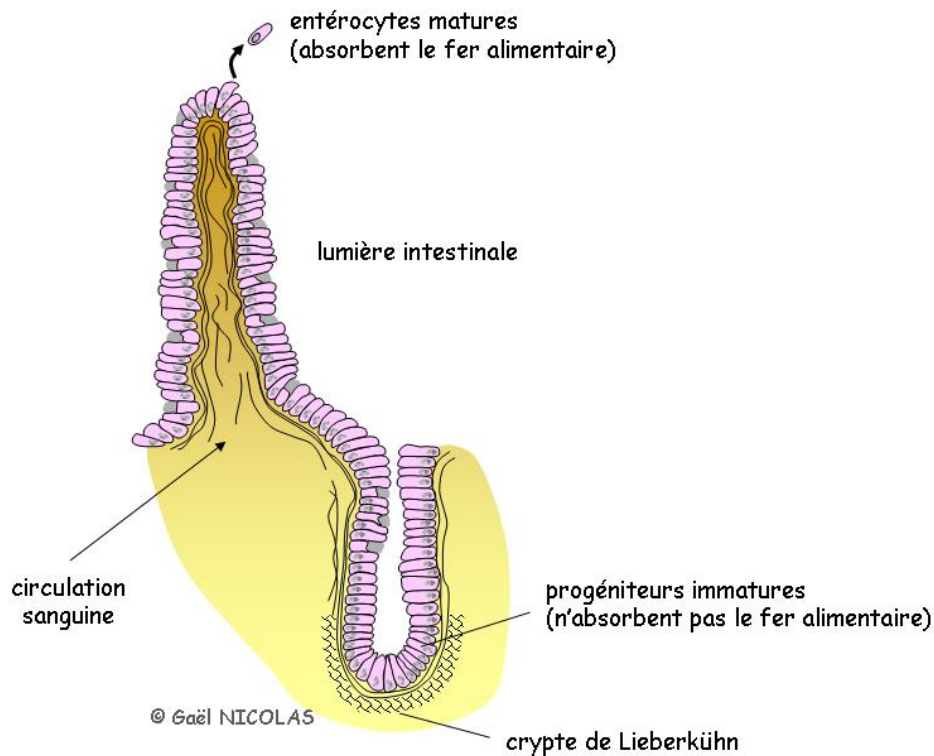


Figure 7

L'absorption du fer a lieu au niveau des entérocytes situés au sommet des villosités duodénales

Au fond des cryptes de Lieberkühn se trouvent les progéniteurs immatures incapables d'absorber le fer alimentaire. Ceux-ci prolifèrent et migrent vers la lumière intestinale tout en se différenciant en entérocytes matures possédant une forte capacité absorbante du fer alimentaire. Il a été proposé que les progéniteurs immatures sont capables d'évaluer la quantité de fer du sang (réflétant le fer de l'organisme) par l'intermédiaire d'un complexe protéique contenant au moins les protéines HFE, β 2-microglobuline, transferrine ainsi que son récepteur. Une fois que ces cellules ont capté ce signal, elles adaptent leur future absorption de fer (voir les mécanismes dans le texte) tout en migrant. Une autre hypothèse fait intervenir une hormone, l'hépcidine, qui bloquerait l'absorption du fer alimentaire au niveau de l'entérocyte mature.

1.3. RÉGULATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DE FER

La régulation de l'absorption intestinale du fer doit intégrer des informations provenant du foie, indiquant le niveau des réserves hépatiques, mais également de la demande en fer de la moelle osseuse indispensable pour assurer la fabrication des globules rouges. Ces informations ont été dénommées respectivement « régulateur des réserves » (*store regulator*) et « régulateur érythroïde » (*erythroid regulator*) (122). Compte tenu de l'éloignement des sites générant ces signaux du site

effectif d'absorption du fer alimentaire, l'existence d'un ou de plusieurs facteurs humoraux pouvant assurer ce rôle était fortement suspectée depuis les années 60 (123). La nature des cellules senseurs de ces signaux n'est actuellement pas claire. Le modèle de la crypte (voir ci-dessous) a longtemps été le modèle de référence car il permet d'expliquer beaucoup des régulations de l'homéostasie du fer. Cependant, certaines données expérimentales sont difficilement conciliables avec ce modèle. Comme nous le verrons, la mise en évidence de l'hépcidine, permet d'apporter une alternative à ce modèle en proposant une régulation directe au niveau des entérocytes matures de la villosité.

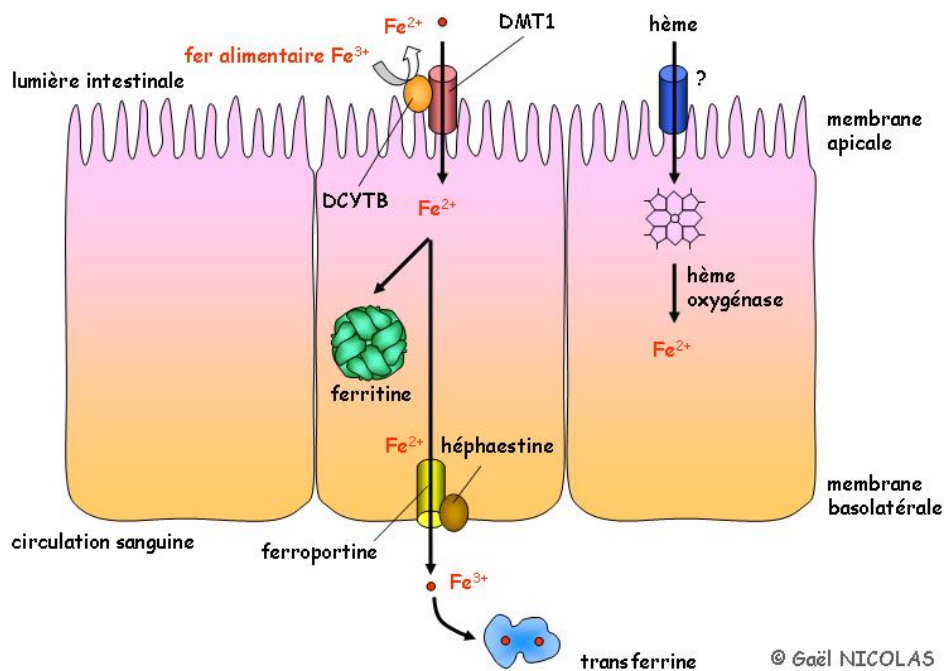


Figure 8

Schéma simplifié de l'absorption du fer alimentaire par l'entérocyte mature

Le fer alimentaire est d'abord réduit par la ferriréductase DCYTB puis transporté au sein de la cellule par le transporteur DMT1. En fonction des demandes en fer de l'organisme, le fer est soit stocké dans des molécules de ferritine (dans ce cas il sera perdu au bout de quelques jours lors de l'exfoliation de l'entérocyte sénéscent), soit il est transloqué vers le pôle basolatéral. Là, il est transporté hors de la cellule par la ferroportine tandis qu'il est oxydé par l'héphaestine. Une fois présent dans la circulation sanguine, le métal est immédiatement fixé sur la transferrine du sang, chargée de la distribuer à toutes les cellules de l'organisme et principalement aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse. L'hème est transporté par un mécanisme inconnu puis dégradé dans la cellule par l'hème oxygénase. Le fer libéré lors de cette réaction emprunte ensuite les mêmes voies que le fer non hémique.

1.4. LE MODÈLE DE RÉGULATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DE FER PAR PROGRAMMATION DES CELLULES DE LA CRYPTÉ

Ce modèle établit que l'absorption intestinale du fer est programmée au niveau des précurseurs situés dans les cryptes de Lieberkühn. Ces cellules de la crypte expriment HFE, la protéine mutée chez la majorité des patients atteints d'hémochromatose et dont la fonction n'est pas encore

clairement élucidée. La protéine HFE est une molécule du système majeur d'histocompatibilité de classe I qui s'associe avec la β 2-microglobuline, indispensable pour son « *processing* » intracellulaire et son intégration vers la membrane. Il ne fait pas de doute que la β 2-microglobuline est impliquée dans le métabolisme du fer puisque des souris déficientes en celle-ci développent, parmi d'autres phénotypes, une surcharge en fer similaire à celle observée dans l'hémochromatose (124). De plus ce complexe HFE/ β 2-microglobuline interagit avec le récepteur de la transferrine (125, 126). Il a été proposé que la protéine HFE agirait pour moduler la quantité de fer internalisée par les progéniteurs de la crypte. Le fer intracellulaire pourrait ensuite moduler l'expression des gènes impliqués dans l'absorption de fer soit grâce au système IRE/IRP (voir plus loin), soit grâce à des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Il vient d'être démontré que les souris ayant une invalidation de *Hfe* spécifiquement dans l'intestin maintiennent une homéostasie du fer normale ce qui constitue un élément fort en défaveur d'un modèle incluant HFE dans l'intestin (127).

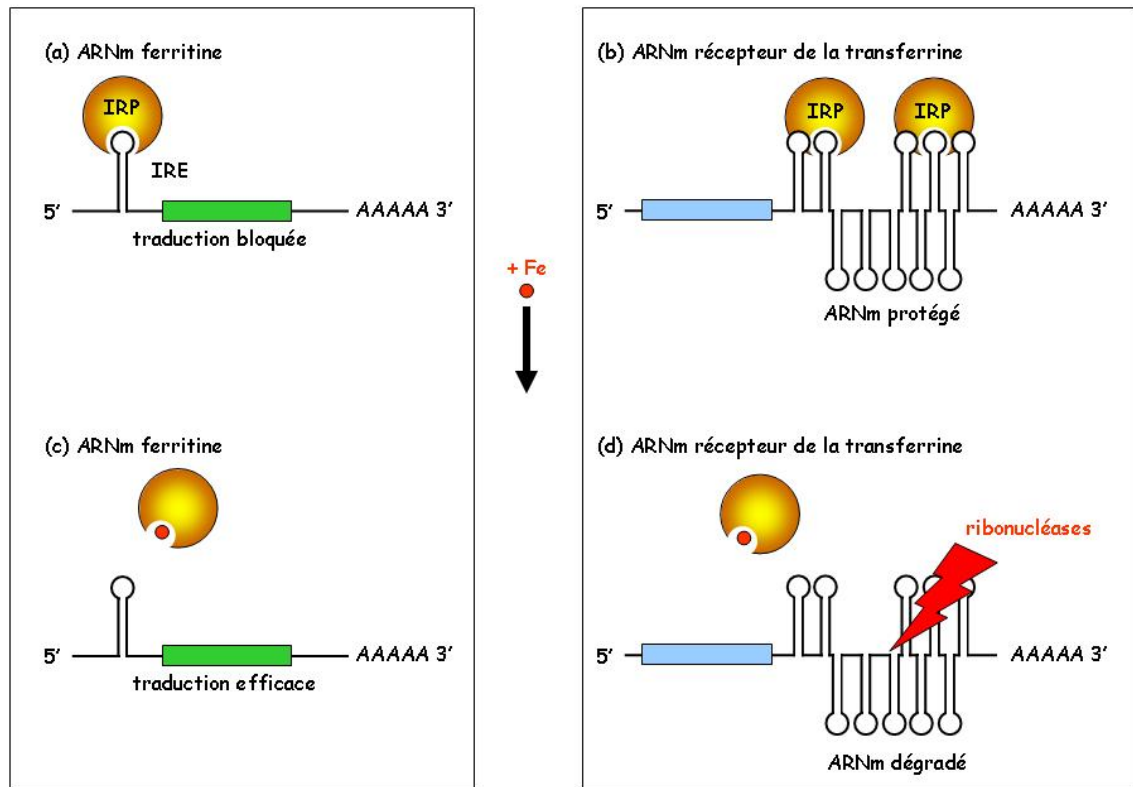
1.5. RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE PAR LES SYSTÈME IRE/IRP

Des régulations post-transcriptionnelles dépendantes du fer participent au contrôle de la régulation de l'absorption de fer. Les protéines IRP (*Iron Regulatory Protein*) sont de petites protéines capables de se lier sur un ARN messager au niveau de l'IRE (*Iron Responsive Element*), une séquence spécifique formant une structure de type tige/boucle. Selon l'endroit où est localisé l'IRE sur l'ARNm il résultera soit un blocage de la traduction par le ribosome (lorsque l'IRE est dans la partie 5' de l'ARNm), soit une protection de l'ARNm vis-à-vis des ribonucléases endogènes (lorsque l'IRE est dans la partie 3' de l'ARNm) (voir Figure 9 page 48). L'activité de liaison des IRP est strictement dépendante de la quantité de fer dans les cellules. Dans des conditions où le fer est présent en grande quantité, les IRP ne se lient pas sur leurs cibles conduisant à une augmentation de la traduction de la ferritine (déblocage de la traduction) afin de stocker le fer, et à une diminution de l'expression du récepteur de la transferrine (dégradation de l'ARNm) afin de diminuer le transport de fer par la cellule. À l'inverse, dans des conditions de carence martiale, la traduction de la ferritine est diminuée et l'expression du récepteur de la transferrine augmentée.

Les expressions des protéines DMT1 et ferroportine sont aussi contrôlées par le statut martial grâce à un système contrôlant soit la traduction, soit la stabilité de l'ARNm. Une isoforme de DMT1 exprimée dans le duodénum possède un IRE dans sa partie 3' non codante, ce qui suggère un mécanisme de régulation semblable à celui du récepteur de la transferrine (l'autre isoforme ne contient pas d'IRE). Des études *in vitro* ont démontré que le site IRE de DMT1 est fonctionnel et capable de fixer les IRP mais la démonstration de son rôle fonctionnel *in vivo* reste à établir. La ferroportine possède un IRE dans sa partie 5' suggérant une régulation de sa traduction par la quantité de fer. L'expression de la ferroportine pourrait faire intervenir des mécanismes différents selon que la régulation s'effectue par le fer intracellulaire (par exemple dans les entérocytes), ou par la charge en fer globale de l'organisme (fer systémique).

Ainsi, ces différents mécanismes permettraient-ils de contrôler l'absorption du fer alimentaire au niveau des cellules de la crypte de Lieberkühn. Ces cellules, en migrant tout en se différenciant le long de la villosité duodénale, deviennent des entérocytes matures et acquièrent une capacité absorbative du fer adaptée à la demande en fer. Il s'agit néanmoins d'une régulation à long terme puisque les cellules de la crypte qui reçoivent les signaux mettent plusieurs jours pour migrer et se différencier. La plupart des stimuli agissent sur l'absorption avec un laps de temps de quelques jours, ce qui a fortement contribué à imposer depuis très longtemps ce modèle de la programmation des cellules de la crypte (128) mais on connaît des situations dans lesquelles l'absorption intestinale est contrôlée de façon plus rapide et qui est incompatible avec une action

au niveau des progéniteurs de la crypte. Il s'agit par exemple des situations inflammatoires aiguës dans lesquelles on observe une diminution de l'absorption du fer en quelques heures. Certains auteurs pensent qu'il pourrait s'agir d'une régulation différente de la régulation physiologique. Néanmoins, ces résultats peuvent être interprétés grâce à un autre modèle dans lequel la régulation de l'absorption de fer intègrerait le rôle d'une nouvelle protéine, l'hepcidine, agissant directement sur l'entérocyte mature.



© Gaël NICOLAS

Figure 9
Régulation post-transcriptionnelle par les protéines IRP

Lorsque le fer est présent en quantité limitée, les protéines IRP (on connaît deux protéines, IRP1 et IRP2, codées par deux gènes différents) se fixent sur les séquences cibles en forme de tige/boucle (appelées IRE, Iron Responsive Element) des ARNm. En se fixant en 5' de l'ARNm (c'est le cas pour l'ARNm codant la ferritine) elles diminuent l'accessibilité par le complexe traductionnel ce qui bloque la traduction (a). En se fixant en 3' de l'ARNm (c'est le cas de l'ARNm codant le récepteur de la transferrine) elles le protègent de l'attaque par des ribonucléases endogènes (b). Quand la quantité de fer intracellulaire augmente, les protéines IRP perdent leur faculté de fixation aux IRE. La traduction des ARNm de la ferritine est alors débloquée (c) tandis que l'ARNm du récepteur de la transferrine est dégradé (d).

1.6. L'HÉMOCHROMATOSE, UNE ABSORPTION DE FER MAL CONTRÔLÉE

L'hémochromatose à caractère autosomique récessif est une maladie génétique hétérogène liée, dans la grande majorité des cas, à l'existence d'une mutation unique C282Y (la cystéine en position 282 est substituée par une tyrosine) du gène *HFE* localisé sur le chromosome 6 (OMIM #235200) (129). Dans la population européenne la fréquence de la mutation est de 2 à 5 %. En France, cela représente 160 000 à 180 000 porteurs homozygotes de la mutation *HFE* C282Y susceptibles de développer une hémochromatose. Cette affection se caractérise cliniquement par l'accumulation de fer dans les organes, principalement dans le foie, le cœur et le pancréas. La

surcharge en fer ne semble pas induire la répression de l'absorption qui devrait se faire grâce au régulateur des réserves. Le fer en excès s'accumule tout au long de la vie et finit par perturber la physiologie des cellules touchées à cause de la production de radicaux libres. Les symptômes cliniques qui apparaissent rarement avant 40-50 ans sont hétérogènes selon l'organe atteint, ce qui rend le diagnostic difficile pour les médecins généralistes : hépatomégalie parfois compliquée d'une cirrhose et de carcinome hépatocellulaire, diabète, insuffisance cardiaque, mélanodermie, insuffisance hormonale, etc. Le seul traitement efficace aujourd'hui consiste en une série de saignées permettant de mobiliser le fer en excès pour maintenir l'érythropoïèse. Les femmes sont d'ailleurs protégées plus longtemps de la surcharge en fer grâce à la perte naturelle de sang lors du cycle menstruel.

2. RÉSULTATS

Initialement mon sujet post-doctoral n'avait rien à voir avec l'homéostasie du fer. Il consistait à étudier des souris invalidées pour le facteur de transcription USF2. Le sujet comportait deux parties : une partie dans laquelle je m'intéressais au rôle d'USF2 dans la régulation du métabolisme du glucose. Dans une partie plus large j'ai cherché à identifier les gènes cibles de ce facteur de transcription. Pour cela j'ai réalisé une banque soustraite d'ADNc permettant d'identifier les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée dans une condition (ici dans le foie des souris *Usf2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages).

Les souris *Usf2*^{-/-} possèdent de nombreux phénotypes : elles sont petites, apathiques, meurent bien souvent au bout de quelques semaines ; les mâles *Usf2*^{-/-} qui se reproduisent mal et les femelles *Usf2*^{-/-} qui n'allaitent pas leurs souriceaux sont quelques-uns de ces phénotypes. Ceux-ci dépendent clairement de facteurs génétiques ou environnementaux. Les autopsies pratiquées sur les souris *Usf2*^{-/-} révèlent qu'elles possèdent un foie et un pancréas extrêmement sombres sans altération de la forme de l'organe (voir Figure 10 page 50). Ce phénotype a une pénétrance complète. Cette coloration sombre est de plus en plus marquée avec l'âge des souris : orange dès l'âge de trois mois le pancréas est complètement noir à l'âge de dix huit mois. On observe une coloration similaire sur le foie mais plus difficile à détecter du fait que cet organe est déjà coloré (alors que le pancréas murin est naturellement blanc ou rose). Nous avons réalisé un dosage du fer tissulaire ainsi que des analyses histologiques en utilisant le bleu de Prusse (qui permet de révéler les dépôts anormaux de fer par une coloration bleue). L'ensemble des résultats a démontré que les souris *Usf2*^{-/-} ont une surcharge en fer massive et multitissulaire. Le foie et le pancréas sont les organes massivement surchargés en fer. Plus la souris est âgée plus les autres organes sont aussi touchés. À l'inverse la rate est un organe qui accumule progressivement le fer. Ceci est lié aux macrophages qui recyclent et stockent le fer des globules rouges âgés pour le redistribuer ensuite afin d'assurer la production de nouveaux globules rouges. Le fer est un élément rare dans l'alimentation et l'organisme cherche par ce moyen à le recycler. Alors que les souris normales accumulent peu à peu du fer dans leur rate, les souris *Usf2*^{-/-} ont une quantité de fer très diminuée dans leur rate. La surcharge hépatique et pancréatique et l'absence de fer splénique sont des phénotypes caractéristiques de l'hémochromatose génétique.

En accord avec Sophie VAULONT et Axel KAHN, j'ai donc décidé de changer l'orientation de mon stage post-doctoral pour comprendre le mécanisme moléculaire créant cette surcharge.

2.1. PREMIÈRE HYPOTHÈSE

L'hypothèse la plus simple était que le facteur de transcription USF2 contrôle l'expression d'un gène régulant l'homéostasie du fer. Au moment de cette étude, chez l'humain, des mutations de

deux gènes avaient été identifiés comme responsables d'hémochromatose génétique : le gène *HFE* et le gène *TFR2* (*Transferrin Receptor 2*). L'expression de ces deux gènes n'est pas altérée chez les souris *Usf2*^{-/-}. On s'orientait donc vers un gène inconnu.

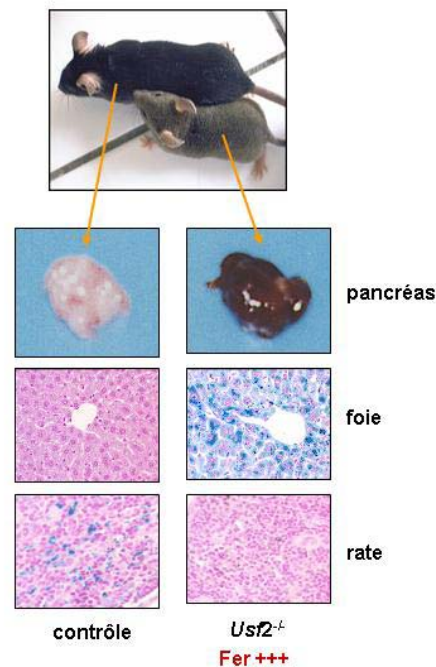


Figure 10
Surcharge en fer des souris *Usf2*^{-/-}

La photo du haut montre une femelle *Usf2*^{-/-} (marron) et sa sœur *Usf2*^{+/+} (noire) âgées de huit mois.

En dessous se trouvent des images du pancréas des deux souris. L'organe de la souris *Usf2*^{-/-} est complètement noir par rapport à celui de la souris contrôle.

Des coupes de foie colorées au bleu de Prusse permettent de révéler la présence de dépôts de fer en excès par une coloration bleue. On voit que la coupe de foie de la souris *Usf2*^{-/-} est complètement bleue par rapport au foie de la souris contrôle.

Dans la rate, les dépôts bleus révèlent la présence des macrophages qui stockent le fer en recyclant les globules rouges. Les macrophages des souris *Usf2*^{-/-} n'arrivent plus à stocker le fer comme le révèle l'absence de coloration bleue.

Nicolas et al. 2001 PNAS (130)

2.2. UN COUP DE POUCE DU HASARD ...

Le 12 décembre 2000 j'ai reçu les dernières séquences de la banque soustraite de foie. Le réflexe habituel était de rechercher à quoi correspond chaque clone dans les banques de données. L'un de ces clones correspondait à un ADNc qui avaient deux noms différents : LEAP-1 et hepcidine. Une recherche dans PubMed indiquait qu'il n'existait alors qu'un seul article sur cette protéine LEAP-1 (*liver-expressed antimicrobial peptide*). Comme son nom l'indique il s'agit d'une protéine antimicrobienne. Devant le peu d'informations alors disponibles ce clone fût placé sur la liste des clones non exploités. Deux heures plus tard j'ai pris connaissance d'un article mis en ligne la veille (11 décembre 2000) sur le site de *The Journal of Biological Chemistry*. Il s'agit du travail d'une équipe française dirigée par Olivier LORÉAL. Les auteurs ont recherché des gènes dont l'expression est modulée par un régime riche en fer. Ils ont aussi utilisé une stratégie de banque soustraite sur le foie des souris recevant une nourriture enrichie en fer. Parmi les clones ils ont identifié un gène dont l'expression augmente en présence de fer : c'est le gène de l'hepcidine (131). Ce travail fût copublié avec le travail d'une équipe américaine dans le même numéro de *JBC*. Cette équipe

américaine a recherché de nouveaux peptides antimicrobiens dans l'urine humaine et identifié l'hepcidine (132). Elle est à l'origine du nom « hepcidine » à cause de son expression majoritairement hépatocytaire (hep-) et de ses propriétés antimicrobiennes (-cidine). Dans la conclusion de leur article Pigeon *et al.* laissent en suspens la question de savoir pourquoi la fabrication d'un peptide antimicrobien est augmentée en présence de fer tandis que l'équipe américaine évoque à peine le lien avec l'homéostasie du fer et se focalise pleinement sur le rôle antimicrobien (131). Un autre point intrigant dans cet article était le fait que le gène de l'hepcidine se trouvait seulement à un millier de paires de base du gène *Uf2*. C'est en combinant toutes ces informations avec les résultats de notre banque soustractive que j'ai décidé d'analyser l'expression de l'hepcidine chez les souris *Uf2*^{-/-}. Les résultats ont rapidement démontré que le foie de ces souris n'exprime plus du tout l'hepcidine.

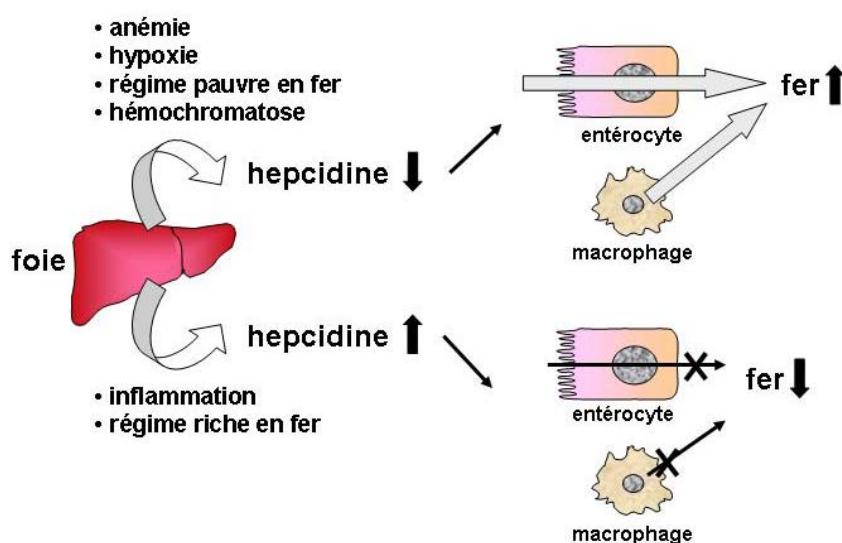


Figure 11
L'hepcidine agit sur les entérocytes et les macrophages

L'hepcidine agit en diminuant l'absorption intestinale du fer alimentaire ainsi que le recyclage du fer des globules rouges sénescents par les macrophages. L'expression de l'hepcidine est réglée en fonction de différents stimuli tels que l'anémie, l'hypoxie, la quantité de fer ou l'inflammation, agissant tous sur les mouvements de fer.

2.3. FINALEMENT... LE RÔLE RÉGULATEUR DE L'HEPCIDINE

Notre travail propose que l'hepcidine soit un inhibiteur de l'absorption intestinale de fer mais également du relargage de fer par les macrophages (voir Figure 11 ci-dessus). Ces cellules jouent en effet un rôle important en recyclant le fer des globules rouges âgés. L'hepcidine est une petite protéine synthétisée majoritairement par le foie sous la forme d'un précurseur de 84 acides aminés, maturée par clivage protéolytique et sécrétée dans la circulation sanguine où elle se trouve sous la forme d'un peptide de 25 acides aminés (133, 131). Ce peptide possède huit cystéines formant 4 ponts disulfures, ce qui lui confère une structure unique et indispensable pour son activité (134, 135). Dans ce premier article nous avons présenté la surcharge en fer tissulaire des souris *Uf2*^{-/-}. Une erreur est présente dans cet article. Nous évoquons une surcharge périportale dans le foie *Uf2*^{-/-} alors qu'il s'agit en fait d'une surcharge centrolobulaire. Nous avons en fait été influencés par les surcharges périportales des souris *Hfe*^{-/-} car nous pensions que le modèle *Uf2*^{-/-} est une phénocopie du modèle *Hfe*^{-/-}. Or il se trouve que cela n'est pas vrai. La surcharge

des souris *Uf2*^{-/-} est beaucoup plus sévère que la surcharge des souris *Hfe*^{-/-}. Pour s'en convaincre on n'observe pas de coloration très marquée des organes d'une souris *Hfe*^{-/-} même si celle-ci est très âgée alors que la coloration est déjà très visible chez la souris *Uf2*^{-/-} âgée de trois mois. Nous l'avons dit, la localisation du fer dans le foie est différente. Le mécanisme à l'origine de cette différence n'est pas clair. Il pourrait être lié à une zonation de la ferroportine – le transporteur ciblé par l'hépcidine (voir plus loin) – dans le foie mais ce point est purement hypothétique.

Nous présentons ensuite la stratégie de la banque soustraite et l'identification de l'hépcidine à partir de cette banque. Nous démontrons que l'expression hépatique de l'hépcidine (en fait il y a deux gènes *Hepc1* et *Hepc2* chez la souris) est effondrée chez la souris *Uf2*^{-/-}. Nous développons l'hypothèse que l'hépcidine est un facteur humoral sécrété par le foie et qui agit comme un régulateur négatif du transport de fer au niveau des entérocytes du duodénum mais également au niveau du recyclage du fer par les macrophages. Cette hypothèse explique que des souris surchargées en fer par un régime ont une expression d'hépcidine augmentée (131) alors que les souris *Uf2*^{-/-} qui ont aussi une surcharge en fer massive n'expriment plus du tout d'hépcidine. En effet les souris normales nourries avec un régime riche en fer accumulent de plus en plus de fer. Lorsque le stock de fer hépatique est élevé le foie fabrique davantage d'hépcidine pour diminuer l'absorption de fer au niveau de l'intestin et éviter ainsi un excès toxique. Chez nos souris *Uf2*^{-/-} l'expression d'hépcidine est devenue inopérante. De fait le fer est absorbé sans cesse et l'accumulation n'est jamais freinée. Le foie ne peut jamais répondre en augmentant la synthèse d'hépcidine. Nous ne connaissons pas le mécanisme d'extinction de l'hépcidine chez les souris *Uf2*^{-/-}. C'est très certainement l'introduction de la cassette de sélection β géo dans l'exon 7 de *Uf2* qui perturbe l'expression de l'hépcidine mais nous n'avons jamais fait d'investigation dessus.

Le hasard a joué un rôle catalyseur dans cette découverte. Il y a d'abord le fait d'avoir réalisé une banque de foie, l'organe dans lequel l'hépcidine est très majoritairement exprimée. Si nous avions réalisé la banque en choisissant le pancréas – organe dont la coloration était la plus marquante – il aurait été impossible d'identifier l'hépcidine car l'expression de celle-ci est normale dans le pancréas des souris *Uf2*^{-/-}. Il y a encore le fait que l'ensemble des derniers éléments (arrivée du clone hépcidine et publication en ligne de l'article de Pigeon *et al.*) se sont déroulés à quelques heures d'intervalle. Sans les informations de Pigeon *et al.* il est clair que nous n'aurions pas mis en évidence si rapidement le rôle de l'hépcidine. Car finalement une banque soustraite ou un crible double hybride c'est comme le ramassage des champignons... on ne garde que ceux que l'on connaît !

J'ai voulu souligner dans le paragraphe précédent le rôle positif que le hasard a joué et le caractère ludique que cela a donné à cette découverte. Il a néanmoins ensuite fallu beaucoup de travail et d'expériences pour valider notre hypothèse de départ et faire de l'hépcidine ce qu'elle est aujourd'hui. Ces expériences sont décrites dans les prochains paragraphes dans lesquels je résume quelques-unes de mes principales publications sur ce sujet. Ces travaux furent réalisés en collaboration avec Carole BEAUMONT et Bernard GRANDCHAMP respectivement directrice d'équipe et directeur de l'unité 409 de l'INSERM à l'époque. Le hasard veut également que ce soit dans cette unité que j'avais effectué mon doctorat.

VOIR L'ARTICLE 4 PRÉSENTÉ EN ANNEXE :

NICOLAS *et al.* 2002, PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA

Dans cet article nous validons complètement l'hypothèse de départ. Puisque l'hépcidine agit comme un frein au mouvements de fer dans l'organisme il serait logique que ce blocage soit d'autant plus important que la synthèse d'hépcidine augmente. Pour cela j'ai réalisé différentes lignées de souris transgéniques exprimant l'ADNc *Hepc1* sous le contrôle du promoteur

hépatospécifique TTR1 (transferrine). J'ai obtenu plusieurs lignées avec des expressions d'hépcidine variables à la fois en intensité et dans le temps. Par exemple j'ai obtenu une lignée avec une expression modérée mais très précoce au cours du développement et des lignées sans expression au cours du développement et qui augmente à l'âge adulte. Les souris transgéniques ont toutes présenté un phénotype commun : une anémie plus ou moins sévère. Il s'agissait clairement d'anémies par carence en fer (ferriprives) comme le démontraient les frottis sanguins avec la présence d'une hypochromie des globules rouges, des microcytes et une poikilocytose (variabilité de la forme des érythrocytes). Sur certaines lignées l'anémie était si sévère que les souriceaux extrêmement pâles mourraient soit à la naissance, soit quelques jours après la naissance. J'ai finalement réussi à sauvegarder plusieurs lignées précieuses en pratiquant une injection sous cutanée de fer dextran aux souriceaux transgéniques lorsqu'ils étaient encore vivants à la naissance. En revanche la lignée fondatrice Thepc5 qui ne donnait que des souriceaux anémiques mort-nés n'a pas pu être conservée. Certaines souris qui ne nécessitaient pas d'injection de fer présentaient également une perte importante du pelage (voir Article 4, Figure 2D) à l'âge adulte. L'absence de poil était d'autant plus marquée que la synthèse d'hépcidine était forte. La pousse des poils reprenait normalement lorsqu'on pratiquait une ou plusieurs injections de fer dextran. Bien qu'il soit clair qu'il existe une relation entre la pousse des poils et le fer nous n'avons jamais étudié cet aspect.

Pour cette étude nous avons également eu accès à un modèle KO *Uf2* réalisé par une équipe américaine (nous l'avons baptisé KO *Uf2* Houston dans l'article). Nous avons démontré que ces souris *Uf2*^{-/-} n'ont pas de surcharge en fer et ont une expression normale de l'hépcidine. Cela éliminait l'hypothèse d'une action du facteur USF2 dans nos souris *Uf2*^{-/-} même si une étude évoque une action de USF2 sur le promoteur de l'hépcidine (136).

L'ensemble de ces résultats a donc confirmé le rôle de l'hépcidine dans l'homéostasie du fer. En outre cette étude démontrait que l'hépcidine agissait également sur le transport du fer au niveau du placenta puisque les embryons surexprimant l'hépcidine présentent une anémie sévère au cours du développement. L'hépcidine n'est normalement pas exprimée pendant la grossesse (sans doute pour favoriser le passage du fer de la mère au fœtus) et commence à l'âge adulte (lorsque le stock en fer est constitué et qu'il faut freiner l'absorption du fer alimentaire). On observe un pic d'expression d'hépcidine à la naissance sans qu'on ne sache pourquoi.

Ce deuxième article confirmant pleinement la découverte d'un facteur humoral recherché depuis quarante ans, a eu un fort retentissement dans les médias français. Sur un plan plus scientifique ces résultats ont placé l'hépcidine au centre de l'homéostasie du fer.

Comme nous l'avions prédit dans notre premier article il était vraisemblable que des mutations de l'hépcidine soient associées à des surcharges en fer chez l'homme. Cela a été effectivement rapporté quelques mois plus tard par une équipe italienne : des mutations de l'hépcidine sont responsables d'une partie des hémochromatoses juvéniles. Cela apportait une explication à cette surcharge en fer très rare qui était orpheline jusqu'à ce jour. Cela indiquait en outre que l'hépcidine joue aussi un rôle central pour l'homéostasie du fer humaine.

NICOLAS et al. 2002, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION

Dans cet article nous avons démontré qu'il existe une excellente corrélation entre les stimuli qui module l'absorption du fer et son recyclage par les macrophages et l'expression de l'hépcidine (voir Figure 11 page 51). Des réserves de fer peu élevées, l'anémie et l'hypoxie stimulent l'absorption et sont corrélées à une diminution de l'expression d'hépcidine. Une inflammation entraîne l'inhibition de l'absorption intestinale et du recyclage du fer stocké dans les macrophages. De fait, une anémie est fréquemment associée aux maladies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les infections chroniques et les cancers mais le mécanisme d'apparition de cette anémie demeurait inexpliqué. Dans cette étude nous avons démontré que l'expression

d'hépcidine est fortement stimulée lors d'un processus inflammatoire induit chimiquement. D'autres travaux ont depuis validé cette hypothèse sur de nombreuses inflammations qu'elles soient induites par une infection bactérienne ou une infection virale. Cette augmentation d'hépcidine aurait pour conséquence de bloquer les mouvements de fer de l'organisme au niveau de l'intestin et des macrophages. On pense qu'il s'agit d'une réponse de l'organisme afin de soustraire le fer indispensable à la prolifération des pathogènes. Lorsque l'on crée un abcès inflammatoire chez la souris, on observe une diminution du fer sérique en quelques heures. Cet effet n'est plus observé chez les souris *Usl2*^{-/-} qui ne fabriquent plus d'hépcidine. Chez des patients porteurs d'un adénome hépatique exprimant une quantité importante d'hépcidine, il se développe une anémie de type inflammatoire, anémie qui disparaît avec l'ablation de l'adénome. Ainsi ces arguments forts suggèrent-ils que l'hépcidine puisse aussi participer au développement de ces anémies (6).

Ces premiers travaux ont démontré que l'hépcidine est le fameux « régulateur des réserves ». Mais l'hépcidine serait aussi le « régulateur érythroïde ». En effet dans une situation dans laquelle il est nécessaire d'augmenter la fabrication des globules rouges (en cas d'anémie par exemple), l'expression d'hépcidine est complètement réprimée. Ce mécanisme pourrait faire intervenir l'érythropoïétine car nous avons démontré que l'injection de celle-ci à des souris suffisait à éteindre l'expression d'hépcidine (7). L'inhibition d'expression d'hépcidine permettrait de lever l'action négative qu'exerce la molécule sur l'absorption de fer, ceci afin d'apporter suffisamment de fer pour la production accrue des globules rouges.

2.4. L'HEPCIDINE COMME TRAITEMENT DES SURCHARGES EN FER

VOIR L'ARTICLE 5 PRÉSENTÉ EN ANNEXE : NICOLAS et al. 2003, NATURE GENETICS

La question de savoir quelle était l'expression de l'hépcidine dans l'hémochromatose génétique est vite apparue à l'ensemble des équipes qui travaillent sur les mouvements de fer et leur régulation. Deux hypothèses étaient possibles. Soit l'hépcidine est augmentée en réponse à la surcharge de l'hémochromatose, soit elle est diminuée et pourrait alors être la cause de la maladie. Il a été démontré, aussi bien chez l'homme que chez la souris, que HFE est très certainement une protéine régulatrice de l'expression de l'hépcidine par le foie. L'altération du gène *HFE* (soit à cause de la mutation C282Y chez l'homme ou par invalidation complète chez la souris) entraîne alors un dysfonctionnement de ce mécanisme de régulation dont la conséquence est un défaut d'expression d'hépcidine en réponse à la surcharge en fer (137, 138, 8). En effet dans toutes ces situations d'hémochromatoses humaines et murines l'hépcidine y est trop peu exprimée au regard de la surcharge en fer qui aurait dû stimuler son expression. La quantité d'hépcidine est donc insuffisante pour freiner l'absorption intestinale du fer. Il est à noter que les macrophages de patients atteints d'hémochromatose ou de souris invalidées pour leur gène *Hfe* ont une diminution de leurs réserves en fer tout comme les souris n'exprimant plus d'hépcidine (130). L'hépcidine agissant en effet pour bloquer le relargage du fer par les macrophages, son absence entraîne une sortie excessive de fer de ces cellules. Nous avons démontré que la complémentation fonctionnelle de souris *Hfe*^{-/-} par un transgène hépcidine les protège complètement de l'accumulation de fer aussi longtemps que l'hépcidine est fabriquée en quantité suffisante, ce qui confirme que le déficit de production d'hépcidine contribue à la physiopathologie de l'hémochromatose. Cette absence de surcharge dépend de la force d'expression du transgène. Par exemple la lignée Thepc27 dont l'expression du transgène diminuée chez les souris âgées d'un mois ne protège pas complètement les souris *Hfe*^{-/-}. Deux points importants découlent de ces travaux :

1. La protéine HFE est un régulateur de l'expression d'hépcidine ;

2. L'hepcidine pourrait servir de thérapie pour les surcharges en fer. D'autant plus que ce n'est pas le gène codant l'hepcidine qui est affecté dans l'hémochromatose mais sa régulation par le fer. Il suffirait donc de pouvoir augmenter l'expression du gène hepcidine pour diminuer la surcharge.

Nous l'avons déjà décrit, chez l'homme, une mutation homozygote du gène de l'hepcidine localisé sur le chromosome 19 peut entraîner une hémochromatose héréditaire très grave dont les symptômes cliniques apparaissent dès l'adolescence (dite hémochromatose juvénile OMIM #602390) (135).

Les souris *Hfe*^{-/-} conservent une régulation de l'absorption intestinale du fer à différents stimuli tels que la carence ou la surcharge en fer mais cette régulation est moins efficace, suggérant que HFE n'est pas la seule protéine impliquée dans la régulation de l'expression d'hepcidine (139). Les mutations de l'hepcidine dans l'hémochromatose juvénile sont rares mais un autre gène muté dans un plus grand nombre de cas et localisé sur le chromosome 1 a été identifié par clonage positionnel (140). Les auteurs ont démontré un déficit d'hepcidine dans l'urine des malades ce qui suggère que la protéine responsable (baptisée hémoujuvéline) est, comme HFE, un régulateur de l'expression d'hepcidine. Les mutations homozygotes d'un autre gène codant pour un nouveau récepteur de la transferrine (*TFR2*) sont aussi responsables d'hémochromatose (type 3 - OMIM #604250) avec un tableau clinique indiscernable des hémochromatoses par mutations de *HFE* (141, 142). Un défaut d'expression d'hepcidine existe chez ces patients.

2.5. HEPCIDINE ET PÉNÉTRANCE DE L'HÉMOCHROMATOSE

NICOLAS et al. 2004, BLOOD

La pénétrance de la mutation *HFE* C282Y à l'état homozygote est très incomplète et un nombre important de ces porteurs ne développe pas de symptôme clinique. Nous avons également démontré qu'en aggravant la carence d'hepcidine chez la souris, l'accumulation de fer devient encore plus sévère. Cela fait de l'hepcidine un candidat privilégié pour expliquer dans certains cas la pénétrance variable de l'hémochromatose. La variabilité pourrait s'expliquer soit par la présence délétère de mutations directement dans le gène de l'hepcidine (il s'agit sans nul doute de cas rares), soit par la modulation de son expression par des mécanismes génétiques et/ou environnementaux qui restent à déterminer (143).

