



HAL
open science

Analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine humaine et mécanismes moléculaires associés à l'hémochromatose de type 4

Marlène Le Tertre

► To cite this version:

Marlène Le Tertre. Analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine humaine et mécanismes moléculaires associés à l'hémochromatose de type 4. Génétique humaine. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2020. Français. NNT : 2020BRES0095 . tel-03934657

HAL Id: tel-03934657

<https://theses.hal.science/tel-03934657v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Génétique, Génomique, Bioinformatique

Par

Marlène LE TERTRE

Analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine humaine et mécanismes moléculaires associés à l'hémochromatose de type 4

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 17 décembre 2020

Unité de recherche : Inserm UMR1078, Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies, Brest

Rapporteurs avant soutenance :

François CANONNE-HERGAUX
Frédérique VERDIER

CRCN, Université Paul Sabatier - Toulouse 3
DR, Université Paris Descartes - Paris 5

Composition du Jury :

Président : Isabelle CALLEBAUT

DR, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6

Examineurs : François CANONNE-HERGAUX
Frédérique VERDIER
Gaël NICOLAS
Isabelle CALLEBAUT
Nicolas LEBONVALLET

CRCN, Université Paul Sabatier - Toulouse 3
DR, Université Paris Descartes - Paris 5
CR, Université Paris Diderot - Paris 7
DR, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6
IgR, Université de Bretagne Occidentale

Dir. de thèse : Gérald LE GAC

PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. Un grand merci aux Dr. Frédérique Verdier et François Canonne-Hergaux d'avoir accepté de rapporter ce travail et du temps consacré à le faire. Je remercie aussi grandement les Dr. Gaël Nicolas, Isabelle Callebaut et Nicolas Lebonvallet de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Un grand merci au Pr. Claude Férec et au Dr. Emmanuelle Génin de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'unité Inserm 1078.

Je remercie également l'école doctorale Biologie-Santé de m'avoir permis, notamment, de suivre des formations très intéressantes pendant ces années de thèse mais aussi de m'avoir accueillie pendant les conseils ainsi que dans la commission « Suivi des thèses et Formation » en tant que représentante des doctorants, une expérience qui fut pour moi, très enrichissante.

Je tiens à remercier l'UBO, le CHRU, l'EFS, l'Inserm et le Labex GR-Ex d'avoir participé au financement de ces travaux de thèse.

A nouveau, je remercie très chaleureusement les Dr. Gaël Nicolas et Nicolas Lebonvallet qui étaient également les membres de mon Comité de Suivi Individuel. Merci beaucoup pour le temps que vous m'avez consacré, pour votre suivi, pour votre bienveillance et pour vos précieux conseils tout au long de ces 4 années de thèse.

Un grand merci au Dr. François Canonne-Hergaux pour le partage de vos anticorps anti-ferroportine humaine, de vos protocoles ainsi que pour vos conseils avisés notamment en termes de western blot.

Je remercie grandement le Dr. Isabelle Callebaut pour l'apport ô combien important de la dimension structurale de ce projet. Merci beaucoup d'avoir répondu à mes questions, d'avoir pris le temps de relire et corriger mes présentations orales ainsi que ce manuscrit. Merci également au Dr. Ahmad Elbahnsi dont le travail a apporté un relief non négligeable à ces travaux de thèse.

Je tiens également à remercier toutes les autres personnes qui m'ont aidée à faire progresser mes travaux de thèse : le Dr. Cécile Ged, qui a identifié la mutation p.Gln478Arg, les Dr. Sophie Hillion et Pierre Pochard pour leurs conseils en cytométrie en flux, le Dr. Kjetil Ask et son équipe qui nous ont transmis les protocoles de différenciation et de polarisation, le Dr. Julie Tabiasco qui nous a conseillés sur les marqueurs « M2 », le Dr. Carine Lefevre qui a travaillé à l'établissement des clones THP-1 « p.Gly80Ser » ainsi que les Dr. Eric Lippert et Valérie Prouzet Mauléon qui m'ont orientée vers la méthylcellulose pour isoler mes clones CRISPR-Cas9. Merci également à tous les stagiaires que j'ai eu l'opportunité de co-encadrer : Kevin, Vincent, Nicolas, Aminati et Dana.

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de thèse, le Pr. Gérald Le Gac. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir toujours encouragée, de m'avoir appris tout ce que tu m'as appris mais aussi de m'avoir tendu la main quand j'en avais besoin. Il va sans dire que je te remercie également pour la relecture et les corrections de ce manuscrit et de tous les autres.... ! Ce fut un réel plaisir de travailler sous ta direction pendant ces presque 6 années !

Merci également au Dr. Yann Fichou, pour ses questions pertinentes et ses conseils avisés notamment lors des répétitions d'oraux ! Merci aussi au Dr. Jian-Min Chen de nous avoir permis de prendre part au projet GT>GC mais aussi pour ses remarques toujours utiles !

Je tiens également à remercier Laurent et Catherine Corcos de m'avoir permis d'utiliser le cytomètre en flux ainsi que Danielle et Brigitte qui m'ont toujours aidée.

Merci également à Laurence, Christine, Gaëlle et Gaëlle ainsi que tout le personnel de l'EFS pour leur gentillesse et leur aide précieuse.

Merci aux Dr. Pascal Trouvé et Mathieu Kerbiriou qui m'ont accueillie en premier au laboratoire lors de mon stage de Master 1 sans oublier Florentin, Marie-Laure, Nathalie et Sophie qui m'ont épaulée pendant ces deux mois !

Merci à Sophie, toujours présente pour donner un coup de main et à Michèle Kerleroux pour son aide précieuse avec tous ces documents administratifs !

Un grand merci au Dr. Ka sans qui le labo tournerait beaucoup beaucoup beaucoup moins bien et les thésards avec ! Toujours là pour répondre à mes 10 000 questions, tu m'as sauvé la vie plus d'une fois à défaut de me l'avoir ôtée à l'escalade ! Merci pour tous ces bons moments passés, et il y en a beaucoup ! Et promis, je trie les congélateurs avant de partir... si tu me montres toutes tes cachettes dans le faux plafond ! hihhi Merci également pour les relectures et corrections !!

Merci beaucoup à toi JG, toi qui m'as accueillie avec une grande bienveillance et qui m'as rassurée plus d'une fois même si tu m'as lâchement abandonnée dans le tramway nantais, chose que je tente d'oublier tant bien que mal depuis... ! Merci pour ces moments hauts en couleurs dont fait partie ton enterrement de vie de jeune fille duquel je garde quelques citations gravées en mémoire signées notamment par Miss Létondor. Une grosse pensée à ta petite famille aussi, à mamie Michèle, Matthieu, Louann et Elaïa !

Je tiens également à te remercier Loann, mon binôme de thèse avec qui j'ai tout traversé, de la gestion de l'asso' Dakodoc au domptage du CRISPR-Cas9 ! J'ai eu beaucoup de chance de tomber sur toi, d'ailleurs laisse-moi te dire que la thèse n'a plus la même saveur depuis ton départ ! Remercie pour moi mamie Chantal pour ses fars bretons du lundi matin !

Merci à toi Kévin pour ta bonne humeur depuis ton arrivée, ton aide et ces échanges toujours des plus sympathiques ! Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse, ne t'inquiètes pas, tu vaincras !

Un grand merci à toi Gayëlle, pour ta passion des faits divers qui anime nos pauses déjeuner, cette découverte et maintenant cette addiction à la « Marie Morin » ! Merci pour ces bons moments passés ensemble, je te souhaite tout le meilleur pour l'avenir ! Un gros bisou à la petite Margaux !

Merci beaucoup aux Isabelles (Gourlaouen et Berlivet) pour votre aide précieuse, votre gentillesse, vos encouragements et toutes ces petites discussions au cours de la journée qui participent à la bonne humeur ambiante ! Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous deux !

Merci à toi, Anne, la toulousaine-brestoïse, pour ces soirées passées ensemble avec ou sans araignées avec ou sans ronde des vins et avec ou sans baroom' ... on aura bien ri pendant toutes ces années !

Un grand merci à toi Nath, toi qui m'as vue grandir et qui m'as en partie appris la vie ! Je pense d'ailleurs que tu as une grande part de responsabilité dans les TOCs que j'ai développés à la paillasse : #psychopatheduwesternblot. Merci à ton acolyte Pascal B, toujours un plaisir de te croiser !

Un grand merci à Rosyne, pour ton accent chantang qui nous ramène le soleil, pour ces nombreuses discussions sur la vie, pour tes conseils d'ancienne thésarde et pour ces bonnes soirées passées ensemble !