2.6. LE MODÈLE DE RÉGULATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DE FER PAR L'ENTÉROCYTE MATURE VIA L'HEPCIDINE

L'hepcidine joue en fait le rôle de régulateur des réserves et serait étroitement lié au régulateur érythroïde évoqué précédemment. Elle agit en limitant l'absorption intestinale du fer ainsi que son relargage par les macrophages (voir Figure 11 page 51) (130, 3). L'hepcidine agit en fait en déclenchant, par un mécanisme moléculaire qui n'est pas encore décrypté, la dégradation du transporteur ferroportine chargé d'extruder le fer des entérocytes et des macrophages. Elle a donc une action directe sur l'entérocyte mature plutôt qu'une action sur les progéniteurs de la crypte. Néanmoins, un mode d'action sur l'entérocyte mature exprimant la ferroportine n'est pas forcément exclusif par rapport à un mode d'action sur les cellules de la crypte (voir chapitre précédent). La réalité pourrait intégrer un contrôle de l'absorption digestive du fer à la fois au niveau des cryptes (*via* le couple *HFE*/*TFR*/ β 2-microglobuline qui serait le complexe « senseur » de la quantité de fer plasmatique, cette dernière étant elle-même le reflet des réserves en fer et de l'érythropoïèse) et au niveau des entérocytes matures (*via* l'hepcidine qui agit directement sur

l'absorption de fer). Dans ce dernier cas il s'agit d'une action rapide (quelques heures) par rapport au modèle qui fait intervenir une « programmation » des entérocytes futurs (un ou deux jours).

2.7. CONCLUSIONS

L'hepcidine n'est plus mon sujet de recherche. Je ne développerai donc pas ici des projets de recherche comme je l'ai fait sur la spectrine. En revanche je décrirai les contributions que cette découverte a permis d'apporter.

Plusieurs conséquences découlent directement de l'identification de l'hepcidine en tant que régulateur majeur de l'absorption intestinale du fer. Tout d'abord cela permet d'identifier un effecteur final commun – l'hepcidine – dans la majorité des hémochromatoses. Ainsi, les hémochromatoses, considérées jusqu'à présent comme des maladies liées à un défaut exclusif de l'intestin, doivent-elles aujourd'hui être redéfinies comme des maladies avec une composante hépatique majeure. L'absorption intestinale de fer mal réglée qui se produit au niveau de l'intestin serait en partie une conséquence de ce déficit. On peut classer la sévérité des différentes hémochromatoses en fonction de l'expression résiduelle de l'hepcidine. Plus le déficit en hepcidine est prononcé, comme c'est le cas lorsque le gène hepcidine est directement touché ou dans l'hémochromatose juvénile – par altération du gène de l'hémojuvéline – plus l'absorption intestinale de fer sera importante conduisant à l'accumulation très précoce du métal dans les organes (voir Figure 12 page 57). Dans l'hémochromatose héréditaire associée à une mutation du gène *HFE*, le défaut d'expression d'hepcidine vis-à-vis de la surcharge est moins important ce qui pourrait expliquer l'apparition plus tardive des symptômes cliniques. L'hétérogénéité de l'hémochromatose pourrait s'expliquer par une variabilité dans l'expression de l'hepcidine. À l'opposé, une fabrication excessive d'hepcidine entraînerait un blocage total des mouvements de fer dans l'organisme (absorption et recyclage) avec pour conséquences une anémie ferriprive.

Aujourd'hui, il semble indispensable de développer des kits de dosage de l'hepcidine puisque de sa quantité dépend directement les mouvements de fer au sein de l'organisme. Un tel outil se révélera probablement un élément diagnostic important pour l'homéostasie du fer dans les années à venir. Il permettrait d'établir un pronostic concernant la sévérité de la surcharge chez les personnes qui fabriquent le moins d'hepcidine. Enfin, en dehors des malades porteurs de mutations situées directement au sein du gène codant l'hepcidine, rappelons que dans toutes les autres situations le gène de l'hepcidine est normal mais que c'est la régulation de son expression qui est altérée. L'utilisation de l'hepcidine, de ses agonistes ou de toute substance capable de stimuler sa production devrait donc, dans le futur, pouvoir constituer un traitement logique de certaines surcharges en fer primaires telles que les hémochromatoses. Nous avons démontré la preuve de ce concept puisque des souris *Hfe*^{-/-} ne développent jamais de surcharge tant qu'elle fabriquent de l'hepcidine à partir d'un transgène (8). Nous rapportons également que la production d'hepcidine induit chez les souris hémochromatosiques dont la surcharge en fer est déjà établie, une redistribution rapide du métal qui s'accumule dans les macrophages au lieu des hépatocytes (10). La toxicité hépatique du fer étant liée à sa surabondance dans les hépatocytes, ce résultat confirme et élargit l'intérêt thérapeutique de l'hepcidine ou des inducteurs de l'hepcidine dans le traitement des surcharges en fer, en particulier des hémochromatoses communes. En effet, un tel traitement serait susceptible non seulement de diminuer l'absorption intestinale du fer, cause de la surcharge, mais aussi d'induire une redistribution du fer déjà accumulé, et donc d'en réduire la toxicité.

Ces molécules pourraient aussi être bénéfiques pour les surcharges secondaires qui se développent dans les maladies comme les thalassémies ou les anémies réfractaires par insuffisance de production de globules rouges. Chez les patients thalassémiques par exemple, il existe une

absorption digestive du fer très importante qui est la conséquence de l'érythropoïèse inefficace. Cette absorption de fer aggrave la surcharge en fer déjà mise en place par la transfusion répétée de globules rouges indispensables pour la survie des patients d'autant plus que ces malades ne peuvent pas bénéficier de traitement par saignées puisque déjà anémiés du fait de l'anomalie de leurs globules rouges. Plusieurs études rapportent qu'il existe une diminution d'expression de l'hepcidine chez les patients ou chez les souris thalassémiques. Pouvoir disposer de molécules inhibitrices de l'absorption intestinale de fer pourrait ici constituer un traitement de choix puisque le seul traitement disponible lorsque la surcharge en fer est trop importante est l'administration de molécules chélatrices du fer par voie intraveineuse, qui est très difficile à supporter pour le patient. De plus son efficacité est parfois limitée.

Au cours de la stéatohépatite alcoolique, l'accumulation hépatique de fer ne tient pas qu'à la richesse en fer du vin rouge. C'est sans doute le stress oxydatif, généré par l'alcool, qui inhibe la production hépatique d'hepcidine, d'où l'élévation de l'absorption intestinale du fer (144). Et le cercle vicieux est engagé, puisque la surcharge en fer augmente le risque de stress oxydatif.

Notons que nous avons déposé un brevet international sur l'utilisation de l'hepcidine dans la traitement des surcharges en fer ainsi que sur le dosage de l'hepcidine comme outil diagnostique. L'INSERM est propriétaire de ce brevet.

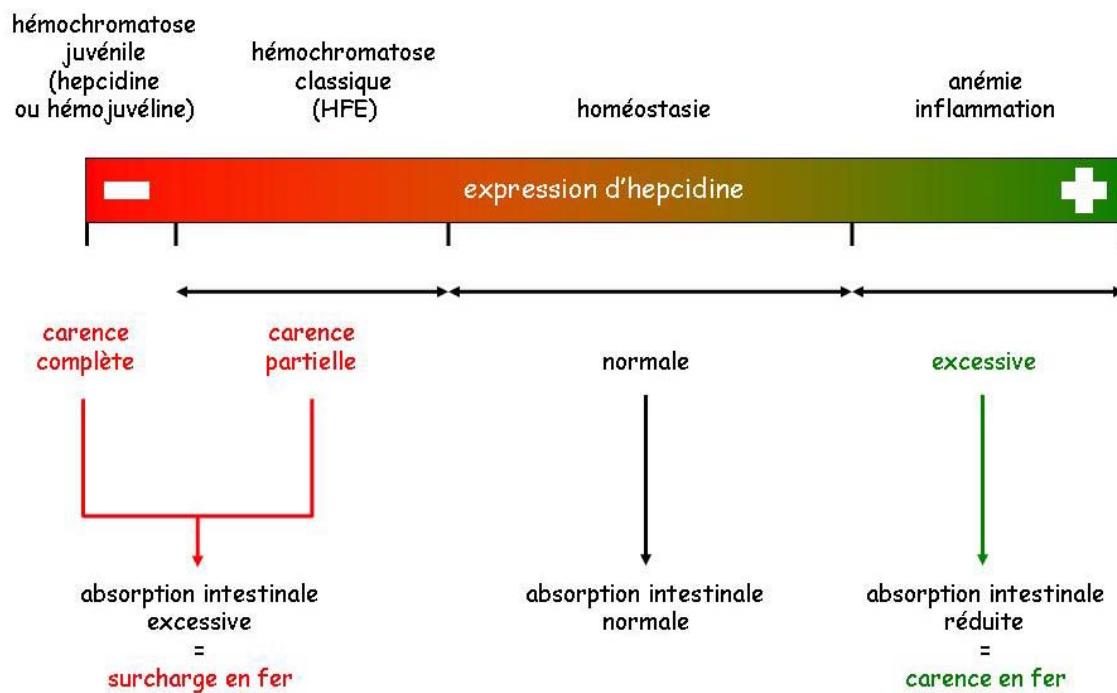


Figure 12

Rôle de l'hepcidine dans l'homéostasie des mouvements de fer

Un excès d'hepcidine peut être à l'origine de la diminution de l'absorption intestinale de fer observée dans un grand nombre d'états inflammatoires. À l'inverse, une carence d'hepcidine entraîne une mauvaise régulation négative de l'absorption de fer qui devient alors excessive. C'est le cas dans les hémochromatoses. Il semblerait que plus la carence soit prononcée, plus l'absorption du fer est importante.

NOUVELLE THÉMATIQUE – RÔLE DE LU/BCAM DANS L'ORGANISATION DES TISSUS À L'AIDE D'UN MODÈLE MURIN D'INVALIDATION DU GÈNE LU

En 2007 j'ai intégré l'équipe de Caroline LE VAN KIM au sein de la même unité INSERM pour y développer une nouvelle thématique. J'ai fait le choix de résumer le projet lié à ce nouveau sujet et non pas de le développer car il est très récent.

Les antigènes de groupe sanguin Luthéran (Lu) et l'antigène tumoral B-CAM (*Basal Cell Adhesion Molecule*) sont portés par des glycoprotéines (gps) isoformes codées par un gène unique *LU*. Ce sont des membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig) qui ne diffèrent que par la taille de leur domaine cytoplasmique. L'isoforme Lu comprend 40 acides aminés supplémentaires par rapport à l'isoforme Lu(v13), parmi lesquels on note la présence de plusieurs sites de phosphorylation. Les protéines Lu sont également exprimées dans de nombreux tissus avec une localisation associée aux couches basolatérales des cellules épithéliales et également au niveau des endothéliums vasculaires. Les gps Lu et Lu(v13) sont des molécules d'adhérence, récepteurs uniques des laminines 511/521 qui sont des composants majeurs de la matrice extracellulaire. Les laminines 511/521 sont des hétérotrimères incluant trois chaînes distinctes appelées α , β et γ . Les laminines 511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$)/521 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) portent les chaînes $\alpha 5$ et $\gamma 1$ en commun. Elles diffèrent par la chaîne β ($\beta 1$ dans la laminine 511 et $\beta 2$ dans la laminine 521). De nombreuses études démontrent que c'est la chaîne $\alpha 5$ qui interagit avec Lu. Notons qu'il existe une interaction directe entre Lu et la spectrine au moins dans le globules rouge (108) mais cette interaction pourrait être conservée dans d'autres tissus. Chez la souris, la protéine Lu est exprimée dans de nombreux tissus (coeur, poumon, rein, intestin, muscle...)(109). De plus, il a été montré *ex-vivo* et *in vitro* que cette interaction joue un rôle dans l'adhérence des cellules épithéliales, endothéliales et musculaires en particulier à la laminine 521. Ces résultats sont confortés par le fait que l'inactivation du gène de la laminine chaîne $\alpha 5$ entraîne une diminution drastique de l'expression de Lu, alors qu'elle est significativement augmentée dans le coeur de souris surexprimant cette même chaîne (110). Les souris déficientes pour la chaîne $\alpha 5$ meurent au stade embryonnaire avec de nombreux défauts de développement, en particulier des anomalies de développement du rein, de l'intestin, des poumons, et des vaisseaux sanguins (111-113). Il existe donc un lien étroit entre Lu et la laminine $\alpha 5$.

Le but du projet est de caractériser la fonction de Lu, en dehors de son caractère d'appartenance au groupe sanguin. Pour cela le laboratoire a généré un modèle murin n'exprimant plus Lu. Les souris *Lu*^{-/-} sont viables et fertiles, mais présentent des anomalies structurales des membranes basales contenant la laminine 521, dans le rein et dans l'intestin, tissus dans lesquels la protéine Lu est fortement exprimée. Nous avons montré que l'absence de Lu conduit dans ces deux tissus à un épaissement de la membrane basale qui perturbe la structure des couches musculaires intestinales et de la membrane basale glomérulaire (GBM) dans le rein, sans répercussion fonctionnelle en conditions normales d'élevage (114). Ces résultats suggèrent que, *in vivo*, Lu participe au maintien de l'architecture de la membrane basale de tissus qui expriment la laminine 521. Nous voulons exploiter ces résultats et notamment en décryptant le mécanisme qui aboutit aux anomalies de ces membranes basales. Un tel mécanisme contient très probablement la clé permettant d'identifier une fonction de Lu.

RÔLE FONCTIONNEL DE LU/BCAM DANS LE REIN

Il s'agit d'une collaboration avec l'équipe de Pierre Louis THARAUX (Hôpital Lariboisière), principale investigatrice de cette partie.

L'absence d'anomalie fonctionnelle rénale (pas de protéinurie) chez les souris *Lu*^{-/-} indique que la désorganisation partielle de la GBM ne modifie pas sa capacité de filtration du plasma en conditions normales. Mais nous ne pouvons exclure le fait que ces anomalies structurales ne permettent pas à la GBM de supporter une pression anormale prolongée en condition pathologique ou de stress et qu'une pathologie rénale puisse se développer. Nous testerons cette hypothèse en réalisant des stress. Nous analyserons les paramètres physiologiques rénaux des souris *Lu*^{-/-} et *Lu*^{+/+} après perfusion des souris par l'angiotensine II qui modifie la pression artérielle intra-glomérulaire ou après injection d'anticorps anti-membrane glomérulaire qui perturbe la barrière de filtration.

RÔLE DE L'INTERACTION LU AVEC LA LAMININE 521

Les souris *Lu*^{-/-} présentent un épaississement de la membrane basale glomérulaire, des couches musculaires intestinales et du ventricule gauche dans le cœur. D'autre part, dans les vaisseaux sanguins, nous observons la même désorganisation de la laminine 521 dans la membrane basale, située entre les cellules endothéliales et les cellules de muscle lisse. Il a précédemment été montré que l'interaction de récepteurs cellulaires avec leurs ligands, situés dans la matrice extra-cellulaire, permet la transmission de signaux et participe à la régulation de l'organisation des membranes basales. Nous voulons caractériser le rôle de Lu dans l'interaction des cellules endothéliales et/ou de muscle lisse avec la laminine 521, et la voie de signalisation impliquée dans le maintien de la structure de la membrane basale. Nous travaillerons à partir de cellules primaires dérivées des souris *Lu*^{-/-} et *Lu*^{+/+}. Dans un premier temps, nous voulons déterminer si Lu/BCAM médie l'adhérence cellulaire sur la laminine 521. Nous rechercherons des partenaires intracytoplasmiques de Lu potentiellement impliqués dans le maintien de l'intégrité de la laminine 521 (kinases, composant du squelette membranaire ...) dans la membrane basale, en présence ou non d'inducteurs connus pour participer au remodelage de la matrice extracellulaire (VEGF, TNF α ...) par des techniques de co-immunoprécipitation couplées à une identification des candidats potentiels par spectrométrie de masse (plate forme Institut Jacques Monod, Paris Diderot). Nous analyserons également le cœur des souris *Lu*^{-/-} qui présente un épaississement des couches musculaires du ventricule gauche (résultats non publiés).

UNE FORME SECRÉTÉE DE LU ?

Nos résultats préliminaires suggèrent l'existence d'une forme soluble (protéine extraite en présence d'un tampon de lyse sans détergent) de Lu qui pourrait correspondre à la partie extracellulaire de la protéine. Nous souhaitons confirmer l'existence de cette protéine Lu sécrétée. Actuellement, nous ne savons pas si cette protéine sécrétée agit sur un récepteur distant ou si elle est simplement intégrée dans la matrice extracellulaire. Nous essayons d'immunopurifier ce fragment afin d'analyser sa masse par spectrométrie dans le but d'identifier la nature moléculaire de la protéine (par exemple le site de coupure s'il s'agit d'une coupure par une protéase). Nous essayons également de voir si ce Lu soluble est le produit d'un épissage alternatif d'un ou plusieurs exons. Nous souhaitons établir un modèle cellulaire capable de produire ce Lu soluble. Cette approche pourrait être plus ou moins délicate selon que ce fragment est généré soit par une protéase endogène, soit par une protéase exogène, soit encore par épissage alternatif. S'il s'agit

d'une protéolyse ciblée nous introduirons des mutations au sein du site de coupure afin de confirmer sa spécificité.

Une deuxième approche consiste à travailler avec la partie extracellulaire de Lu produite *ex vivo* sous la forme d'une protéine recombinante (cellules COS.M6) fusionnée au fragment Fc des immunoglobulines. Le milieu conditionné contenant ce Lu-Fc est mis en contact sur des coupes d'organes (par exemple du rein). Nos résultats indiquent que le Lu-Fc se fixe dans des zones exprimant majoritairement la laminine 521. La spécificité de cette approche est démontrée par le fait qu'un Lu-Fc muté ponctuellement sur le site d'interaction avec la laminine ne se fixe plus sur les coupes de rein. Néanmoins nous démontrons clairement que le Lu-Fc ne se fixe pas dans toutes les zones exprimant la laminine 511 (par exemple la matrice mésangiale du glomérule) ou la laminine 521. Ceci va dans le sens d'une interaction probablement médiée par la chaîne $\alpha 5$. Mais là encore nous démontrons que toutes les zones exprimant $\alpha 5$ ne fixent pas Lu-Fc. Cela suggère l'existence de deux populations de laminine $\alpha 5$: l'une capable de lier Lu-Fc tandis que l'autre en est incapable. Nous souhaitons bien entendu caractériser la nature moléculaire de cette chaîne $\alpha 5$ fixant le Lu-Fc. Elle pourrait être produite par épissage alternatif ou par protéolyse. Mais cette différence d'interaction pourrait être médiée par des changements conformationnels de la même chaîne $\alpha 5$. Nos résultats préliminaires indiquent que la migration de la chaîne $\alpha 5$ se comporte très différemment en SDS-PAGE selon que la migration s'effectue en présence d'agent réducteur et selon les anticorps anti- $\alpha 5$ utilisés (anticorps monoclonaux ou polyclonaux fournis par le docteur Lydia Sorokin, *Institute for Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, Muenster University*, Allemagne). Nous produisons également nos propres anticorps anti-laminine $\alpha 5$ dont nous espérons qu'ils pourront constituer un outil permettant d'avancer vers l'identification de ces formes de laminine.

À plus terme nous envisageons de créer un modèle murin transgénique surexprimant un Lu soluble afin d'analyser les conséquences de production excessive de cette protéine.

Dans cette équipe je travaille avec Cécile RAHUEL (Ingénieur de recherche INSERM) et Anne FILIPE (MCU). Dans cette nouvelle thématique j'apporte mon expertise sur les modèles murins.

FINANCEMENT DE NOS RECHERCHES

Actuellement nos recherches sont co-financées par l'INSERM et l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS). Par ailleurs l'INTS met à notre disposition des locaux de recherche. Cette situation financière aisée fait qu'il n'a pas été nécessaire jusqu'à présent de demander des fonds extérieurs. Je suis totalement conscient du privilège de cette situation.

Je suis également conscient qu'une partie de l'évaluation du chercheur passera, dans les prochaines années, par le succès de telles demandes de financement externes. J'envisage donc de m'adapter à ce nouveau mode de fonctionnement.

En 2002 j'avais obtenu qu'une partie du projet de recombinaison homologue soit financé par l'Institut de la Clinique de la Souris (Illkirch, France). Actuellement mon autoévaluation passe donc essentiellement par la publication de mes résultats. J'ai co-signé vingt quatre publications en dix ans (dix en étant premier ou dernière auteur et sept en étant deuxième auteur). Enfin mes recherches sur l'hepcidine ont été valorisées par la prise d'un brevet international (l'INSERM étant propriétaire du brevet).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Lorsque j'ai initié ce travail sur l'hepcidine il s'agissait d'un sujet totalement vierge de résultats et de publications. C'était le terrain idéal pour démontrer mes capacités à diriger et faire fructifier l'hypothèse de départ. J'ai eu la chance sur ce point de recevoir la pleine confiance de Sophie VAULONT et d'Axel KAHN. Un tel régulateur était recherché depuis plusieurs dizaines d'années et sa découverte a constitué un véritable changement de paradigme. Ces importants résultats déclenchèrent de nombreuses recherches qui devaient rapidement confirmer le rôle de l'hepcidine chez l'homme. On compte aujourd'hui plus de 500 publications basées sur notre hypothèse. Fort de mon expérience post-doctorale j'ai ensuite pris la direction d'un projet risqué sur la délétion de la région CCC au sein de la spectrine α II. Ceci m'a permis d'acquérir un modèle original qui nous oblige à revisiter les hypothèses quant au rôle du clivage de la spectrine non érythroïde. Ce modèle murin doit maintenant être exploité de façon plus approfondie.

Je souhaite que l'ensemble de ces informations soit susceptible de constituer les critères appropriés pour bénéficier de l'habilitation à diriger des recherches.

RÉFÉRENCES

1. Galluzzi L, Nicolas G, Paiardini M, Magnani M et Lecomte MC. (2000) Identification of ubiquitinated repeats in human erythroid alpha-spectrin. *Eur J Biochem*; **267**:2812-2819.
2. Galluzzi L, Paiardini M, Magnani M, Nicolas G, Lecomte MC, Harper S et Speicher DW. (1999) cDNA sequence of the human erythroid alpha-spectrin: identification of a base deletion in the sequence database. *Blood*; **93**:2421-2422.
3. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A et Vaulont S. (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99**:4596-4601.
4. Lou DQ, Lesbordes JC, Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Van Rooijen N, Kahn A, Renia L et Vaulont S. (2005) Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in mice is not mediated by Kupffer cells in vivo. *Hepatology*; **41**:1056-1064.
5. Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, Viatte L, Grimber G, Szajnert MF, Kahn A et Vaulont S. (2004) Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*; **103**:2816-2821.
6. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A et Vaulont S. (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*; **110**:1037-1044.
7. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A et Vaulont S. (2002) Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis*; **29**:327-335.
8. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC et Vaulont S. (2003) Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*; **34**:97-101.
9. Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A, Canonne-Hergaux F et Vaulont S. (2005) Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*; **105**:4861-4864.
10. Viatte L, Nicolas G, Lou DQ, Bennoun M, Lesbordes-Brion JC, Canonne-Hergaux F, Schonig K, Bujard H, Kahn A, Andrews NC et Vaulont S. (2006) Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. *Blood*; **107**:2952-2958.
11. Meary F, Metral S, Ferreira C, Eladari D, Colin Y, Lecomte MC et Nicolas G. (2007) A mutant alphaII-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process in vivo. *J Biol Chem*; **282**:14226-14237.
12. Yu J, Fischman DA et Steck TL. (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct*; **1**:233-248.
13. Liu SC et Palek J. (1980) Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature*; **285**:586-588.
14. Shotton DM, Burke BE et Branton D. (1979) The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. *J Mol Biol*; **131**:303-329.
15. Ungewickell E et Gratzer W. (1978) Self-association of human spectrin. A thermodynamic and kinetic study. *Eur J Biochem*; **88**:379-385.
16. Liu SC, Derick LH et Palek J. (1987) Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol*; **104**:527-536.
17. Delaunay J. (2007) The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev*; **21**:1-20.
18. Grum VL, Li D, MacDonald RI et Mondragon A. (1999) Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. *Cell*; **98**:523-535.
19. Kusunoki H, Minasov G, Macdonald RI et Mondragon A. (2004) Independent movement, dimerization and stability of tandem repeats of chicken brain alpha-spectrin. *J Mol Biol*; **344**:495-511.
20. Speicher DW, Weglarz L et DeSilva TM. (1992) Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *J Biol Chem*; **267**:14775-14782.
21. Ursitti JA, Kotula L, DeSilva TM, Curtis PJ et Speicher DW. (1996) Mapping the human erythrocyte beta-spectrin dimer initiation site using recombinant peptides and correlation of its phasing with the alpha-actinin dimer site. *J Biol Chem*; **271**:6636-6644.
22. Viel A et Branton D. (1994) Interchain binding at the tail end of the Drosophila spectrin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91**:10839-10843.

23. Tse WT, Lecomte MC, Costa FF, Garbarz M, Feo C, Boivin P, Dhermy D et Forget BG. (1990) Point mutation in the beta-spectrin gene associated with alpha I/74 hereditary elliptocytosis. Implications for the mechanism of spectrin dimer self-association. *J Clin Invest*; **86**:909-916.
24. Lecomte MC, Garbarz M, Gautero H, Bournier O, Galand C, Boivin P et Dhermy D. (1993) Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis (HE) with spectrin alpha I variants. *Br J Haematol*; **85**:584-595.
25. Gorina S et Pavletich NP. (1996) Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*; **274**:1001-1005.
26. Romero F, Dargemont C, Pozo F, Reeves WH, Camonis J, Gisselbrecht S et Fischer S. (1996) p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol Cell Biol*; **16**:37-44.
27. Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R et Saraste M. (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature*; **359**:851-855.
28. Blanco FJ, Ortiz AR et Serrano L. (1997) 1H and 15N NMR assignment and solution structure of the SH3 domain of spectrin: comparison of unrefined and refined structure sets with the crystal structure. *J Biomol NMR*; **9**:347-357.
29. Pradhan D, Lombardo CR, Roe S, Rimm DL et Morrow JS. (2001) alpha -Catenin binds directly to spectrin and facilitates spectrin-membrane assembly in vivo. *J Biol Chem*; **276**:4175-4181.
30. Tsukamoto T et Nigam SK. (1997) Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J Biol Chem*; **272**:16133-16139.
31. Ye J, Tsukamoto T, Sun A et Nigam SK. (1999) A role for intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP depletion-repletion. *Am J Physiol*; **277**:F524-532.
32. Devarajan P, Stabach PR, Mann AS, Ardito T, Kashgarian M et Morrow JS. (1996) Identification of a small cytoplasmic ankyrin (AnkG119) in the kidney and muscle that binds beta I sigma spectrin and associates with the Golgi apparatus. *J Cell Biol*; **133**:819-830.
33. Nelson WJ et Veshnock PJ. (1986) Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol*; **103**:1751-1765.
34. Hu RJ, Moorthy S et Bennett V. (1995) Expression of functional domains of beta G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells. *J Cell Biol*; **128**:1069-1080.
35. Harris AS et Morrow JS. (1990) Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87**:3009-3013.
36. Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H et Yuan J. (1996) Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem*; **271**:31277-31282.
37. Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L et Rosen A. (1996) Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett*; **390**:299-303.
38. Janicke RU, Ng P, Sprengart ML et Porter AG. (1998) Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*; **273**:15540-15545.
39. Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC et Green DR. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem*; **270**:6425-6428.
40. Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB et Wang KK. (1996) Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J*; **319 (Pt 3)**:683-690.
41. Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D et Lecomte MC. (2004) AlphaII-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem J*; **378**:161-168.
42. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH et Orrenius S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*; **271**:31075-31085.
43. Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB et Morrow JS. (1998) Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem*; **273**:22490-22497.
44. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL et Flavell RA. (1998) Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**:13618-13623.
45. Navarro-Garcia F, Canizalez-Roman A, Sui BQ, Nataro JP et Azamar Y. (2004) The serine protease motif of EspC from enteropathogenic Escherichia coli produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative E. coli. *Infect Immun*; **72**:3609-3621.
46. Sangerman J, Gard AL, Shah A et Goodman SR. (1999) Synthesis, assembly, and turnover of alpha and beta-erythroid and nonerythroid spectrins in rat hippocampal neurons. *Brain Res*; **849**:128-138.
47. Bignone PA et Baines AJ. (2003) Spectrin alpha II and beta II isoforms interact with high affinity at the tetramerization site. *Biochem J*; **374**:613-624.

48. Kamal A, Ying Y et Anderson RG. (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol*; **142**:937-947.
49. Perrin D, Langley OK et Aunis D. (1987) Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature*; **326**:498-501.
50. Sato K, Saito Y et Kawashima S. (1995) Identification and characterization of membrane-bound calpains in clathrin-coated vesicles from bovine brain. *Eur J Biochem*; **230**:25-31.
51. Gitler D et Spira ME. (1998) Real time imaging of calcium-induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation. *Neuron*; **20**:1123-1135.
52. Gitler D et Spira ME. (2002) Short window of opportunity for calpain induced growth cone formation after axotomy of Aplysia neurons. *J Neurobiol*; **52**:267-279.
53. Spira ME, Oren R, Dormann A et Gitler D. (2003) Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured Aplysia neurons. *J Comp Neurol*; **457**:293-312.
54. Doctor RB, Bennett V et Mandel LJ. (1993) Degradation of spectrin and ankyrin in the ischemic rat kidney. *Am J Physiol*; **264**:C1003-1013.
55. Vanderklish PW et Bahr BA. (2000) The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol*; **81**:323-339.
56. Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, Noji S, Sugino H et Hayashi Y. (1997) Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science*; **276**:604-607.
57. Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Mishima K, Arakaki R, Suda T, Saito I et Hayashi Y. (2002) Prevention and induction of autoimmune exocrinopathy is dependent on pathogenic autoantigen cleavage in murine Sjogren's syndrome. *J Immunol*; **169**:1050-1057.
58. Gallagher PG, Petrucci MJ, Weed SA, Zhang Z, Marchesi SL, Mohandas N, Morrow JS et Forget BG. (1997) Mutation of a highly conserved residue of betaI spectrin associated with fatal and near-fatal neonatal hemolytic anemia. *J Clin Invest*; **99**:267-277.
59. Gallagher PG, Weed SA, Tse WT, Benoit L, Morrow JS, Marchesi SL, Mohandas N et Forget BG. (1995) Recurrent fatal hydrops fetalis associated with a nucleotide substitution in the erythrocyte beta-spectrin gene. *J Clin Invest*; **95**:1174-1182.
60. Alloisio N, Morle L, Pothier B, Roux AF, Marechal J, Ducluzeau MT, Benhadji-Zouaoui Z et Delaunay J. (1988) Spectrin Oran (alpha II/21), a new spectrin variant concerning the alpha II domain and causing severe elliptocytosis in the homozygous state. *Blood*; **71**:1039-1047.
61. Fournier CM, Nicolas G, Gallagher PG, Dhermy D, Grandchamp B et Lecomte MC. (1997) Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human alpha-spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia. *Blood*; **89**:4584-4590.
62. Wilmotte R, Marechal J, Morle L, Baklouti F, Philippe N, Kastally R, Kotula L, Delaunay J et Alloisio N. (1993) Low expression allele alpha LELY of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 (alpha V/41 polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest*; **91**:2091-2096.
63. Randon J, Boulanger L, Marechal J, Garbarz M, Vallier A, Ribeiro L, Tamagnini G, Dhermy D et Delaunay J. (1994) A variant of spectrin low-expression allele alpha LELY carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Br J Haematol*; **88**:534-540.
64. Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW et Ranum LP. (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet*; **38**:184-190.
65. Birkenmeier CS, McFarland-Starr EC et Barker JE. (1988) Chromosomal location of three spectrin genes: relationship to the inherited hemolytic anemias of mouse and man. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **85**:8121-8125.
66. Bloom ML, Kaysser TM, Birkenmeier CS et Barker JE. (1994) The murine mutation jaundiced is caused by replacement of an arginine with a stop codon in the mRNA encoding the ninth repeat of beta-spectrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91**:10099-10103.
67. Bodine DM, Birkenmeier CS et Barker JE. (1984) Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. *Cell*; **37**:721-729.
68. Dahl SC, Geib RW, Fox MT, Edidin M et Branton D. (1994) Rapid capping in alpha-spectrin-deficient MEL cells from mice afflicted with hereditary hemolytic anemia. *J Cell Biol*; **125**:1057-1065.
69. Kaysser TM, Wandersee NJ, Bronson RT et Barker JE. (1997) Thrombosis and secondary hemochromatosis play major roles in the pathogenesis of jaundiced and spherocytic mice, murine models for hereditary spherocytosis. *Blood*; **90**:4610-4619.
70. Wandersee NJ, Lee JC, Kaysser TM, Bronson RT et Barker JE. (1998) Hematopoietic cells from -spectrin-deficient mice are sufficient to induce thrombotic events in hematopoietically ablated recipients. *Blood*; **92**:4856-4863.
71. Mishra L, Cai T, Yu P, Monga SP et Mishra B. (1999) Elf3 encodes a novel 200-kD beta-spectrin: role in liver development. *Oncogene*; **18**:353-364.

72. Katuri V, Tang Y, Li C, Jogunoori W, Deng CX, Rashid A, Sidawy AN, Evans S, Reddy EP, Mishra B et Mishra L. (2006) Critical interactions between TGF-beta signaling/ELF, and E-cadherin/beta-catenin mediated tumor suppression. *Oncogene*; **25**:1871-1886.
73. Hayes NV, Scott C, Heerkens E, Ohanian V, Maggs AM, Pinder JC, Kordeli E et Baines AJ. (2000) Identification of a novel C-terminal variant of beta II spectrin: two isoforms of beta II spectrin have distinct intracellular locations and activities. *J Cell Sci*; **113 (Pt 11)**:2023-2034.
74. Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX et Mishra L. (2003) Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science*; **299**:574-577.
75. Katuri V, Tang Y, Marshall B, Rashid A, Jogunoori W, Volpe EA, Sidawy AN, Evans S, Blay J, Gallicano GI, Premkumar Reddy E, Mishra L et Mishra B. (2005) Inactivation of ELF/TGF-beta signaling in human gastrointestinal cancer. *Oncogene*; **24**:8012-8024.
76. Kitisin K, Ganesan N, Tang Y, Jogunoori W, Volpe EA, Kim SS, Katuri V, Kallakury B, Pishvaian M, Albanese C, Mendelson J, Zasloff M, Rashid A, Fishbein T, Evans SR, Sidawy A, Reddy EP, Mishra B, Johnson LB, Shetty K et Mishra L. (2007) Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation. *Oncogene*.
77. Tang Y, Katuri V, Srinivasan R, Fogt F, Redman R, Anand G, Said A, Fishbein T, Zasloff M, Reddy EP, Mishra B et Mishra L. (2005) Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res*; **65**:4228-4237.
78. Parkinson NJ, Olsson CL, Hallows JL, McKee-Johnson J, Keogh BP, Noben-Trauth K, Kujawa SG et Tempel BL. (2001) Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat Genet*; **29**:61-65.
79. Komada M et Soriano P. (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol*; **156**:337-348.
80. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H et Bennett V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*; **421**:634-639.
81. Manya H, Inomata M, Fujimori T, Dohmae N, Sato Y, Takio K, Nabeshima Y et Endo T. (2002) Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J Biol Chem*; **277**:35503-35508.
82. Lee JK, Coyne RS, Dubreuil RR, Goldstein LS et Branton D. (1993) Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*; **123**:1797-1809.
83. Norman KR et Moerman DG. (2002) Alpha spectrin is essential for morphogenesis and body wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*; **157**:665-677.
84. Praitis V, Ciccone E et Austin J. (2005) SMA-1 spectrin has essential roles in epithelial cell sheet morphogenesis in *C. elegans*. *Dev Biol*; **283**:157-170.
85. Voas MG, Lyons DA, Naylor SG, Arana N, Rasband MN et Talbot WS. (2007) alphaII-spectrin is essential for assembly of the nodes of Ranvier in myelinated axons. *Curr Biol*; **17**:562-568.
86. Lecomte MC, Nicolas G, Dhermy D, Pinder JC et Gratzer WB. (1999) Properties of normal and mutant polypeptide fragments from the dimer self-association sites of human red cell spectrin. *Eur Biophys J*; **28**:208-215.
87. Cherry L, Menhart N et Fung LW. (1999) Interactions of the alpha-spectrin N-terminal region with beta-spectrin. Implications for the spectrin tetramerization reaction. *J Biol Chem*; **274**:2077-2084.
88. Mehboob S, Luo BH, Fu W, Johnson ME et Fung LW. (2005) Conformational studies of the tetramerization site of human erythroid spectrin by cysteine-scanning spin-labeling EPR methods. *Biochemistry*; **44**:15898-15905.
89. Sumandea CA et L WMF. (2005) Mutational effects at the tetramerization site of nonerythroid alpha spectrin. *Brain Res Mol Brain Res*; **136**:81-90.
90. Park S, Caffrey MS, Johnson ME et Fung LW. (2003) Solution structural studies on human erythrocyte alpha-spectrin tetramerization site. *J Biol Chem*; **278**:21837-21844.
91. Park S, Johnson ME et Fung LW. (2002) Nuclear magnetic resonance studies of mutations at the tetramerization region of human alpha spectrin. *Blood*; **100**:283-288.
92. Nedrelow JH, Cianci CD et Morrow JS. (2003) c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J Biol Chem*; **278**:7735-7741.
93. Rotter B, Bournier O, Nicolas G, Dhermy D et Lecomte MC. (2005) AlphaII-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts. *Biochem J*; **388**:631-638.
94. Bournier O, Kroviarski Y, Rotter B, Nicolas G, Lecomte MC et Dhermy D. (2006) Spectrin interacts with EVL (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerization. *Biol Cell*; **98**:279-293.
95. Drusco A, Zanesi N, Roldo C, Trapasso F, Farber JL, Fong LY et Croce CM. (2005) Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102**:10947-10951.

96. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Grobe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB et Carlier MF. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*; **144**:1245-1258.
97. Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P et Kandel ER. (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*; **258**:1903-1910.
98. Lynch G et Baudry M. (1987) Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res Bull*; **18**:809-815.
99. Wu Y, Liang S, Oda Y, Ohmori I, Nishiki T, Takei K, Matsui H et Tomizawa K. (2007) Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. *Embo J*; **26**:2981-2990.
100. Wechsler A et Teichberg VI. (1998) Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *Embo J*; **17**:3931-3939.
101. Ozkan ED, Lee FS et Ueda T. (1997) A protein factor that inhibits ATP-dependent glutamate and gamma-aminobutyric acid accumulation into synaptic vesicles: purification and initial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:4137-4142.
102. Koike H, Arguello PA, Kvajo M, Karayiorgou M et Gogos JA. (2006) Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **103**:3693-3697.
103. Harris AS, Croall DE et Morrow JS. (1989) Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I. *J Biol Chem*; **264**:17401-17408.
104. Leto TL, Pleasic S, Forget BG, Benz EJ, Jr. et Marchesi VT. (1989) Characterization of the calmodulin-binding site of nonerythroid alpha-spectrin. Recombinant protein and model peptide studies. *J Biol Chem*; **264**:5826-5830.
105. Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, Cooper C, Pichardo EL, Shah N, Peck AB et Humphreys-Beher MG. (1997) Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjogren syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:5767-5771.
106. Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K et Hayashi Y. (2003) Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol*; **163**:1481-1490.
107. Nicolas G, Fournier CM, Galand C, Malbert-Colas L, Bournier O, Kroviarski Y, Bourgeois M, Camonis JH, Dhermy D, Grandchamp B et Lecomte MC. (2002) Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol Cell Biol*; **22**:3527-3536.
108. Kroviarski Y, El Nemer W, Gane P, Rahuel C, Gauthier E, Lecomte MC, Cartron JP, Colin Y et Le Van Kim C. (2004) Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin. *Br J Haematol*; **126**:255-264.
109. Rahuel C, Colin Y, Goossens D, Gane P, El Nemer W, Cartron JP et Le Van Kim C. (1999) Characterization of a mouse liminin receptor gene homologous to the human blood group Lutheran gene. *Immunogenetics*; **50**:271-277.
110. Moulson CL, Li C et Miner JH. (2001) Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, and transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo. *Dev Dyn*; **222**:101-114.
111. Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, Sorokin L, Miner JH, Kedinger M et Simon-Assmann P. (2003) Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol*; **260**:376-390.
112. Miner JH, Cunningham J et Sanes JR. (1998) Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol*; **143**:1713-1723.
113. Nguyen NM, Kelley DG, Schlueter JA, Meyer MJ, Senior RM et Miner JH. (2005) Epithelial laminin alpha5 is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung. *Dev Biol*; **282**:111-125.
114. Rahuel C, Filipe A, Ritie L, El Nemer W, Patey-Mariaud N, Eladari D, Cartron JP, Simon-Assmann P, Le Van Kim C et Colin Y. (2007) Genetic inactivation of the laminin {alpha}5 chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*.
115. Andrews NC et Schmidt PJ. (2007) Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol*; **69**:69-85.
116. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F et Simpson RJ. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*; **291**:1755-1759.
117. Mackenzie B et Hediger MA. (2004) SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Arch*; **447**:571-579.
118. Abboud S et Haile DJ. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*; **275**:19906-19912.
119. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC et Zon LI. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*; **403**:776-781.

120. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW et Simpson RJ. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*; **5**:299-309.
121. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J et Anderson GJ. (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*; **21**:195-199.
122. Finch C. (1994) Regulators of iron balance in humans. *Blood*; **84**:1697-1702.
123. Beutler E et Bittenwieser E. (1960) The regulation of iron absorption. I. A search for humoral factors. *J Lab Clin Med*; **55**:274-280.
124. Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, Marx JJ, de Sousa M et Clevers H. (1996) Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med*; **184**:1975-1985.
125. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ et Schatzman RC. (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**:1472-1477.
126. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE et Sly WS. (1997) Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:13198-13202.
127. Spasic MV, Kiss J, Herrmann T, Kessler R, Stolte J, Galy B, Rathkolb B, Wolf E, Stremmel W, Hentze MW et Muckenthaler MU. (2007) Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe. *Blood*; **109**:4511-4517.
128. Charlton RW, Jacobs P, Torrance JD et Bothwell TH. (1965) The Role of the Intestinal Mucosa in Iron Absorption. *J Clin Invest*; **44**:543-554.
129. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR et Wolff RK. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*; **13**:399-408.
130. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A et Vaulont S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **98**:8780-8785.
131. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P et Loreal O. (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*; **276**:7811-7819.
132. Park CH, Valore EV, Waring AJ et Ganz T. (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*; **276**:7806-7810.
133. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P et Adermann K. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*; **480**:147-150.
134. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T et Vogel HJ. (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*; **277**:37597-37603.
135. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D et Camaschella C. (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*; **33**:21-22.
136. Bayele HK, McArdle H et Srai SK. (2006) Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood*; **108**:4237-4245.
137. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ et Ramm GA. (2003) Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*; **361**:669-673.
138. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, deGraaf J, Montross LK, Andrews NC et Hentze MW. (2003) Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet*; **34**:102-107.
139. Ajioka RS, Levy JE, Andrews NC et Kushner JP. (2002) Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood*; **100**:1465-1469.
140. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakiaff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR et Goldberg YP. (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*; **36**:77-82.

141. Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A et Gasparini P. (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*; **25**:14-15.
142. Fleming RE, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Koeffler HP, Kawabata H, Britton RS, Bacon BR et Sly WS. (2002) Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99**:10653-10658.
143. Nicolas G, Andrews NC, Kahn A et Vaulont S. (2004) Heparidin, a candidate modifier of the hemochromatosis phenotype in mice. *Blood*; **103**:2841-2843.
144. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K et Gollan J. (2006) Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem*; **281**:22974-22982.