Evidemment je n'oublie pas Dr. Boulling. Merci de m'avoir raconté toutes tes théories, souvent fumeuses, il faut l'avouer, sur la vie pendant ces longues heures de culture cellulaire. Pour ces soirées épiques au Baroom', pour ces parties de scrabble endiablées et pour ces partages de vidéos « satisfaisantes » (à ce propos, merci de partager certaines particularités psychologiques avec moi, je me sens moins seule !)

Merci aux autres doctorants : Ozvan, Lucas, Anaïs, Mégane, Guillaume, Aziliz, Elise pour les soirées Dakodoc, pour ces discussions dans le couloir ou pendant la pause déjeuner qui égayent la vie doctorante; Paul et Manu pour les traquenards au 54, Aline, Gaëlle et Yann en souvenir de ce retour mémorable en voiture des journées scientifiques de l'ED avec Loann ; Alice, Gaël, Lisa et Marion pour votre bienveillance en tant qu'anciens thésards.

Thank you à Wen-Bin, Hao, Jin-Huan, Jairak et Shuang Shuang Jia pour ces discussions en frananglais-chinois-thaï et ces découvertes culinaires parfois hautes en couleurs !

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de l'unité Inserm 1078 pour son accueil et sa gentillesse.

Un grand merci à mes amis pour leur soutien sans faille. A ma Camaïeu, ma meilleure amie pour la vie de la rue parallèle comme disait la petite Sophie ! J'ai une chance énorme de traverser la vie à tes côtés depuis la petite section ! Merci également à Laurie et Hélène, mes amies qui me manquent et que je ne vois pas assez, j'ai grand hâte de passer plus de temps avec vous les filles et d'apprendre à connaître les deux petits Barbouez !

Merci à Yuna avec qui j'ai débarqué à Brest en 2012, pour tous ces bons moments passés l'une chez l'autre à manger du poisson pané coquille (ok ça c'était surtout chez moi), et à papoter et rigoler jusqu'à pas d'heure et autres soirées de folies qui me manquent terriblement depuis ton départ pour d'autres contrées ! J'espère bien rattraper le temps perdu en m'incrutant dans votre voilier par-ci par-là aux quatre coins du monde, je suis sûre que Floflo sera ravi !

Merci à toi ma S, pour ces appels France-Australie pendant lesquels tu me fais bien rire avec tous tes potins du bout du monde ! Promis un jour je viendrai te voir au pays des kangourous !

Merci à toi mon Tritri pour ces Art Rock endiablés qui font du bien, même si on te court après en fin de soirée !

Une pensée particulière à toi Seb, toi qui m'as toujours soutenue dans les études, merci pour ça et pour tout le reste !

Je tiens à remercier ma famille ainsi que ma belle-famille pour votre soutien.

Un immense merci à ma petite sœur bien aimée. J'ai le cœur serré en pensant que c'est la fin de notre super coloc', je pense même que les embrouilles devant le monticule de vaisselle du vendredi soir vont me manquer ! Merci d'être toujours là, dans les bons comme dans les mauvais moments, j'ai une chance inouïe de t'avoir, la vie doit être terriblement fade sans petite sœur !

Un grand merci à mes parents. A toi Maman, toujours là pour nous. Merci de nous soutenir dans tout ce qu'on entreprend avec bienveillance ! Merci à toi Papa, pour ces chocolats chauds/petits Lu du dimanche soir, pour ces fous rires mais aussi pour tes paroles réconfortantes dont toi seul a le secret !

Merci du fond du cœur à toi mon Théo, toi qui m'as écoutée parler de ma thèse pendant des heures sans sourciller (ou presque...), merci de me faire rire et de me soutenir quand j'en ai besoin ! Je trépigne d'impatience de ressortir les sacs à dos et la tente pour repartir à l'aventure avec toi et continuer d'explorer le monde à tes côtés !