ANNEXE

PRINCIPALES PUBLICATIONS SÉLECTIONNÉES

ARTICLE 1

Spectrin self-association site: characterization and study of β -spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis

Gaël NICOLAS*, Sophie PEDRONI*, Catherine FOURNIER*, Huguette GAUTERO*, Constantin CRAESCU†, Didier DHERMY* and M. Christine LECOMTE¹*

*INSERM U409, Faculté de Médecine Bichat, 75870 Paris cedex 18, France, and †INSERM U350, Institut Curie, 91405 Orsay cedex, France

Most of hereditary elliptocytosis (HE) cases are related to a spectrin dimer (SpD) self-association defect. The severity of haemolysis is correlated with the extent of the SpD self-association defect, which itself depends on the location of the mutation regarding the tetramerization site. This site is presumed to involve the first C helix of the α chain and the last two helices, A and B, of the β chain to reconstitute a triple helical structure (A, B and C), as observed along spectrin. Using recombinant peptides, we demonstrated that the first C helix of the α chain and the last two helices of the β chain alone are not sufficient to establish interactions, which only occurred when a complete triple-helical repeat was added to each partner. One adjacent

repeat is necessary to stabilize the conformation of both N- and C-terminal structures directly involved in the interaction site and is sufficient to generate a binding affinity similar to that observed in the native molecule. Producing peptides carrying a β^{HE} mutation, we reproduced the tetramerization defect as observed in patients. Therefore, the β^{W2024R} and β^{W2061R} mutations, which replace the invariant tryptophan and a residue located in the hydrophobic core, respectively, affect α - β interactions considerably. In contrast, the β^{A2013V} mutation, which modifies a residue located outside any presumed interacting regions, has a minor effect on the interaction.

INTRODUCTION

Hereditary elliptocytosis (HE) is a haemolytic disease related to defects within the erythrocyte membrane skeleton. HE is a heterogeneous disorder in terms of clinical severity, red-cell morphology abnormalities and underlying molecular defects. Its clinical presentation ranges from an asymptomatic condition to fatal hydrops fetalis, with intermediate phenotypes such as mild HE showing compensated haemolysis and severe haemolytic anaemia, characterized by red-cell fragmentation (hereditary pyropoikilocytosis) [1,2]. HE results from mutations in the genes encoding the spectrin α and β chains and protein 4.1. These proteins (together with actin) are the major components of the erythrocyte skeleton, the complex protein network responsible for the characteristic shape and the unique physical properties of red cells, such as deformability and remarkable stability to shear stresses.

Spectrin is composed of two elongated subunits, an α and a β chain (280 000 and 246 000 Da, respectively), which are non-covalently associated side-by-side in an antiparallel orientation to form heterodimers (spectrin dimers, SpDs). Involving each α -chain N-terminus and each β -chain C-terminus, SpDs self-associate head-to-head to form tetramers that constitute the long flexible filaments of the network. SpD self-association is crucial in maintaining the stability and the integrity of the cell, as clearly pointed out by studies on HE. In almost all cases of HE caused by a spectrin molecular defect, there is a more-or-less pronounced deficiency in SpD self-association. Under such conditions, the severity of haemolysis depends on the extent of the spectrin self-association defect [2]. The same interaction has also been demonstrated to be critical for normal development in *Drosophila* [3].

Each spectrin chain is mainly made up of a succession of repeating segments flanked by non-consensus structures [4–6]: 22 repeats in the α chain and 17 in the β chain. The repeating units,

which are about 106 amino acids long, show low sequence identity (roughly 20%), but some residues are highly conserved, notably leucine and tryptophan at positions 26 and 45 of the repeats, respectively. As first proposed by Speicher and Marchesi [4], and recently confirmed by crystallographic and NMR data on a repeating unit of *Drosophila* α spectrin [7] and chicken brain α spectrin [8], the repeating motifs are folded in a triple-helical coiled-coil structure made up of helices A, B and C. Previous CD studies and analyses of protease sensitivity of *Drosophila* and human α -spectrin recombinant peptides have led to determination of the phasing of the native folded structure: the beginning of the stable conformational unit is shifted 20–30 residues toward the C-terminal end relative to the originally suggested alignment of the repeat-unit sequences [9,10]. Thus the conformational unit begins around the invariant leucine at position 26 in the repeat sequence and continues up to the same residue of the following repeat, involving helices A and B of one repeat unit and helix C of the following repeat. The crystallographic studies suggest the presence of a long helix C–A rather than two separate helices C and A, this long helix making the link between two triple-helical bundles.

According to the phasing and the triple-helical structure of the motif, the N-terminal end of the α chain begins with an isolated C helix (α 1), whereas the β chain ends in an incomplete structure (β 17), consisting of helices A and B, followed by an unfolded segment called domain III. It has been proposed that the two A and B helices of the last repeat β 17 interact with the first C helix of the α chain to constitute a triple-helical structure similar to the repeats along the remainder of spectrin molecule (Figure 1) [11,12].

This model was first inferred from the relationship between the severity of the spectrin self-association defect and the location of the underlying mutations found in HE. Most amino acid substitutions located in the helices that were presumed to be involved in the self-association site are related to more severe

spectrin self-association defects than those located outside these helices. Shortened β -chain variants truncated at the C-terminal end with partial or complete deletion of the final helix B cannot interact with the N-terminus of the α chain [13,14]. This model was reinforced by studies involving partial or complete deletions of these helices from large recombinant peptides corresponding to the ends of the α and β chains. Loss of the first 16 residues of the α chain decreased its binding affinity to the β chain by about 50% [12]. Further truncations of recombinant peptides encompassing the α I domain, by deleting the 27, 30 or 49 residues, totally abolished detectable head-to-head association with the complementary β subunit [10]. In a similar way, deletions of the two last helices of the β chain led to a loss of binding to the α partner [15].

These data demonstrated the involvement of these three helices in the dimer-dimer contact site but did not indicate whether they alone are sufficient for binding. To determine whether the three helices compose the complete self-association site and to better define the bounds of this site, we have chosen to express several recombinant peptides encompassing different parts of the β -chain C-terminal domain and the α -chain N-terminal domain. We have tested their ability to associate with their respective partners and with SpDs. We have defined the minimum lengths of peptides required to generate the strong interaction observed in the native molecule and we have also determined the dissociation constant for the interaction of univalent peptides.

It is now well established that the severity of HE related to α^{HE} mutations depends on two parameters: (i) the location of the HE mutation in relation to the tetramerization site; and (ii) the proportion of mutated spectrin α chain present in the membrane, because the expression of the α^{HE} allele can be modulated by the presence *in trans* of a low-expression α allele, such as the α^{LELY} allele [16].

In HE arising from mis-sense β mutations, the clinical heterogeneity is also related to the severity of the spectrin self-association defect. Although all known mutations are located within the two helices in the self-association site, their effect on this function is variable. Two parameters, such as the nature of the substitution and the location of the mutation, could affect this function. To address this question, we have reproduced three previously defined β^{HE} mutations using site-directed mutagenesis on the recombinant peptides and we have analysed their effect on the interaction between the β -chain C-terminus and the α -chain N-terminus.

EXPERIMENTAL

Construction of the spectrin peptide expression plasmids

To identify the minimum length of peptides required in the tetramerization site, several recombinant peptides encompassing different parts of the C-terminal region of the β chain and of the N-terminal extremity of the α chain were expressed as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins in *Escherichia coli* from the plasmid pGEX-2T (Pharmacia-Biotech) and the plasmid pGEX-KG [17].

The DNA fragments were obtained by PCR amplification of human spectrin cDNA clones (β 29 and α B6 clones were generous gifts from B. Forget, Yale University, NH, U.S.A.), using either *Taq* polymerase (Gibco-BRL) or Vent polymerase (Biolabs) with the primers as shown in Table 1.

For the four α -spectrin constructs cloned into pGEX-2T plasmid, the upstream primer contained a *Bam*HI restriction site, whereas the downstream primer contained a stop codon followed by an *Eco*R1 restriction site. The four α -spectrin constructs, α 1–50 (containing the first C helix), α 1–85 (helix

C–A), α 1–124 (helices C–A and B) and α 1–154 (first C helix followed by a triple-helical repeat) encode the first 50 (6.7 kDa), 85 (10.6 kDa), 124 (15.2 kDa) and 154 (18.3 kDa) residues of the spectrin α chain, respectively (Figure 1).

Concerning the β -spectrin constructs cloned in pGEX-KG vector, the 5'-end primer has an *Eco*R1 restriction site, whereas the 3'-end primer contained a stop codon, immediately followed by a *Hind*III restriction site.

The β -spectrin construct β 17C, from residue R2004 to Y2137 (15.9 kDa), consists of the last two A and B helices of the β chain, followed by the non-homologous C-terminal end; this corresponds to a partial fragment of repeat β 17 and complete domain III (Figure 1). The β -spectrin construct β 17, from residue R2004 to E2083 (10 kDa), contains only the last two A and B helices and corresponds to the β 17C peptide without the domain III. The β -spectrin construct β 16–17C, from residue Q1898 to Y2137 (28.7 kDa), and the β -spectrin construct β 16–17, from residue Q1898 to E2083 (22.8 kDa), correspond to the β 17C and β 17 peptides, including the last complete triple-helical repeat, respectively.

The purified PCR-amplified cDNAs were sequentially or simultaneously cut with the appropriate enzymes (Gibco-BRL) and directionally cloned into the restricted vector using standard techniques. *E. coli* strain JM109 (Stratagène) and strain OMPT–, a protease deficient strain (a generous gift from J. M. Clément, Institut Pasteur, Paris, France) were transformed by pGEX-2T and pGEX-KG plasmids, respectively. Transformant colonies were screened by peptide expression after induction by isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG, Appligene; 0.5 mM). Then the appropriate candidates were expanded for sequencing using Sequenase 2 (United States Biochemical Corp.) to confirm the fidelity of the construct. Because of residual polylinker sequences in the plasmid, the α -spectrin peptides have two additional residues (G and S) at the N-terminal end after thrombin cleavage and the β -spectrin peptides have the additional residues GSPGISGGGGGI at the N-terminal end, as verified by micro-sequencing.

Site-directed mutagenesis

Mutations were introduced in the β -spectrin cDNA cloned in the pGEX-KG plasmids according to the site-directed mutagenesis method known as long primer-unique-site elimination mutagenesis [18] and modified as previously described [19]. The template target plasmid containing the cloned insert corresponding to the β 16–17C construct was amplified using two kinds of mutant primers: (i) the selection primer (sense primer) eliminates the unique *Bam*HI site by converting it to a *Kpn*I site (see bold sequence in Table 1); and (ii) the other primers (reversed primers) contain the desired mutations (Table 1).

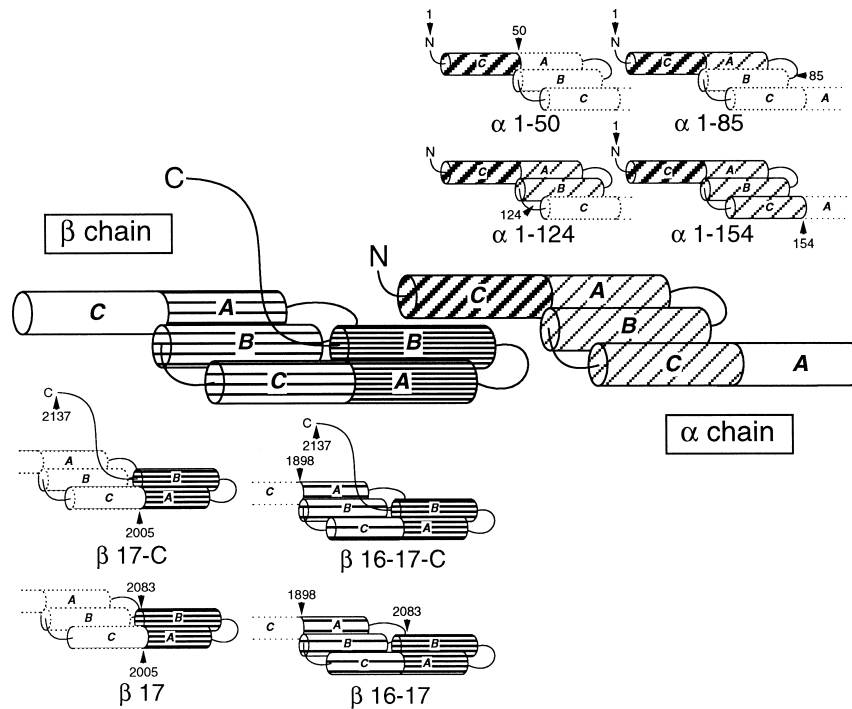
Expression and purification of recombinant peptides

Cells were grown at 37 °C in Terrific Broth medium containing ampicillin (100 μ g/ml). Overnight cultures were diluted (1:10) in Terrific Broth and were grown to an attenuation of 0.8–0.9 at 600 nm, and diluted again (4:5) prior to induction with 0.5 mM IPTG. Growth was continued for 1.5–2.5 h according to the stability of the recombinant peptide. After centrifugation, the bacterial pellets were frozen and stored at –20 °C. Frozen cells from 1 litre of culture were resuspended in 25–50 ml of 20 mM phosphate buffer (pH 7.3)/150 mM NaCl/0.5% Triton X100 containing 1 mM EDTA, 0.5 mM AEBSF [4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride] or PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, 100 Units/ml aprotinin and 1 mM β -mercaptoethanol, and lysed by sonication. The expressed GST-spectrin fusion

Table 1 Design of recombinant α - and β -spectrin tetramerization-site peptides

Bold text indicates mutations within the primers. See text for more details.

Peptides	Amino acids	5' Primer	3' Primer
β 16–17C	1898–2137	5' GGGAATTC AGCTAGTGGACACGGCGGAT 3'	5' GGAAGCTTTT ACTAGTAGGGGTGAGAGGG 3'
β 16–17	1898–2083	5' GGGAATTC AGCTAGTGGACACGGCGGAT 3'	5' GGAAGCTTTT ACTACTCTGCAATCTGGCG 3'
β 17C	2005–2137	5' GGGAATTC GGCTCCGCATGTTGCTGGAG 3'	5' GGAAGCTTTT ACTAGTAGGGGTGAGAGGG 3'
β 17	2005–2083	5' GGGAATTC GGCTCCGCATGTTGCTGGAG 3'	5' GGAAGCTTTT ACTACTCTGCAATCTGGCG 3'
α 1–50	1–50	5' GGGGATCC GAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAATTC ATCCTCAAGCTTCTGACCC 3'
α 1–85	1–85	5' GGGGATCC GAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAATTC TTATTAGTTGGGTCTTCATAGCTCT 3'
α 1–124	1–124	5' GGGGATCC GAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAATTC TTAGCAGAATGACCCATGGTAA 3'
α 1–154	1–154	5' GGGGATCC GAGCAATTTCCAAAGGAAAC 3'	5' GGGAATTC TTACAACGGTCACCCCTTCTC 3'
α -UR2	152–259	5' GGGGATCC CAGTTGCTGCGGGCCCTGAA 3'	5' GGGAATTC TTAATTGGACAGAGCTTTCTG 3'
β 16–17C	A2023V	5' GATCTGGTTCCGCGTGGT ACCCCGGGAATTTCCG 3'	5' GGGCAATCAGCCACACCTCAGCCACAGAG 3'
β 16–17C	W2024R	5' GATCTGGTTCCGCGTGGT ACCCCGGGAATTTCCG 3'	5' CTGGGCAATCAGCCTCGCCTCAGCCACAG 3'
β 16–17C	W2061R	5' GATCTGGTTCCGCGTGGT ACCCCGGGAATTTCCG 3'	5' CGCTCTGCCCTGCTGGCCGTG 3'

**Figure 1** Models of the self-association site and of the recombinant peptides used in this study

The positions of residues corresponding to the beginning and end of each recombinant peptide are indicated by arrows.

proteins were affinity purified on a glutathione–Sepharose column (Pharmacia-Biotech). The spectrin peptides were cleaved from the carrier protein by thrombin digestion on the affinity column. Spectrin peptides were purified to homogeneity by anionic exchange chromatography either on Mono Q or on Resource Q columns (Pharmacia-Biotech).

All the peptides were highly expressed in bacteria, but they

differed in their solubility and stability. The α peptides (α 1–50, α 1–85 and α 1–124) and the β peptides (β 17C and β 17 peptides) were less soluble and stable than α 1–154, β 16–17C and β 16–17 peptides, which contain a complete triple-helical repeat. The β 17C and β 16–17C fusion peptides, which contain the non-homologous part of the C-terminal end of the β chain, were susceptible to proteolysis. To reduce insolubility and proteolysis

of the less-stable peptides, expression was performed at 25–30 °C instead of 37 °C, and the β 16–17C and β 17C peptides were expressed in a protease-deficient strain, OMPT–.

After thrombin cleavage of fusion proteins immobilized on the glutathione–Sephacrose Cl-4B affinity column, the α 1–50, α 1–85 and α 1–154 recombinant peptides were highly purified and had an apparent molecular mass in gel electrophoresis that was in agreement with the calculated value. The α 1–124 peptide was proteolysed during thrombin cleavage and consequently was not available for further investigation. Subsequent anion-exchange chromatography of the α 1–154 peptide revealed elution of a predominant peak and other, minor, peaks. The α 1–50 and α 1–85 peptides were poorly eluted from the anion-exchange column, even at high salt concentration. Thus, both these peptides were used after the affinity column without any further purification steps.

The β 17 and β 17C peptides were highly unstable after thrombin cleavage. The β 16–17 peptide, and particularly the β 16–17C peptide containing domain III, required subsequent anion-exchange chromatography to eliminate proteolytic products.

As previously observed [17], the series of glycine residues near the thrombin cleavage site, introduced in the fusion protein by the plasmid pGEX-KG, allowed almost complete cleavage (95–100 %) compared with that achieved with fusion proteins expressed from the plasmid pGEX-2T (50–75 %).

Binding assays

As indicated in the Figure legends, various mixtures of recombinant peptides in the form of fusion proteins, isolated peptides or ^{125}I -labelled peptides were incubated in isotonic buffer (150 mM NaCl/20 mM Tris, pH 7.4) at 0 °C for at least 4 h. Free and bound species were analysed following three different procedures. (i) When α -spectrin peptides were mixed with β -spectrin peptides as GST-fusion proteins, bound and free α -spectrin species were separated by centrifugation after adding glutathione agarose beads. After three successive centrifugations and washes, pellets containing bound ligands were analysed by SDS/PAGE [20]. (ii) Interactions between α - and β -spectrin peptides, free of GST, were analysed by rapid non-denaturing electrophoresis (15 min) at 4 °C using a Phast System (Pharmacia-Biotech). When one partner was ^{125}I -labelled, Coomassie Blue-stained bands were excised from the gel and quantified by γ -radiation counting (Beckman 7000 γ counter). Peptides were radiolabelled with Na^{125}I (Amersham) by the chloramine T method.

CD spectroscopy

The far-UV CD spectra were recorded on a Jasco 700 spectropolarimeter in 0.1 or 0.2 cm quartz cells at 20 °C. The protein concentration was determined by UV absorption at 280 nm, using the known molar extinction coefficient of the Trp, Tyr and Cys residues in the sequence. The spectra were obtained as an average of 10 runs and were corrected for the contribution of the buffer. The final CD data are shown as mean residue ellipticity in units of degrees $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

Other procedures

Native spectrin dimers were extracted from human erythrocyte membrane by incubation at 37 °C in a low ionic-strength buffer and dimer–tetramer formation was followed by non-denaturing electrophoresis as described previously [21].

SDS/PAGE was performed either as described by Laemmli [20] or by using a Phast system. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Western blots were performed from Phast gels on PVDF membranes using diffusion blotting. Recombinant polypeptides were detected by rabbit polyclonal antibodies directed against either α - or β -spectrin chains. Blots were incubated with the peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin antibodies from goat and developed using Nitro Blue Tetrazolium as substrate [22].

Protein concentrations were determined by absorbance at 280 nm using extinction coefficients calculated from sequences.

RESULTS

CD studies

A coherent analysis of specific intermolecular interactions between biomolecules requires minimal information on the

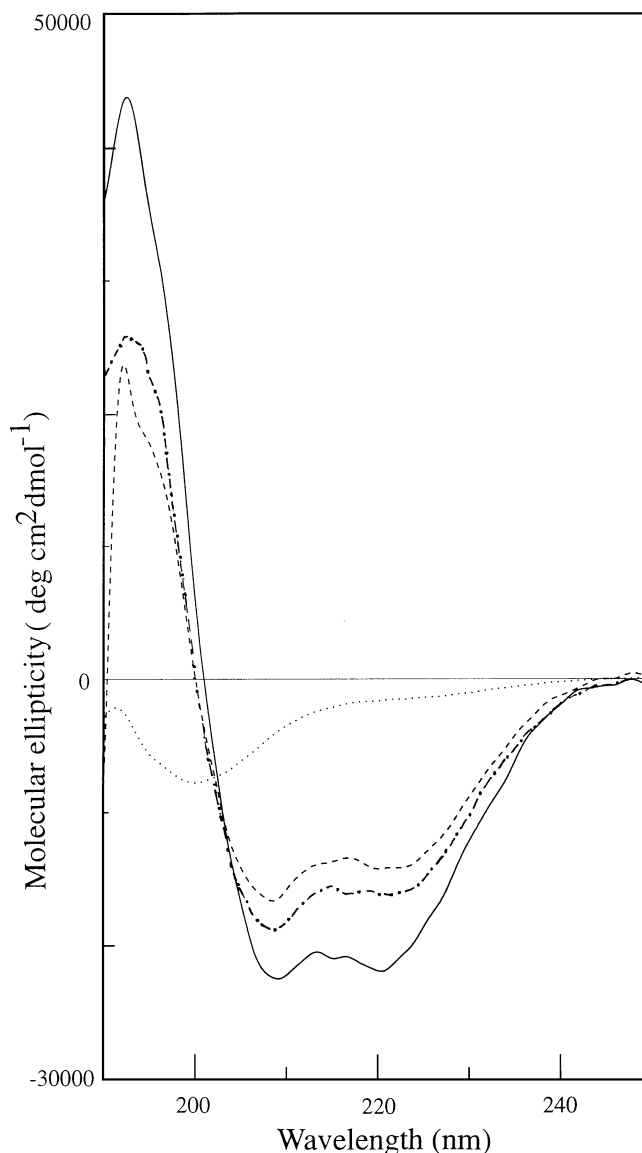


Figure 2 Far-UV spectra of some of the recombinant polypeptides in the present study

The spectra were obtained at 20 °C, in Tris buffer (5 mM), pH 8.5, containing EDTA (0.2 mM) and β -mercaptoethanol (0.2 mM). Dotted line, α 1–50; continuous line, α 1–154; broken line, β 16–17C; and dash-and-dot line, β 16–17.

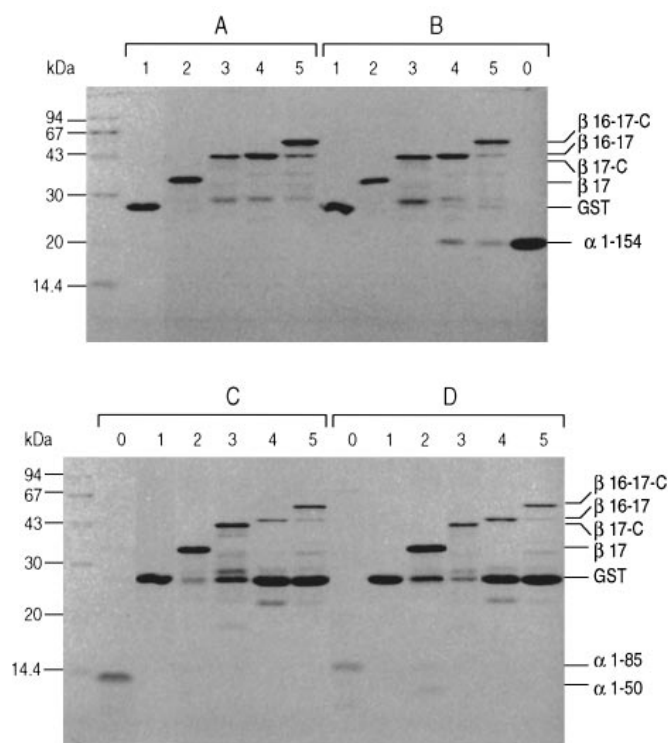


Figure 3 SDS/PAGE analysis of α - and β -spectrin recombinant peptides involved in the spectrin self-association site

GST and β -spectrin GST-fusion peptides (10–15 μ M) were incubated overnight at 0–4 $^{\circ}$ C in the absence of α recombinant peptides (A), or in the presence of each of the following spectrin α peptides (25–30 μ M): α 1–154 (B); α 1–50 (C); and α 1–85 (D). Unbound α peptides were eliminated by adding glutathione–agarose beads. The washed pellets were analysed by SDS/PAGE on a 14% acrylamide gel. Lanes 0 of (B), (C) and (D) correspond to isolated spectrin α peptides. Lane 1, GST; lane 2, β 17 fusion peptide; lane 3, β 17C fusion peptide; lane 4, β 16–17 fusion peptide; lane 5, β 17–16C fusion peptide.

structure content and stability of the molecules in the free state. For this aim, CD spectroscopy is generally used as a convenient method to evaluate the secondary structure of polypeptides. Figure 2 shows the far-UV CD spectra of some of the protein fragments used in the present study. The α 1–154 peptide gives a CD spectrum with all the characteristics of a highly helical polypeptide: two negative bands at 222 nm and 208 nm and a positive one at 192 nm [23]. A simple evaluation, using the molar ellipticity at 222 nm, gives a helical content of about 68 %, a value that is somewhat lower than what could be predicted from the comparison with the crystallographic three-dimensional structure of the repetitive segment of spectrin (80 %) [7]. Similarly, the protein fragments derived from the sequence of the β chain (β 16–17 and β 16–17C) have a high content of α -helix secondary structure. In contrast, the smaller polypeptide α 1–50 gives a small ellipticity and spectral features suggesting a random-coil structure. In the presence of 2,2,2-trifluoroethanol (30 % v/v), a co-solvent which decreases the solvent polarity, the CD spectrum indicates the stabilization of some elements (about 15 %) of helical structure (results not shown).

Determination of the peptides involved in the tetramerization site

It was previously shown [24] that polypeptides from the N-terminus of the α chain can readily associate with β -spectrin monomers at low temperature (4 $^{\circ}$ C) in contrast with the self-

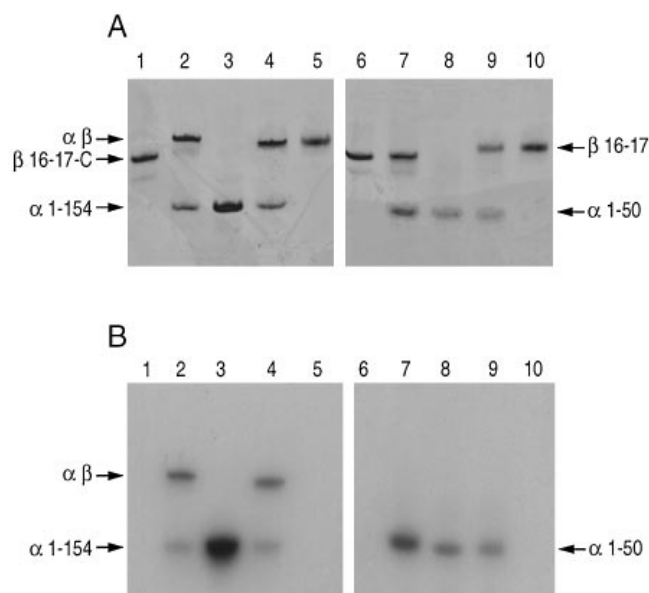


Figure 4 Analysis of spectrin peptides involved in the tetramerization site by non-denaturing electrophoresis

β 16–17 and β 16–17C peptides (approx. 10 μ M) were incubated with 125 I-labelled α 1–154 and α 1–50 peptides (10 μ M and 15 μ M, respectively) for 4 h at 0–4 $^{\circ}$ C and analysed by rapid non-denaturing gel-electrophoresis (15 min) at 4 $^{\circ}$ C using a Phast system (12.5% acrylamide gel). For this purpose, 6 μ l of each sample was loaded on the gel. (A) Coomassie Blue-stained gels. (B) Autoradiograms: lanes 1 and 6, β 16–17C peptide (15 μ M); lane 2, mixture of β 16–17C and α 1–154 at 10 μ M; lane 3, α 1–154 at 30 μ M; lane 4, mixture of β 16–17 and α 1–154 at 10 μ M; lanes 5 and 10, β 16–17 at 15 μ M; lane 7, mixture of β 16–17C and α 1–50 at 10 and 30 μ M, respectively; lane 8, α 1–50 at 15 μ M; lane 9, mixture of β 16–17 and α 1–50 at 10 and 15 μ M, respectively. The presence of α – β peptide complexes is indicated by arrows.

association of native SpD, which is infinitesimally slow under these conditions. The different recombinant peptides were therefore tested for their ability to associate with their respective partners at 0 $^{\circ}$ C in isotonic solution.

In a first approach, each β -spectrin peptide as a GST-fusion protein (10–15 μ M) was incubated with each of the different purified α -spectrin peptides, devoid of GST (25–30 μ M), and pelleted after attachment to glutathione–Sepharose beads (Figure 3). A significant proportion of α 1–154 peptide was found in the pellet with the β 16–17 and β 16–17C fusion peptides (Figure 3B, lanes 4 and 5, respectively) whereas no detectable amount of α 1–154 peptide was pelleted with the β 17 and β 17C fusion proteins (Figure 3B, lanes 2 and 3, respectively). No traces of α 1–50 and α 1–85 peptides were observed in the pellets after incubation with any of the four β -spectrin-fusion peptides (Figures 3C and 3D). GST immobilized on beads did not bind any of the α -spectrin peptides (lanes 1 of Figures 3B, 3C and 3D).

Direct interactions between α - and β -spectrin peptides, devoid of GST, were analysed by rapid non-denaturing gel electrophoresis. In this alternative approach, binding assays were performed between the four isolated β -spectrin peptides and two α 1–50 and α 1–154 125 I-labelled α -spectrin peptides. As shown in Figure 4, the α 1–50 peptide (lane 8), the α 1–154 peptide (lane 3) and the β 16–17 peptide (lanes 5 and 10) migrated in a short band, and the β 16–17C peptide (lanes 1 and 6) migrated in two bands. Only a fraction of the β 17 and β 17C peptides entered into the gel and migrated in several diffuse bands (results not shown).

Compared with the electrophoretic pattern of each isolated

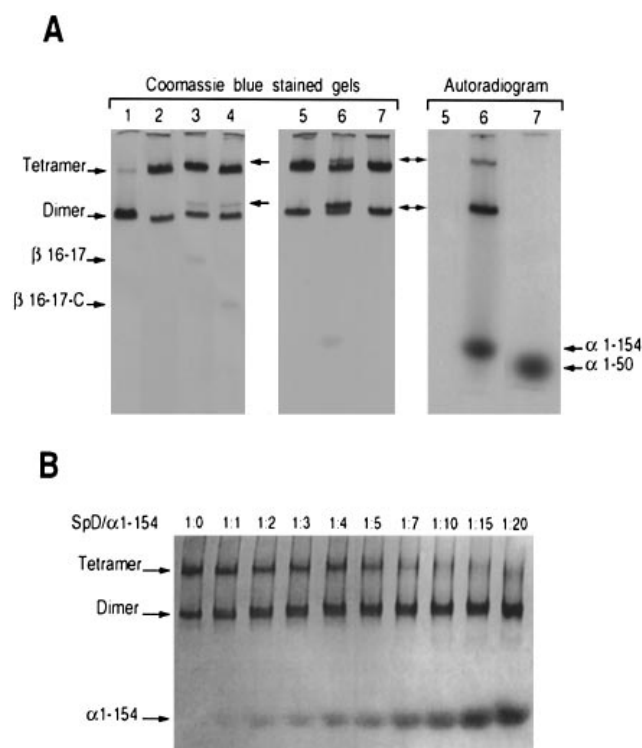


Figure 5 Interaction of α and β peptides with intact SpDs analysed by non-denaturing gel electrophoresis

(A) Spectrin dimers ($2 \mu\text{M}$; lane 1) were incubated for 4 h at 30°C , either alone (lanes 2 and 5), or in the presence of recombinant peptides: β 16-17 ($2 \mu\text{M}$; lane 3); β 16-17C ($2 \mu\text{M}$; lane 4); ^{125}I -labelled α 1-154 ($4 \mu\text{M}$; lane 6); and ^{125}I -labelled α 1-50 ($4 \mu\text{M}$; lane 7). The α 1-154, β 16-17 and β 16-17C peptides bound extensively to SpDs and to a lesser extent to spectrin tetramers, with the appearance of two new species (indicated by arrows). (B) SpDs ($2 \mu\text{M}$) were incubated with increasing amounts of α 1-154 peptide (molar ratio from 1:1 to 1:20).

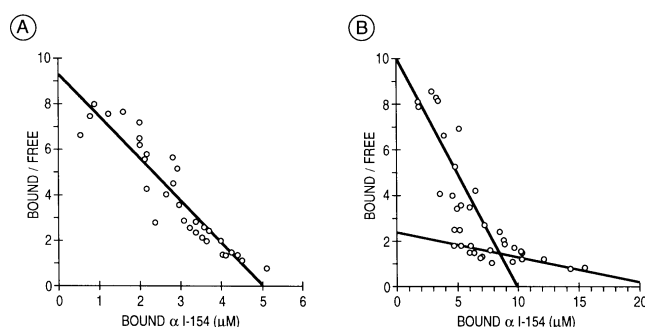


Figure 6 Scatchard representation of the α - β peptide interactions

β 16-17C peptide ($5 \mu\text{M}$; A) and β 16-17 peptide ($10 \mu\text{M}$; B) were incubated with increasing amounts of ^{125}I -labelled α 1-154 peptide. Free and bound species were separated and analysed by non-denaturing gel electrophoresis. The measured K_d was $0.9 \mu\text{M}$ for the interaction between β 16-17C and α 1-154 peptides. Scatchard analysis of the binding between α 1-154 and β 16-17 revealed two slopes (K_d approx. 1 and $7.5 \mu\text{M}$, respectively).

species, an additional band was only observed in the mixture of the α 1-154 and β 16-17C peptides, with a concomitant decrease in free species (Figure 4A, lane 2). This new band was radioactive (Figure 4B, lane 2) and was recognized by antibodies directed against either α spectrin or β spectrin (results not shown),

demonstrating that it corresponds to an α (1-154)- β (16-17C) complex. After electrophoretic separation of the mixture containing the α 1-154 and β 16-17 peptides (Figure 4A, lane 4), the free α 1-154 peptide decreased with no appearance of an additional band. Autoradiograms revealed the presence of an additional labelled band co-migrating with the β 16-17 peptide (Figure 4B, lane 4), showing that association of the two peptides had indeed occurred. We confirmed that the α (1-154)- β (16-17) complex has the same electrophoretic mobility as the free β 16-17 peptide by immunoblots (results not shown). We were unable to demonstrate an interaction between the α 1-154 peptide and either the β 17 or β 17C peptides, because both of these were unstable. Similar results were obtained when β species were used in the form of fusion proteins instead of isolated peptides.

Incubation of the α 1-50 peptide with either the β 16-17C or β 16-17 peptides led to no detectable association, even after 48 h (Figure 4, lanes 7-9).

Association of recombinant peptides with dimers

The head-to-head interactions of SpDs that lead to formation of a series of oligomers, tetramer, hexamer and so on, are based on the involvement of every α and β chain of the dimers. Therefore, the tetramer formation results from two α - β interactions. The isolated peptides α 1-50, α 1-154, β 16-17C and β 16-17 were tested for their ability to bind to native SpD and to compete against tetramer formation after incubation for 4 h at 30°C (Figure 5). When the concentrations of the peptides α 1-154, β 16-17C and β 16-17 were in the same range as the SpD concentration, they bound to SpD, and to a lesser extent to tetramers, with the appearance of two new species (Figure 5A). These new species were radiolabelled when labelled recombinant peptides were used in the experiment (Figure 5A). When the peptide concentration was increased and present in molar excess, the formation of tetramers was decreased with a concomitant increase in the new species migrating behind the SpD (Figure 5B). The species, which migrate just behind the dimers, correspond to the binding of one molecule of recombinant peptide to its respective partner in the SpD molecule: either an α peptide with the C-terminal end of a β chain or a β peptide with the N-terminal end of α chain. In these complexes, SpD-peptide, one binding site of SpD is involved in an interaction with the recombinant peptide, the other one remains free and can interact with one native SpD molecule to form tetramers. Therefore, the new species migrating behind the tetramers corresponded to the interaction between the SpD-peptide complex and native SpDs. The higher the recombinant peptide concentration, the greater the SpD-peptide formation and the lower the concentration of free SpD. As the SpD-peptide complex cannot interact with another SpD-peptide complex, and the free SpD concentration is decreased, the number of tetramers that form decreases.

The α 1-50 peptide did not show any detectable interaction with native SpDs or tetramers.

Determination of the association constants

The kinetics of the interaction between α 1-154 and either β 16-17C or β 16-17 peptides was analysed. ^{125}I -Labelled α 1-154 peptide at $10 \mu\text{M}$ was incubated with equimolar amounts of either β 16-17C or β 16-17 peptides for different times, and the species present in the mixture were analysed by non-denaturing gel electrophoresis. The interaction was fast, since between 65 and 85 % of the complex had formed after a 5 min incubation and equilibrium was reached after 3-4 h. No detectable redistribution between the free and associated species occurred during the short time of electrophoresis (15 min).

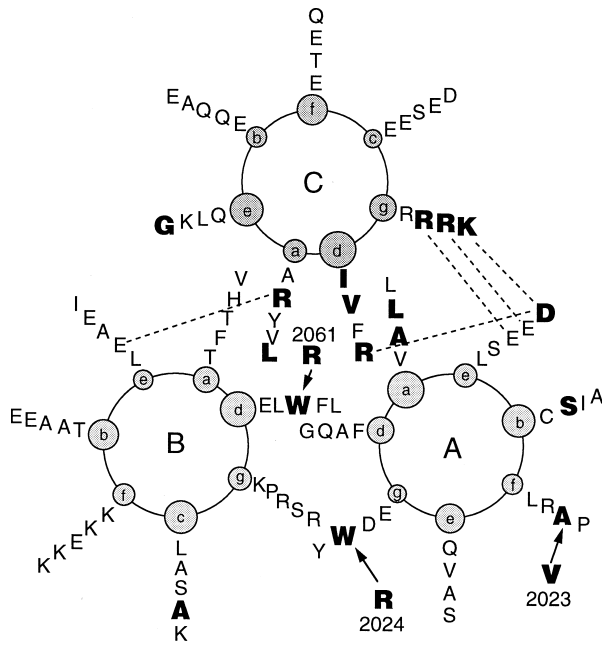


Figure 7 Axial helical projection of the SpD self-association site, based on crystallographic data of a *Drosophila* spectrin repeat [7]

Wheels A and B correspond to A and B helices of the incomplete $\beta 17$ repeat, and wheel C corresponds to the first C helix of spectrin α chain. The heptad positions (a–g) are shown by circles. Residues that are mutated in HE are shown in bold. The three β^{HE} mutations reproduced by directed mutagenesis are indicated by arrows: A2023V, W2024R and W2061R.

Association constants for binding of $\alpha 1$ –154 (0.5–25 μM) to $\beta 16$ –17C or $\beta 16$ –17 peptides have been determined from the equilibrium of two peptide preparations. $\beta 16$ –17C or $\beta 16$ –17 peptides (at 5 or 10 μM) were incubated for 20 h with increasing amounts of ^{125}I -labelled $\alpha 1$ –154 peptide. All determinations were in duplicate. The $\alpha 1$ –154 peptide interacted with the $\beta 16$ –17C peptide with a K_d value ($\pm$ S.D.) of $0.9 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ($n = 4$) (Figure 6A). Concerning the interaction between the $\alpha 1$ –154 peptide and the $\beta 16$ –17 peptide, missing the non-homologous C-terminal end of the β chain, a Scatchard plot of the results suggested two binding components, one corresponding to a K_d value of $1.09 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ($n = 3$), the other to a K_d value of $7.45 \pm 1.8 \mu\text{M}$ ($n = 3$).

Analysis of three β^{HE} mutations on the head-to-head α – β interaction

Three natural β^{HE} mutations discovered in different HE kindreds (A2023V, W2024R and W2061R) were reproduced using directed mutagenesis in the $\beta 16$ –17C peptide. These mutations are located within either the last A helix or the last B helix (Figure 7). The mutated peptides were tested for their ability as free peptides (15 μM) to interact with the $\alpha 1$ –154 peptide (up to 40 μM). Saturation curves (Figure 8A) revealed that the A2023V mutant peptide was able to bind to the $\alpha 1$ –154 peptide, in a range quite similar to the wild-type, since the K_d value, as determined by the Scatchard plot (Figure 8B) using the Prism software® programme (Graph Pad®, San Diego, U.S.A.) was 8 μM . In contrast, the W2024R mutant peptide showed no ability to interact with the $\alpha 1$ –154 peptide, even in a 1:3 molar ratio, and the W2061R mutant peptide had an intermediate binding ability. The K_d values estimated from the Scatchard plot (Figures 8C and 8D)

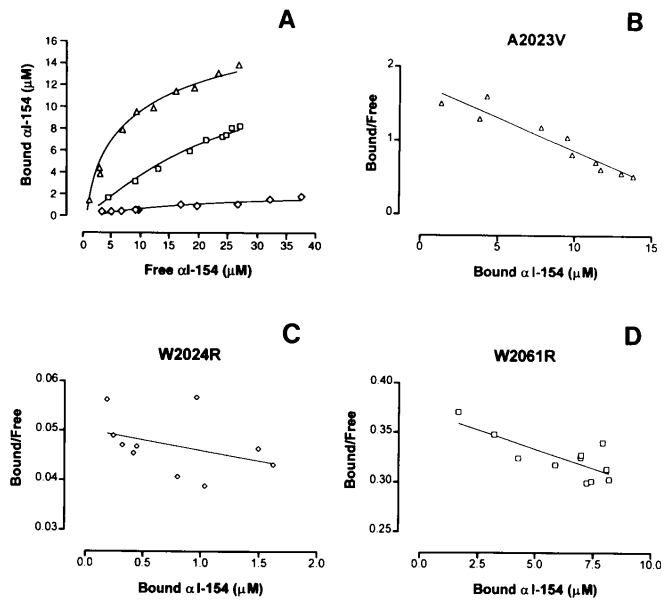


Figure 8 Interaction of β^{HE} mutant peptides with $\alpha 1$ –154 peptide

(A) Saturation curves. β^{HE} mutant peptides (15 μM) [(Δ) A2023V, ($\diamond$) W2024R and ($\square$) W2061R] were incubated with increasing amounts of ^{125}I -labelled $\alpha 1$ –154 peptide. (B), (C) and (D) Scatchard representations of the $\alpha 1$ –154 peptide interaction with the β^{HE} mutant peptides.

were higher than 100 μM (the K_d was 240 μM and 130 μM for the W2024R and W2061R mutant peptides, respectively).

DISCUSSION

Self-association of SpDs to tetramers is a crucial process for erythrocyte-membrane stability, as clearly demonstrated in HE states in which this function is defective. It is clear that the tetramerization process involves the last two A and B helices of the C-terminal end of the β -spectrin chain and the first C helix at the N-terminal end of α -spectrin chain. In this report, we have demonstrated that these helices alone are insufficient for the interaction. The peptide $\alpha 1$ –50, containing the first C helix of the α chain did not manifest any ability to interact with complementary β partners in the form of either recombinant peptides, at 0 $^\circ\text{C}$, or SpDs, at 30 $^\circ\text{C}$. As previously demonstrated [10,12], deletion of the first 45 residues of the α chain abolished binding of the α chain to the β chain. Thus, the first 50 residues, although required for binding, are apparently insufficient for binding to a β partner. The lack of binding could be related to the lack of folding, as indicated by CD studies. The complete helix C–A has no more binding capacity than the first part of the helix. Stable folding and strong interactions only occurred when the C helix was followed by a complete triple-helical repeat ($\alpha 1$ –154 peptide). This $\alpha 1$ –154 peptide was able to bind to native spectrin and to compete for the self-association site, and therefore contains a functional dimer-binding site. Similar conclusions can be drawn for the β -spectrin end: the last two A and B helices of the β -chain end ($\beta 17$ and $\beta 17\text{C}$ peptides) are unstable and insufficient to establish interactions with the α -spectrin partners; binding only occurred when a complete triple-helical repeat was added (peptides $\beta 16$ –17 and $\beta 16$ –17C). Thus, one adjacent repeat is necessary to stabilize the conformation of both N- and C-terminal

structures directly involved in the interaction site, and is sufficient to generate a binding affinity similar to that of the native molecule (K_d , 1 μ M) [24]. In agreement with previous work from Kennedy et al. [15], we found that the non-homologous end of the β chain, i.e. the random domain III, is not required for the interaction with the N-terminal end of the α chain. The β 16–17 peptide binds strongly to the α 1–154 peptide, as well as to SpDs or tetramers, but the two limbs observed in the Scatchard plot for the β 16–17 peptide could suggest the presence of two populations, one with a fully active conformation, like the equivalent peptide with domain III, the other with a lower affinity. Domain III could stabilize the structure of either the last two A and B helices or the triple-helical structure occurring during the interaction.

In the self-association site as defined, several point mutations leading to HE have been located in the first C helix of the α chain, as well as in the last two A and B helices of the β chain. Clinical heterogeneity of HE, as reflected by the variable extent of haemolysis, appears to be related to the severity of the spectrin self-association impairment [21]. Concerning α -spectrin gene mutations, the extent of the spectrin self-association defect depends on two parameters: (i) the location of the mutation in relation to the self-association site; and (ii) the proportion of mutated HE spectrin α chain recruited to the membrane which, in turn, depends on the presence *in trans* (or *cis*) of low-expression α alleles, such as the α^{LELY} allele [16]. Conversely, in HE related to β -spectrin mutations, no low-expressed β -spectrin allele has been described so far and differences in severity as observed within the same α -spectrin HE kindred were not found in β -spectrin HE kindreds. Thus, the clinical heterogeneity of β -spectrin HE stemming from point mutations raises the question of whether a clear relationship exists between the self-association defect and the nature and position of the mutated residue. To address this question, three natural β -spectrin mutations found in different HE kindreds, were reproduced by directed mutagenesis in the self-association site. The A2023V mutation (spectrin^{Paris}) [25] was described in two related patients with fully asymptomatic HE, associated with a minor self-association defect (roughly 13% of SpD in the membrane compared with a normal value of 4%). The W2024R mutation (spectrin^{Linguerre}) [25] was found in two related patients with mild HE, associated with 30% of SpD in the membrane. The W2061R mutation (spectrin^{Cotonou}) [26] was described in a patient with mild HE with 24% of SpD in the membrane. Our studies *in vitro* of the interaction between α - and β -mutated recombinant peptides reproduced well the self-association defects observed in the HE patients. The replacement of either Trp-2061 or Trp-2024 affected considerably the α - β association, giving a K_d of 100 μ M (normal value, 1 μ M). In contrast, the mutation A2023V affected the interaction to a lesser extent (K_d approx. 8 μ M).

In an attempt to understand better the relation between the nature and location of the mutated residues and impairment of the self-association process, Figure 7 shows the self-association site based on the crystallographic data for the *Drosophila* spectrin α 14 repeat [7]. Each of the three helices exhibits the heptad repeat pattern found in extended coiled-coil α -helical structures when the positions are conventionally labelled a–g; the residues at positions a and d are generally hydrophobic and lie inside the three-helix bundle. Electrostatic interactions also appear to stabilize the structure, and external interchain salt bridges are often formed by charged residues at positions e and g. All the mutated residues described so far in HE are indicated in bold in Figure 7. The amino acids that are particularly affected are in positions a, d, e and g. These correspond to regions seen to be involved in either hydrophobic or electrostatic interactions. The

results suggest that these positions could be crucial for the interaction between the three helices and, consequently, for the tetramer formation. The two mutations studied *in vitro* in this report and that strongly affect the binding are located in the presumed interaction site. The first, the W2061R mutation, affects a residue located within the hydrophobic core. The second, which seems to abolish the interaction, replaces the invariant Trp-2024 with arginine (W2024R). This tryptophan is highly conserved throughout the repeats of erythroid and non-erythroid spectrins, as well as in other spectrin family members (such as dystrophin and α -actinin). Our results indicate the crucial nature of this invariant tryptophan and confirm its contribution to formation of the triple-helical structure, as has been suggested [7,27]. The third mutation, A2023V, is conservative and modifies a residue located outside any presumed region of interaction. Its modest effect on self association could be related either to the kind of the mutation (conservative) or to its location. We have observed another similar conservative mutation, V31A, in an asymptomatic HE (Garbarz, M. and Dhermy, D. unpublished work), also presenting a modest defect on the tetramer formation (7.5% of SpD in the membrane for a control value of 2.5%). Although this mutation is located in the C helix of the spectrin α chain, at a d position in the hydrophobic core, the SpD self-association defect is moderate, suggesting that in this case the kind of mutation determines the reduced deleterious effect.

Taken together, our results showed the molecular basis of a direct correlation between the severity of both the self-association defect and the clinical expression in HE caused by β^{HE} point mutations, and the location and nature of the β -spectrin mutation.

REFERENCES

- Palek, J. and Jarolim, P. (1993) Semin. Hematol. **30**, 249–283
- Lux, S. E. and Palek, J. (1995) in Blood: principles and practice of hematology (Handin, R. I., Lux, S. E. and Stossel, T. P., eds.), pp. 1701–1818, Lippincott Co., Philadelphia
- Deng, H. Y., Lee, J. K., Goldstein, L. S. B. and Branton, D. (1995) J. Cell Biol. **128**, 71–79
- Speicher, D. W. and Marchesi, V. T. (1984) Nature (London) **311**, 177–180
- Sahr, K. E., Laurila, P., Kotula, L., Scarpa, A. L., Coupal, E., Leto, T. L., Linnebach, A. J., Winkelmann, J. C., Speicher, D. W., Marchesi, V. T., Curtis, P. J. and Forget, B. G. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 4434–4443
- Winkelmann, J. C., Chang, J. G., Tse, W. T., Scarpa, A. L., Marchesi, V. T. and Forget, B. G. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 11827–11832
- Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Harrison, S. C. and Branton, D. (1993) Science **262**, 2027–2030
- Pascual, J., Pfuhl, M., Rivas, G., Pastore, A. and Saraste, M. (1996) FEBS Lett. **383**, 201–207
- Winograd, E., Hume, D. and Branton, D. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 10788–10791
- Kotula, L., DeSilva, T. M., Speicher, D. W. and Curtis, P. J. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 14788–14793
- Tse, W. T., Lecomte, M. C., Costa, F. F., Garbarz, M., Feo, C., Boivin, P., Dhermy, D. and Forget, B. G. (1990) J. Clin. Invest. **86**, 909–916
- Speicher, D. W., DeSilva, T. M., Speicher, K. D., Ursitti, J. A., Hembach, P. and Weglarz, L. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 4227–4235
- Lecomte, M. C., Gautero, H., Garbarz, M., Boivin, P. and Dhermy, D. (1990) Br. J. Haematol. **76**, 406–413
- Pothier, B., Alloisio, N., Marechal, J., Morle, L., Ducluzeau, M. T., Caldani, C., Philippe, N. and Delaunay, J. (1990) Blood **75**, 2061–2069
- Kennedy, S. P., Weed, S. A., Forget, B. G. and Morrow, J. S. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 11400–11408
- Wilmotte, R., Maréchal, J., Morlé, L., Baklouti, F., Philippe, N., Kastally, R., Kotula, L., Delaunay, J. and Alloisio, N. (1993) J. Clin. Invest. **91**, 2091–2096
- Guan, K. L. and Dixon, J. E. (1991) Anal. Biochem. **192**, 262–267
- Ray, F. A. and Nickoloff, J. A. (1992) BioTechniques **13**, 342–348
- Nicolas, G., Pedroni, S., Fournier, C., Gautero, H. and Lecomte, M. C. (1997) BioTechniques **22**, 430–434

-
- 20 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- 21 Lecomte, M. C., Garbarz, M., Gautero, H., Bournier, O., Galand, C., Boivin, P. and Dhermy, D. (1993) *Br. J. Haematol.* **85**, 584–595
- 22 Taketa, K. (1987) *Electrophoresis* **8**, 409–414
- 23 Johnson, Jr., C. W. (1990) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**, 205–214
- 24 De Silva, T. M., Peng, K. E., Speicher, K. D. and Speicher, D. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 10872–10878
- 25 Parquet, N., Devaux, I., Boulanger, L., Galand, C., Boivin, P., Lecomte, M. C., Dhermy, D. and Garbarz, M. (1994) *Blood* **84**, 303–308
- 26 Glele-Kakai, C., Garbarz, M., Lecomte, M. C., Leborgne, S., Galand, C., Bournier, O., Devaux, I., Gautero, H., Zohoun, I., Gallagher, P. G., Forget, B. G. and Dhermy, D. (1996) *Br. J. Haematol.* **95**, 57–66
- 27 MacDonald, R. I., Musacchio, A., Holmgren, R. A. and Saraste, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1299–1303
-

Received 10 September 1997/23 January 1998; accepted 10 February 1998

ARTICLE 2

Tyrosine Phosphorylation Regulates Alpha II Spectrin Cleavage by Calpain

Gaël Nicolas,¹ Catherine M. Fournier,¹ Colette Galand,¹ Laurence Malbert-Colas,¹ Odile Bournier,¹
Yolande Kroviarski,¹ Monique Bourgeois,¹ Jacques H. Camonis,² Didier Dhermy,¹
Bernard Grandchamp,¹ and Marie-Christine Lecomte^{1*}

*INSERM U409, Faculté de Médecine Xavier Bichat-Association Claude Bernard,¹ and INSERM U248, Institut Curie,²
Paris, France*

Received 26 November 2001/Accepted 1 February 2002

Spectrins, components of the membrane skeleton, are implicated in various cellular functions. Understanding the diversity of these functions requires better characterization of the interacting domains of spectrins, such as the SH3 domain. Yeast two-hybrid screening of a kidney cDNA library revealed that the SH3 domain of α II-spectrin binds specifically isoform A of low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP). The α II-spectrin SH3 domain does not interact with LMW-PTP B or C nor does LMW-PTP A interact with the α I-spectrin SH3 domain. The interaction of spectrin with LMW-PTP A led us to look for a tyrosine-phosphorylated residue in α II-spectrin. Western blotting showed that α II-spectrin is tyrosine phosphorylated in vivo. Using mutagenesis on recombinant peptides, we identified the residue Y1176 located in the calpain cleavage site of α II-spectrin, near the SH3 domain, as an in vitro substrate for Src kinase and LMW-PTP A. This Y1176 residue is also an in vivo target for kinases and phosphatases in COS cells. Phosphorylation of this residue decreases spectrin sensitivity to calpain in vitro. Similarly, the presence of phosphatase inhibitors in cell culture is associated with the absence of spectrin cleavage products. This suggests that the Y1176 phosphorylation state could modulate spectrin cleavage by calpain and may play an important role during membrane skeleton remodeling.

First identified at the intracellular surface of the erythrocyte plasma membrane, spectrins (Sp) are now known to be the central components of the membrane skeleton, a ubiquitous and complex spectrin-actin scaffold located under the lipid bilayer of metazoan animal cells (for review, see references 4 and 21). Numerous studies on red cells, particularly those in hereditary hemolytic anemia, have clearly established the organization of the erythrocyte skeleton and its importance in maintaining erythrocyte shape, stability, and deformability. Spectrins are giant extended flexible molecules composed of two subunits (α I and β I in red cells) which intertwine to form $\alpha\beta$ heterodimers. Spectrin exists as elongated tetramers resulting from self-association of $\alpha\beta$ heterodimers. Sp tetramers constitute the filaments of the lattice, the nodes of which are crossed-linked by short actin filaments. This spectrin-based skeleton is bound to various transmembrane proteins through two connecting proteins, ankyrin and protein 4.1.

In nonerythroid mammal cells, α (α I and α II) and β (β I to β V) chains are encoded by two and five genes, respectively, each of these genes producing several isoforms by alternative splicing. Despite this diversity, all Sp chains present the same structural organization mainly made up of a succession of triple-helical repeat units, 22 for α chains and 17 for β chains except β V, which has 30 repeats. These units are characteristic of spectrin family members. They are about 106 amino acids long and folded in a coiled-coil structure made up of three

helices (A, B, and C). Beside these repeat units, spectrin isoforms can also contain several interacting domains, such as SH3 domain, EF hands, PH domains, and binding domains for ankyrin, actin, protein 4.1, and calmodulin.

In nonerythroid cells, spectrin isoforms are not evenly distributed at the plasma membrane. Spectrins are also present in the Golgi apparatus, in cytoplasmic vesicles (16, 41), and in the nucleus (31). Several mechanisms appear to control spectrin dynamic distribution at the protein level, such as serine phosphorylation (19) and proteolysis by calpain and caspase. Spectrin binds Ca^{2+} and calmodulin which regulate spectrin binding to the membrane (43).

The multiple physiological functions attributed to spectrins are related to both their cellular locations and the nature of proteins that interact with them. Spectrins and the spectrin-based skeleton are considered to participate in the formation and maintenance of specialized plasma membrane domains in epithelial cells (17), in neurons (5), and in striated muscle cells (7, 22, 33). They are considered to stabilize integral membrane proteins, to reduce their endocytic rate, and to confer resiliency and durability on the membrane itself. Recent studies also suggest that spectrin may play a role in membrane protein sorting, vesicle trafficking (3), endocytosis (27), and neurite outgrowth (22, 38, 46). The recent description of spectrin mutations in quivering mice that manifest auditory and motor neuropathies (35) confirms their important functions in the maintenance of specialized subcellular domains.

The involvement of spectrins in many diverse physiological processes can be explained by their modular structure that combines numerous protein-interacting domains in a number of different isoforms. One approach for obtaining insight into

* Corresponding author. Mailing address: INSERM 409, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, BP416, 75870 Paris Cedex 18, France. Phone: (33) 01 44 85 63 45. Fax: (33) (1) 01 42 26 46 24. E-mail: lecomte@bichat.inserm.fr.

the function(s) of spectrins is to define the proteins interacting with its domains in specific cell types. We have focused our study on a particular domain of 350 residues located within the middle part of the α II-spectrin. This area contains two repeat units (α 9 and α 10) together with several additional sequences. These additional sequences include (i) an SH3 domain, (ii) a calmodulin binding site, and (iii) two cleavage sites for proteases, such as calpains and caspase 3.

SH3 domains are 60-amino-acid-long sequences that are present in many signaling and cytoskeletal proteins. Despite the modest sequence homology, the three-dimensional structure is well conserved. They mediate protein interactions by binding short proline-rich sequences bearing the consensus motif PXXP, where X is any amino acid. The α II-Sp SH3 domain is highly conserved between species, with 100% identity between birds and mammals, suggesting important and conserved functions.

The protein E3B1, a substrate for tyrosine kinase, has been identified as a ligand for the α I-Sp SH3 domain (51) but no partner has been clearly defined for the α II-Sp SH3 domain. Using the yeast two-hybrid system, we identified isoform A of low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) as a specific partner for the α II-Sp SH3 domain. As not reported previously to our knowledge, we demonstrated that α II-Sp was tyrosine phosphorylated in cells. We identified one tyrosine residue (Y1176) that is phosphorylated and dephosphorylated in vivo. This residue is located in the specific calpain cleavage site, near the SH3 domain, and is an in vitro substrate for two tyrosine kinases of the Src family, Src and Lck, and for the isoform A of LMW-PTP. Phosphorylation of this residue antagonizes calpain proteolytic activity. LMW-PTP A can dephosphorylate phosphotyrosine 1176 and so modulate spectrin susceptibility to calpain.

MATERIALS AND METHODS

Construction of rat kidney cDNA libraries for yeast two-hybrid screening. RNAs were isolated from adult male rat kidney (Sprague Dawley) by using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (12). First-strand cDNA synthesis was performed on 4.5- μ g polyadenylated RNAs (twice purified on an oligo(dT) column [Pharmacia, Uppsala, Sweden]) using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase in the presence of 50-base oligonucleotide primers [including the *Xho*I restriction site and an 18-base poly(dT) sequence] and a nucleotide mixture containing 5-methyl dCTP. After second-strand synthesis by DNA polymerase I (Pol I) in the presence of RNase H, double-stranded cDNA uneven termini were filled with *Pfu* DNA polymerase. *Eco*RI adapters (phosphorylated 9-mer and dephosphorylated 13-mer nucleotides, cDNA synthesis kit; Stratagene) were bound to cDNAs by T4 DNA ligase (Gibco-BRL, Life Technologies). After phosphorylation and *Xho*I digestion, cDNAs were size fractionated on a Sepharose CL2B column. The cDNAs (above 600 bp) were introduced directionally as *Eco*RI-*Xho*I fragments into a modified version of plasmid pGAD GH, which includes a longer multiple cloning site. After electrotransformation of the DH10B strain (Gibco BRL, Life Technologies) with recombinant plasmids, 2.7×10^6 independent clones were obtained (with insert sizes ranging from 600 to 4,200 bp, with a mean value of 1,250 bp) and 2% of the clones were empty clones.

Screening of spectrin SH3 domain-binding proteins by yeast two-hybrid system. The sequence encoding the α II-Sp SH3 domain (E970 to P1026) was amplified with primers GGGGGATCCGGGAGCTGGTCTTG and GGAAT TCTAGGGGTCCAATTTCTTCAC containing the *Bam*HI and *Eco*RI sites (underlined), respectively, and cloned to the C terminus of the LEX A DNA-binding domain into pLEX10 (generous gift from J. H. Camonis). Overnight culture of the yeast strain L40 established with the α II-Sp SH3-pLEX plasmid on selective medium lacking tryptophan (DO-W) was diluted to 5×10^6 cells/ml and grown for 3 h to 10^7 cells/ml before transfection with 100 μ g of cDNA library plasmids. Transformation efficiency was estimated by dilution spreading on me-

dium lacking tryptophan and leucine (DO-WL). As the bait did not induce background, His⁺ clones were selected on medium lacking tryptophan, leucine, and histidine (DO-WLH) after 3 to 4 days of growth at 30°C. Expression of β -galactosidase was estimated on filter and liquid assays using X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrates, respectively. Recombinant pGAD was recovered from His⁺LacZ⁺ yeasts and selected after transformation of an HB101 *Escherichia coli* strain grown on a selective medium lacking leucine.

Sequences were obtained from PCR-amplified products (forward primer, CGATGATGAAGATACCCCACC, and reverse primer, promT7-TAATAC GACTCACTATAGGGCGA) and were subsequently submitted to BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Analysis of interaction specificity using yeast mating strategy. The L40 yeast strain was transfected with pGAD plasmids containing different LMW-PTP inserts (full-length sequence, residues 1 to 158, and partial sequences, residues M1 to T78, Q33 to T78, and Q33 to H158) obtained with the following primers (cloning sites are underlined): forward M1, GGGGGGAATTAGATGGCG GAACAGGCTACC; forward Q33, GGGGGGAATTCAAAACATCTCAGAGA ATTGGAG; reverse H158, GGGGGCTCGAGCCTCAGTGGGCCTTCTCCA AG; and reverse T78, GGGGCTCGAGTCAGGTAATCTGCCGGGCAAC.

Transfected L40 cells were mated with the complementary yeast strains AMR70 established with different SH3 baits cloned in pLEX: mutant α II-Sp SH3, α I-Sp SH3 (residues 980 to 1036), and full-length SCD2 (11). Mutations of α II-Sp SH3 were introduced as previously described (34) by using the forward primer pLex-*Bam*HI-*Kpn*I, which alters the unique *Bam*HI site into a *Kpn*I site (underlined): selection primer, CGACTGGCTGGAATTCGGT ACCGAGCTGGTCTTGGCT, and reverse primers containing mutations (in bold), GAGAAGAGTCCCGAGCGGTACCATGAAGAAG, ACTCAAC AGCACCAACGAGGATTGGTGAAAGT, and CGTCAGGGTTTTGTG CTGGCTGCGTACGTGAAG, for introduction of the E985A, K1002E, and P1017L mutations, respectively.

Expression and purification of recombinant peptides. Sequences corresponding to α II-Sp SH3 (E970 to P1026), α I-Sp SH3 (A970 to Q1055 cDNA amplified with primers containing cloning sites (underlined) GGGGATCCGCTGCAC CAGTGGAGGGAGT and GGGGAATTCGGGTGATGTTTCTGGCT), α II-Sp SH3- α 9- α 10 (D885 to L1229, GGGCCATGCACCTGGAGCACTCT TGCAG and GGGGGATCCCAAGAGCTGGCTCCGTTC), and LMW-PTP (1 to 157) were PCR amplified with *Pfu* polymerase from different sources (rat kidney cells, human lymphocytes, and reticulocytes). After digestion with appropriate restriction enzymes, amplification products were cloned either into *Bam*HI/*Eco*RI-linearized pGEX-2T plasmid (Pharmacia) for glutathione S-transferase (GST) fusion peptides or into *Nco*I/*Bam*HI-linearized pQE-60 plasmid (Qiagen) for His₆-tagged peptides. The Y1176E mutation was introduced as described above with the reverse primer containing mutations (in bold), CTGTGCAAC AACAGGAAGTGGAGGGCATGATGCCAGGGATGA. GST-fusion peptides were expressed in *E. coli* strains JM109 (Promega) or ompT⁻ (a protease deficient strain) while His₆-tagged peptides were expressed in strain M15. After induction with 0.5 to 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37°C, cells were lysed by sonication in Triton X-100-phosphate-buffered saline (PBS) buffer containing antiproteases (10 μ g of aprotinin/ml, 10 μ g of leupeptin/ml, 10 μ g of pepstatin/ml, and 1 mM PMSF). His₆-tagged peptides were purified on nickel-agarose beads according to the instructions of Qiagen. GST-fusion proteins were purified on a glutathione-Sepharose column according to the instructions of Amersham Pharmacia Biotech. Proteins were further purified by anion-exchange chromatography on a Resource Q column (Amersham Pharmacia Biotech) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)–1 mM β -ME–1 mM EDTA with a linear gradient of NaCl.

Transfection and cell culture. Sequences corresponding to the wild type and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10 were amplified (forward primer, CCCGGATC CACCATGGAGCTGGAGGACTCTCTGCAGG containing the *Bam*HI site [underlined]; reverse primer containing the FLAG sequence [bold] and an *Eco*RI site [underlined], CCCGAATTCATTGTGTCATCGTCATCTTTGTAGTC CAAGAGCTGGCTCCGTTCCTC from pQE60 constructs and introduced into the pcDNA 3 plasmid). COS cells were grown in Dulbecco minimal essential medium containing 10% serum and transfected using Lipofectamine as recommended by the manufacturer (Invitrogen). RCCD1 cells were grown on collagen-coated plastic dishes as previously described (8). When indicated, pervanadate solution was added at 0.1 mM to culture medium 30 min before cell scraping.

Immunoprecipitation and immunoblotting. Polyclonal antibodies were obtained after the immunization of rabbits (Eurogentec) with GST fusion protein (GST-LMW-PTP A and GST-Sp α II SH3 domain) and purification by affinity chromatography (HiTrap; Amersham Pharmacia Biotech) using the central regions (residues 33 to 78) of LMW-PTP A and SH3- α 9- α 10-His₆ peptides, re-

spectively, as the affinity matrix. After washing, cells were lysed as previously described (14) for 20 min on ice in radioimmunoprecipitation (RIPA) lysis buffer containing antiproteases and 1 mM orthovanadate when cells were preincubated with pervanadate. Immunoprecipitations with anti-FLAG M2-Agarose Affinity gel (Sigma) were performed on RIPA supernatants (1 ml). Immunoprecipitations with immune serum directed against Sp α II/ β II (generous gift from B. Geny, Paris, France) were performed on RIPA supernatants precleared with normal rabbit serum (50 μ l) and protein-G Agarose (Sigma).

Samples were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose. Immunoblots were blocked in PBS buffer containing 1.5% bovine serum albumin. After washing with PBS buffer containing 0.1% Tween 20–0.1% bovine serum albumin, immunoblots were probed either with a horseradish peroxidase-conjugated phosphotyrosine antibody (PY99) (Santa Cruz Biotechnology) or with affinity-purified immunoglobulin G (IgG) directed against the α II-Sp-SH3 domain or the LMW-PTP A and then with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase. Blots were developed with the SuperSignal West Pico chemiluminescence's substrate (Pierce). If necessary, blots were stripped with Restore buffer (Pierce) and then blocked and probed again.

In vitro interactions and cross-linking experiments. In vitro interactions were performed at 4°C with 10 μ g of immobilized recombinant peptides (either on Sepharose 4B glutathione beads or on nickel beads) and recombinant peptides free of GST (purified after thrombin cleavage) in 20 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2% Nonidet NP-40, and anti-proteases. After extensive washings, bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. Cross-linking between LMW-PTP (1 to 10 μ M) and different SH3 peptides (1 to 10 μ M) was performed with bifunctional reagent disuccinimidyl suberate (DSS) (Pierce) at 1 mM and analyzed by SDS-PAGE.

Kinase, phosphatase, and calpain assays. Phosphorylation of spectrin recombinant peptides was performed using Src and Lck kinases (Upstate Biotechnology) in the presence of [γ -³²P]ATP as recommended by the manufacturer, but without O vanadate. Samples were resolved by SDS-PAGE. The amount of radioactivity incorporated was determined by Instant Imager (Packard). Recombinant LMW-PTP activity was estimated in acetate buffer at pH 5.5 on *para*-nitrophenylphosphate (pNPP) by colorimetric assay (at 410 nm) and on phosphorecombinant peptides by Instant Imager after separation on SDS-PAGE. μ -Calpain activity (Chemicon) was studied with SH3 α 9- α 10-His₆ recombinant peptides in 100 to 150 mM NaCl–25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in the presence of 500 μ M Ca²⁺ and 50 μ M calmodulin. Native and cleaved products were evaluated from Coomassie blue-stained gels by densitometry scanning.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of rat LMW-PTP A has been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number AF171072.

RESULTS

Looking for partners: the α II-Sp SH3 domain can recruit low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase. We looked for putative partners of the α II-Sp SH3 domain from a rat kidney cDNA library by using the yeast two-hybrid system with the α II-Sp SH3 domain (residues E970 to P1026) fused to the DNA binding domain of LexA. Then, 309 clones having the Leu⁺/Trp⁺/His⁺/LacZ⁺ phenotype were selected from 1.3×10^7 transformants. Seventy-eight out of 309 clones were found to encode isoform A of LMW-PTP. These 78 clones exhibited a weak β -galactosidase activity on both filter and liquid assays. These clones were derived from numerous independent RNA molecules as their sequence displayed different 5' and 3' ends; however, all of them contained at least the full-length coding sequence with insert sizes larger than 1,500 nucleotides (nt).

α II-Sp SH3 domain interacted specifically with isoform A of LMW-PTP. In mammals, the single LMW-PTP gene codes for three distinct isoforms, A, B, and C (10, 45). Isoforms A and B result from splicing of two alternative exons coding for residues 41 to 74 out of 158 residues, while isoform C does not contain this sequence (Fig. 1A). As LMW-PTP B and C had not been selected by the α II-Sp SH3 bait, their presence was checked in the library by analysis of the size of PCR products for isoform

C and of the restriction pattern obtained after *Bgl*II digestion, which enabled isoforms A and B to be distinguished. Results showed that the library contains the three isoforms, indicating that the restricted selection of isoform A was not due to the absence of isoforms B and C in the library. In addition, cDNA of each of the three human isoforms was obtained by reverse transcription-PCR of lymphocyte mRNA and their interaction with spectrin SH3 was tested in the two hybrid systems. As shown in Fig. 2, the α II-Sp SH3 domain interacts with human isoform A but not with human isoforms B or C. This confirmed that the α II-Sp SH3 domain interacted specifically with isoform A of human and rat LMW-PTP.

Using a yeast mating strategy, we tested the hypothesis that residues 41 to 74, specific to isoform A, were responsible and sufficient for binding to the SH3 domain. Sequences encompassing the N-terminal (residues 1 to 78), the C-terminal (residues 33 to 158), and the central (residues 33 to 78) regions of LMW-PTP A were fused to the Gal4 activating domain. However, no interaction was detected with these three partial sequences of LMW-PTP A, suggesting that the interaction required the entire LMW-PTP A molecule (Fig. 2).

To better characterize the specificity of the interaction, we studied the behavior of LMW-PTP A versus various SH3 domains. We used the α I-Sp SH3 domain and two other unrelated SH3 domains from the yeast SCD2 protein (11) that share 68, 28, and 18% identity with the α II-Sp SH3 domain, respectively (Fig. 1B). As shown in Fig. 2, LMW-PTP A did not interact with any of the other tested SH3 domains in the yeast two-hybrid assay.

Mutations affecting two highly conserved residues in all SH3 domains (corresponding to E985 and P1017 in the α II-Sp SH3 sequence; Fig. 1B) have been associated with a complete loss of interactions in vitro as well as with a loss of function in vivo (15, 18, 37, 47). Structural studies of several SH3 domains have revealed that these two conserved residues are involved in the formation of the ligand-binding surface. Interaction of mutant P1017L and E985A α II-Sp SH3 peptides with LMW-PTP A was analyzed using the yeast two-hybrid system. The presence of either mutation totally abolished the interaction as revealed by the absence of growth on triple-selective medium DO-WLH (Fig. 2) and of β -galactosidase activity (data not shown). In contrast, mutation of a nonconserved Lys (K1002E) did not affect the interaction.

In vitro experiments confirmed weak but specific interaction. In order to confirm the results obtained with the two-hybrid system, LMW-PTP A and B as well as several peptides encompassing the α II-Sp SH3 domain were expressed as either GST- or His₆-tagged proteins. GST- α II-Sp SH3 peptide bound to glutathione beads did not retain purified recombinant LMW-PTP A (devoid of GST) (data not shown). Similarly, GST-LMW-PTP A bound to glutathione beads did not retain α II-Sp SH3- α 9- α 10-His₆ peptides. These negative results could be explained by a weak interaction between the two partners, in keeping with the observation of a weak β -galactosidase activity observed in the two-hybrid system. To verify this hypothesis, cross-linking agent (DSS) was added to the binding reaction solution containing both partners (at 1 to 10 μ M). Subsequent analysis of the proteins by SDS-PAGE (Fig. 3A) revealed the presence of an additional band in the sample containing the α II-Sp SH3/LMW-PTP A mixture. This new

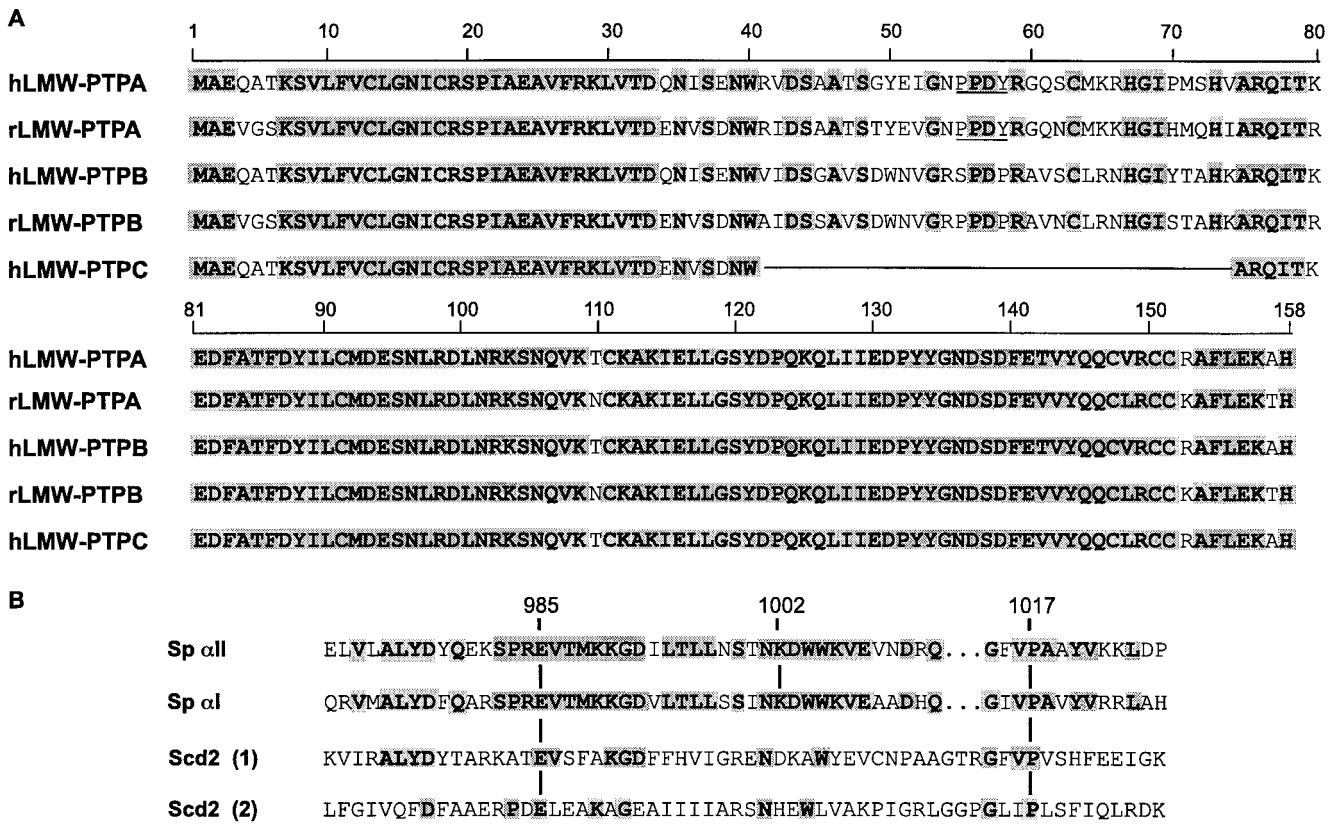


FIG. 1. Comparative analysis of amino acid sequence of LMW-PTP isoforms and SH3 domains used in this study. Identical residues are highlighted in grey. (A) Sequence alignment of human and rat LMW-PTP isoforms (accession numbers P24666, P24667, P41498, and H33956). Alternative splicing leads to different sequences for residues 41 to 74 between isoforms A and B. Isoform C is characterized by the absence of residues 41 to 74. The PPXY motif is underlined. (B) Sequence alignment of SH3 domains from mammal α II-spectrin (accession number A35715), human α I-spectrin (accession number P02549), and yeast SCD2 protein (11). The numbered residues have been mutated.

band showed an apparent molecular weight compatible with the formation of a complex between both species in a 1:1 ratio. No such additional band was detected on Coomassie blue-stained gels in the mixture containing either α I-Sp SH3 instead of α II-Sp SH3 or LMW-PTP B instead of LMW-PTP A (Fig. 3A). The identity of this new band was confirmed by Western blottings (Fig. 3B). This new band corresponds to the complex consisting of α II-Sp SH3 and LMW-PTP A since it was recognized by both antibodies directed against the SH3 domain and LMW-PTP A. This band was absent when the P1017L mutant α II-Sp SH3 peptide was used instead of the wild-type SH3 (Fig. 3B). These results confirm that the interaction between α II-Sp SH3 and LMW-PTP A occurs with high specificity but weak affinity.

LMW-PTP A was present with spectrin-based skeleton in detergent-insoluble fraction. LMW-PTPs are essentially considered to be cytosolic enzymes in a number of tissues; however, a fraction has also been observed in the detergent-insoluble pellet of NIH 3T3 cells (14). Using Western blotting, we analyzed the distribution of isoform A between the detergent-soluble and -insoluble fractions obtained from a rat kidney cell line (RCCD1). Immunopurified polyclonal antibodies raised against LMW-PTP A showed the presence of this phosphatase not only in the detergent-soluble fraction but also in the de-

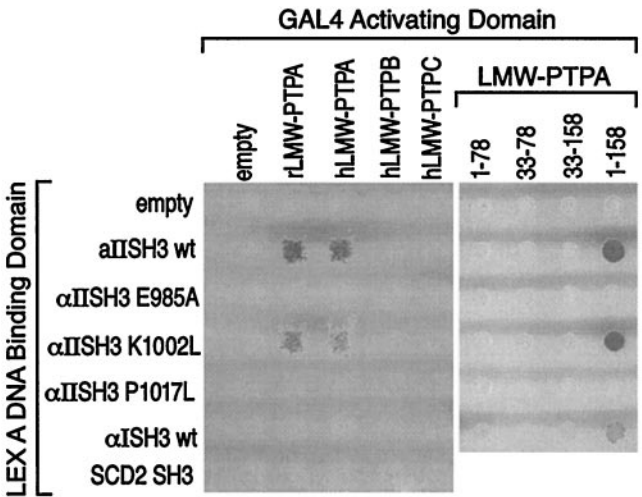


FIG. 2. Analysis of SH3 domains/LMW-PTP interactions using yeast mating. AMR70 yeast cells transformed with different pLexA-SH3 plasmids were mated with L40 yeast cells transformed with pGAD plasmids containing different sequences of rat and human LMW-PTP. As revealed by yeast growth on selective medium DO-WLH, interactions occurred only between either wild-type or K1002L α II-Sp SH3 peptides and full-length LMW-PTP A.

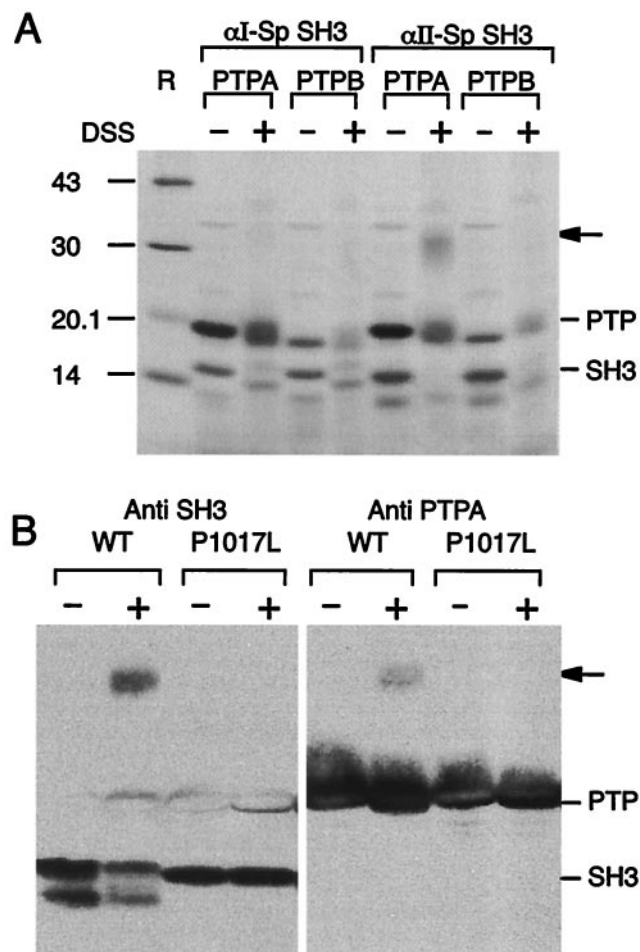


FIG. 3. In vitro interactions between α -spectrin SH3 domains and LMW-PTP isoforms. (A) Coomassie blue-stained gel. LMW-PTP A (19.5 kDa) and LMW-PTP B (19 kDa) (at 10 μ M) were incubated with either α I-Sp SH3 (10.6 kDa) or α II-Sp SH3 (9.7 kDa) in the presence of cross-linking reagent (DSS). Interaction occurred only between α II-Sp SH3 and LMW-PTP A, as revealed by the presence of a new band (indicated by an arrow) with an apparent molecular mass of 32 kDa. Lane R, molecular mass markers. (B) Western blots. Wild-type (WT) and mutant (P1017L) α II-Sp SH3 peptides (at 1 μ M) were incubated with LMW-PTP A in the presence of DSS. Western blots were revealed by antibodies directed against either the α II-Sp SH3 domain or LMW-PTP A. In the presence of DSS, both antibodies revealed the same additional band (indicated by an arrow) in the mixture containing wild-type α II-Sp SH3 peptide. In contrast, no such a band was detected in the presence of mutant α II-Sp SH3.

tergent-insoluble fraction (Fig. 4), which contains the spectrin-based skeleton.

α II-spectrin was tyrosine phosphorylated in vivo. The interaction between the α II-Sp SH3 domain and LMW-PTP A could have two biological implications. On the one hand, the interaction with spectrin could target this enzyme to the vicinity of its known substrates, which are transmembrane proteins (42). On the other hand, spectrin itself could be a substrate: the α II-Sp from mammals has been reported to be tyrosine phosphorylated in vitro by Src and spleen tyrosine kinases (1, 48). We studied endogenous α II-Sp tyrosine phosphorylation in a rat kidney cell line (RCCD1) by Western blotting using

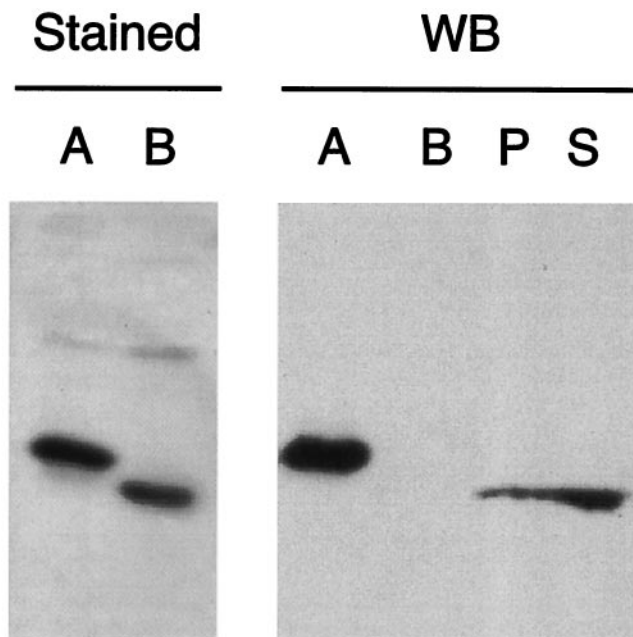


FIG. 4. Distribution of LMW-PTP A in cell detergent extracts. Shown are a Coomassie blue-stained gel and a Western blots (WB). The immunopurified antibodies directed against LMW-PTP A specifically recognized LMW-PTP A (lane A) and did not label LMW-PTP B (lane B). These antibodies revealed the presence of LMW-PTP A not only in the detergent-soluble fraction (lane S) but also in the detergent-insoluble fraction (lane P) obtained from the rat kidney cell line RCCD1.

anti-phosphotyrosine antibodies. Spectrin was immunoprecipitated by anti- α II/ β II-Sp antibodies and then probed using Western blotting with anti-phosphotyrosine antibodies, and after stripping, with anti- α II-Sp SH3 antibodies (Fig. 5). When cells were treated with a phosphatase inhibitor (pervanadate) 30 min before lysis, anti-phosphotyrosine antibodies strongly labeled a high-molecular-mass peptide displaying an apparent molecular mass in agreement with that of the full-length α II-spectrin (280 kDa). This band was recognized by anti- α II-Sp SH3 antibodies. In the absence of phosphatase inhibitors in cell culture, the α II-spectrin was faintly labeled by anti-phosphotyrosine antibodies. Moreover, apart from the 280-kDa peptide, the α II-Sp SH3 antibodies revealed a 150-kDa peptide that could correspond to the well-determined spectrin cleavage product (23). This 150-kDa peptide has been demonstrated to result from either calpain or caspase 3 cleavage at two close residues, Y1176 and D1185, respectively, which are located in the α 10 repeat unit, near the SH3 domain (residues 971 to 1025). In pervanadate-treated cells, the 150-kDa peptide was not detected, suggesting a protective effect of phosphatase inhibitor on spectrin cleavage.