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	6
Liste des abréviations	9
Table des figures et tableaux	11
Introduction.....	13
I- Le métabolisme du fer - Généralités	15
a- Importance et toxicité du fer dans l'organisme	15
b- Répartition du fer dans l'organisme.....	15
c- Les cellules spécialisées du métabolisme du fer	16
i. Absorption du fer alimentaire par les entérocytes	17
ii. Synthèse des érythrocytes dans la moelle osseuse	18
iii. Recyclage du fer des globules rouges sénescents par les macrophages	20
iv. Stockage du fer par les hépatocytes	22
II- Régulation cellulaire et systémique de la ferroportine.....	24
a- Mise en évidence du rôle de la ferroportine.....	24
b- Régulation cellulaire de l'expression de la ferroportine	25
i. Dans les macrophages.....	25
ii. Dans les entérocytes	26
iii. Régulation post-transcriptionnelle de la ferroportine par les petits ARN non codants ...	27
c- Régulation systémique de la ferroportine par l'hepcidine.....	27
i. Généralités sur les protéines MFS.....	28
ii. Premiers modèles de la structure tridimensionnelle de la ferroportine humaine	30
iii. L'hepcidine	33
iv. Régulation de la ferroportine par l'hepcidine	35
v. Les principales voies de régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine	37
III- L'hémochromatose de type 4 ou maladie de la ferroportine	41
a- L'hémochromatose de type 1.....	43
i. Cause génétique	43
ii. Manifestations biologiques	43
iii. Expression clinique	44
iv. Diagnostic et traitement.....	45
b- L'hémochromatose de type 2A, 2B et 3	46

c-	L'hémochromatose de type 4 ou maladie de la ferroportine	46
i.	L'hémochromatose de type 4A	46
ii.	L'hémochromatose de type 4B	47
iii.	Evolution de la nomenclature	48
iv.	Hétérogénéité phénotypique de l'hémochromatose de type 4	48
IV-	Bases moléculaires de l'export du fer et de la régulation par l'hepcidine.....	50
a-	Structures expérimentales de la ferroportine.....	50
b-	Mécanisme d'export du fer de la ferroportine	51
i.	Site de liaison du calcium dans le lobe N-ter	52
ii.	Site de liaison du fer dans le lobe C-ter.....	53
iii.	Modèle du cycle de transport du fer par la ferroportine selon Deshpande et collaborateurs.....	54
iv.	Les « gating-residues »	55
c-	Régulation post-traductionnelle de la ferroportine par l'hepcidine.....	60
Objectifs	63
Résultats	66
I-	Organisation structurale et fonctionnelle de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine.....	67
a-	Article "Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A "	67
b-	Article "New insights into the step-by-step mechanism of iron export by human ferroportin and the underlying molecular basis of disease"	81
II-	Bases moléculaires du mécanisme de résistance partielle à l'hepcidine.....	109
a-	Contexte	109
b-	Matériel et méthodes.....	116
c-	Résultats	121
III-	Questions posées au cours de la thèse	139
a-	Caractérisation structurale et fonctionnelle des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn en lien avec les observations de Deshpande et collaborateurs	139
i.	Contexte	139
ii.	Matériel et méthodes.....	140
iii.	Résultats	143
b-	Analyse de l'effet de variations faux-sens sur l'épissage du pré-ARN messager <i>SLC40A1</i> .	147
IV-	Développement d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude fonctionnelle de la ferroportine.....	179
a-	Contexte	179
b-	Matériel et méthodes.....	180

i.	Mise au point d'un protocole de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 en macrophages de type M2.....	180
ii.	Création de cellules THP-1 éditées au locus <i>SLC40A1</i> par la technologie CRISPR-Cas9..	181
iii.	Mise en place et validation de tests fonctionnels : analyse de la présence en membrane plasmique de la ferroportine endogène dans les cellules THP-1	186
c-	Résultats	187
i.	Mise au point d'un protocole de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 en macrophages de type M2.....	187
ii.	Création de cellules THP-1 éditées au locus <i>SLC40A1</i>	190
iii.	Mise en place et validation de tests fonctionnels.....	195
Discussion	200
I-	Etude structure/fonction du mécanisme d'export du fer et de la résistance partielle à l'hepcidine de la ferroportine	201
a-	Mécanisme d'export du fer de la ferroportine	201
b-	Mécanisme de résistance partielle de la ferroportine à l'hepcidine.....	206
II-	Analyse de l'effet de variations faux-sens sur l'épissage du pré-ARN messenger <i>SLC40A1</i>	208
III-	Développement d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude fonctionnelle de la ferroportine.....	209
Conclusion	213
Références bibliographiques	215