Phosphorylation occurred on Tyr residue 1176 located in calpain cleavage site. Our results showed an interaction between the α II-Sp SH3 domain and LMW-PTP A and suggested a relationship between the phosphorylation of spectrin and its proteolytic cleavage at residues located near the SH3 domain. We therefore looked for tyrosine phosphorylation sites close to the SH3 domain. Computer analysis (using the prediction programs PROSITE and NETPHOS) of the amino acid sequence

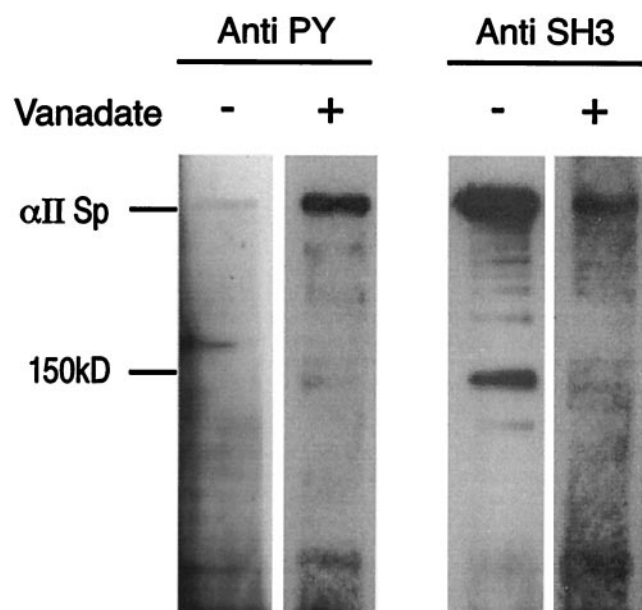


FIG. 5. α II-spectrin phosphorylation in cells and effects of phosphatase inhibitor. Sp α II/βII was immunoprecipitated with anti-Sp α II/βII antibodies from detergent-soluble extracts of RCCD1 cells. Prior to SDS lysis, cells were incubated for 30 min in the presence of phosphatase inhibitor (pervanadate) when indicated. The immunoprecipitate was probed with anti-phosphotyrosine (PY) and then stripped and probed with anti- α II-Sp SH3 antibodies.

encompassing the SH3 domain and its two adjacent repeat units (α 9 and α 10) predicted one or two potential tyrosine phosphorylation sites (Y1073 and Y1176). We studied the in vitro activity of two tyrosine kinases, Src and Lck, on a set of either GST- or His₆-tagged peptides encompassing the human sequences corresponding to the SH3 domain alone or with one (α 9) or two (α 9 and α 10) adjacent repeat units in the presence of [γ -³²P]ATP. These peptides have a high Tyr residue content (14 for GST and 3, 7, and 8 for Sp α II SH3, SH3- α 9, and SH3- α 9- α 10, respectively). Only the Sp recombinant peptide containing the α 10 repeat (SH3- α 9- α 10 peptide) was phosphorylated. The peptide was highly phosphorylated by the two kinases (Fig. 6, upper panel), up to 90% by Src. The α 10 repeat bears the calmodulin binding site and the cleavage sites for calpain and caspase (at residues Y1176 and D1185, respectively). This peptide differs from the other tested peptides only by the presence of one additional Tyr residue (Y1176) located in the calpain cleavage site (40). Site-directed mutagenesis resulting in Y1176E amino acid substitution totally abolished in vitro spectrin phosphorylation by Src and Lck (Fig. 6, upper panel). This site was predicted by NETPHOS with a probability of 0.76.

Whether or not the Y1176 residue is phosphorylated in vivo was further tested by transient expression of FLAG-tagged SH3- α 9- α 10 peptides (wild-type and Y1176E mutant) in COS cells. Western blottings of cell lysate (obtained from transfected cells incubated for 30 min in the presence of pervanadate prior to lysis) were probed with anti- α II-Sp SH3 antibodies. The results indicated that both wild-type and mutant peptides were well expressed and highly stable as indicated by the presence of a unique band with an apparent molecular

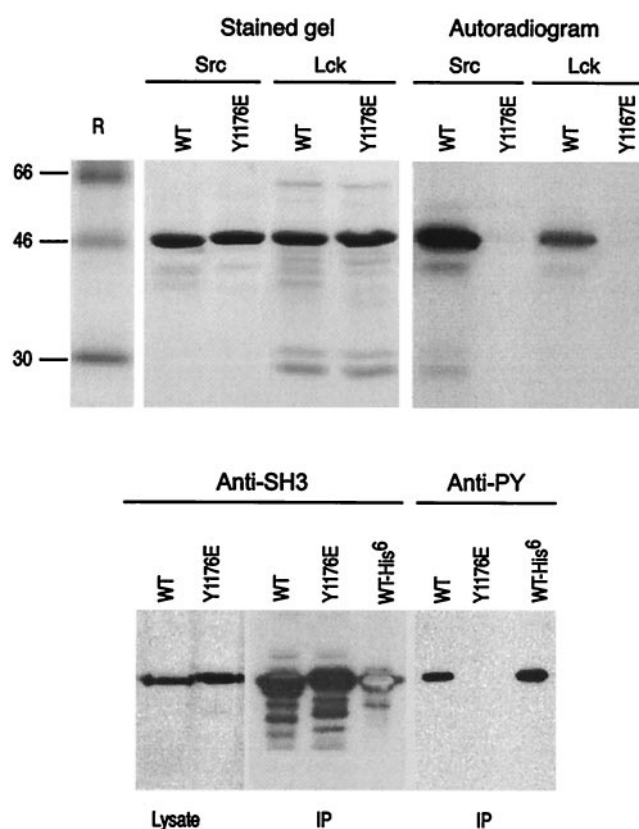


FIG. 6. Identification of a phosphorylation site in α II-spectrin, located near the SH3 domain. (Top) His-tagged recombinant peptides (wild-type [WT] and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10) were submitted to in vitro Src and Lck phosphorylation in the presence of [³²P]ATP. Wild-type peptide was phosphorylated by both enzymes, whereas the Y1176E mutant SH3- α 9- α 10-His₆ was not. Lane R, molecular mass markers. (Bottom) Expression and phosphorylation of wild-type (WT) and Y1176E mutant SH3- α 9- α 10 peptides in COS cells (preincubated in presence of pervanadate) were analyzed by Western blotting on cell lysates and after immunoprecipitation (IP) by anti-Flag antibodies. Peptides were revealed by antibodies directed against α II-Sp SH3 and then by anti-phosphotyrosine (PY). WT-His₆ corresponds to the recombinant SH3- α 9- α 10-His₆ peptide phosphorylated in vitro by Src.

weight similar to that of the His-tagged peptide (Fig. 6, lower panel). After immunoprecipitation by anti-FLAG antibodies, both wild-type and mutant peptides were labeled by anti- α II-Sp SH3 antibody, but only the wild-type SH3- α 9- α 10 peptide was recognized by anti-phosphotyrosine antibodies. The anti-phosphotyrosine antibodies did not react with the mutant Y1176E peptide. These data confirm the residue Y1176 as a phosphorylation site recognized in vivo by cellular kinases. In the absence of cell treatment with phosphatase inhibitors, phosphorylation of this residue was very weak, indicating that this residue is also an in vivo substrate for tyrosine phosphatase (data not shown). So, the phosphorylation state of Y1176 is determined by a dynamic equilibrium between kinases and phosphatases.

Spectrin phosphorylation affected calpain cleavage. After the identification of residue Y1176 located in the calpain cleavage site as a phosphorylation site, we analyzed in vitro the effects of this phosphorylation on α II-Sp cleavage by μ -calpain.

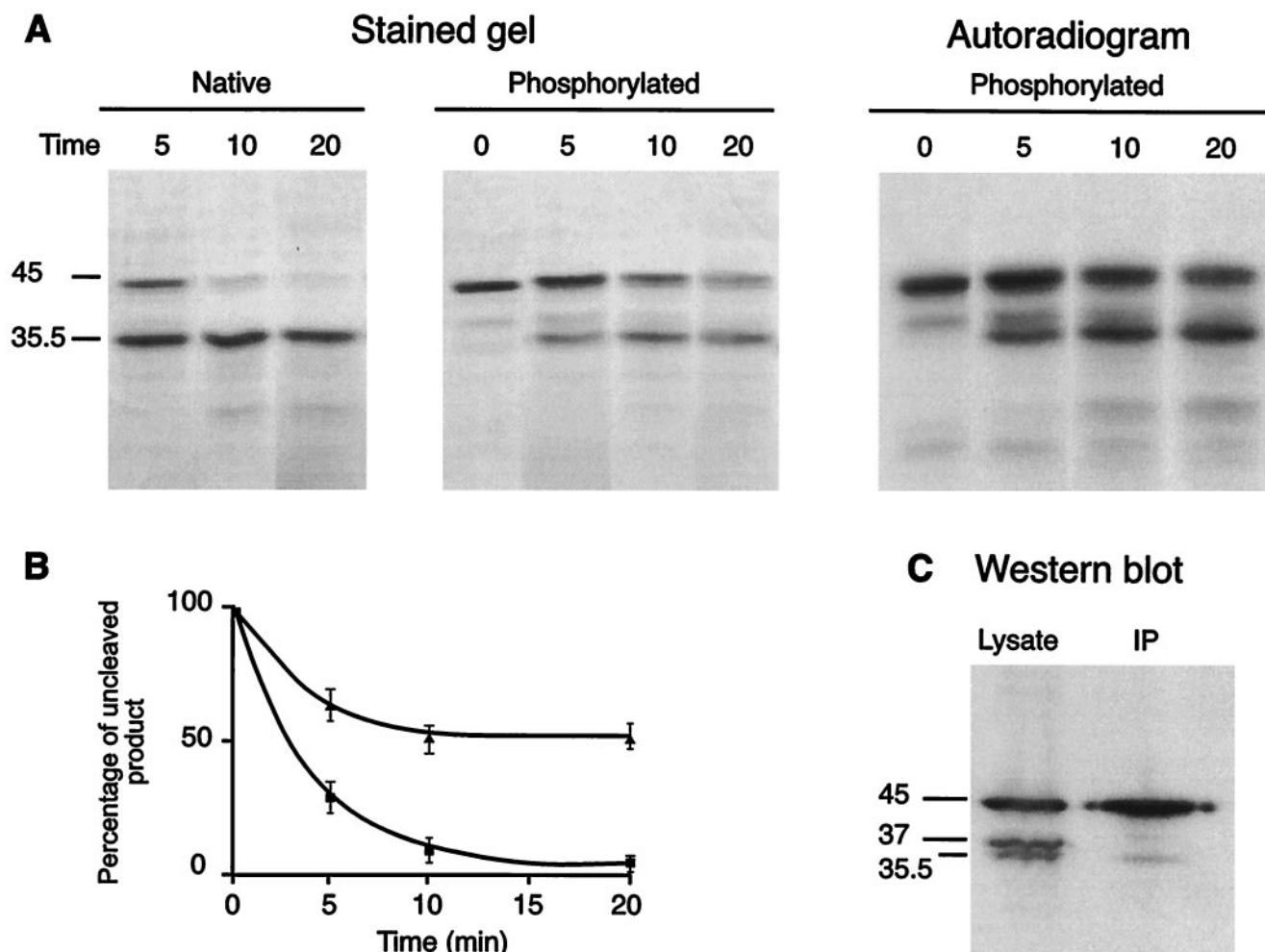


FIG. 7. α II-spectrin phosphorylation and protease cleavage. (A) In vitro kinetic studies of μ -calpain activity on 32 P-phosphorylated and native SH3- α 9- α 10-His₆ peptides. The 35.5-kDa peptide corresponds to the cleavage product. (B) Graph showing μ -calpain activity on native (■) and phosphorylated (▲) peptides calculated from Coomassie blue-stained gels and autoradiograms. (C) Expression and cleavage of Flag-tagged SH3- α 9- α 10 peptide expressed in COS cells. In the absence of phosphatase inhibitor, anti- α II-Sp SH3 antibody revealed the full-length peptide (45 kDa) and two proteolytic products (37 and 35.5 kDa). The 45-kDa peptide immunoprecipitated (IP) only anti-Flag antibodies.

In the presence of calmodulin (50 μ M) and Ca^{2+} (500 μ M), phosphorylated peptides (His₆-tagged SH3- α 9- α 10) were less sensitive to μ -calpain than nonphosphorylated peptides (Fig. 7A and B): after 10 min of incubation, the nonphosphorylated SH3- α 9- α 10 peptide was almost completely cleaved, whereas only 40% of the phosphorylated form was cleaved by μ -calpain. Mass spectrometry of peptide products after calpain cleavage confirmed that spectrin cleavage occurred after residue Y1176 (data not shown).

As phosphorylation of Y1176 residue appears to protect spectrin against in vitro calpain degradation, we further investigated in vivo proteolysis of FLAG-tagged SH3- α 9- α 10 peptide transiently expressed in COS cells. In the absence of phosphatase inhibitors (Fig. 7C), Western blottings of cell lysate exhibited three bands (with apparent molecular masses of 45, 37, and 35.5 kDa) labeled by anti- α II-Sp SH3 antibodies, whereas in the presence of phosphatase inhibitor (Fig. 6, lower panel), only the 45-kDa peptide (corresponding to the full-length peptide) was detected. Anti-FLAG antibodies were able

to pull down the 45-kDa peptide but not the 37- or 35.5-kDa peptides, suggesting that both these peptides have lost the FLAG located at the COOH end. This was confirmed by Western blottings on cell lysate using anti-FLAG antibodies that recognized only the 45-kDa band (data not shown). These two 37- and 35.5-kDa peptides probably arise from proteolytic cleavage that must occur between the SH3 domain and the FLAG. The apparent molecular masses of these peptides (37 and 35.5 kDa) are compatible with a cleavage at residues D1185 and Y1176 by caspase 3 and calpain, respectively.

Spectrin is substrate for LMW-PTP A. We checked whether this Src-phosphorylated residue could be an in vitro substrate of LMW-PTP A. Since the linkage of GST to the N terminus of LMW-PTP does not affect the kinetic properties of the enzymes (13), the activity of both LMW-PTP A and B expressed as GST-fusion proteins was tested on *para*-nitrophenylphosphate (pNPP) and on the Src-phosphorylated peptide (SH3- α 9- α 10 peptide). Recombinant LMW-PTP B displayed a higher activity on pNPP than on LMW-PTP A (100 times as

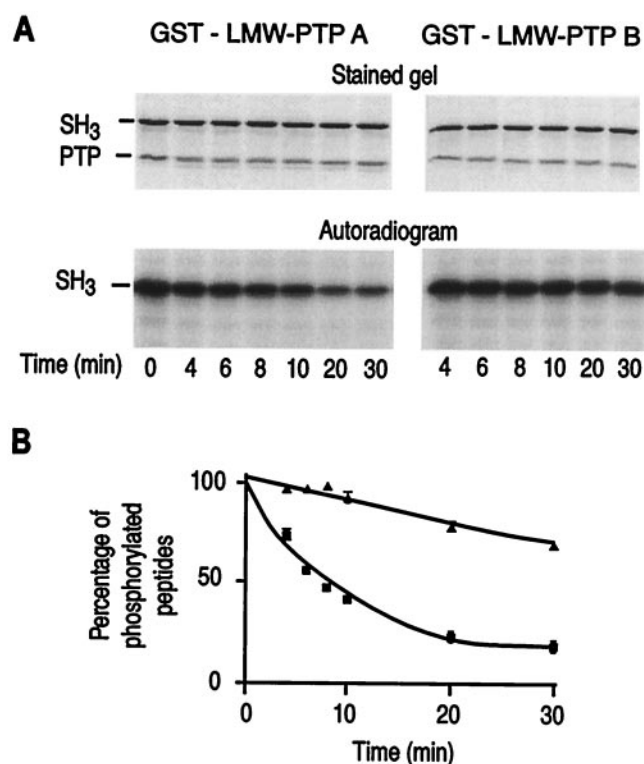


FIG. 8. Kinetic studies of LMW-PTP A and B activity on phosphorylated spectrin peptides. After phosphorylation by Src, recombinant peptide SH3- α 9- α 10-His₆ (indicated by SH3) was submitted to dephosphorylation by LMW-PTP A and B (indicated by PTP). (A) Coomassie blue-stained gel and autoradiogram. (B) Activity of LMW-PTP A (■) and LMW-PTP B (▲).

estimated by the number of pNPP molecules hydrolyzed per microgram of recombinant peptides), but LMW-PTP A was considerably more active on spectrin peptides than isoform B (Fig. 8). After 10 min of incubation at the same enzyme-substrate ratio, more than 50% of the spectrin was dephosphorylated by isoform A. In contrast, no detectable loss of phosphate was observed in the presence of isoform B after 10 min of incubation, and only a 25% loss of phosphate label was observed after 30 min of reaction.

DISCUSSION

Spectrin was tyrosine phosphorylated in vivo on residue Y1176. There is very little information available on the phosphorylation of spectrins, but in vivo ³²P labeling of spectrin has revealed phosphorylation of β -spectrins, mainly on serine but also threonine residues (19, 24, 39). In erythrocytes, β I-spectrin was reported to contain at least six phosphorylatable sites in vivo (36). The locations of these phosphorylated residues, the kinases, and phosphatases involved in this process as well as the functional significance of β I-spectrin phosphorylation are not clear. Manno et al. (30) demonstrated that an increase in the phosphorylation of β I-spectrin causes a decrease in the mechanical stability of red blood cell membrane. Serine phosphorylation of β II-spectrin has been associated with spectrin redistribution in epidermal growth factor-stimulated A 431

cells (9) and during mitosis (19). These findings support the view that β I-spectrin phosphorylation may regulate physiological functions in vivo. Concerning α -spectrins, mammalian α II-spectrin is an in vitro substrate for tyrosine kinases such as Src (1). The α -spectrin from *Torpedo* has been shown to be tyrosine phosphorylated (2). In this study, we demonstrate for the first time by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibodies that the mammalian endogenous α II-spectrin is tyrosine phosphorylated in vivo. This tyrosine phosphorylation of α II-spectrin depends greatly on kinase/phosphatase equilibrium since this phosphorylation cannot be detected in the absence of phosphatase inhibitors, which could explain why it was not previously detected.

Expression of mutant peptides in COS cells has allowed us to identify residue Y1176, located in the hypersensitive site for calpains (23, 40), as an in vivo site for cellular kinases and phosphatases.

In vitro experiments showed that this tyrosine can be a substrate for nonreceptor tyrosine kinases, such as Src and Lck. Some lines of evidence suggest that Src may be the physiological kinase: (i) Src is more active on residue Y1176 than Lck, (ii) in our in vitro studies (data not shown), Src preferentially phosphorylated Sp peptides rather than LMW-PTP A, which has been demonstrated to be a physiological target for Src (14), and (iii) Src and spectrin have been colocalized (20). The Src involvement in Sp phosphorylation on residue Y1176 in cells is likely but remains to be confirmed.

LMW-PTP A interacted with α II-Sp SH3 domain and dephosphorylated Y1176. Our in vitro studies have shown that residue Y1176 is a substrate for LMW-PTP A. We suspected spectrin might be a substrate for LMW-PTP A since we detected an interaction between LMW-PTP and the α II-Sp SH3 domain by two-hybrid screening of a rat kidney cDNA library. LMW-PTP A appears to be a highly specific partner for the α II-Sp SH3 domain as indicated by the following observations: (i) this interaction is conserved in humans, although LMW-PTP A sequences differ slightly between the two species (20 different residues out of 158; Fig. 1), (ii) LMW-PTP B (with 21 different residues) and LMW-PTP C (with these 21 residues deleted) did not interact with the α II-Sp SH3 domain, (iii) LMW-PTP A did not interact with either the α I-Sp SH3 domain (68% identity with α II-Sp SH3) or two other unrelated SH3 domains, and (iv) mutations of α II-Sp SH3 on residues involved in SH3 domain functions led to a loss of interaction with LMW-PTP A.

Surprisingly, the LMW-PTP A sequence did not contain the PXXP core motif usually flanked by positively charged residues, mainly Arg [RXX(X)PXXP or PXXP(X)R], whereas rat LMW-PTP B contains this motif (PPXPR). However, recent data have extended the repertoire of SH3 domain binding motifs to Tyr-based motifs, such as RKXXYXXY and PXXDY (28, 32), indicating that SH3 domain binding motifs are not so restrictive. Rat and human LMW-PTP A do not contain such a motif, but they contain a similar sequence (PPDYR) that is not present in isoforms B or C. Mutagenesis experiments are in progress to test whether this motif is the SH3-binding site. However, this short sequence is probably not sufficient since any interaction can be detected with partially truncated proteins that contain this sequence, suggesting that the whole molecule is required in the interaction. Selection of

clones with only the full-length sequence in the two-hybrid screens reinforces such a hypothesis.

The interaction of α II-Sp SH3 with LMW-PTP A was weak since we detected it only in the two-hybrid assay and in vitro, in the presence of a cross-linking agent. During evolution it seems that SH3 domains have been selected to recognize their ligands with a high specificity but a relatively low affinity. Such interactions are ideal for signaling domains that must recognize selective ligands to transduce information accurately, but with low affinity to allow sensitive and dynamic modulation in response to changing signals. Typically, the K_d values of ligands binding SH3 domains are low (between 1 and 100 μ M for synthetic peptides). Recent data have suggested that SH3 domain interactions may be regulated in the cell, for example, by phosphorylation. The interaction between Sos and Grb2 and the interaction between WASP and PSTPIP can be regulated by phosphorylation of either the ligand or the SH3 domain (49, 50). So, the interaction between spectrin and LMW-PTP A can involve both the Sp SH3 domain and the phosphorylated Y1176 residue. Interaction with the α II-Sp SH3 domain could participate either in the recruitment or in the regulation of the enzyme activity, and it could also make the enzyme-substrate interaction more specific. Such effects have been observed between PTP 1B and its substrate, the protein p130cas: the interaction between the PTP 1B proline-rich region and the p130cas SH3 domain is required for substantial tyrosine dephosphorylation of p130cas and for the function of PTP 1B as a negative regulator of integrin signaling (29).

Moreover, LMW-PTPs are 18-kDa enzymes that are distantly related to other PTPases: they contain only the catalytic domain whereas other PTPases also possess regulatory or targeting domains. Because LMW-PTPs apparently lack regulatory elements, their regulation and targeting are not fully understood, although Y131 and Y132 phosphorylation by kinases of the Src family up-regulate their catalytic activity (44). The Sp α II SH3 domain ability to bind LMW-PTP A correlates with the presence of a tyrosine phosphorylation site near the SH3 domain. It is noticeable that the α I-spectrin chain, which does not contain this tyrosine or the calpain cleavage site, has an SH3 domain unable to recruit LMW-PTP. Similarly, our in vitro studies have shown that spectrin is a better substrate for LMW-PTP A than for isoform B. The isoforms A and B are quite similar; they arise from alternative splicing of two homologous exons of the same gene. However, the two enzymes differ in substrate specificity (towards synthetic substrates as well as more physiological protein targets) and in response to inhibitors or activators, indicating that isoforms have acquired different physiological functions (13). Several proteins have been identified as LMW-PTP B substrates (PDGF-R, EGF-R, insulin-R, and MCSF-R), whereas ephrin receptor tyrosine kinases are the only physiological targets of LMW-PTP A known so far (42). Spectrin is a new candidate for a physiological substrate for LMW-PTP A, since a fraction of LMW-PTP A that is mainly cytosolic is associated with the skeleton in a detergent-insoluble fraction.

Spectrin cleavage by calpain and membrane skeleton remodeling. As we have shown, α II-spectrin phosphorylation on residue 1176 modifies its susceptibility to calpains, ubiquitous Ca^{2+} -dependent proteases. Modification of sensitivity to proteolysis by phosphorylation has already been observed: the

glutamate ionotropic AMPA receptors are more resistant to calpain when phosphorylated (6). In contrast, tyrosine phosphorylation of cortactin increases its sensitivity to calpain (26).

Proteolysis of the α II-spectrin by calpain is well known and has been documented as a consequence of cell injury in several tissues. It also correlates with platelet activation, neutrophil degranulation, neuronal long-term potentiation, NMDA receptor activation, stimulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells, and endocytosis (27). The action of calpain on spectrin is of significant interest because of its dramatic effect on the stability of the spectrin-based skeleton: spectrin cleavage by calpain leads up to a loss of spectrin ability to cross-link actin filaments and to bind to the membrane (25). Thus, modulation of spectrin proteolysis by phosphorylation must be important for stability and reorganization of the spectrin-based skeleton and consequently for spectrin-based skeleton functions. These data raise the question of the events that can modify the balance of kinase/phosphatase activities.

Taken together, our results demonstrate that calpain-mediated truncation of spectrin can be regulated not only by Ca^{2+} -calmodulin level but also by phosphorylation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maria Skibinska (program Erasmus) for technical help and Philippe Vernier for their valuable advice and suggestions in the preparation of the cDNA library.

This work was supported by an SFH grant.

REFERENCES

1. Akiyama, T., T. Kadowaki, E. Nishida, T. Kadooka, H. Ogawara, Y. Fukami, H. Sakai, F. Takaku, and M. Kasuga. 1986. Substrate specificities of tyrosine-specific protein kinases toward cytoskeletal proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **261**:14797–14803.
2. Balasubramanian, S., and R. L. Haganir. 1999. Characterization of phosphotyrosine containing proteins at the cholinergic synapse. *FEBS Lett.* **446**:95–102.
3. Beck, K. A., J. A. Buchanan, and W. J. Nelson. 1997. Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **110**:1239–1249.
4. Bennett, V., and A. J. Baines. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* **81**:1353–1392.
5. Berghs, S., D. Aggularo, R. Dirks, Jr., E. Maksimova, P. Stabach, J. M. Hermel, J. P. Zhang, W. Philbrick, V. Slepnev, T. Ort, and M. Solimena. 2000. BetaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**:985–1002.
6. Bi, R., X. Bi, and M. Baudry. 1998. Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. *Brain Res.* **797**:154–158.
7. Bloch, R. J., and J. S. Morrow. 1989. An unusual beta-spectrin associated with clustered acetylcholine receptors. *J. Cell Biol.* **108**:481–493.
8. Blot-Chabaud, M., M. Laplace, F. Cluzeaud, C. Capurro, R. Cassingena, A. Vandewalle, N. Farman, and J. P. Bonvalet. 1996. Characteristics of a rat cortical collecting duct cell line that maintains high transepithelial resistance. *Kidney Int.* **50**:367–376.
9. Bretscher, A. 1989. Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* **108**:921–930.
10. Bryson, G. L., H. Massa, B. J. Trask, and R. L. Van Etten. 1995. Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. *Genomics* **30**:133–140.
11. Chang, E. C., M. Barr, Y. Wang, V. Jung, H. P. Xu, and M. H. Wigler. 1994. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**:131–141.
12. Chomczynski, P. A., and N. Sacchi. 1991. Single-step isolation from cultured cells or tissue, p. 4.2.1–4.2.2. *In* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
13. Cirri, P., T. Fiaschi, P. Chiarugi, G. Camici, G. Manao, G. Raugeli, and G.

- Ramponi. 1996. The molecular basis of the differing kinetic behavior of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* **271**:2604–2607.
14. Cirri, P., P. Chiarugi, L. Taddei, G. Raugi, G. Camici, G. Manao, and G. Ramponi. 1998. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J. Biol. Chem.* **273**:32522–32527.
 15. Clark, S. G., M. J. Stern, and H. R. Horvitz. 1992. *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**:340–344.
 16. De Matteis, M. A., and J. S. Morrow. 1998. The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:542–549.
 17. Dubreuil, R. R., P. Wang, S. Dahl, J. Lee, and L. S. Goldstein. 2000. *Drosophila* beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **149**:647–656.
 18. Erpel, T., G. Superti-Furga, and S. A. Courtneidge. 1995. Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interaction. *EMBO J.* **14**:963–975.
 19. Fowler, V. M., and E. J. Adam. 1992. Spectrin redistributes to the cytosol and is phosphorylated during mitosis in cultured cells. *J. Cell Biol.* **119**:1559–1572.
 20. Fox, J. E., L. Lipfert, E. A. Clark, C. C. Reynolds, C. D. Austin, and J. S. Brugge. 1993. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **268**:25973–25984.
 21. Gascard, P., and N. Mohandas. 2000. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. *Curr. Opin. Hematol.* **7**:123–129.
 22. Hammarlund, M., W. S. Davis, and E. M. Jorgensen. 2000. Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J. Cell Biol.* **149**:931–942.
 23. Harris, A. S., and J. S. Morrow. 1988. Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci.* **8**:2640–2651.
 24. Harris, H. W., Jr., and S. E. Lux. 1980. Structural characterization of the phosphorylation sites of human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* **255**:11512–11520.
 25. Hu, R. J., and V. Bennett. 1991. In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J. Biol. Chem.* **266**:18200–18205.
 26. Huang, C., N. N. Tandon, N. J. Greco, Y. Ni, T. Wang, and X. Zhan. 1997. Proteolysis of platelet cortactin by calpain. *J. Biol. Chem.* **272**:19248–19252.
 27. Kamal, A., Y. Ying, and R. G. Anderson. 1998. Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J. Cell Biol.* **142**:937–947.
 28. Kang, H., C. Freund, J. S. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner, and C. E. Rudd. 2000. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.* **19**:2889–2899.
 29. Liu, F., M. A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr. Biol.* **8**:173–176.
 30. Manno, S., Y. Takakuwa, K. Nagao, and N. Mohandas. 1995. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**:5659–5665.
 31. McMahon, L. W., C. E. Walsh, and M. W. Lambert. 1999. Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J. Biol. Chem.* **274**:32904–32908.
 32. Mongioli, A. M., P. R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W. T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, and P. P. Di Fiore. 1999. A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* **18**:5300–5309.
 33. Moorthy, S., L. Chen, and V. Bennett. 2000. Caenorhabditis elegans beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function. *J. Cell Biol.* **149**:915–930.
 34. Nicolas, G., S. Pedroni, C. Fournier, H. Gautero, and M. C. Lecomte. 1997. Method of site-directed mutagenesis using long primer-unique site elimination and exonuclease III. *BioTechniques* **22**:430–434.
 35. Parkinson, N. J., C. L. Olsson, J. L. Hallows, J. McKee-Johnson, B. P. Keogh, K. Noben-Trauth, S. G. Kuja, and B. L. Tempel. 2001. Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat. Genet.* **29**:61–65.
 36. Pedroni, S., M. C. Lecomte, H. Gautero, and D. Dhermy. 1993. Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin beta chain in intact cells. *Biochem. J.* **294**(Pt. 3):841–846.
 37. Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, and D. Bowtell. 1993. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**:83–85.
 38. Sihag, R. K., T. B. Shea, and F. S. Wang. 1996. Spectrin-actin interaction is required for neurite extension in NB 2a/dl neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **44**:430–437.
 39. Sihag, R. K. 1998. Brain beta-spectrin phosphorylation: phosphate analysis and identification of threonine-347 as a heparin-sensitive protein kinase phosphorylation site. *J. Neurochem.* **71**:2220–2228.
 40. Stabach, P. R., C. D. Cianci, S. B. Glantz, Z. Zhang, and J. S. Morrow. 1997. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry* **36**:57–65.
 41. Stanekewich, M. C., W. T. Tse, L. L. Peters, Y. Ch'ng, K. M. John, P. R. Stabach, P. Devarajan, J. S. Morrow, and S. E. Lux. 1998. A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:14158–14163.
 42. Stein, E., A. A. Lane, D. P. Cerretti, H. O. Schoecklmann, A. D. Schroff, R. L. Van Etten, and T. O. Daniel. 1998. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev.* **12**:667–678.
 43. Steiner, J. P., H. T. Walke, Jr., and V. Bennett. 1989. Calcium/calmodulin inhibits direct binding of spectrin to synaptosomal membranes. *J. Biol. Chem.* **264**:2783–2791.
 44. Tailor, P., J. Gilman, S. Williams, C. Couture, and T. Mustelin. 1997. Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. *J. Biol. Chem.* **272**:5371–5374.
 45. Tailor, P., J. Gilman, S. Williams, and T. Mustelin. 1999. A novel isoform of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase, LMPTP-C, arising from alternative mRNA splicing. *Eur. J. Biochem.* **262**:277–282.
 46. Takeda, S., H. Yamazaki, D. H. Seog, Y. Kanai, S. Terada, and N. Hirokawa. 2000. Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin- associating vesicles important for neurite building. *J. Cell Biol.* **148**:1255–1265.
 47. Vidal, M., N. Goudreau, F. Cornille, D. Cussac, E. Gincel, and C. Garbay. 1999. Molecular and cellular analysis of Grb2 SH3 domain mutants: interaction with Sos and dynamin. *J. Mol. Biol.* **290**:717–730.
 48. Wang, C. Y., S. K. Kong, and J. H. Wang. 1988. Characterization of fodrin phosphorylation by spleen protein tyrosine kinase. *Biochemistry* **27**:1254–1260.
 49. Wu, Y., S. D. Spencer, and L. A. Lasky. 1998. Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J. Biol. Chem.* **273**:5765–5770.
 50. Zhao, H., S. Okada, J. E. Pessin, and G. A. Koretzky. 2007. 1998. Insulin receptor-mediated dissociation of Grb2 from Sos involves phosphorylation of Sos by kinase(s) other than extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:12061–12067.
 51. Ziemnicka-Kotula, D., J. Xu, H. Gu, A. Potempska, K. S. Kim, E. C. Jenkins, E. Trenkner, and L. Kotula. 1998. Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **273**:13681–13692.

ARTICLE 3

A Mutant α II-spectrin Designed to Resist Calpain and Caspase Cleavage Questions the Functional Importance of This Process *in Vivo**

Received for publication, January 2, 2007, and in revised form, February 20, 2007. Published, JBC Papers in Press, March 20, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700028200

Fleur Meary^{‡§¶}, Sylvain Metral^{‡§¶}, Chrystophe Ferreira^{||}, Dominique Eladari^{***‡}, Yves Colin^{‡§¶}, Marie-Christine Lecomte^{‡§¶}, and Gaël Nicolas^{‡§¶||}

From the [‡]INSERM, U665, Paris F-75015, [§]Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris F-75015, [¶]Université Paris 7/Denis Diderot, Paris, F-75005, ^{||}Institut Fédératif de Recherche Claude Bernard, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris F-75018, ^{***}INSERM, U652, Paris F-75006, and ^{‡‡}Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, and AP-HP, Département de Physiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris F-75006, France

α - and β -spectrins are components of molecular scaffolds located under the lipid bilayer and named membrane skeletons. Disruption of these scaffolds through mutations in spectrins demonstrated that they are involved in the membrane localization or the maintenance of proteins associated with them. The ubiquitous α II-spectrin chain bears in its central region a unique domain that is sensitive to several proteases such as calpains or caspases. The conservation of this region in vertebrates suggests that the proteolysis of α II-spectrin by these enzymes could be involved in important functions. To assess the role of α II-spectrin cleavage *in vivo*, we generated a murine model in which the exons encoding the region defining this cleavage sensitivity were disrupted by gene targeting. Surprisingly, homozygous mice expressing this mutant α II-spectrin appeared healthy, bred normally, and had no histological anomaly. Remarkably, the mutant α II-spectrin assembles correctly into the membrane skeleton, thus challenging the notion that this region is required for the stable biogenesis of the membrane skeleton in nonerythroid cells. Our finding also argues against a critical role of this particular α II-spectrin cleavage in either major cellular functions or in normal development.

Spectrin was first identified at the inner surface of the red blood cell membrane and is well known to be the central component of the membrane skeleton, a ubiquitous and complex spectrin-actin scaffold. Spectrins are long and flexible molecules composed of two subunits, α and β , that intertwine to form α/β heterodimers. Spectrin is subsequently integrated into the membrane skeleton as $(\alpha/\beta)_2$ tetramers resulting from the self-association of α/β heterodimers (1). These tetramers constitute the filaments of the lattice, the nodes of which are cross-linked by short actin filaments (2). Each spectrin subunit is mainly composed of a succession of triple helical repeats. The spectrin-based membrane skeleton is

responsible for the characteristic shape and the unique physical properties of red blood cells, such as deformability and remarkable stability to shear stress. Defects in components of this network lead to membrane fragility and are associated with various hemolytic anemias (3).

This membrane skeleton network was identified in all nonerythroid mammalian cells with components, including spectrins, that are very similar to those found into red blood cells but in most cases are expressed by different genes. There are only two genes encoding α -spectrins. The α I-spectrin is mainly expressed into red blood cells in association with β I. The ubiquitous α II-spectrin (also named α -fodrin) is actually considered as the major α -spectrin expressed in nonerythroid cells, and the α II/ β II heterodimers are the main species described in these cells. Disruption of membrane skeletons through β -spectrin mutations was found to be responsible for the abnormal localization or the maintenance of proteins associated with spectrin-based complexes (4–7).

There are no mammalian models describing α II-spectrin mutations. Defects in the unique α -spectrin ortholog to the α II-gene from vertebrates are lethal in larva in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, arguing for the crucial role of the entire protein (8–10).

α II-spectrin differs from the erythroid α I-spectrin mainly in one feature as follows: the presence of a short region consisting of 36 amino acids encoded by three exons and located in the middle part of the protein near an SH3² domain. This region bears several cleavage sites for different proteases, including calpains and caspases. Moreover, it contains a binding site for calmodulin, and a calmodulin/ α II-spectrin interaction was shown to regulate the cleavage by calpains and caspases (11). We and others found that calpain cleavage is also regulated by phospho/dephosphorylation of the tyrosine residue (position 1176) located in the calpain recognition site (12, 13). More recently, it was shown that this region here named CCC (for calpain, caspase, calmodulin) is also targeted by proteases (*e.g.* Pet) secreted by pathological enteroaggregative strains of *Escherichia coli* (14, 15).

* This work was supported by INSERM and by the Institut National de la Transfusion Sanguine. The project was initiated at unit 409 of INSERM. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] To whom correspondence should be addressed: INSERM U665, Institut National de la Transfusion Sanguine, 6 Rue Alexandre Cabanel, Paris F-75015, France. Tel.: 33-1-44-49-30-00 (ext. 32-02); Fax: 33-1-43-06-50-19; E-mail: gnicolas@idf.inserm.fr.

² The abbreviations used are: SH, Src homology; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; BDP, breakdown product; MEF, murine embryonic fibroblast; PGK, phosphoglycerate kinase; ES, embryonic stem; ALLN, N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal.

Our working hypothesis is that specific proteolysis of α II-spectrin by proteases such as calpains and caspases could be a pathway for local and global membrane skeleton reorganization that occurs during different cellular mechanisms such as cell shape regulation, cell differentiation, motility, or cytokinesis (16). As an example, cells treated with the Pet protease underwent actin remodeling, which might be the consequence of α II-spectrin cutting (15). Cleavage by calpains could be more physiological than cutting by caspases, which are mainly activated during the irreversible apoptotic process. However, calpains can also be overactivated in pathological conditions (17). It has been proposed that the α II-spectrin cleavage during apoptosis can be responsible for the membrane blebbing, which is typical in this process.

To address *in vivo* the role of the CCC α II-spectrin region, we generated mice in which this region is deleted by using gene targeting. This is the first report concerning the description of a murine mutant for α II-spectrin. Surprisingly, homozygous mice expressing this mutant spectrin are healthy, breed normally, and present no histological anomaly, arguing against the role of this particular α II-spectrin cleavage in either major cellular functions or in normal development.

MATERIALS AND METHODS

Construction of the Targeting Vector—Both *Spna1* and *Spna2* genes encoding α I- and α II-spectrin, respectively, have similar intron-exon organizations. The main difference consists in the presence of three additional exons in the *Spna2* gene, which encode the specific CCC region of α II-spectrin (Fig. 1). The first exon (24 bp), which we arbitrarily named exon “24b” (to respect the nomenclature of other exons based on intron-exon organization of *Spna1* gene), encodes an 8-amino acid sequence containing the calpain cleavage site. The two following exons, exons “24c” (36 bp) and “24d” (48 bp), encode the caspase cleavage site and the calmodulin binding domain, respectively. We also named “ Σ 1” for the alternative spliced exon located between exons 22 and 23, which encodes a 20-amino acid sequence specific for the α II Σ 1 isoform. Our strategy consists of the elimination of these three exons using a classical knockout approach. However, the rest of the encoded mutant α II-spectrin was kept intact as the deletion should not impair the translation reading frame.

To evaluate the splicing of the chimeric intron resulting from Cre recombination, a minigene model was developed. A genomic DNA portion of the murine *Spna2* gene, including exon 24, chimeric intron 24/24d, and exon 25, was cloned into pcDNA3 plasmid (Invitrogen). After transfection of this construct into NIH-3T3 fibroblastic cells, we demonstrated that this chimeric intron was correctly spliced using reverse transcription-PCR (data not shown).

The targeted mutation was introduced at the *Spna2* locus by homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. The targeting construct was assembled as follows. All amplifications were performed with *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen). All primers were from Invitrogen or MWG Biotec. Genomic DNA (129/Sv) was amplified using primers 5'-cagtcagcctcgaggagacc-3' and 5'-gggggatccaaccaaggccaccacagacac-3', and the 3.5-kbp amplified product was cloned into XhoI-BamHI-linearized

pBluescript II KS plasmid (Stratagene). The resulting plasmid was linearized with BamHI and NotI, and a 3.6-kbp fragment amplified with primers 5'-gggggatccctaagttcctaagttcctaataagataagtggtttg-3' and 5'-ataagaatgcggccgcataacttcgtatagcatacattatcgaagttattgtaacttggtcccttggga-3' (LoxP site is underlined) was subcloned (after digestion with BamHI and NotI). The resulting plasmid was linearized with NotI and SacII and a 3.5-kbp fragment amplified with primers 5'-gggggatccataacttcgtatagtgatgcatacgaagttatgcggccgcacatgagcctatgggagtcattctc-3' (LoxP site is underlined) and 5'-tccccgcggctcgagacgtgaagtcagagccagtc-3' was subcloned (after digestion with NotI and SacII). The resulting plasmid was linearized with BamHI to receive a 2.1-kbp “floxed” PGK promoter/hygromycin resistance cassette (a generous gift from Marco Giovannini, INSERM U434, Paris, France). Orientation of the cassette was checked. Each cloned fragment was completely sequenced at each step. No mutation was found when compared with sequences from data bases. The 12.7-kbp recombination fragment was separated from pBluescript II KS backbone using XhoI digestion, agarose electrophoresis, gel purification QIAquick PCR purification kit, Qiagen), and then a second purification (QIAquick PCR purification kit, Qiagen).

Gene Targeting in ES Cells and Generation of Chimeras—Following linearization at the XhoI site, the 12.7-kbp targeting vector was electroporated into 129/Sv-ter ES cells grown on feeder layers (Mouse Clinical Institute, Illkirch, France). After hygromycin selection (150 μ g/ml), DNA of resistant clones was analyzed by Southern blot and PCR strategies to identify correctly targeted ES cells. To generate chimeras, targeted ES cells were injected into C57BL/6J host blastocysts that were transferred into foster females. Male chimeras were selected by coat color and crossed with C57BL/6J females to obtain germ line transmission of the targeted *Spna2* allele. Males chimeras were then bred with 129/Sv-ter females in order to put the targeted allele on a homogeneous 129/Sv genetic background. The Cre recombination was performed by crossing mice bearing the targeted *Spna2* allele with the *MeuCre40* transgenic line (18). Recombined alleles were then segregated by crossing the mosaic mice with 129/Sv mice (Charles River Laboratories). In this study we focused only on the allele that recombined between the LoxP site 1 and LoxP site 3 (see Fig. 1). All experiments were performed in compliance with French laws on animal care, using relevant INSERM guidelines.

Genotype Analysis—Genotyping on mouse DNA was performed using Southern blot (data not shown, available upon request) or by using a multiplex PCR to identify wild-type and *Spna2* knock-out alleles. Genomic DNA (0.1–0.5 μ g) was used in a 25- μ l reaction that included five primers as follows: primer 1, 5'-gatctgaagccaatgagtcctggc-3' (forward, annealing in exon 24); primer 2, 5'-tacaatagagaatggccagtcctttgac-3' (forward, annealing in intron 24d), primer 3, 5'-gcacaactgggtaaggtcctattcc-3' (reverse, annealing in intron 24d), primer 4, 5'-cccggcattctgcagcttc-3' (forward, annealing in PGKhygro cassette) and primer 5- 5' tccatggcctcgcgaccg 3' (reverse, annealing in PGKhygro cassette). The wild-type *Spna2*^S allele amplifies a single amplicon (201 bp with primers 2 + 3, see Fig. 2A); the targeted *Spna2* allele amplifies two amplicons (243 bp with primers 2 + 3 and 450 bp with primers 4 + 5), and the Cre

recombined (LoxP site 1 with LoxP site 3) *Spna2^R* allele amplifies one single amplicon (374 bp with primers 1 + 3, see Fig. 2A). PCR was performed as follows: 35 cycles (each cycle consisting of 20 s at 94 °C, 20 s at 65 °C, and 30 s at 72 °C) with an initial denaturation at 94 °C for 4 min, and a final elongation at 72 °C for 5 min in 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.18 mM each primer 1–3, 0.2 mM each primer 4–5, 0.5 unit of Taq polymerase (Invitrogen). The reaction was analyzed on 2% agarose gel containing SYBR Safe (Invitrogen). This PCR method for genotyping gave the same results as Southern blot (data not shown). Cre transgene genotyping was performed as described (19).

Reverse Transcription—Total RNA was extracted from organs biopsies with RNA PLUSTM (Q-Biogen). The cDNA synthesis was performed in 20 μ l with 2 μ g of total RNA, in the presence of 0.5 mM of each dNTP, 10 ng/ μ l of random hexanucleotide primers, 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1 unit/ μ l RNase OUT (Invitrogen), 10 mM dithiothreitol, and 10 units/ μ l SuperScriptTM reverse transcriptase (Invitrogen). The reaction was conducted for 65 min at 42 °C before reverse transcriptase was inactivated for 6 min at 96 °C. After reaction, cDNA was diluted with 80 μ l of 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0). PCR amplification was performed with 2.5 μ l of reverse transcriptase reaction mixture in 25 μ l of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 mM each primer as follows: forward, 5'-gggaagcttcaccatgac-tgaaagcaatgagctcggc-3' (annealing in exon 24), and reverse, 5'-gggctcgaggtgaaacctgtactctgtgtgcac-3' (annealing in exon 25), 0.5 units of Taq polymerase (Invitrogen). PCR was performed as follows: 30 cycles (each cycle consisting of 20 s at 94 °C, 20 s at 60 °C, and 40 s at 72 °C) with an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, and a final elongation step at 72 °C for 5 min. The reaction was analyzed on 1.5% agarose gel containing SYBR Safe (Invitrogen).

Primary Murine Embryonic Fibroblasts (MEFs)—Primary fibroblast cultures were established from E13.5 embryos. The time of fertilization was determined by observation of copulation plugs, and noon of that day was defined as E0.5. Embryos were dissected from pregnant mutant (*Spna2^{R/R}*) females that had been bred with mutant males or from wild-type females (*Spna2^{S/S}*) that had been bred with wild-type males. The yolk sacs, heads, and internal organs were removed. Carcasses were carefully rinsed with D-PBS (Invitrogen), cut into very small pieces with fine scissors, and treated with trypsin/EDTA (Invitrogen; 4 ml per embryo) for 5 min at 37 °C under agitation. Clumps of cells were disrupted by repeated aspirations through a 5-ml pipette. The trypsin was neutralized by adding an equal volume of culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/liter glucose, 110 mg/liter pyruvate sodium, 862 mg/liter GlutaMAXTM I) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin). After centrifugation, the cells were resuspended in culture medium and plated onto 10-cm plates. Fibroblasts were maintained at 37 °C under 5% CO₂. Cells were diluted at a 1:5 ratio 24 h later on new plates, and confluence was obtained 3 days later. They were frozen in 90% fetal bovine serum with 10% Me₂SO. Cells were passed every three or 4 days. We observed a growth crisis after passage 5 (approximately 2

weeks), so the study presented here was only performed with fibroblasts maintained at passage 4 maximum. When indicated, cells were preincubated with 5 μ M calpain inhibitor I (*N*-acetyl-Leu-Leu-norleucinal (ALLN); BioMol).

Induction of Apoptosis—Apoptosis was triggered using either 1 mM H₂O₂ during 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS or UV irradiation (312 nm) for 5 min. The UV irradiation was delivered by six bulbs (15 watts, T15M) on a 35 $\times$ 20 cm surface.

Caspase and Calpain Cleavage Assay—Organs were submitted to an Ultraturrax rotor in the following ice-cold lysis buffer: 50 mM Hepes buffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton, 2 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 20 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml bestatin. For post-mortem analysis, pieces of liver were kept at 4 °C for 48 h and were then treated as the other organs. Triton-soluble extracts correspond to the supernatant obtained after centrifugation at 13,000 rpm (Eppendorf 5415R Centrifuge) for 20 min (4 °C) of the lysed organs previously kept on ice for 20 min. The pellets were further solubilized in the same lysis buffer containing 1% SDS and kept on ice for 20 min; insoluble extracts correspond to the supernatant obtained after centrifugation at 13,000 rpm for 20 min (4 °C) of these resuspended pellets. Extracts from MEF culture were obtained in a similar way except that samples were vigorously vortexed instead of treatment with the Ultraturrax rotor. Protein concentration was measured using the micro-BC assay protein quantification kit (Uptima) with bovine serum albumin (62.5 to 2000 ng) as standard samples. Wild-type or mutant endogenous α II-spectrin present in Triton-soluble cell lysates were submitted to exogenous recombinant proteases. Recombinant caspase 2 (catalog number SE-175, Biomol) and caspase 3 (catalog number 235417, Calbiochem, or catalog number C-1305, A. G. Scientific) were used at 1.5–1.7 units/ μ l of reaction in 10 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) CHAPS, and 50 mM Hepes buffer (pH 7.4) (final volume, 60 μ l) for 2 (caspase 2) or 2–4 h (caspase 3) at 30 °C. Digestion with μ -calpains (catalog number C6108, Sigma) was used with 3.2 units/ μ l of reaction in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 100 nM recombinant calmodulin for 1 h at 30 °C (final volume, 60 μ l). Cleavage reactions were stopped by addition of electrophoresis sample buffer, and the proteins were analyzed by Western blot.

Western Blotting—Samples were analyzed by SDS-PAGE (7% polyacrylamide gel) and transferred onto nitrocellulose membrane (Optitrans[®], Schleicher & Schuell) using a Tris/glycine buffer (Bio-Rad). After saturation in 10 mM phosphate buffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (PBST), and 5% (w/v) nonfat-milk, blots were probed with specific antibodies. Antibodies used are as follows: immunopurified anti-SH3 domain of α II-spectrin (10 ng/ml (12)); anti- α II-spectrin monoclonal antibody (50 ng/ml, FG 6090 antibody, clone AA6; BioHit); immunopurified anti-CCC region obtained by immunization of rabbits against the NH₂-Cys-Ser-Lys-Thr-Ala-Ser-Pro-Trp-Lys-Ser-Ala-Arg-Leu-Met-Val-His-Thr-Val-Ala-Thr-Phe-Asn-Ser-Ile-Lys-COOH peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin (1:500 dilution; Covalab). The antibodies against the mutant α II-spectrin were obtained by immunization of rab-

TABLE 1

 K_a/K_s values of the CCC region

Alignment of the nucleotide and amino acid (in black) sequences of exons 24b, 24c, and 24d of α II-spectrin from various species. Hs, *H. sapiens*; Pt, *P. troglodytes*; Mm, *M. musculus*; Rn, *R. norvegicus*; Bt, *B. taurus*; Cf, *C. familiaris*, and Gg, *G. gallus*. Changes in nucleotides or amino acids (compared to the human sequences) are indicated in gray.

	<	exon 24b										>	<	exon 24c										>
Hs-		gaa	gtg	tat	ggc	atg	atg	ccc	agg	gat	gaa	act	gat	tcc	aag	aca	gcc	tcc	ccg	tgg	aag			
Hs-		E	V	Y	G	M	M	P	R	D	E	T	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Pt-		gaa	gtg	tat	ggc	atg	atg	ccc	agg	gat	gaa	act	gat	tcc	aag	aca	gcc	tcc	ccg	tgg	aag			
Pt-		E	V	Y	G	M	M	P	R	D	E	T	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Mm-		gag	gtg	tat	ggt	gcg	atg	ccc	agg	gat	gaa	gca	gat	tcc	aag	acg	gcc	tcc	cca	tgg	aag			
Mm-		E	V	Y	G	A	M	P	R	D	E	A	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Rn-		gag	gtg	tat	ggt	atg	atg	ccc	agg	gat	gaa	gca	gat	tcc	aag	acc	gcc	tcc	cca	tgg	aag			
Rn-		E	V	Y	G	M	M	P	R	D	E	A	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Bt-		gag	gtg	tat	ggc	gcg	atg	ccc	agg	gat	gaa	tct	gat	tcc	aag	aca	gcc	tcc	cct	tgg	aag			
Bt-		E	V	Y	G	A	M	P	R	D	E	S	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Cf-		gag	gtg	tat	ggc	atg	atg	ccc	agg	gat	gac	acg	gat	tcc	aag	act	gca	tcc	cct	tgg	aag			
Cf-		E	V	Y	G	M	M	P	R	D	D	T	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
Gg-		gaa	gtc	tat	gga	atg	atg	ccc	aga	gat	gaa	act	gat	tct	aag	aca	gcc	tct	cct	tgg	aag			
Gg-		E	V	Y	G	M	M	P	R	D	E	T	D	S	K	T	A	S	P	W	K			
	<	exon 24d										>												
Hs-		tct	gct	cgt	ctg	atg	gtt	cac	acc	gtg	gcc	acc	ttt	aat	tcc	atc	aag							
Hs-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Pt-		tct	gct	cgt	ctg	atg	gtt	cac	acc	gtg	gcc	acc	ttt	aat	tcc	atc	aag							
Pt-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Mm-		tct	gct	cga	ctg	atg	gtc	cat	aca	gtg	gct	acc	ttc	aac	tcc	atc	aag							
Mm-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Rn-		tct	gct	cga	ctg	atg	gtc	cac	aca	gtg	gcc	acc	ttc	aac	tcc	atc	aag							
Rn-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Bt-		tct	gct	cgc	ctg	atg	gtt	cac	acc	gtg	gcc	acc	ttt	aat	tcc	atc	aag							
Bt-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Cf-		tct	gct	cgt	ctg	atg	gtt	cat	acc	gtg	gcc	acc	ttt	aat	tcc	atc	aag							
Cf-		S	A	R	L	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							
Gg-		tct	gca	cgt	atg	atg	gta	cac	aca	gtg	gca	acc	ttt	aac	tca	atc	aag							
Gg-		S	A	R	M	M	V	H	T	V	A	T	F	N	S	I	K							

bits with NH₂-Ala-Val-Gln-Gln-Glu-Leu-Asn-Glu-Arg-COOH peptide coupled to keyhole limpet hemocyanin (200 ng/ml; DB-BioRun). Immunopurifications were performed against the immunization peptide or recombinant α II-spectrin peptide with HiTrap column (Amersham Biosciences). Immunocomplexes with immunopurified antibodies against mutant α II-spectrin were performed in 50 mM Tris buffer (pH 7.2), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂. Other immunocomplexes were formed in PBST with or without 5% (w/v) nonfat milk. Detections were performed with either anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Nordic Immunological Laboratories) using the Supersignal West Pico chemiluminescence substrate (Pierce) and Gel DocTM system (Bio-Rad).

Immunohistochemistry on MEF—Cells cultured on glass slides were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and washed in PBS. Free aldehyde groups were blocked by 50 mM

NH₄Cl for 10 min. Slides were washed in PBS, permeabilized in 0.5% Triton for 15 min, and washed again in PBS. To reduce nonspecific binding, slides were incubated in 0.1% PBS/BSA for 15 min. They were then incubated with rabbit polyclonal anti-SH3 α II-spectrin antibody diluted at 2 μ g/ml (0.1% PBS/BSA) for 1 h at room temperature. After washings (0.1% PBS/BSA), slides were incubated for 1 h at room temperature with Alexa FluorTM 488 goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution) and Alexa FluorTM 568 phalloidin (1:50 dilution; Molecular Probes) diluted in 0.1% PBS/BSA. Samples were examined by confocal microscopy using a Nikon Eclipse TE300 inverted microscope equipped with a 60 $\times$ oil immersion objective NA 1.4 and a D-Eclipse C1 confocal system.

Immunohistochemistry on Tissue Sections—Organs were fixed in 4% formaldehyde (Carlo Erba) in PBS and embedded in paraffin, and 3- μ m sections of the paraffin block were deparaffinized with EZ-DeWaxTM (BioGenex). Rehydration was com-

TABLE 2

K_a/K_s values of the CCC region

The value of K_a/K_s is calculated and indicated for each couple of vertebrates.

	<i>H. sapiens</i>	<i>P. troglodytes</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>C. familiaris</i>
<i>P. troglodytes</i>	0					
<i>M. musculus</i>	0.051	0.051				
<i>R. norvegicus</i>	0.022	0.022	0.198			
<i>B. taurus</i>	0.291	0.291	0.020	0.080		
<i>C. familiaris</i>	0.042	0.042	0.080	0.038	0.220	
<i>G. gallus</i>	0.013	0.013	0.029	0.016	0.048	0.012

pleted in demineralized water. Slides were then incubated in 1× Target Retrieval Solution at pH 9.0 (DakoCytomation) and heated for 40 min at 98 °C in a heated water bath. This step unmasked antigen and allowed immunostaining on formaldehyde-fixed paraffin sections, as determined in preliminary experiments (not shown). The tank containing slides was cooled at room temperature for 20 min. To reduce nonspecific binding, sections were rinsed in 0.1% PBS/BSA for 5 min and preincubated for 20 min with antibody diluent with background reducing components (DakoCytomation). The labeling procedure was as follows: affinity-purified anti-SH3 antibodies (4 μg/ml), diluted in antibody diluent with background reducing components, were applied for 1 h at room temperature. After intensive washes with 0.1% PBS/BSA, sections were incubated with a 1:200 dilution (in antibody diluent with background reducing components) of Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) for 30 min at room temperature, followed by washings in 0.1% PBS/BSA. Nuclei were labeled by incubation of 0.2 μg/ml propidium iodide in 0.1% PBS/BSA for 15 min. Sections were mounted with ProLong™ Gold (Molecular Probes) and then examined by confocal microscopy.

We took advantage of the platform present at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) to perform an extensive histological analysis on mutant males ($n = 3$) or females ($n = 3$) and control wild-type male ($n = 1$) and female mice ($n = 1$). Mice were 6 months old. Organ biopsies analyzed were the salivary glands, pancreas, stomach (trimmed after fixation), duodenum, distal ileum, proximal colon, liver (the median lobe and half of the left lateral lobe), spleen, kidney (trim before fixation), urinary bladder, adrenal glands (both), mesenteric lymph nodes, thoracic aorta, trachea, thyroid gland, esophagus, thymus, heart, entire lung, leg muscle, tongue, white adipose

tissue (paragenital fat pad), brown adipose tissue, dorsal tail, footpad and snout skin, eye, Harderian gland, knee joint, brain, and hypophysis. Specific samples from males were preputial gland, right testis and epididymis (fixed in Bouin's fluid), left testis, and epididymis (fixed in neutral buffered formalin), prostate and seminal vesicles. Supplementary samples from females were ovaries, oviducts, vagina, uterus body, uterine horns, and urinary bladder.

K_a/K_s Values—The K_a/K_s value is the ratio of the number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s), with K_s indicating the background rate of evolution. These parameters allow an estimation of the selective forces acting on a protein sequence during evolution. If a sequence should be kept intact, a K_a/K_s value lower than 1 is expected. The process is called “purifying selection.” The K_a/K_s analysis was performed using DnaSP software using cDNA from exons 23 to 27 and protein sequences available from *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, and *Gallus gallus*.

RESULTS

Analysis of the Selection Pressure on the Central Domain of the α II-spectrin Using the K_a/K_s Evaluation Method—Analysis of the CCC sequences from data bases reveals that this region is highly conserved in vertebrates but does not exist in invertebrates. To estimate the level of constraint on the CCC region, we aligned the orthologous sequences of exon 24b, 24c, and 24d from different species (Tables 1 and 2). Compared with human, the murine sequence (separated by 91 million years (20)) shows 3 nonsynonymous mutations and 12 synonymous mutations in exon 24b, 24c, and 24d with the consequence that there are only two substitutions leading to amino acid change, giving a K_a/K_s

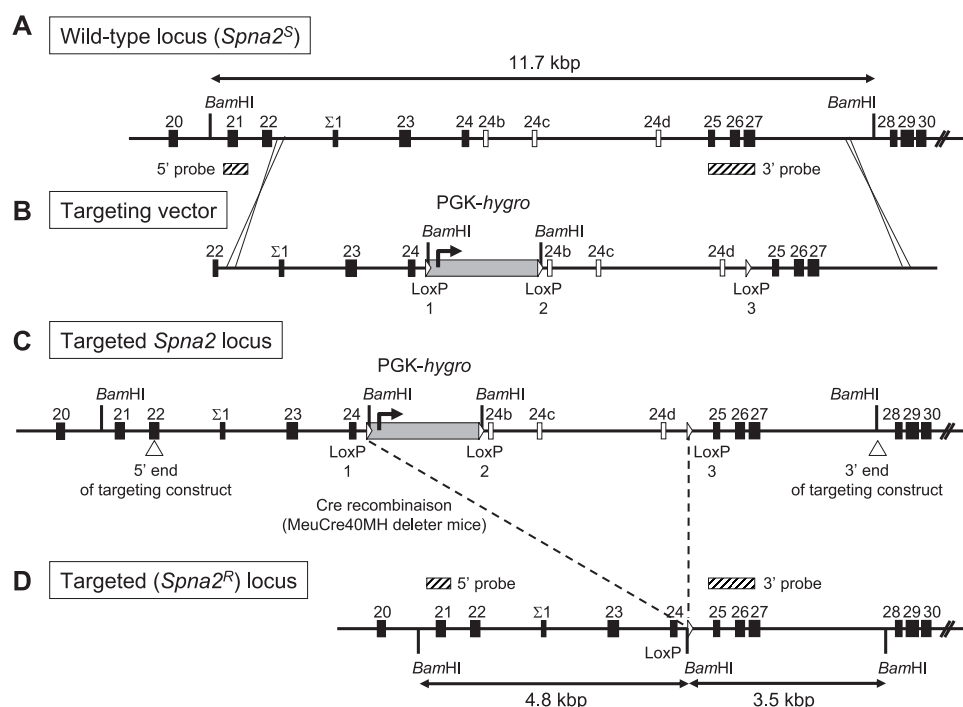


FIGURE 1. Schematic representation of the genomic structure of the wild-type murine *Spna2^S* allele (A), the targeting construct (B), the targeted *Spna2* allele (C), and the *Spna2^R* allele between exons 20 and 30 (D). Exons encoding the CCC region are represented by white boxes, and other exons are represented by black boxes. A floxed PGK-hygromycin cassette (PGK-hygro), shown in gray (the arrow indicates transcriptional orientation), was introduced into intron 24. The LoxP sites are represented by white arrowheads. A third LoxP was introduced into intron 24d. BamHI cleavage sites are indicated. The 5' and 3' ends of the targeting construct are indicated by white arrowheads. The 5' and 3' probes are indicated by hatched boxes. After recombination with a Cre transgenic line (18), the resulting *Spna2^R* allele lacks exons encoding the CCC region and encodes the mutant α II-spectrin.

of 0.051 (Tables 1 and 2). Compared with human, the chicken sequence (separated by 310 million years (20)) shows 1 nonsynonymous mutation and 13 synonymous mutations resulting in only one substitution at the protein level and a K_a/K_s of 0.013. These data reveal that the CCC region is under a strong purifying selection. The pressure to keep intact the protein sequence suggests that the CCC region has at least one important function. It should be noted that the purifying selection is not restricted to the CCC region because K_a/K_s values $\ll 1$ were also found when flanking exons (exon 23 to exon 27) were analyzed.

Generation of Mice—To assess the role of the CCC region and particularly the cleavage of α II-spectrin, we generated a murine model in which the three exons encoding the region were disrupted by gene targeting in embryonic stem cells. The *Spna2* targeting strategy (shown in Fig. 1) introduces two LoxP sites, one upstream of the exon 24b and the other one downstream of the exon 24d allowing the deletion of the exons encoding the CCC region by Cre recombinase. The rest of the encoded mutant α II-spectrin was kept intact as the deletion should not impair the translation reading frame.

Analysis revealed that 20 of 37 hygromycin-resistant ES clones underwent homologous recombination at the *Spna2* locus. Germ line transmission of the mutant allele was achieved with one targeted ES clone in which no additional sites of integration were detected. Chimeric males were crossed with C57BL/6 and 129/Sv females to obtain the targeted *Spna2* allele on C57BL/6–129/Sv mixed or 129/Sv

genetic background, respectively. Mice heterozygous for this allele were bred with mice carrying a Cre transgene allowing us to eliminate targeted exons (18). This Cre recombination produces a chimeric intron composed of the upper half of intron 24 and the lower part of intron 24d (Fig. 1D). As the resulting allele should produce an α II-spectrin resistant to different proteolytic processes (see below), we named this allele, *Spna2^R* (R for resistant) in comparison to the wild-type allele, *Spna2^S* (S for sensitive). Therefore, wild-type mice are named S/S, heterozygous mice S/R, and homozygous mutant mice R/R.

The genotyping shows a mendelian proportion of each genotype on mixed genetic background (containing a contribution of 129/Sv and C57BL/6; Table 3). The homozygous mutant mice ($n = 63$, aged up to 18 months) did not exhibit a particular phenotype and were indistinguishable from heterozygous or wild-type littermates. These animals were healthy and had a normal

cage behavior. Furthermore, when interbred, homozygous mutant males and females gave rise to litters that were composed of healthy mice.

We first analyzed this mutation at the RNA level using reverse transcription-PCR and primers located in exons 24 and 25, flanking targeted exons 24b, 24c, and 24d. In homozygous R/R mice, we found that liver and kidney expressed a product of the expected size of 221 bp (Fig. 2B). Sequencing of this amplicon confirmed the deletion of the three exons and a correct boundary between exon 24 and 25 (Fig. 2C), indicating that the chimeric intron resulting from Cre/LoxP recombination between intron 24 and 24d has been correctly spliced. We further analyzed the mutant spectrin at the protein level. We prepared Triton-soluble lysates from organs from mice with different genotypes and analyzed them by Western blotting using different antibodies directed against α II-spectrin. We prepared an antibody directed against the CCC region (from Ser-1186 to Lys-1209). This antibody reveals a protein of the expected size (285 kDa) in samples prepared from wild-type and heterozygous mice (Fig. 2D). This antibody does not recognize any band in samples obtained from homozygous mutant mice. We also prepared a specific antibody against the protein junction resulting from fusion of exon 24 with 25. This antibody reveals a protein of the expected size (280 kDa) in heterozygous and homozygous mutants but not in wild-type mice (Fig. 2D). As a control, we reprobated blots using either the purified polyclonal antibodies recognizing the α II-spectrin SH3 domain (Fig. 2D) or the monoclonal antibody AA6 (data not shown). Both anti-

TABLE 3

Number of mice of each genotype obtained from crossings between *S/R* males and females

Genotypes were determined by PCR at postnatal days 10–12 as described under "Materials and Methods."

	<i>S/S</i> mice	<i>S/R</i> mice	<i>R/R</i> mice	Total
Pups	23 (27.1%)	42 (49.4%)	20 (23.5%)	85 (100%)

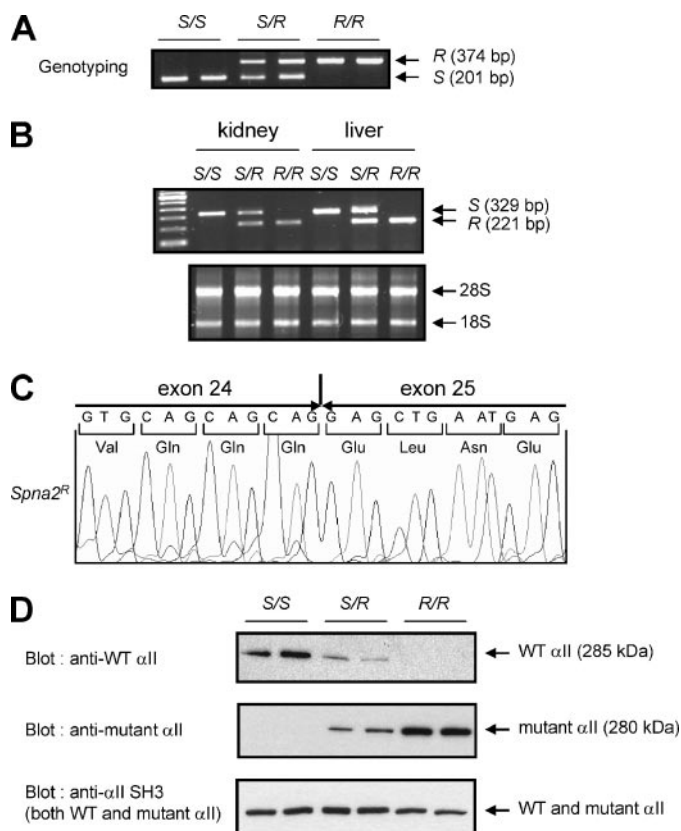


FIGURE 2. The mutant α II-spectrin is correctly expressed. *A*, DNA from each genotype (wild-type *S/S*, heterozygous *S/R*, and homozygous *R/R*) was extracted and amplified as described under "Materials and Methods." Amplification from *Spna2*^S (wild-type) allele and *Spna2*^R (mutant) allele were 201 and 374 bp, respectively. *B*, total RNA was isolated from mouse liver and kidney and reverse-transcribed. Resulting cDNA was amplified with primers annealing in exons 24 and 25. A 329- and a 221-bp fragment was amplified from *Spna2*^S and *Spna2*^R cDNA, respectively. Each sample shows a similar amount of total RNA. *C*, electropherogram of the sequenced 221-bp amplicon reveals a correct deletion of the three targeted exons. *D*, liver lysates from different mice were prepared, and proteins (50 μ g) were separated by SDS-PAGE on 7% acrylamide gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and hybridized with antibodies specific either for wild-type (WT) (top), mutant α II-spectrin (middle), or with antibodies recognizing both α II-spectrins (bottom). This figure is a representation of two independent mice of each genotype.

bodies reveal wild-type and mutant spectrins. We did not find any significant variation in the amount of α II-spectrin between the different samples. Thus the mutation we introduced does not alter α II-spectrin expression either at the RNA or at the protein levels.

An extensive histopathological examination of 6-month-old male ($n = 3$) and female ($n = 3$) mutants and wild-type male ($n = 1$) and female ($n = 1$) counterparts failed to detect any significant anomaly in mutant mice (data not shown). Furthermore, no abnormalities were found in several organs (kidney, liver, colon, spleen, and brain) from 18-month-old mice. We

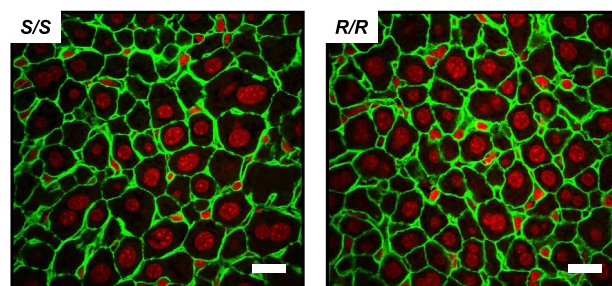


FIGURE 3. α II-spectrin immunodetection in liver from *S/S* or *R/R* mice. α II-spectrin (pseudocolored in green) was stained with affinity-purified polyclonal antibodies against α II-spectrin SH3 domain on 3- μ m tissue sections from the liver of mice. Nuclei were counterstained with propidium iodide (pseudo-colored in red). Scale bar, 20 μ m. No differences were observed between wild-type and mutant liver samples. Similarly, no anomalies have been identified in all others investigated organs (data not shown).

assumed that this mutation affects only the fragility of α II-spectrin to proteases and not its ability to be incorporated into membrane skeleton, because all domains responsible for interaction with other molecular partners are presumably kept intact. Therefore, we analyzed the cell location of mutant spectrin in different tissues by immunohistochemistry using antibodies against the SH3 domain. In all organs analyzed (brain, heart, lung, stomach, spleen, duodenum, colon, liver, kidney, and skin), the α II-spectrin distribution was the same regardless of whether it was expressed in wild-type or mutant mice. One example in liver is presented in Fig. 3. We did not find any sign of intracellular accumulation of α II-spectrin.

Our results showed that the specific CCC region of α II-spectrin seems dispensable with regard to mouse reproduction and development. These features could be explained by the use of other cleavage sites by calpains and caspases. So it was important to show unambiguously that the mutant *Spna2*^R allele bears the expected properties. We therefore further analyzed the proteolytic pattern of mutant α II-spectrin.

Mutant Spectrin Is Resistant to Proteases in Vitro—In a first approach, α II-spectrin present in Triton-soluble lysates from *S/S* and *R/R* livers was submitted to proteases such as μ -calpain (calpain I), caspase 2, and caspase 3. α II-spectrin is cleaved by the two ubiquitous calpains, called m and μ , which differ by the calcium concentration required for activation (m-calpain is activated by millimolar calcium and μ -calpain by micromolar calcium). As expected, μ -calpain digestion of wild-type spectrin generates a unique N-terminal breakdown product (136 kDa calculated) and two C-terminal breakdown products (Fig. 4B, Cter BDP). The 150-kDa C-terminal BDP (calculated molecular mass of 149 kDa) arises from the calpain cleavage site at residue Tyr-1176. The cleavage site producing the 145-kDa C-terminal BDP is unknown. In contrast, α II-spectrin in *R/R* lysates is resistant to calpain digestion (Fig. 4B).

Caspase 3 is a well characterized protease of the CCC region. It was shown previously that the degradation of α II-spectrin occurs in a two-step mechanism (21). First, caspase 3 cuts in the CCC region behind Asp-1185, generating a 137-kDa N-terminal BDP and a 148-kDa C-terminal BDP. The 148-kDa fragment is further cleaved after the Asp-1478, generating 34- and 114-kDa fragments (often described as the "120-kDa" fragment) as shown in Fig. 4A. In our *in vitro* experiments, caspase

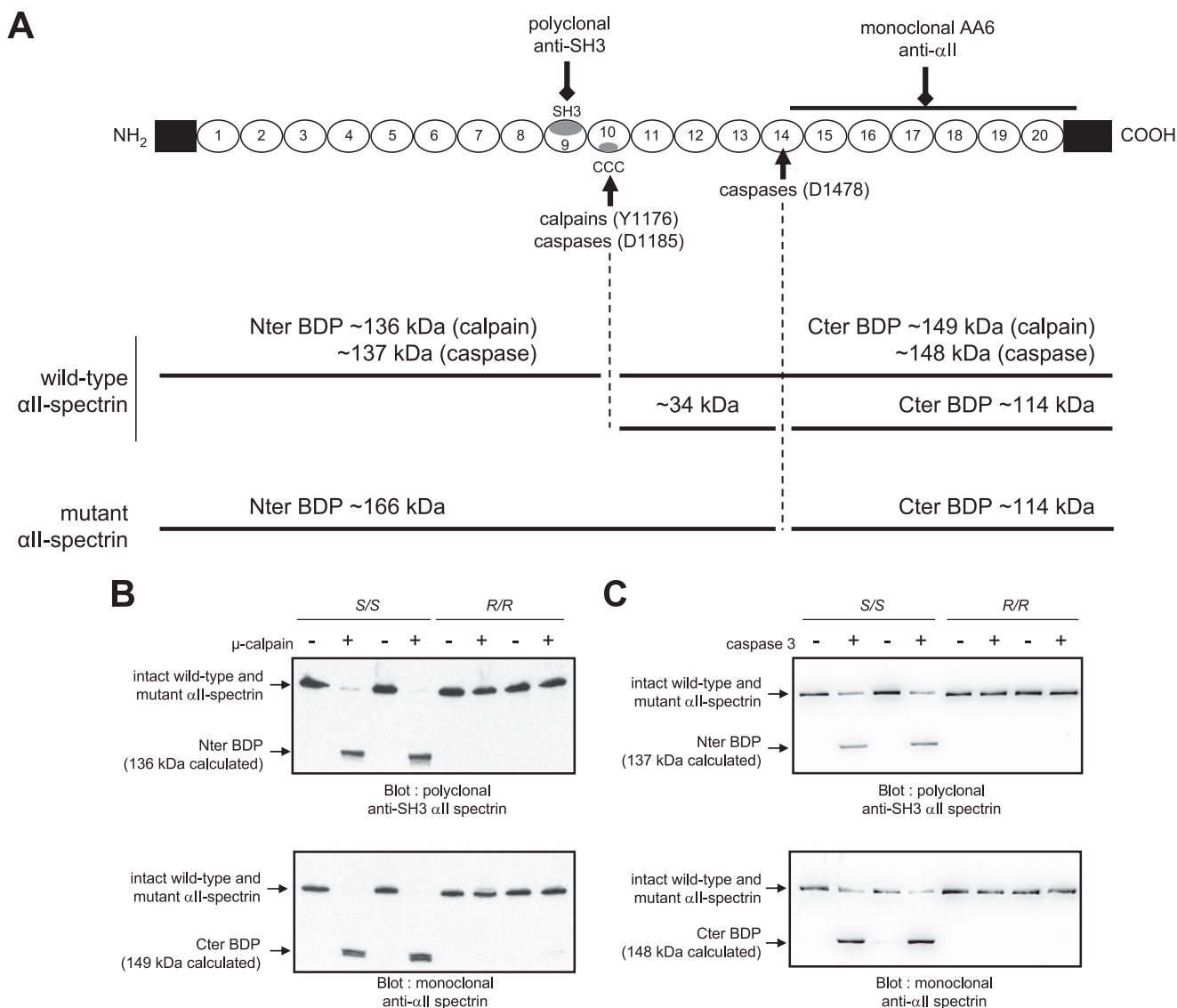


FIGURE 4. α II-spectrin breakdown in liver lysate from S/S and R/R mice. *A*, wild-type α II-spectrin molecule is represented by a succession of triple helical repeats (ovals with numbers) and by the nonhomologous N- and C-terminal ends (black rectangles). The SH3 domain and the CCC region are also indicated. Depicted are the caspase and calpain cleavage sites (each enzyme cleaves behind the indicated amino acid) in α II-spectrin and the produced breakdown products from each wild-type and mutant α II-spectrins. Both halves of α II-spectrin are revealed as follows: the anti-SH3 antibodies reveal the N-terminal breakdown product because the SH3 domain is upstream of the CCC region. The monoclonal anti- α II-spectrin antibody AA6 reveals the C-terminal fragments (C-ter BDP) of α II-spectrin because the epitope is located downstream of the CCC region, in a region included between repetitive units 14 and 21 (21). *B* and *C*, detergent extracts (50 μ g) obtained from livers of different mice were subjected to *in vitro* digestion with μ -calpain (*B*, 3.2 units/ μ l of reaction) with 100 nM calmodulin at 30 °C for 1 h, or with caspase 3 (*C*, 1.5 units/ μ l of reaction) at 30 °C for 4 h, or were sham-digested without enzyme. After SDS-PAGE (7% acrylamide), Western blots were probed with either polyclonal anti- α II-spectrin SH3 domain (upper panel) or monoclonal anti- α II-spectrin (lower panel). The size of each breakdown product is indicated. The mutant spectrin is resistant to digestion with caspase or calpain. This figure is a representation of two independent mice of each genotype.

3 cuts wild-type spectrin from Triton-soluble lysates only at the first site and not at the second site as shown in Fig. 4C with the detection of the 137- and 148-kDa products revealed by both antibodies. We found that mutant α II-spectrin is completely resistant to caspase 3. Caspase 2 cuts α II-spectrin from wild-type lysate at the same major cleavage site as caspase 3 but not in the second site (11, 21). Mutant α II-spectrin is also completely resistant to caspase 2 (data not shown).

It has been shown that calpains are activated in post-mortem samples (22). So we analyzed the endogenous proteolytic pattern of α II-spectrin prepared from pieces of liver kept at 4 °C during 48 h. This analysis was performed by Western blot on

spectrin present in detergent-soluble (Triton) fractions. In S/S samples, α II-spectrin is nearly completely cleaved with the presence of one band of 145/150 kDa corresponding to the C-terminal end as detected by monoclonal antibody against α II-spectrin (Fig. 5). This profile resembles those observed with calpain digestion. The 114-kDa C-terminal BDP, which is specific of caspase digestion, is not produced under these conditions. In the R/R samples obtained under such conditions, we observed that α II-spectrin is also strongly resistant as indicated by the high amount of native α II-spectrin concomitant with the absence of cleavage product. In S/R samples, we found an intermediate pattern of digestion (Fig. 5). Collectively, all these *in*

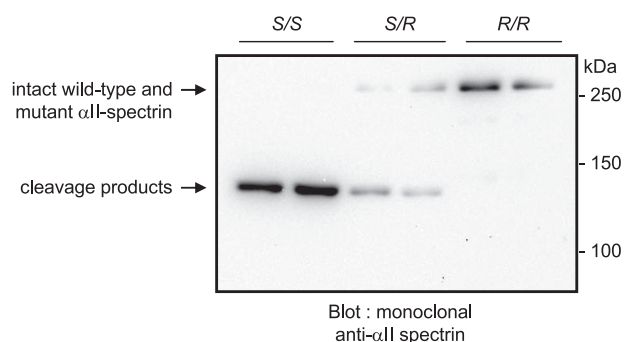


FIGURE 5. The mutant spectrin is resistant to post-mortem proteolysis. Pieces of liver were taken from *S/S*, *S/R*, and *R/R* mice and kept at 4 °C for 48 h. Then detergent extracts were prepared (100 μ g) and separated by SDS-PAGE (7% acrylamide). Western blot was probed with monoclonal anti- α II-spectrin. This figure is a representation of two independent mice of indicated genotype.

in vitro experiments revealed that the mutant α II-spectrin produced by mutant *R/R* mice is strongly resistant to proteolysis.

Analysis of *ex Vivo* Cleavage—We further analyzed the behavior of mutant spectrin in cultured primary MEF prepared from *S/S* or *R/R* embryos. We observed that *Spna2*^{*R/R*} MEFs have a similar behavior than their *Spna2*^{*S/S*} counterparts in general growth properties. The morphology of *S/S* or *R/R* MEFs was alike with the presence of stress fibers crossing through the cell and a rim of cortical actin (see examples in Fig. 6, *A* and *B*). Apoptosis was induced in MEFs by UV irradiation. After UV treatment we observed a high proportion of nonadherent cells. Fluorescence-activated cell sorter analysis revealed that they are positive for propidium iodide staining (data not shown) and thus correspond to dead cells. We focused our attention on the status of α II-spectrin cleavage in the population of these dead cells (nonadherent) and the population of still viable (adherent) cells. In contrast to the proteolytic pattern obtained on α II-spectrin presented in cell lysates with exogenous proteases (Fig. 4), α II-spectrin in irradiated dead wild-type and mutant MEFs was completely digested (Fig. 7*A*). The monoclonal anti- α II-spectrin reveals the production of 114-kDa breakdown products demonstrating that caspases can cut at the second site whatever the genotype of α II-spectrin (Fig. 7*A*). When we analyzed the digestion profile using the anti-SH3 antibody, we found the typical 136-kDa breakdown product for α II-spectrin from wild-type dead MEFs. We observed a shift of the size (166 kDa) of the breakdown product for α II-spectrin from mutant MEFs because of the disappearance of the central site and the use of the second site (see Figs. 4*A* and 7*B*). Triton-insoluble fractions produced very similar results with both antibodies (not shown). Thus our experiments showed, as expected, that caspases cannot cleave *ex vivo* in the CCC region and that the secondary site can be used during apoptosis independently of the site present in the CCC region.

The CCC Region Is Not Involved in the Production of Blebs during Apoptosis—It was hypothesized that α II-spectrin cleavage is involved in the blebbing of membrane that occurs during apoptosis. To clarify this point, we triggered apoptosis using UV irradiation in our MEF model, fixed cells, and stained them with anti- α II-spectrin antibody and phalloidin. As shown in Fig. 6 (*C–F*), blebs were present in wild-type

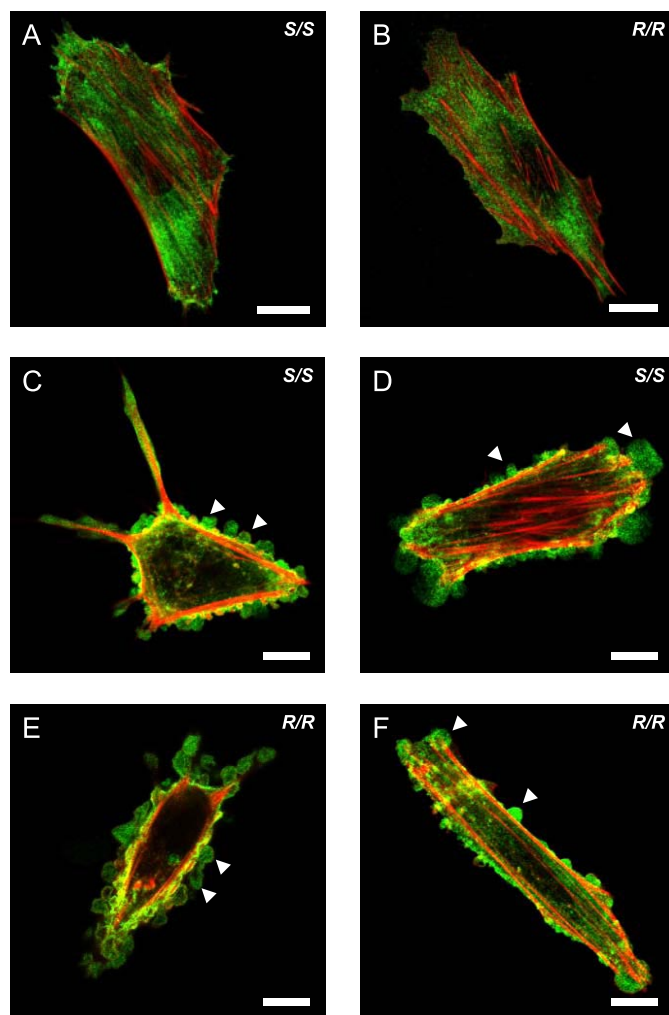


FIGURE 6. Murine embryonic fibroblasts from *S/S* and *R/R* embryos were cultured and fixed. The α II-spectrin (pseudocolored in green) was stained with affinity-purified polyclonal antibodies against α II-spectrin SH3 domain. Actin (pseudo-colored in red) was stained with phalloidin. *S/S* and *R/R* MEFs were untreated (*A* and *B*) or submitted to UV irradiation (*C–F*). Membrane blebbing is indicated with arrowheads. Scale bar, 20 μ m.