Liste des abréviations

3D	Tridimensionnel
ABCB10	ATP-Binding Cassette subfamily B member 10
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARE	Antioxidant Response Elements
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BbFPN	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> ferroportin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP-RE	Bone Morphogenetic Protein-Responsive Elements
CD	Cluster of Differentiation
DCYTB	Duodenal CYTochrome B
DEER	Double Electron-Electron Resonance
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DTT	DiThioThrétol
EPO	Erythropoïétine
ERFE	Erythroferrone
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
⁵⁵ Fe	Isotope 55 du fer
FECH	Ferrochelatase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLVCR	Feline Leukemia Virus subgroup C cellular Receptor
FPN/FPN1	Ferroportine 1
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
HCP-1	Heme Carrier Protein 1
HDR	Homology-Directed-Repair
HIFs	Hypoxia-Inducible Factor
HJV	Hémojuvéline
HO-1	Hème oxygénase-1
HRE	HIF Response Elements
HRG1	Heme-Responsive Gene-1
HRP	Horseadish Peroxidase
IL	Interleukine
IRE	Iron Responsive Element
IREG1	Iron-REgulated Gene 1
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

IRP	Iron Regulatory Protein
I-TASSER	Iterative Threading ASSEMBLY Refinement
MARE	Maf Recognition Elements
MFS	Major Facilitator Family
MTP1	Metal Transporter Protein 1
NCOA4	Nuclear receptor CO-Activator 4
NHEJ	Non-Homologous-End-Joining
NTBI	Non-Transferrin-Bound Iron
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBPs	Poly(rC)-Binding Proteins
PDB	Protein Data Base
PHD	Prolyl-Hydroxylases
Phyre	Protein Homology/analogy Recognition Engine
PLA	Proximity Ligation Assay
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PS	PhosphatidylSerine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLC39A14	Solute Carrier Family 39 member 14
SLC40A1	Solute Carrier Family 40 member 1
SMAD	(Small) Mothers Against Decapentaplegic
smFRET	single-molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STEAP3	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3
SVF	Sérum de Veau Fétal
TBS	Tris Buffered Saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TfR1	Transferrin Receptor 1
TfR2	Transferrin Receptor 2
TLR	Toll Like Receptors
TM	Hélice transmembranaire
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	UnTranslated Region
WT	Wild-Type
ZIP14	ZRT/IRT-like Protein 14

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme du fer chez l'Homme (d'après Papanikolaou & Pantopoulos, 2017)	16
Figure 2 : Absorption du fer alimentaire par les entérocytes.	18
Figure 3 : Acquisition et utilisation du fer par les cellules érythroïdes.	20
Figure 4 : Recyclage du fer des globules rouges sénescents par les macrophages.	21
Figure 5 : Stockage du fer en excès par les hépatocytes.....	23
Figure 6 : Repliement des transporteurs MFS (d'après Vishwakarma <i>et al</i> , 2018).....	28
Figure 7 : Modèle de transport, dit d' « alternating access », utilisé par les protéines MFS pour transporter leurs substrats à travers les membranes cellulaires.....	29
Figure 8 : Modèle bidimensionnel de la ferroportine proposé en 2005 par Liu et collaborateurs (Liu <i>et al</i> , 2005).....	30
Figure 9 : Modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine proposé par Wallace et collaborateurs en 2010 (Wallace <i>et al</i> , 2010).....	31
Figure 10 : Représentation en ruban du modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine construit en 2013 par le Dr. Isabelle Callebaut (d'après Le Gac <i>et al</i> , 2013).....	32
Figure 11 : Représentation en ruban des modèles tridimensionnels de la ferroportine humaine proposés par Bonaccorsi di Patti et collaborateurs en 2014 (d'après Bonaccorsi di Patti <i>et al</i> , 2014).	33
Figure 12 : Séquence protéique et structure tridimensionnelle de la forme mature et active de l'hepcidine (d'après Jordan <i>et al</i> , 2009 et Clark <i>et al</i> , 2011).....	34
Figure 13 : Les principales voies de régulation de l'expression hépatique d'hepcidine.	40
Figure 14 : Les 5 stades phénotypiques de l'hémochromatose de type 1 (d'après Brissot <i>et al</i> , 2008).	44
Figure 15 : Modèles tridimensionnels de la ferroportine humaine construits par le Dr. Isabelle Callebaut à partir des structures expérimentales de l'homologue bactérien BbFpn, cristallisé par Taniguchi et collaborateurs en 2015.....	51
Figure 16 : Localisation, sur le modèle 3D de la ferroportine humaine construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « outward-facing », des sites de liaison du fer et du calcium successivement proposés.....	53
Figure 17 : Site de liaison du fer identifié par Billesbølle et collaborateurs dans le lobe C-terminal de la ferroportine par des simulations de dynamique moléculaire (Billesbølle <i>et al</i> , 2020).	54
Figure 18 : Modèle du mécanisme d'export du fer de la ferroportine proposé par Deshpande et collaborateurs en 2018 (Deshpande <i>et al</i> , 2018).	55
Figure 19 : Modèle du « clamp-and-switch » (Quistgaard <i>et al</i> , 2016).....	56
Figure 20 : Alignement de la séquence protéique de BbFpn avec celles de différentes ferroportines (FPN) eucaryotes (Taniguchi <i>et al</i> , 2015).	58
Figure 21 : Réseaux d'interactions intra- et inter-lobes formant la « gate » intracellulaire de l'homologue bactérien BbFpn; décrits par Taniguchi et collaborateurs en 2015 (d'après Guellec <i>et al</i> , 2019).....	59
Figure 22 : Représentation en ruban du modèle 3D de la ferroportine humaine construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « outward-facing », avec les différents réseaux d'interactions qui formeraient la « gate » intracellulaire.....	60