MEF as well as in mutant MEF with no noticeable difference between them. This experiment demonstrated that blebbing can occur without any cleavage in the CCC region. Apoptosis triggered by H₂O₂ gave similar results concerning the cleavage profile of mutant α II-spectrin or the production of blebs (data not shown).

Finally, we analyzed the calpain-specific cleavage. We took advantage of the fact that in our culture conditions, α II-spectrin is cut in the CCC region in adherent MEFs when they are freshly spread (30,000 cells/cm²) on plastic with 10% SVF. We observed two breakdown products with *S/S* MEF of 145 and 150 kDa (Fig. 8*A*). The 150-kDa product probably corresponds to cleavage by caspases, whereas the 145-kDa corresponds to cleavage by calpain. When MEF were incubated with calpain inhibitor ALLN, the lower band is not produced (Fig. 8*B*), indicating that this product is specifically processed by calpains. The *R/R* MEFs produced neither the higher band nor the lower band, again clearly indicating that mutant α II-spectrin is resistant to calpain in *ex vivo* conditions (Fig. 8*B*).

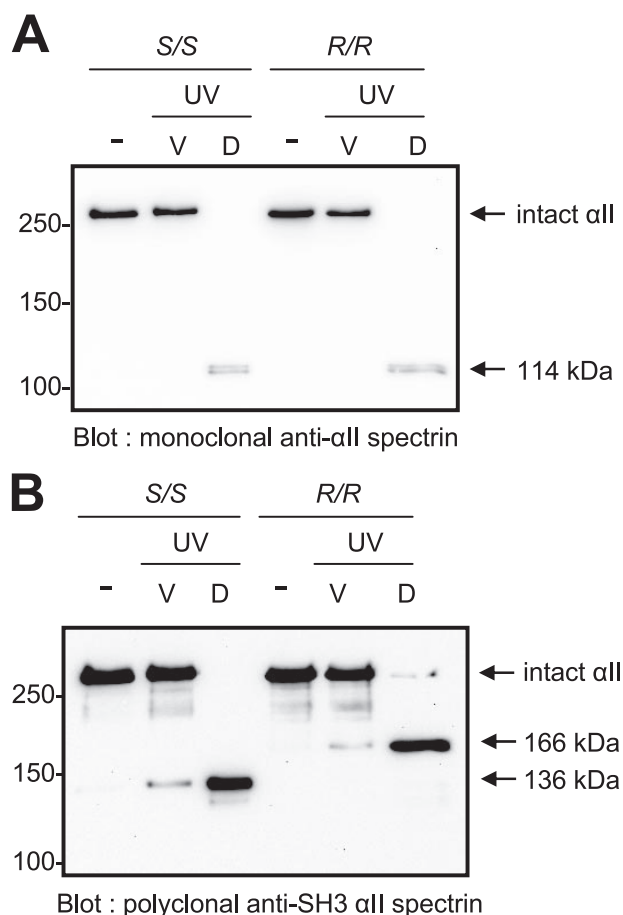


FIGURE 7. Twenty-four hours after UV treatment, both adherent viable cells (V) and nonadherent dead cells (D) were harvested separately. Western blot analysis of the Triton-soluble fractions were performed using either monoclonal anti- α II-spectrin (A) or polyclonal anti- α II-spectrin SH3 domain (B). The size of each breakdown product (BDP) is indicated.

DISCUSSION

Previous genetic studies in *D. melanogaster* and *C. elegans* have demonstrated that mutations in the unique α -spectrin ortholog to the α II-gene of the vertebrates are lethal in larva (8–10), and we assumed that the entire α II-spectrin would also have important functions in vertebrates. Hence, we defined a domain targeting strategy and focused our attention on the specific CCC region, which contains the calpain and caspase cleavage sites as well as the calmodulin binding domain. As indicated by K_a/K_s analysis, this region is highly conserved during the evolution of vertebrates, including in species that diverged several hundred million years ago. We hypothesized that the CCC region bears at least one important function in vertebrates, and we created a murine model specifically lacking the CCC region. It should be noted that this region does not exist in α II-spectrin from invertebrates. Surprisingly, we obtained healthy homozygote mice with a normal cage behavior. Histological and immunohistochemical analysis demonstrated lack of abnormalities at the organ or cellular level and question the importance of α II-spectrin cleavage *in vivo*.

Is α I-spectrin able to compensate the mutant α II-spectrin? This hypothesis is unlikely because the replacement of mutant α II by α I should not lead to the production of an α -spectrin sensitive to cleavage because of the absence of a CCC-like

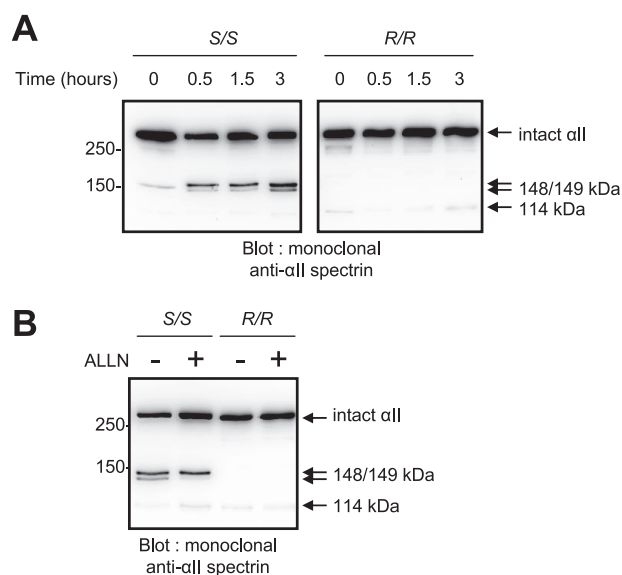


FIGURE 8. A, MEFs were plated onto uncoated dishes and cultured for 0.5, 1.5, or 3 h. Cells were harvested, and detergent-soluble lysates were prepared. Western blot analysis was performed using monoclonal anti- α II-spectrin. The size of each breakdown product is indicated. B, MEFs were harvested and incubated in new dishes with 5 μ M calpain inhibitor ALLN in 0.1% Me₂SO (+) or in 0.1% Me₂SO alone (–) for 3 h. Cells were harvested, and detergent-soluble lysates were prepared. Western blot analysis was performed using monoclonal anti- α II-spectrin. The size of each breakdown product is indicated.

region in α I. Moreover, we did not find any decrease of α II-spectrin expression in tissues from mutant mice. Does an α III chain exist? This seems unlikely because analysis of the human and the murine genome does not suggest the existence of such a novel spectrin, a possibility that has not been formally excluded. Another compensatory mechanism, if it exists, may involve the cleavage of β II-spectrin, which is also targeted by caspases and calpains (21). Although a high affinity binding site for calmodulin is not present within β II-spectrin, calpain cleavage of β II-spectrin is modulated by the presence of calmodulin (23, 24). The following mechanism has been suggested: after the initial calpain cleavage of α II-spectrin, calmodulin binding on α II-spectrin exposes a calpain-cleavage site on the β II chain, then disrupts the (α II/ β II)₂ spectrin tetramer, and finally down-regulates the binding of α II/ β II spectrin to actin (25). Consequently, we expected that removing the principal binding site for calmodulin should have consequences for proteolysis of both chains. We demonstrated that β II-spectrin from mutant lysates can be cleaved *in vitro* by calpains suggesting that the calpain sites of β II are accessible despite the disappearance of the CCC region (data not shown). As a result, the synergy of cleavage between α II and β II is still not clear. Furthermore, a compensatory mechanism via β -chain cannot explain the strong conservation of the CCC region in vertebrates.

We found that the mutant spectrin lost its sensitivity to caspase in its central region. However, the second caspase site is functional *ex vivo*, but we failed to obtain digestion at this site *in vitro*. A simple explanation for the difference between our *in vitro* and *ex vivo* experiments could be that the second site is cleaved by an uncharacterized protease. However, thymocytes derived from caspase 3-deficient mice that underwent apopto-

sis failed to produce cleavage at this second site (26). Alternatively, this protease could be under the control of caspase 3.

In red blood cells, it is well established that a loss of interaction between proteins of membrane skeleton can be associated with blebbing of cells and loss of membrane materials (example in Refs. 27 and 28)). With regard to the similarity between the major components of membrane skeleton from erythroid and nonerythroid cells, it has been proposed that cleavage of spectrin could be responsible for membrane blebbing observed during apoptosis (29, 30). Because we observed normal blebbing in mutant MEFs that underwent apoptosis, we concluded that proteolysis of the CCC region during apoptosis is not an initially required event in this process or that the cleavage at the second site of α II or in β II-spectrin is sufficient for it. Several studies suggested that α II-spectrin is initially cleaved at a caspase 3 consensus site (Asp-1185), and this primary event likely alters the structural conformation of the protein exposing subsequent cleavage sites and altering cytoskeletal integrity (31). However, this is not compatible with our results.

The α I and β I chains that form spectrin tetramers found in red blood cells interact with a lower affinity than α II and β II chains (32). Thus, the erythroid membrane skeleton is probably more flexible than the membrane skeleton found in nonerythroid cells. This physical property could be responsible for the deformability and remarkable stability to shear stress. We assume that specific proteolytic processes exist in α II-spectrin to deform the robust membrane skeleton of cells, e.g. during cell differentiation or mitosis. In fact, it was demonstrated that spectrin redistributes to the cytosol during mitosis (33). However, taking into account all our results, we concluded that CCC deletion introduces a change in the proteolytic property of α II-spectrin but clearly had no severe consequences for these mice or cells derived from them. It should be noted that if a partial proteolytic process by caspases is maintained, this is not the case for calpain proteolysis. Thus we argued that the good health of the mutants cannot only be explained simply by the maintenance of the second caspase site, especially as it was demonstrated that the cleavage at this site occurs only when cells are apoptotic.

A function for α II-spectrin cleavage could have been remained unidentified if it concerns the long term potentiation process essential for memory. Previous studies have shown that it is possible to obtain mutant mice with no obvious visible phenotype but a strong perturbation in the learning process, which is difficult to appreciate without specific tests (34). Such a perturbation could exist in our mutant mice because of the following. (i) It has been suggested that calpain cleavage of spectrin could be involved in long term potentiation (35). (ii) A protein factor that inhibits ATP-dependent glutamate accumulation into synaptic vesicles has been purified and has been shown to correspond to α II-spectrin breakdown products. Intact α II-spectrin did not have such an inhibitory property (36). (iii) It has been shown that α II/ β II spectrin dimer interacts with NR1a, NR2A, and NR2B subunits of *N*-methyl-D-aspartic acid receptor (37), and α II-spectrin is cleaved under *N*-methyl-D-aspartic acid activation. Thus spectrin cleavage could be involved in specific processes allowing modulation of the glutamatergic synaptic transmission or could act directly on

the number of glutamate receptors available in the membranes of synapses by modulating the plasticity of the membrane skeleton (38). A defect in these processes could interfere with learning and memory in our murine model; therefore, this hypothesis on our murine model merits further investigation.

Acknowledgments—We thank Colette Galand for valuable assistance in the targeting construct work; Marco Giovaninni for the PGK-hygromycin cassette; Manoussos Koutsourakis and Abdel Ayadi for the work on ES line establishment and chimera production; Martin Holzenberger for the *MeuCre40MH* line and for the very careful reading and suggestions for the manuscript; Bernard Grandchamp and Carole Beaumont for providing access to animal facility; Olivier Thibaudreau for the help with paraffin blocks and slides preparation; Laurent Gouya and Bernard Grandchamp for fruitful discussions; Joël Nicolas for its assistance in page make-up and informatics; and Dominique Goossens for the careful revision of the text.

REFERENCES

- Byers, T. J., and Branton, D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6153–6157
- Mohandas, N., and An, X. (2006) *Transfus. Clin. Biol.* **13**, 29–30
- Delaunay, J. (2007) *Blood Rev.* **21**, 1–20
- Ikeda, Y., Dick, K. A., Weatherspoon, M. R., Gincel, D., Armbrust, K. R., Dalton, J. C., Stevanin, G., Durr, A., Zuhlke, C., Burk, K., Clark, H. B., Brice, A., Rothstein, J. D., Schut, L. J., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2006) *Nat. Genet.* **38**, 184–190
- Parkinson, N. J., Olsson, C. L., Hallows, J. L., McKee-Johnson, J., Keogh, B. P., Noben-Trauth, K., Kujawa, S. G., and Tempel, B. L. (2001) *Nat. Genet.* **29**, 61–65
- Komada, M., and Soriano, P. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 337–348
- Tang, Y., Katuri, V., Srinivasan, R., Fogt, F., Redman, R., Anand, G., Said, A., Fishbein, T., Zasloff, M., Reddy, E. P., Mishra, B., and Mishra, L. (2005) *Cancer Res.* **65**, 4228–4237
- Lee, J. K., Coyne, R. S., Dubreuil, R. R., Goldstein, L. S., and Branton, D. (1993) *J. Cell Biol.* **123**, 1797–1809
- Norman, K. R., and Moerman, D. G. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 665–677
- Praitis, V., Ciccone, E., and Austin, J. (2005) *Dev. Biol.* **283**, 157–170
- Rotter, B., Krowiarski, Y., Nicolas, G., Dhermy, D., and Lecomte, M. C. (2004) *Biochem. J.* **378**, 161–168
- Nicolas, G., Fournier, C. M., Galand, C., Malbert-Colas, L., Bournier, O., Krowiarski, Y., Bourgeois, M., Camonis, J. H., Dhermy, D., Grandchamp, B., and Lecomte, M. C. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3527–3536
- Nedrełow, J. H., Cianci, C. D., and Morrow, J. S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 7735–7741
- Canizalez-Roman, A., and Navarro-Garcia, F. (2003) *Mol. Microbiol.* **48**, 947–958
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B. Q., Nataro, J. P., and Azamar, Y. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 3609–3621
- Simonovic, M., Zhang, Z., Cianci, C. D., Steitz, T. A., and Morrow, J. S. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 34333–34340
- Harwood, S. M., Yaqoob, M. M., and Allen, D. A. (2005) *Ann. Clin. Biochem.* **42**, 415–431
- Leneuve, P., Colnot, S., Hamard, G., Francis, F., Niwa-Kawakita, M., Giovannini, M., and Holzenberger, M. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, e21
- Rubera, I., Poujeol, C., Bertin, G., Hasseine, L., Counillon, L., Poujeol, P., and Tauc, M. (2004) *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2050–2056
- Hedges, S. B. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 838–849
- Wang, K. K., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talianian, R. V., Glantz, S. B., and Morrow, J. S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22490–22497
- Geddes, J. W., Bondada, V., Tekirian, T. L., Pang, Z., and Siman, R. G. (1995) *Neurobiol. Aging* **16**, 651–660

23. Harris, A. S., Croall, D. E., and Morrow, J. S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17401–17408
24. Leto, T. L., Pleasic, S., Forget, B. G., Benz, E. J., Jr., and Marchesi, V. T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5826–5830
25. Harris, A. S., and Morrow, J. S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3009–3013
26. Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L., and Flavell, R. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13618–13623
27. Chen, H., Khan, A. A., Liu, F., Gilligan, D. M., Peters, L. L., Messick, J., Haschek-Hock, W. M., Li, X., Ostafin, A. E., and Chishti, A. H. (2006) *J. Biol. Chem.* **282**, 4124–4135
28. Peters, L. L., Shivdasani, R. A., Liu, S. C., Hanspal, M., John, K. M., Gonzalez, J. M., Brugnara, C., Gwynn, B., Mohandas, N., Alper, S. L., Orkin, S. H., and Lux, S. E. (1996) *Cell* **86**, 917–927
29. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., and Green, D. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6425–6428
30. Lee, A., Morrow, J. S., and Fowler, V. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20735–20742
31. Williams, S. T., Smith, A. N., Cianci, C. D., Morrow, J. S., and Brown, T. L. (2003) *Apoptosis* **8**, 353–361
32. Bignone, P. A., and Baines, A. J. (2003) *Biochem. J.* **374**, 613–624
33. Fowler, V. M., and Adam, E. J. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 1559–1572
34. Grant, S. G., O'Dell, T. J., Karl, K. A., Stein, P. L., Soriano, P., and Kandel, E. R. (1992) *Science* **258**, 1903–1910
35. Lynch, G., and Baudry, M. (1987) *Brain Res. Bull.* **18**, 809–815
36. Ozkan, E. D., Lee, F. S., and Ueda, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4137–4142
37. Wechsler, A., and Teichberg, V. I. (1998) *EMBO J.* **17**, 3931–3939
38. Lynch, G., Rex, C. S., and Gall, C. M. (2007) *Neuropharmacology* **52**, 12–23

ARTICLE 4

Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin

Gaël Nicolas*, Myriam Bennoun*, Arlette Porteu*, Sandrine Mativet*, Carole Beaumont†, Bernard Grandchamp†, Mario Sirito‡, Michèle Sawadogo‡, Axel Kahn*, and Sophie Vaulont*§

*Département de génétique, développement et Pathologie Moléculaire, Institut Cochin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, et Université René Descartes, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, 75014 Paris, France; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 409, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 75018 Paris, France; and ‡Department of Molecular Genetics, University of Texas, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030

Edited by William S. Sly, Saint Louis University School of Medicine, Saint Louis, MO, and approved February 5, 2002 (received for review November 28, 2001)

We recently reported the hemochromatosis-like phenotype observed in our *Usp2* knockout mice. In these mice, as in murine models of hemochromatosis and patients with hereditary hemochromatosis, iron accumulates in parenchymal cells (in particular, liver and pancreas), whereas the reticuloendothelial system is spared from this iron loading. We suggested that this phenotypic trait could be attributed to the absence, in the *Usp2* knockout mice, of a secreted liver-specific peptide, hepcidin. We conjectured that the reverse situation, namely overexpression of hepcidin, might result in phenotypic traits of iron deficiency. This question was addressed by generating transgenic mice expressing hepcidin under the control of the liver-specific transthyretin promoter. We found that the majority of the transgenic mice were born with a pale skin and died within a few hours after birth. These transgenic animals had decreased body iron levels and presented severe microcytic hypochromic anemia. So far, three mosaic transgenic animals have survived. They were unequivocally identified by physical features, including reduced body size, pallor, hairless and crumpled skin. These pleiotropic effects were found to be associated with erythrocyte abnormalities, with marked anisocytosis, poikilocytosis and hypochromia, which are features characteristic of iron-deficiency anemia. These results strongly support the proposed role of hepcidin as a putative iron-regulatory hormone. The animal models devoid of hepcidin (the *Usp2* knockout mice) or overexpressing the peptide (the transgenic mice presented in this paper) represent valuable tools for investigating iron homeostasis *in vivo* and for deciphering the molecular mechanisms of hepcidin action.

Iron is an essential element that is required for growth and survival. However, in excess, the metal is toxic to the cell. To deal with this problem, elaborate cellular mechanisms have evolved in virtually all organisms to meet the iron needs of the body. In adult mammals, iron homeostasis depends upon regulated absorption of iron by the enterocyte, a highly specialized cell of the duodenum that coordinates dietary iron uptake and transport into the body. In the fetus, the mechanisms involved in placental maternofetal iron transport are also highly efficient and tightly regulated. Indeed, although fetal serum iron concentrations generally exceed those in the maternal circulation, only rare newborns exhibit evidence of iron toxicity. Although considerable progress has been made these last years in identifying key components of the iron transport molecular pathway (for review, see refs. 1–3), important questions are still unanswered. In particular, the molecular nature of the signals that programs the enterocyte cells of the duodenum and the syncytiotrophoblast cells of the placenta to adjust iron absorption and iron transport still remains to be identified.

In this context, we recently identified a putative key component of iron homeostasis that could act as a central player in the programming pathway from body iron stores to iron absorptive cells (4). It concerns a recently characterized mammalian peptide exhibiting antimicrobial activity, hepcidin (5, 6). The expression of the gene encoding hepcidin is restricted nearly to the

liver (5–7). Whereas only one copy of the gene exists in humans, two duplicated hepcidin genes have been reported in mice (4, 7). The human gene encodes a precursor protein of 84 aa, including a putative 24-aa leader peptide. The human circulating form of hepcidin, described by two research groups in blood (6) and in urine (5), consists of the C-terminal 25 aa of the protein. Like many antimicrobial peptides, the mature hepcidin peptide seems to be highly structured with four intrachain disulfide bonds (5, 6). The link between hepcidin and iron metabolism stemmed from our finding that hepcidin gene expression was totally inhibited in mice exhibiting iron overload consequent to target disruption of the *Usp2* (Upstream Stimulatory Factor 2) gene (4). In these *Usp2* knockout mice, the development of iron overload was strikingly similar to that observed in human hereditary hemochromatosis and in *Hfe*^{-/-} mice, the mouse model for hemochromatosis, with preferential loading of iron in parenchymal cells, increased circulating iron and decreased reticuloendothelial (RE) iron (8, 9). Interestingly, whereas our data show that a complete defect in hepcidin expression was linked to progressive tissue iron overload, Pigeon *et al.* (7) demonstrated that hepcidin gene expression was strongly up-regulated in the liver of iron-overloaded mice. This latter result highlighted the role of hepcidin as a putative iron regulator that could be induced to decrease dietary iron absorption.

Our previous results left open the role of the transcription factor USF2 in the iron-overload phenotype and did not directly prove that the absence of hepcidin was responsible for it. In the present work, we address these two questions. Because the hepcidin genes are located directly downstream of the *Usp2* gene in the genome, we hypothesized that extinction of hepcidin gene activities in our *Usp2*^{-/-} mice could result from a specific *cis* effect of the targeting construct. The role of USF2 in the process of iron loading was evaluated by studying the iron status in another mouse model where the *Usp2* gene was inactivated by using a different targeting approach (10). We show that in this alternative model the iron metabolism is normal, thus demonstrating that the lack of USF2 is probably not involved in the iron-overload phenotype in our previously reported *Usp2*^{-/-} mice. Secondly, to address the question of whether hepcidin could directly fulfill the role of a sensor for iron homeostasis, we sought to generate transgenic mice overexpressing hepcidin in the liver. In good agreement with our proposed role for hepcidin in iron metabolism, we report that transgenic animals overex-

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: TTR, transthyretin; En, embryonic day *n*; Pn, postnatal day *n*; TFR, transferrin-receptor.

§To whom reprint requests should be addressed at: Département de génétique, développement et Pathologie Moléculaire, Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, 24 Rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: vaulont@cochin.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

pressing hepcidin died perinatally with severe iron-deficiency anemia.

Taken together, our previous data and the results presented in this paper strongly suggest that hepcidin is a secreted factor acting as a signaling molecule required to regulate iron homeostasis. Any pathophysiological situations leading to variation of circulating hepcidin are predicted to produce either iron deficiency or iron overload.

Materials and Methods

Animals. All animals used in these experiments were cared for in accordance with criteria outlined in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals. Animals were maintained in a temperature- and light-controlled environment and were given free access to tap water and food (standard laboratory mouse chow, AO3, Usine d'Alimentation Rationnelle, Epinay-S/Orge, France).

Where indicated, iron-dextran was injected s.c. at the dose of 0.5–1 mg of iron per g of body weight (Sigma).

Generation of Transgenic Mice. The Paris and Houston knockout *Usp2* mice have been described (10, 11). Transgenic mice had a mixed genetic background that included contributions from C57BL/6, 129/Sv, and B6D2 strains as described (12). Full-length cDNA of the murine *HEPC1* cDNA was amplified by using primers 5'-GGGGGATATCAGGCCTCTGCACAGCA-GAACAGAAGG-3' and 5'-GGGGGATATCAGGCCTCTATGTTTTGCAACAGATACC-3'. The *HEPC1* PCR fragment was introduced between the transthyretin (TTR) sequences (consisting of the 3 kb of the mouse TTR regulatory regions 5' to the cap site, the first exon, first intron, and most of the second exon) and the SV40 small-T poly(A) signal sequence (13). The construct was checked by DNA sequencing. The 4.7-kbp TTR-*HEPC1* transgene was separated from the plasmid sequence by digestion with *HindIII* and used for pronuclear microinjection.

Genotyping of Transgenic Mice by PCR and Southern Blotting. Southern blotting was done as described (4). *Bam*HI-digested DNA was electrophoresed, transferred to a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Pharmacia), and hybridized to a probe corresponding to the 1.7-kbp *Bgl*II-*Hind*III fragment of the TTR plasmid (13). The probe was labeled with [³²P]dCTP by random priming with a commercially available kit (Megaprime DNA labeling systems, Amersham Pharmacia). The 5.3-kbp-labeled fragment corresponds to endogenous TTR gene, and the 4.7-kbp-labeled fragment corresponds to the transgene.

For PCR, genomic DNA (0.5–1 µg) was used in 50-µl reactions that included three primers. The TTR-*HEPC1* transgene was amplified by using the forward primer 5'-GAGTCAG-GAAGTATGTGAGGG-3' (annealing in intron 1 of TTR) and the reverse primer 5'-AACAGATACCACACTGGGAA-3' (annealing in *HEPC1* cDNA). The endogenous TTR gene was amplified by using the same forward primer 5'-GAGTCAG-GAAGTATGTGAGGG-3' and the reverse primer 5'-CTTTCCGGTGATAGACTCTGG-3', both annealing in intron 1 of TTR. The PCR was performed as follows: 34 cycles (each cycle consisting of 40 s at 94°C, 40 s at 53°C, and 40 s at 72°C), with an initial denaturation step at 94°C for 4 min and a final elongation step at 72°C for 5 min, in 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)/50 mM KCl/0.05% W-1/2 mM MgCl₂/0.2 mM each dNTP/0.2 µM each primer, and 4 units of *Taq* polymerase (GIBCO/BRL). The 705-bp-specific product corresponds to the TTR-*HEPC1* transgene and the 364-bp product corresponds to the endogenous TTR gene. The reaction was analyzed on 1.5–2% agarose gel containing ethidium bromide. This PCR method for mouse genotyping was found to give the same results as the Southern blot method.

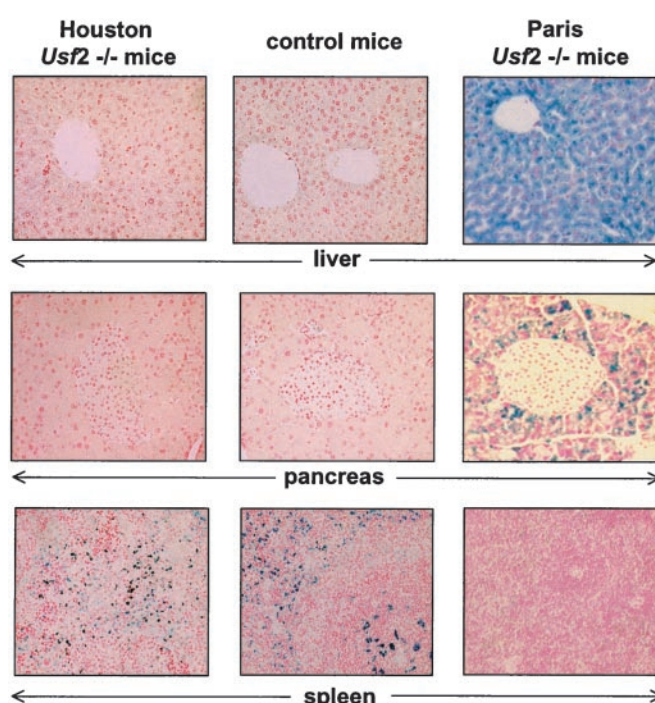


Fig. 1. Iron content in liver, pancreas, and spleen of Houston *Usp2*^{-/-} mice. Liver, pancreas, and spleen were fixed in formaldehyde and stained with the Perls' stain for iron. Non-heme iron stains blue. Liver, pancreas, and spleen sections from a representative 10-month-old Houston *Usp2*^{-/-} mouse, 8-month-old control mice, and an 8-month-old Paris *Usp2*^{-/-} mouse (×20).

Northern Blotting. Twenty micrograms of RNA from each source was denatured in formaldehyde-containing buffer and electrophoresed in 1% agarose/2.2 M formaldehyde gels. Northern blot was performed as described (4). After electrophoresis, RNA was transferred to a nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont/NEN) in 20 × SSC buffer. The probe used to detect hepcidin mRNAs was prepared from the plasmid isolated by suppressive subtractive hybridization pT-Adv/*HEPC1* (4). To detect TTR mRNAs, we used a 600-bp cDNA fragment (a gift from Virginie Joulin, Institut Cochin, Paris, France). Because of the presence of the SV40 small-T poly(A) sequence, the size of the transgenic hepcidin transcript is greater than that of the endogenous one. Each blot was stripped and reprobed with ribosomal 18S cDNA to check for the integrity and the amount of loaded RNAs.

Iron Measurements and Histology. Quantification of iron level was performed as described by Torrance and Bothwell (14) on fragments or total organs by using an IL test (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). For histology, tissues were fixed in 4% (vol/vol) formaldehyde, embedded in paraffin, mounted onto slides, and stained with Prussian blue and nuclear red counterstains by using standard procedures.

Results

The Iron-Overload Phenotype Is Not Related to *USF2* Deficiency. To assess the role, if any, of the transcriptional factor *USF2* in the establishment of the iron-overload phenotype observed in our *Usp2*-null mice (ref. 4, referred to as the Paris KO), we sought to determine whether the same iron-related phenotype could be observed in another KO mouse model. To this end, we used the *Usp2*-null mice (ref. 10, referred to as the Houston KO) and analyzed the iron status in this model by Perls' Prussian blue staining in the liver, pancreas, and spleen of these mice.

As clearly demonstrated in Fig. 1, whereas the Paris *Usp2*^{-/-}

KO mice exhibit marked iron overloading in the liver and pancreas, iron did not accumulate in these tissues from Houston *Usf2*^{-/-} KO mice. In the spleen, the normal positive reaction with the Perls' Prussian blue staining observed between the red pulp cells was also clearly present in the Houston KO mice. In contrast, as previously demonstrated, the spleen reticuloendothelial system from Paris *Usf2*^{-/-} KO mice is spared from this iron loading (4).

In agreement with this normal iron metabolism phenotype in the Houston *Usf2*-null mice, we found normal amounts of both *HEPC1* and *HEPC2* transcripts in the liver of these mice by Northern blot and reverse transcription (RT)-PCR (data not shown).

Taken together, these data, which demonstrate that the Houston *Usf2*-null mice have a normal iron-related phenotype with normal amounts of liver hepcidin, are strongly in favor of the hypothesis that the lack of *USF2* protein is not responsible for the increased iron accumulation observed in the Paris *Usf2* KO, and that the absence of hepcidin gene expression could indeed explain the expression of the hemochromatosis-like phenotype in these mice. This supposition led us to conjecture that the reverse situation, namely an increase in hepcidin gene expression, could result in pathologies associated with iron deprivation. To investigate this hypothesis, we created transgenic mice overexpressing hepcidin.

Generation of TTR-HEPC1 Transgenic Mice. Because of the highly liver-specific pattern of hepcidin gene expression (5–7), we used a liver-specific promoter to direct selective expression of hepcidin into hepatocytes. Although there is only one copy of the hepcidin gene in the human genome, two highly related copies, *HEPC1* and *HEPC2*, have been reported in the mouse. So far, however, there is no data assessing differential functional roles for *HEPC1* and *HEPC2* in mice. In this study, the *HEPC1* peptide was chosen rather than *HEPC2*, because it is the peptide most closely related to that found in humans. Indeed, as shown in Fig. 2A, there is a 76% sequence identity of the human 25-residue peptide with *HEPC1* and only a 58% identity with *HEPC2*.

The transgenic construct was made by introducing a murine PCR-made *HEPC1* cDNA fragment between the -3 kb mouse TTR promoter region and the SV40 small-T poly(A) signal (13). The construction is schematized in Fig. 2B. After standard microinjection of the linearized construct, a total of 14 independent transgenic F0 was obtained. Fig. 2C shows the Southern blot of the *Bam*HI-digested genomic DNA from these different F0 mice. The probe revealed a band at 4.7 kbp corresponding to the transgene (Tg) and one at 5.3 kbp corresponding to the transthyretin endogenous gene (End). This latter band was used as the internal reference corresponding to two allele copies. The transgenic F0 mice could be separated into two groups according to their phenotype. The first one corresponded to transgenic mice that were born with a pale skin and died within a few hours after birth (Fig. 2C, newborn mice transgenic for hepcidin—THnb—including THnb 2, 3, 4, 10, 25, and 29). In this case, a transgene band at the expected size and representing more than two copies was always detected. The second group was characterized by the same genomic pattern—i.e., at least two copies of the transgene—and corresponded to three transgenic mouse founders (Fig. 2C, group 2, TH5, TH35, and TH61). These animals all had an unequivocal phenotype with small size, apathy, poor coat, and crumpled skin. This phenotype appeared rapidly after birth, except for TH61, whose phenotype was only clearly established after 2 weeks. The health of TH5 and TH35 founders deteriorated significantly after 2–3 weeks of life. Because hepcidin was hypothesized to impair iron absorption, we sought to rescue these animals by directly administering iron by means of s.c. injection of iron-dextran. This iron therapy caused

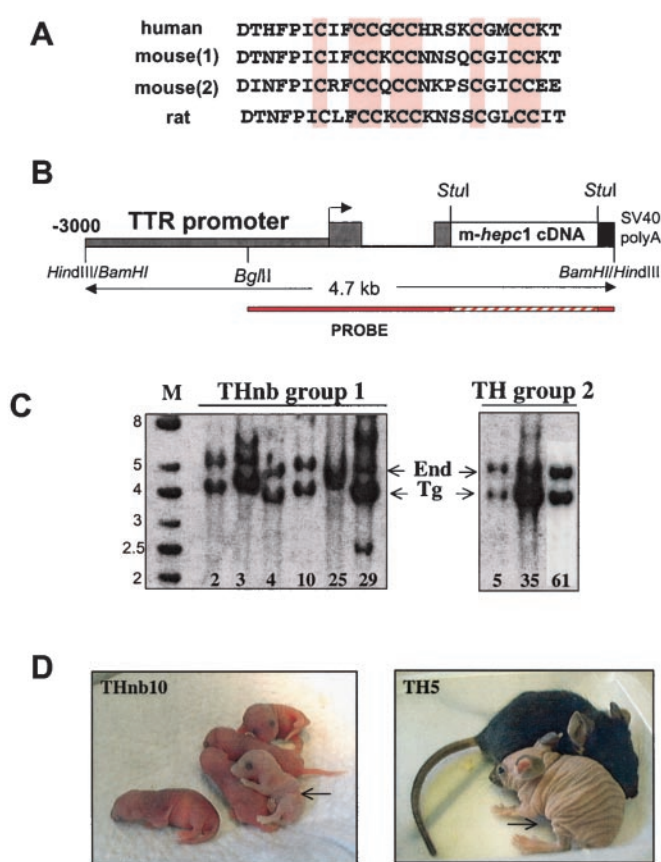


Fig. 2. Generation of TTR-HEPC1 transgenic mice. (A) Comparison of the 25-aa peptide sequences from human, mouse, and rat. Conserved cysteine residues are shaded. (B) Schematic representation of the TTR-HEPC1 construct. The murine *HEPC1* cDNA was introduced between the transthyretin sequences (consisting of the 3 kb of the mouse TTR regulatory regions 5' to the cap site, the first exon, first intron, and most of the second exon) and the SV40 small-T poly(A) signal sequence (13). (C) Southern blot analysis of tail DNA from transgenic founders. The founders were distributed among two groups according to their phenotype. Genomic DNA was digested by *Bam*HI and hybridized with the TTR probe represented in B. Two bands of the expected size, 5.3 kbp and 4.7 kbp, representing the endogenous TTR gene (End) and the transgene (Tg), respectively, were detected. (D) Phenotypic features of transgenic mice harboring hepcidin. The arrows indicate the pale newborn THnb10 (arrow) at birth among the nontransgenic littermates and the hairless and crumpled TH5 founder at 4 weeks, as compared with a nontransgenic littermate.

improvements in both founders; several weeks after injection, they were indistinguishable from their normal coat littermates (not shown). However, it cannot definitively be concluded that this renewal was caused by iron-dextran therapy because no controls, i.e., noninjected transgenic founder mice, were available. The transgenic male founder TH5 and the two females TH35 and TH61 were mated to give F1 offspring. In all cases, phenotypes of the progeny were much more severe than those of the parent founders. Indeed, all transgenic mice from TH5 died perinatally with marked pallor (to date, from nine independent litters, 13 F1 transgenic newborns died at birth). Female TH35 gave birth only once, with only one transgenic pup in the litter. This pup, which was small and had a pale and crumpled skin, died at 13 days. The TH61 female gave birth to two transgenic F1 pups in one litter. One transgenic pup died at birth with pallor, whereas the other died at 3 weeks.

The phenotype of the transgenic mice from the two groups is shown in Fig. 2D, where THnb10 at birth and TH5 at 3 weeks are presented next to unaffected littermates.

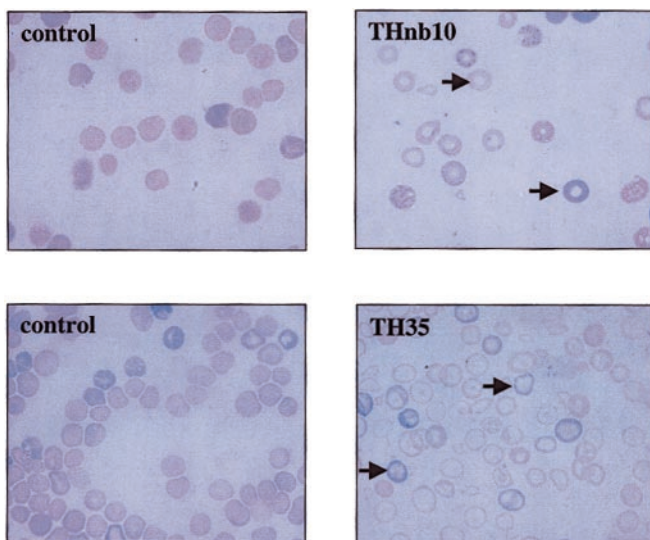


Fig. 3. Hematological phenotype of the transgenic mice. Wright-Giemsa-stained blood smears were performed on control (*Left*) and transgenic mice (*Right*). Compared with normal erythrocytes, transgenic erythrocytes from THnb10 at birth and TH35 at 4 weeks show marked anisocytosis, poikilocytosis, and hypochromia. Arrows indicate the typical ringed red cells characteristic of iron deficient anemia.

Severe Microcytic Anemia in Transgenic Mice Overexpressing Hepcidin.

If hepcidin compromises iron transport, then erythropoiesis should be altered because most iron is directed to hemoglobin synthesis. Therefore, to directly assess the consequences of exogenous hepcidin on erythropoiesis, we performed Wright-Giemsa-stained blood smears on newborn transgenic F0 mice and on TH5. Fig. 3 shows that, in comparison to control erythrocytes, erythrocytes from both THnb10 and TH5 exhibited evidence of poikilocytosis, hypochromia, and microcytosis. Most red cell centers were flattened with the hemoglobin being extruded to the periphery, leading to the typical ring aspect of hypochromic red cells. The same erythrocyte abnormalities were found in F1 progenies from TH5, TH35, and TH61. Because of the early lethality and, as a result, the very small amount of plasma available, it was difficult to characterize further the anemia by blood parameters (especially ferritin, which is a good indicator and whose level drops substantially during iron deficiency). On the other hand, total iron deficiency was evaluated in F1 progeny from TH5 by directly measuring iron content in the whole embryo at embryonic day 15.5 (E15.5). The results indicated that there was 4-fold less total iron in a transgenic fetus as compared with a control fetus ($5.3 \pm 0.4 \mu\text{g}$ of iron per gram wet tissue in transgenic F1 progeny from TH5 [$n = 5$] vs. $19.7 \pm 2.6 \mu\text{g}$ in control fetuses [$n = 19$] $P < 0.0001$). The classical hematological features of iron deficiency anemia associated with the severe iron deficit in transgenic mice strongly support the idea of hepcidin acting as a negative regulator of iron transport.

Developmental Expression of Hepcidin Genes in Wild-Type Mice. To understand better the reasons for the early postnatal lethality of most of the transgenic animals, we sought to determine the level of murine hepcidin gene expression during liver development in wild-type C57BL/6 mice. As shown in the Northern blot of Fig. 4, from E15.5 to postnatal day 56 (P56), there was no detectable expression of hepcidin genes apart from a strong transient induction at birth (B) and at P1 and P2. Hepcidin expression only reached a high level in adult liver (P56). This pattern of expression was different to that of transthyretin. Indeed, as shown in the lower part of Fig. 4, transthyretin expression was

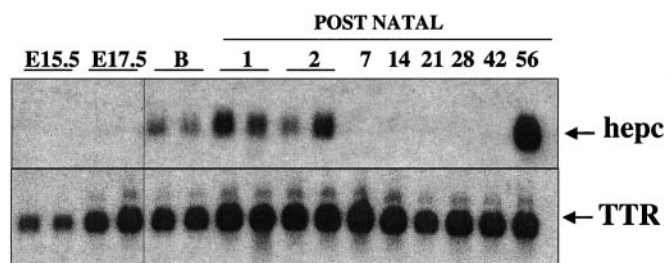


Fig. 4. Hepcidin and transthyretin mRNA content during liver development of wild-type C57BL/6 mice as determined by Northern blot analysis. Twenty micrograms of wild-type total liver RNA, from E15.5 and E17.5, birth (B), and during postnatal development from P1 to P56, was electrophoresed, blotted, and hybridized with hepcidin and TTR ^{32}P -labeled probes.

detectable in the developing liver starting at E15.5 and remained high and constant throughout development.

This leads us to hypothesize that the early death of transgenic mice may be caused by the sustained transgenic hepcidin expression during liver development, at a time when normally the endogenous hepcidin gene is not expressed at detectable levels.

The presence of hepcidin in the fetus at the end of gestation might alter maternofetal iron transport, leading to severely iron-deficient newborn mice. The presence of the transgenic hepcidin transcripts could be confirmed only in the progeny of the male TH5 (TH35 and TH61 were founder females we wanted to keep alive). At E15.5, transgenic F1 animals from TH5 were already visibly anemic, and the expression of the transgene was demonstrated by RT-PCR (data not shown).

The Severity of the TTR HEPC1 Mouse Phenotype Is Correlated with the Expression of the Hepcidin Transgene.

The transgenic mice found dead postnatally as well as the progeny from TH5, TH35, and TH61 were analyzed by Northern blot for expression of hepcidin in their livers. Fig. 5 shows a Northern blot revealing both the transgenic (Tg-hepc, upper band) and the endogenous (End-hepc, lower band) hepcidin transcripts. It is clearly evident that all of the newborn F0 mice, which were readily distinguishable at birth by their pallor, expressed high levels of hepcidin (Fig. 5A, THnb10,

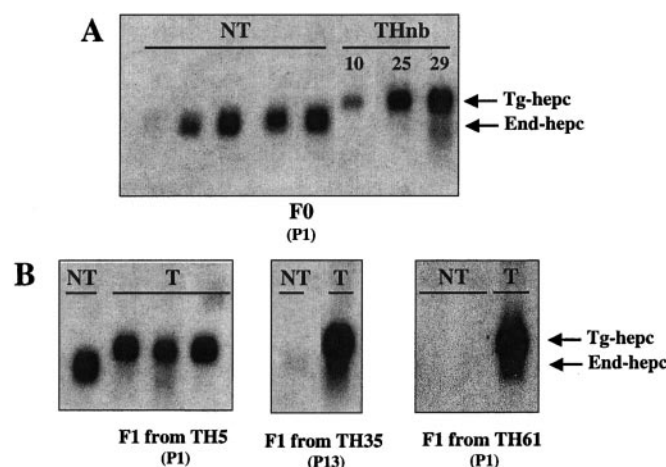


Fig. 5. Hepcidin mRNA level in transgenic mice as determined by Northern blot analysis. Twenty micrograms of total liver RNA was electrophoresed, blotted, and hybridized with the ^{32}P -labeled hepcidin probe made by PCR as described in *Materials and Methods*. This probe reveals both the transgenic hepcidin (Tg-hepc, upper band) and the endogenous hepcidin (End-hepc, lower band). (A) Hepcidin mRNA level in F0 transgenic animals (THnb) at P1, as compared with nontransgenic (NT) littermates. (B) Hepcidin mRNA level in F1 progeny from TH5 at P1, from TH35 at P13, and from TH61 at P1.

25 and 29). Very interestingly, we noted in these transgenic mice that the normal hepcidin mRNA induction observed at birth (see the nontransgenic littermates) was totally inhibited.

Transgenic TH5, TH35, and TH61 progenies also expressed the hepcidin transgene at a high level, whereas the endogenous hepcidin gene again was found to be silent in these animals (Fig. 5B). In the nontransgenic pups from the same litter, the endogenous hepcidin gene was, as expected, expressed 1 day after birth in TH5 male offspring, not expressed at day 13 in TH35 female offspring and, more interestingly, not expressed at day 1 in TH61 female offspring. The difference between TH5 and TH61 offspring is that the mother was wild-type in the first case and transgenic with microcytic anemia in the second.

Discussion

The present study provides substantial evidence for a central role for hepcidin in iron homeostasis. We demonstrate that the iron-overload phenotype previously described in *Usp2/hepcidin*-deficient mice is not related to *USF2* deficiency and is thus most likely associated with the lack of hepcidin. Indeed, in another *Usp2*^{-/-} model (the Houston KO), iron metabolism and hepcidin gene expression are normal. In addition, we show that, when constitutively expressed, hepcidin impairs maternofetal iron transport leading to severe iron deficiency anemia in neonates. This latter observation relies on transgenic mice expressing hepcidin under the control of the TTR promoter. This promoter is known to direct liver-specific expression, but most importantly, this expression starts during liver development. We report here that the endogenous TTR gene is active at E15.5; data in the literature have reported TTR promoter activity as early as E9.5 (15).

The Severity of the Anemia in Hepcidin Transgenic Mice Is Associated with the Fetal Expression of the Transgene. The majority of the transgenic animals we have generated die after birth, presumably from severe anemia. This anemia was revealed by abnormalities of erythrocyte morphology (Fig. 3), and iron deficiency was directly assessed by measuring iron level in transgenic fetuses. Attempts to determine whether some changes occurred in tissue distribution between control and transgenic fetuses were hampered because of the small amount of material available and the very low concentration of iron in fetal fetuses. Today, only three phenotypically affected founders are still alive: the male TH5, and the two females, TH35 and TH61. In fact, Southern blot analysis comparing genomic DNA from parents and progeny showed that TH5, TH35, and TH61 are mosaics (data not shown). This result might explain why these parents survive, whereas their progeny die around birth, and also the low transmission rate of the transgene.

When available, F0 mice, as well as the F1 progeny from TH5, TH35, and TH61, were analyzed for transgenic hepcidin expression (Fig. 5). These transgenic animals, which were all visibly anemic, expressed high levels of hepcidin. For TH5 progeny, hepcidin expression was demonstrated to occur at least at E15.5, a time when pallor was already evident as well as alteration of erythrocyte morphology (data not shown). This result suggests that hepcidin can be correctly processed and secreted in fetal liver. In fact, although we did not detect hepcidin transcription between E15.5 and birth in wild-type mice liver, an earlier fetal expression is conceivable because it was reported by two groups (5, 7) in human liver fetuses between 18 and 24 weeks of gestation. The absence of hepcidin gene expression late in pregnancy is in good agreement with the known high rate of iron transfer from the mother to the embryo during this period. In the postnatal period, hepcidin gene expression is only transiently detected around birth and then in young adults, i.e., after the period of rapid growth in which active iron absorption is crucial. The transient expression at birth probably reflects birth-

associated stress. Indeed, the hepcidin gene was reported to be responsive to different stimuli; in particular, it was associated with inflammation (7).

Silencing of endogenous hepcidin gene expression in transgenic neonates is most likely explained by the inhibitory effect of iron deficiency and, perhaps, anemia. The anemia of the TH61 mother also could account for the absence of neonatal hepcidin gene activation even in the nontransgenic offspring. In other words, a normal iron homeostasis could be permissive for the hepcidin gene responding to other stimuli. Conversely, the positive effect of iron on hepcidin gene expression has been well documented by Pigeon *et al.* (7).

Role of Hepcidin in the Iron Transport Pathway. Whereas much progress has been made these last years in the understanding of iron absorption by mature enterocytes of the villus (for review, see ref. 1), the mechanisms of the maternofetal transport of iron through the syncytiotrophoblast cells of the placenta is less well documented. It is known that the growing fetus requires a large supply of iron that is taken up from the maternal blood via transferrin-receptor (TFR)-mediated endocytosis. TFR knock-out mice show embryonic death with severe anemia in homozygotes and increased microcytic erythrocytes and decreased tissue iron in heterozygotes (16). Interestingly, Parkkila *et al.* (17) have reported that these TFRs are physically associated with the HFE/ β 2M complex in the human placental syncytiotrophoblast cells. Therefore, it is tempting to hypothesize that the HFE/ β 2M/TFR complex, whose pathophysiological role is now well established in the process of iron absorption in the small intestine, could be involved in regulating iron transport in the placenta. The existence of severe neonatal iron deficiency anemia in the microcytic anemia (*mk*) mice defective in the divalent metal iron transporter (DMT1; ref. 18, and see below) indicates that this transporter is also most likely involved in maternofetal iron transport. Efflux of iron in the fetal circulation, whose mechanisms are not yet fully clarified, is thought to operate through the iron exporter IREG1/ferroportin1. Ferroportin1 was identified in the zebrafish mutant *weissherbst* by positional cloning (19), and in a mouse model of increased iron absorption by a subtractive cloning strategy (20). Zebrafish with ferroportin mutations die early in life with severe hypochromic anemia. Investigations of ferroportin1 gene expression in different tissues showed high levels of expression in placenta, with ferroportin1 transcripts being located throughout the labyrinth zone of the mouse inner placenta (19, 20).

How transgenic hepcidin interferes with these placental proteins (HFE, TFR, DMT1, and ferroportin1), leading to down regulation of iron delivery from the mother to the developing fetus, deserves further investigation. We are currently looking at the level of these different proteins in the placenta of F1 transgenic mice. Molecular insights into the mechanism of hepcidin action at the level of intestinal absorption also would be of great interest. However, our model is not suitable for this purpose because of the early lethality of the transgenic mice at a stage when the gastrointestinal tract has not achieved competency for iron absorption. To address this question and to characterize more precisely the steps in hepcidin regulation of iron homeostasis, it is necessary to create inducible transgenic models.

Animal and Human Models of Anemia. The phenotype observed in our transgenic mice is reminiscent of that of the murine model exhibiting severe iron deficiency, namely microcytic anemia (*mk*) mice. These *mk* mice carry mutations in the iron transporter DMT1 (18), thus impairing intestinal iron absorption and iron metabolism in peripheral tissues. In addition, these mice have severe neonatal microcytic anemia, and only a few survive to weaning. Iron injections intended to circumvent the intestinal block in *mk* mice only partially reverse the anemia, suggesting a

further block to iron entry into red blood cell precursors. In our model, iron treatment experiments deserve further investigation to establish clearly whether hepcidin-induced anemia can be fully rescued by this iron therapy.

In any case, the phenotypes of both hepcidin-hyperexpressing (this paper) and hepcidin-deficient mice (4) demonstrate that this peptide plays an essential role in regulating iron transport through both placental and intestinal barriers and is most likely involved at other sites as well, e.g., reticuloendothelial cells.

The anemia of human chronic diseases is particularly interesting because it occurs under conditions such as infection or inflammation, which involve decreased circulating iron, increased reticuloendothelial iron and decreased intestinal iron absorption, all features of iron disorders that could be explained by up-regulation of hepcidin. Fleming and Sly (21) already predicted such an inflammation-induced increase in hepcidin, and this increase is now under investigation with mouse models of inflammation. The putative role of hepcidin in inflammation is reinforced by the interesting finding by Pigeon *et al.* (7) that lipopolysaccharide, a classical inducer of acute-phase proteins involved in response to inflammation and infection, is able to induce hepcidin gene expression both *in vitro* and *in vivo*.

Conclusion

The demonstration that the absence of USF2 protein is not responsible for the iron abnormalities, coupled with the phenotypes of *Usf2* knockout mice and hepcidin overexpressing transgenic mice, clearly permit a key regulatory role in iron homeostasis to be attributed to hepcidin. Further studies are now needed to elucidate the molecular mechanisms of hepcidin action. One of the key questions is whether hepcidin acts by itself or, as a circulating factor, is able to interact with specific receptors. Whatever the mechanisms of hepcidin, we believe that our models of transgenic mice devoid of hepcidin (the *Usf2* knockout mice) or overexpressing hepcidin (the transgenic mice presented in this paper) offer a valuable tool for investigating iron homeostasis *in vivo* and for screening potential drugs for modulating iron absorption.

We thank Terry Van Dyke for the TTR vector. The TTR probe was a kind gift from Virginie Joulin. We thank Isabelle Devaux for quantification of iron level and Alan Strickland for the careful revision of the text. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

- Andrews, N. C. (2000) *Nat. Rev. Genet.* **1**, 208–217.
- Murray, K. F. & Kowdley, K. V. (2001) *Pediatrics* **108**, 960–964.
- Roy, C. N. & Enns, C. A. (2000) *Blood* **96**, 4020–4027.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. & Vaulont, S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8780–8785.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. & Ganz, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7806–7810.
- Krause, A., Neitz, S., Magert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P. & Adermann, K. (2000) *FEBS Lett.* **480**, 147–150.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. & Loreal, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7811–7819.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Ellis, M. C., Fullan, A., *et al.* (1996) *Nat. Genet.* **13**, 399–408.
- Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Fleming, R. E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, J., Fei, Y., Brunt, E. M., Ruddy, D. A., Prass, C. E., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2492–2497.
- Sirito, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R. & Sawadogo, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3758–3763.
- Vallet, V. S., Henrion, A. A., Bucchini, D., Casado, M., Raymondjean, M., Kahn, A. & Vaulont, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21944–21949.
- Cuif, M. H., Porteu, A., Kahn, A. & Vaulont, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13769–13772.
- Yan, C., Costa, R. H., Darnell, J. E., Jr., Chen, J. D. & Van Dyke, T. A. (1990) *EMBO J.* **9**, 869–878.
- Torrance, J. D. & Bothwell, T. H. (1980) *Methods Hematol.* **1**, 90–115.
- Cereghini, S., Ott, M. O., Power, S. & Maury, M. (1992) *Development (Cambridge, U.K.)* **116**, 783–797.
- Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F. & Andrews, N. C. (1999) *Nat. Genet.* **21**, 396–399.
- Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R. S., Bacon, B. R., Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Fleming, R. E. & Sly, W. S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13198–13202.
- Fleming, M. D., Trenor, C. C., Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F. & Andrews, N. C. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 383–386.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., *et al.* (2000) *Nature (London)* **403**, 776–781.
- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., *et al.* (2000) *Mol. Cell.* **5**, 299–309.
- Fleming, R. E. & Sly, W. S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8160–8162.

ARTICLE 5

Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis

Gaël Nicolas^{1*}, Lydie Viatte^{1*}, Dan-Qing Lou¹, Myriam Bennoun¹, Carole Beaumont², Axel Kahn¹, Nancy C. Andrews³ & Sophie Vaulont¹

*These authors contributed equally to this work.

Published online 21 April 2003; doi:10.1038/ng1150

Hereditary hemochromatosis is a prevalent genetic disorder of iron hyperabsorption leading to hyperferremia, tissue iron deposition and complications including cirrhosis, hepatocarcinoma, cardiomyopathy and diabetes. Most individuals affected with hereditary hemochromatosis are homozygous with respect to a missense mutation that disrupts the conformation of HFE, an atypical HLA class I molecule (ref. 1; OMIM 235200). Mice lacking *Hfe*²⁻⁴ or producing a C282Y mutant *Hfe* protein³ develop hyperferremia and have high hepatic iron levels. In both humans and mice, hereditary hemochromatosis is associated with a paucity of iron in reticuloendothelial cells. It has been suggested that HFE modulates uptake of transferrin-bound iron by undifferentiated intestinal crypt cells, thereby programming the absorptive capacity of enterocytes derived from these cells^{5,6}; however, this model is unproven and controversial^{7,8}. Hepcidin, a peptide hormone (HAMP; OMIM 606464), seems to act in the same regulatory pathway as HFE.

Although expression of mouse *Hamp* is normally greater during iron overload, *Hfe*^{-/-} mice have inappropriately low expression of *Hamp*. We crossed *Hfe*^{-/-} mice with transgenic mice overexpressing *Hamp* and found that *Hamp* inhibited the iron accumulation normally observed in the *Hfe*^{-/-} mice. This argues against the crypt programming model and suggests that failure of *Hamp* induction contributes to the pathogenesis of hemochromatosis, providing a rationale for the use of HAMP in the treatment of this disease.

Normal iron balance is maintained by meticulous regulation of iron absorption from the intestine and iron release from macrophages. It is modulated in response to body iron stores and demand for iron by erythropoiesis⁹ to prevent deleterious extremes of iron deficiency or excess.

HAMP (hepcidin) is a peptide hormone that may be central to these regulatory systems. It is synthesized predominantly in the liver, secreted as peptides of 20–25 amino acids^{10–12} and expression is induced by dietary iron loading¹¹. *Hamp*-deficient mice accumulate iron in parenchymal cells due to greater intestinal absorption and impaired retention of iron by reticuloendothelial macrophage cells¹³. Recently, humans with severe hemochromatosis have been shown to have null mutations in the gene *HAMP*¹⁴. In contrast, transgenic mice overexpressing *Hamp* have markedly lower iron stores, resulting in severe anemia¹⁵. Thus, HAMP seems to be a negative regulator of iron release both from reticuloendothelial macrophages and from enterocytes mediating intestinal absorption of dietary iron.

This conclusion is further supported by studies of *Hamp* expression in inflammation. *Hamp*-deficient mice are unresponsive to the hypoferremic effects of inflammation provoked by turpentine injection¹⁶. Humans with constitutively active *HAMP* expression develop iron-refractory anemia associated with defective intestinal iron absorption and macrophage iron retention, similar to the anemia of chronic inflammation¹⁷. Other individuals with anemia and inflammation have been reported with elevated urinary HAMP excretion¹⁸.

Because HFE and HAMP both seem to be important in regulating iron metabolism, and because *Hfe*-deficient and *Hamp*-deficient mice have similar iron overload phenotypes, we speculated that HAMP and HFE might act through the same regulatory pathway. We examined liver *Hamp* mRNA levels in *Hfe*^{-/-} mice at 4 months of age, when liver iron content is maximal¹⁹.

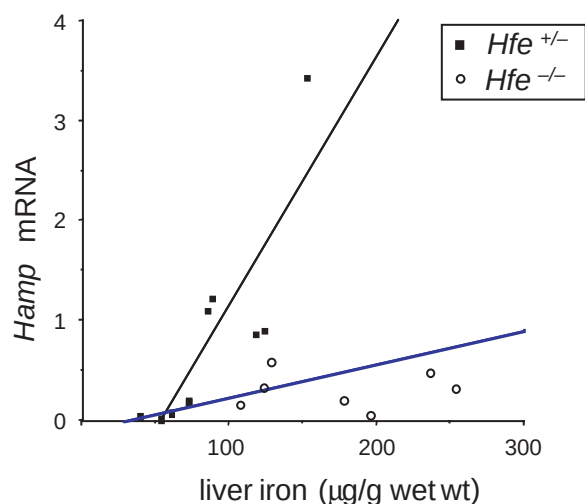


Fig. 1 *Hamp* mRNA levels in 3-wk-old *Hfe*^{+/−} and *Hfe*^{−/−} mice. Liver *Hamp* expression was quantified by northern-blot analysis, and *Hamp* mRNA level (18S normalized, arbitrary units) was determined using a STORM850 Phosphorimager and ImageQuant 5.0. Results are plotted in relation to iron liver concentration.

¹Département de Génétique, Développement et Pathologie Moléculaire, Institut Cochin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, et Université René Descartes, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, 24, rue du Fg St Jacques 75014 Paris, France.

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 409, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 75018, Paris, France. ³Howard Hughes Medical Institute, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. Correspondence should be addressed to S.V. (e-mail: vaulont@cochin.inserm.fr).

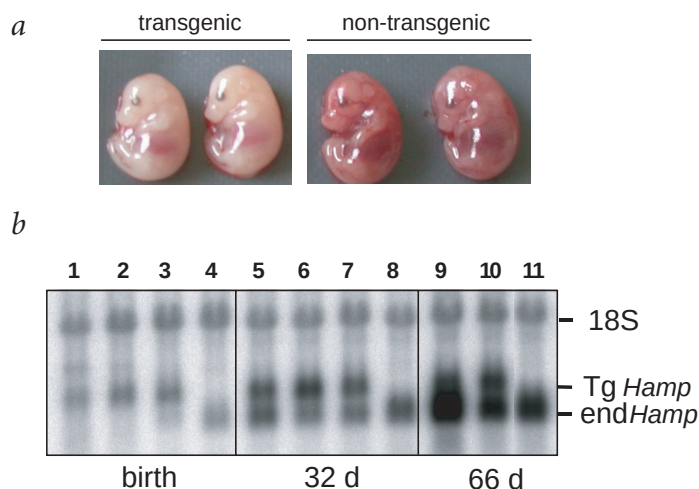


Fig. 2 Phenotypic features of the Thep27 transgenic mice. The transgenic Thep27 line was generated as previously reported¹⁵. **a**, Two transgenic embryos at embryonic day (E) 15.5 are shown along with two non-transgenic littermates. The transgenic embryos were very pale in comparison to their non-transgenic littermates. At this age, we found that transgenic embryos had roughly one third of total iron content of non-transgenic embryos ($12 \pm 1 \mu\text{g}$ iron per gram wet tissue in transgenic embryos ($n = 16$) versus 36 ± 2 in non-transgenic embryos ($n = 15$), $P < 0.0001$). The anemia persisted throughout the first month of life, with average hemoglobin concentrations of $12.8 \pm 1.3 \text{ g dl}^{-1}$ in transgenic mice ($n = 4$) versus $14.6 \pm 0.6 \text{ g dl}^{-1}$ in non-transgenic mice ($n = 6$; $P < 0.05$). Thereafter, both the hematological parameters and the hepatic iron content were indistinguishable from normal. **b**, Time course of transgenic (Tg) and endogenous (end) liver *Hamp* mRNA levels as determined by northern-blot analysis in transgenic (lanes 1–3, 5–7, 9 and 10) and non-transgenic (lanes 4, 8 and 11) mice. Due to the presence of the SV40 small-T poly(A)⁺ sequence, the size of the transgenic *Hamp* transcript is larger than that of the endogenous *Hamp* transcript. The blot was probed simultaneously with the ribosomal 18S cDNA to check for RNA integrity and loading. *Hamp* was expressed earlier in this outbred B6D2-C57Bl/6-129Sv genetic background than in the previously reported inbred C57Bl/6 background¹⁵.

Hamp mRNA expression was not induced in *Hfe*^{-/-} mice, despite a four-fold increase in liver iron content (data not shown). To confirm that *Hamp* expression did not change during iron overload in *Hfe*^{-/-} mice, we analyzed *Hamp* mRNA as a function of the liver iron concentration in *Hfe*^{+/-} and *Hfe*^{-/-} mice at 3 weeks of age, during the iron loading phase. Although *Hamp* expression was positively correlated with liver iron concentration in both *Hfe*^{+/-} and *Hfe*^{-/-} mice, the slope of the line was lower in *Hfe*^{-/-} mice (Fig. 1). This observation concurs with recent reports that mice²⁰ and humans²¹ with HFE-associated hemochromatosis have inappropriately low *HAMP* levels, suggesting that failure of normal *HAMP* induction might contribute to iron overload.

To explore this possibility, we intercrossed *Hfe*^{-/-} mice³ with transgenic mice constitutively expressing *Hamp* (Thep27) and analyzed tissue iron content and *Hamp* expression in the offspring. Thep27 mice express a liver-specific *Hamp* transgene¹⁵, resulting in fetal (Fig. 2a) and neonatal anemia. Thep27 mice are viable without iron therapy and their anemia resolves spontaneously after the first month of life. As reported¹⁵, endogenous

Hamp expression was downregulated in young Thep27 anemic mice (Fig. 2b), but by 66 days of age, the anemia subsided and levels of endogenous *Hamp* mRNA normalized.

Among embryos from an *Hfe*^{-/-} × Thep27 cross (Fig. 3a), *Hamp* transgenic offspring were pale and anemic, regardless of their *Hfe* genotype. We quantified total iron content in embryos from six litters (Fig. 3b), and, as observed previously, transgenic mice with a wild-type *Hfe* genotype had three times less iron than their non-transgenic counterparts. We observed the same effect in transgenic *Hfe*^{-/-} embryos compared with non-transgenic *Hfe*^{-/-} embryos, indicating that fetal *Hamp* might inhibit placental iron transfer even in the absence of HFE. Furthermore, total body iron content was similar in non-transgenic *Hfe*^{-/-} and non-transgenic *Hfe*^{+/?} mice, indicating that loss of *Hfe* does not increase placental iron transport. Accordingly, no iron overload has been observed in newborn *Hfe*^{-/-} mice³ or human infants with a genotype associated with HFE-dependent hemochromatosis. Iron overload is clearly apparent in *Hfe*^{-/-} mice by day 32 (ref. 3).

We next asked whether expression of the *Hamp* transgene abrogated iron loading in *Hfe*^{-/-} mice at day 32. We crossed transgenic *Hfe*^{+/?} males with non-transgenic *Hfe*^{+/?} females and analyzed liver *Hamp* mRNA expression (Fig. 4). In accord with our previous results, the level of endogenous *Hamp* mRNA was not higher in non-transgenic *Hfe*^{-/-} mice than in non-transgenic *Hfe*^{+/?} mice, although liver iron content was more than twice as high in non-transgenic *Hfe*^{-/-} mice ($283 \pm 84 \mu\text{g}$ per g in non-transgenic *Hfe*^{-/-} ($n = 13$) versus $105 \pm 22 \mu\text{g}$ per g in non-

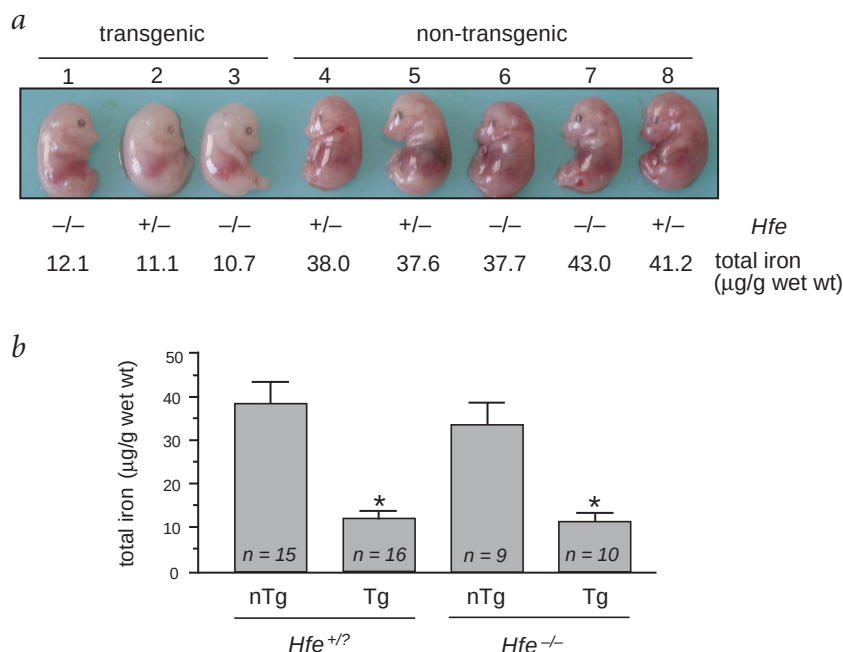


Fig. 3 Total iron content in E15.5 embryos carrying the *Hfe* mutation and the Thep27 *Hamp* transgene. To produce the transgenic *Hfe*^{-/-} mice, transgenic (Tg) mice were first mated with non-transgenic *Hfe*^{+/?} mice to obtain transgenic *Hfe*^{+/?} males. These males were interbred with non-transgenic *Hfe*^{+/?} females to produce the transgenic *Hfe*^{-/-} mice. **a**, Phenotypic analysis of a typical litter at E15.5. The genotypes of the pups are indicated. **b**, Quantification of total liver iron. Results are expressed as mean ± s.d. for the number of mice indicated, and statistical analysis was done using Student's *t*-test (unpaired, two-tailed): * $P < 0.0001$ as compared to non-transgenic (nTg) mice in each group.

transgenic $Hfe^{+/?}$ ($n = 19$). Transgenic $Hfe^{+/?}$ mice had lower liver iron content than non-transgenic $Hfe^{+/?}$ mice (68 ± 13 μg per g in transgenic $Hfe^{+/?}$ ($n = 13$) versus 105 ± 22 μg per g in non-transgenic $Hfe^{+/?}$ ($n = 19$)), probably accounting for the partial or complete extinction of endogenous *Hamp* expression. Endogenous *Hamp* mRNA was never detected in transgenic $Hfe^{-/-}$ mice, again indicating defective regulation of *Hamp* in the absence of *Hfe*. Hematological parameters, including hemoglobin concentration, were indistinguishable between transgenic $Hfe^{+/?}$ and transgenic $Hfe^{-/-}$ mice (data not shown). The most notable result was that expression of the *Hamp* transgene totally prevented iron overload in the livers of transgenic $Hfe^{-/-}$ mice (99 ± 52 μg per g in transgenic $Hfe^{-/-}$ ($n = 11$) versus 283 ± 84 μg per g in non-transgenic $Hfe^{-/-}$ ($n = 13$)). Thus, liver iron accumulation in $Hfe^{-/-}$ mice can be prevented by overexpression of a *Hamp* transgene in the first month of life, as early as 21 days (data not shown).

Because our data suggested that the Thep27 transgene was partially silenced after the first month of life, we compared liver iron content at 32 and 66 days (Fig. 5). Liver iron was constant in non-transgenic $Hfe^{+/?}$ mice, whereas liver iron stores were replenished in transgenic $Hfe^{+/?}$ mice, with values approaching those of non-transgenic $Hfe^{+/?}$ mice. As expected, liver iron content was higher in non-transgenic $Hfe^{-/-}$ mice at 66 days. Iron accumulation was still much lower in transgenic $Hfe^{-/-}$ mice at 66 days than in non-transgenic $Hfe^{-/-}$ mice, though it was higher than in 32-day-old transgenic $Hfe^{-/-}$ mice. This result probably reflects the low level of transgene expression after the first month of life.

To confirm our findings, we bred $Hfe^{-/-}$ mice with two other transgenic lines, Thep35 and Thep61, each of which maintains high level of transgene expression (Fig. 6a) and has more severe, persistent iron deficiency. The mice are anemic, and, in contrast to Thep27, endogenous *Hamp* expression is still repressed at two months. At two months, Thep35 and Thep61 mice have 53% and 33% lower hemoglobin concentrations, respectively (7.1 ± 1.0 g dl^{-1} in Thep35 mice ($n = 10$) versus 15.1 ± 0.8 in non-transgenic mice ($n = 12$), $P < 0.0001$; and 10.5 ± 1.0 g dl^{-1} in Thep61 mice ($n = 8$) versus 14.5 ± 1.1 in non-transgenic mice ($n = 8$), $P < 0.0001$). Thep35 mice also have compensatory splenomegaly, as is typically observed in mice with severe iron deficiency (N.C.A., unpublished results). Viability of both transgenic lines was poor unless they were treated with iron¹⁵, but a few mice did survive. Transgenic $Hfe^{-/-}$ mice produced from crosses with both of these lines had complete absence of iron overload compared with non-transgenic $Hfe^{-/-}$ mice at two months (Fig. 6b,c). These results indicate that sustained, high levels of *Hamp* transgene expression prevented liver iron accumulation in spite of the absence of *Hfe*. The inhibition of iron absorption depends on the level of *Hamp* transgene expression, which explains why it is associated with anemia in Thep35 and Thep61 mice but not in Thep27 mice.

In summary, we find that the absence of *Hfe* results in a failure of *Hamp* induction in spite of iron overload and that constitutive *Hamp* expression blocks iron loading in mouse hemochromatosis. Our data could be explained by a simple model in which *Hfe* acts as a regulator of *Hamp* expression and

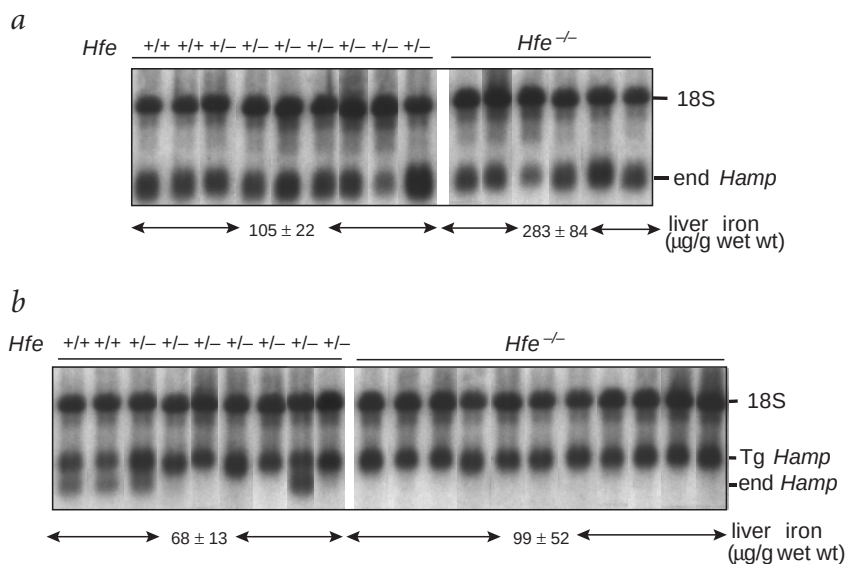


Fig. 4 Endogenous and transgenic *Hamp* expression in mice carrying the *Hfe* mutation and/or the Thep27 *Hamp* transgene. Transgenic (Tg) and endogenous (end) liver *Hamp* mRNA levels were quantified by northern blotting (as in Fig. 1b) in non-transgenic $Hfe^{+/?}$ and non-transgenic $Hfe^{-/-}$ mice (a) and in transgenic $Hfe^{+/?}$ and transgenic $Hfe^{-/-}$ mice (b) at 32 d.

Hamp modulates intestinal iron transport at the level of the mature enterocyte. If *Hfe* is just one means of controlling *Hamp* expression, and others are intact in $Hfe^{-/-}$ mice, this would explain why *Hamp* is present but not appropriately induced in those mice. Lower levels of endogenous *Hamp* expression in 66-day-old transgenic mice could be attributable to anemia in Thep35 and Thep61 mice, but this should not be the case for non-anemic Thep27 mice. The result of inappropriate *Hamp* regulation in $Hfe^{-/-}$ mice is a relatively mild iron loading compared to mice with total loss of *Hamp* expression¹³, analogous to observations in humans with severe juvenile hemochromatosis¹⁴.

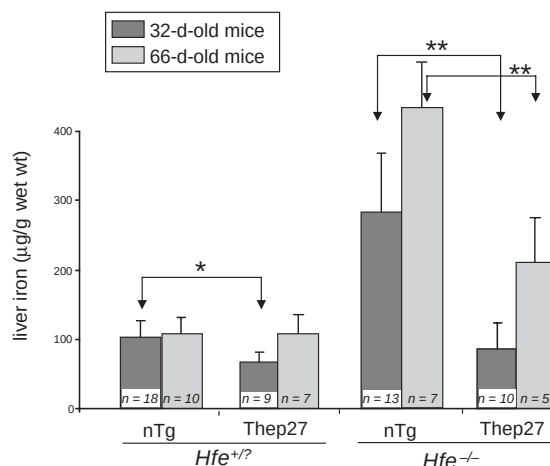


Fig. 5 Liver iron content in transgenic Thep27 $Hfe^{-/-}$ mice. Quantification of liver iron level in 32-d-old and 66-d-old Thep27 and non-transgenic (nTg) mice with and without the *Hfe* mutation. Results are expressed as mean $\pm$ s.d. for the number of mice indicated, and statistical analysis was done using Student's t-test (unpaired, two-tailed). * $P < 0.001$; ** $P < 0.0001$.

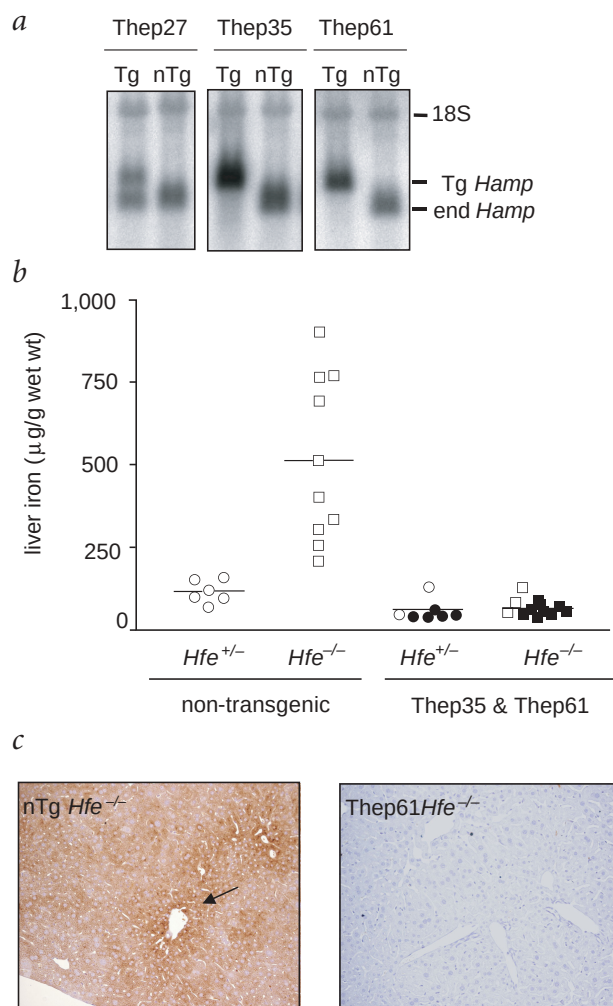


Fig. 6 Liver iron content in transgenic Thep27, Thep35 and Thep61 $Hfe^{-/-}$ mice. **a**, Transgenic (Tg) and endogenous liver *Hamp* mRNA levels, as quantified by northern blotting, in 66-d-old mice from the three transgenic mouse lines. **b**, Quantification of liver iron level in 66-d-old Thep35 (open symbols) and Thep61 (filled symbols) mice carrying the *Hfe* mutation. **c**, Liver sections from two-month-old non-transgenic (nTg) and transgenic (Tg, Thep61) $Hfe^{-/-}$ mice were stained with the 3,3-diaminobenzidine and Perl's stain to detect iron (brown). The arrow shows that iron deposition is greatest around the portal vein in non-transgenic (nTg) $Hfe^{-/-}$ mice.

expression observed in individuals who are homozygous with respect to the allele encoding C282Y mutant HFE.

HAMP gene regulation in response to iron status is not yet understood, although C/EBP α has been implicated in some aspects of promoter control²². Iron-dependent regulation of *Hamp* expression may involve cells other than hepatocytes. Indeed, iron was found to have no effect¹¹ or even to downregulate *HAMP* expression¹⁸ when added to human cultured hepatocytes. We speculate that hepatic K  pffer cells (macrophages) may communicate with hepatocytes to effect regulation of the *HAMP* response. The demonstration that IL-6, a macrophage-produced cytokine, can stimulate *HAMP* expression by hepatocytes¹⁸ supports this hypothesis. Inappropriate *HAMP* expression could mediate the pathological effects of mutations in *HFE* in hereditary hemochromatosis. Accordingly, we speculate that *HAMP* therapy could benefit individuals with hemochromatosis by preventing iron overload and its complications.

Methods

Mice. All mice used in the experiments were cared for in accordance with criteria outlined in the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. Mice were maintained in a temperature- and light-controlled environment and were given free access to tap water and food (standard laboratory mouse chow, AO3, UAR, France).

Generation of transgenic mice. Null *Hfe*-deficient mice ($Hfe^{-/-}$ mice) have been previously described³. We generated transgenic mice overexpressing *Hamp* as previously described¹⁵. Briefly, we introduced a *Hamp* cDNA fragment between transthyretin sequences (consisting of the 3 kb of the mouse transthyretin regulatory regions 5' to the cap site, the first exon, first intron and most of the second exon) and the SV40 small-T poly(A)⁺ signal sequence²³. We detected the transgene by Southern blotting and PCR analysis of DNA prepared from tail biopsy samples. Primer sequences are available on request.

Northern blotting. We denatured 20 μ g of liver RNA in formaldehyde-containing buffer and separated it by electrophoresis through 1% agarose, 2.2 M formaldehyde gels. We did northern blotting as described¹³. After electrophoresis, we transferred RNA to a nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont-NENTM Life Science Products) in 20 $\times$ saline-sodium citrate buffer. The probe used to detect *Hamp* mRNA has been previously described¹³. Owing to the presence of the SV40 small-T poly(A)⁺ sequence, the size of the transgenic *Hamp* transcript is larger than that of the endogenous transcript. We stripped each blot and reprobed it with ribosomal 18S cDNA to check for integrity and confirm the amount of loaded RNA.

Iron measurements and histochemistry. We quantified iron concentrations as previously described²⁴ on fragments or total organs using the IL test (Instrumentation Laboratory). For histochemistry, we incubated sections from liver for 20 min in 1% hydrogen peroxide in 0.1 M phosphate-buffered saline, immersed them in Perl's solution (1:1, 2% HCl and 2% potassium ferrocyanide) at room temperature for 30 min and incubated them for 10 min in 0.015% hydrogen peroxide in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

Hematological analysis of mice. We obtained blood by retro-orbital phlebotomy before mice were killed and collected it in heparinized tubes (capiject T-MLH, Terumo Medical Corporation). We determined blood cell counts and erythrocyte parameters using a MaxM coulter automatic analyzer.

We propose that *HAMP* functions to regulate iron export from enterocytes and macrophages. Normally, absorptive enterocytes retain some iron and transfer some across the basolateral membrane to enter the plasma. The iron retained by the enterocytes never enters the body; it is lost when the cells senesce and are sloughed into the gut lumen. If the fraction of iron transferred across the basolateral membrane is greater, however, more dietary iron is absorbed. If *HAMP* normally functions to limit basolateral iron release, then relative *HAMP* deficiency would result in greater net intestinal iron absorption. Similarly, if *HAMP* normally functions to limit macrophage iron release, then inappropriately low *HAMP* levels would explain both the relative iron depletion of reticuloendothelial macrophages and the higher plasma iron levels that have been consistently reported in individuals with hemochromatosis. In this model, *HAMP* would modulate the expression or activity of the cellular iron export machinery in the same way in both cell types.

At least one iron export molecule, the transporter SLC11a3 (ferroportin), is expressed both at the basolateral membrane of enterocytes and in macrophages, and its function might be modulated by *HAMP* to mediate the effects of the stores or erythroid regulator. This could easily be accomplished if *HAMP* is the final effector, downstream of HFE and the other molecules involved in sensing iron stores and bone marrow iron demand. In addition, genetic variability in the expression of *HAMP* might contribute to the wide range in phenotypic

Acknowledgments

We thank B. Grandchamp for discussions, J. Bauchet and N. Sorhaindo for technical assistance and L. Montross for maintaining and shipping *Hfe*^{-/-} mice. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Ministère de la Recherche, the Howard Hughes Medical Institute and the US National Institutes of Health. G.N. was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale and the Association Hémochromatose France.

Competing interests statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 27 January; accepted 31 March 2003.

1. Feder, J.N. *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* **13**, 399–408 (1996).
2. Zhou, X.Y. *et al.* *HFE* gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2492–2497 (1998).
3. Levy, J.E., Montross, L.K., Cohen, D.E., Fleming, M.D. & Andrews, N.C. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* **94**, 9–11 (1999).
4. Bahram, S. *et al.* Experimental hemochromatosis due to MHC class I *HFE* deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13312–13317 (1999).
5. Roy, C.N. & Enns, C.A. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* **96**, 4020–4027 (2000).
6. Trinder, D., Olynyk, J.K., Sly, W.S. & Morgan, E.H. Iron uptake from plasma transferrin by the duodenum is impaired in the *Hfe* knockout mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5622–5626 (2002).
7. Townsend, A. & Drakesmith, H. Role of *HFE* in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* **359**, 786–790 (2002).
8. Drakesmith, H. *et al.* The hemochromatosis protein *HFE* inhibits iron export from macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15602–15607 (2002).
9. Finch, C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* **84**, 1697–1702 (1994).
10. Krause, A. *et al.* LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**, 147–150 (2000).
11. Pigeon, C. *et al.* A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* **276**, 7811–7819 (2001).
12. Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J. & Ganz, T. Hepcidin: a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**, 7806–7810 (2001).
13. Nicolas, G. *et al.* Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8780–8785 (2001).
14. Roetto, A. *et al.* Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* **33**, 21–22 (2003).
15. Nicolas, G. *et al.* Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 4596–4601 (2002).
16. Nicolas, G. *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* **110**, 1037–1044 (2002).
17. Weinstein, D.A. *et al.* Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* **100**, 3776–3781 (2002).
18. Nemeth, E. *et al.* Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* **101**, 2461–2463 (2003).
19. Ajioka, R.S., Levy, J.E., Andrews, N.C. & Kushner, J.P. Regulation of iron absorption in *Hfe* mutant mice. *Blood* **100**, 1465–1469 (2002).
20. Ahmad, K.A. *et al.* Decreased liver hepcidin expression in the *hfe* knockout mouse. *Blood Cells Mol. Dis.* **29**, 361–366 (2002).
21. Bridle, K.R. *et al.* Disrupted hepcidin regulation in *HFE*-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* **361**, 669–673 (2003).
22. Courselaud, B. *et al.* *C/EBPα* regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between *C/EBP* pathway and iron metabolism. *J. Biol. Chem.* **277**, 41163–41170 (2002).
23. Yan, C., Costa, R.H., Darnell, J.E.Jr., Chen, J.D. & Van Dyke, T.A. Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *EMBO J.* **9**, 869–878 (1990).
24. Torrance, J.D. & Bothwell, T.H. Tissue iron stores. *Methods Hematol.* **1**, 90–115 (1980).