Figure 23 : Fixation de l'hepcidine et changements conformationnels de la ferroportine (d'après Billesbølle <i>et al</i> , 2020).	61
Figure 24 : Localisation des acides aminés ciblés par les variations p.Ser47Phe et p.Gly204Ser sur le modèle 3D de la ferroportine humaine, construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « outward-facing ».	116
Figure 25 : Etude <i>in silico</i> de l'importance structurale et fonctionnelle des résidus Gly204 et Ser47.	137
Figure 26 : Localisation des sites de liaison du fer et du calcium proposés par Deshpande et collaborateurs en 2018, sur le modèle 3D de la ferroportine humaine construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « inward-facing ».	139
Figure 27 : Evaluation de la capacité de la ferroportine de type sauvage et des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn à exporter le fer.....	144
Figure 28 : Evaluation de la présence à la surface des cellules HEK293T de la ferroportine de type sauvage et des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn.	145
Figure 29 : Analyse <i>in silico</i> du rôle de l'acide aspartique 325 à partir des structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine publiées par Billesbølle et collaborateurs.	146
Figure 30 : Carte du plasmide pcDNA3.1 (+) utilisé pour la construction de l'ADN donneur linéaire.	182
Figure 31 : Schéma récapitulatif de la stratégie adoptée pour construire l'ADN donneur linéaire. ...	183
Figure 32 : Analyse par RTqPCR de l'expression des différents marqueurs M2 (<i>CCL18</i> , <i>CD163</i> et <i>CD206</i>) et de la ferroportine (<i>FPN</i>) à l'issue des différents protocoles de polarisation des cellules THP-1 en macrophages de type M2.....	189
Figure 33 : Stratégie CRISPR-Cas9 utilisée pour construire un clone THP-1 avec un des deux allèles du gène <i>SLC40A1</i> invalidé.....	191
Figure 34 : Caractérisation par séquençage de type Sanger du clone 3.	192
Figure 35 : Séquençage Sanger des ARNm <i>SLC40A1</i> reverse transcrits des cellules THP-1 natives et du clone 3.	193
Figure 36 : Premier test en western blot des anticorps anti-ferroportine humaine, mis à disposition par le Dr. François Canonne-Hergaux (HuFPN1 et HuFPN2).	195
Figure 37 : Evaluation de la capacité de l'anticorps HuFPN1 à révéler la ferroportine endogène exprimée par les cellules THP-1.	197
Figure 38 : Schéma repositionnant les différents éléments qui pourraient intervenir dans le basculement conformationnel « outward- » vers « inward-facing » de la ferroportine sur les modèles 3D du transporteur humain construits par le Dr. Isabelle Callebaut.	204
Figure 39 : Schéma repositionnant les différents éléments qui pourraient intervenir dans le basculement conformationnel « inward- » vers « outward-facing » de la ferroportine sur les modèles 3D du transporteur humain construits par le Dr. Isabelle Callebaut.	205
Figure 40 : Observation par microscopie (x400) de la capacité de monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 à endocyter des érythrocytes sénescents. ...	210
Tableau I : Les différentes formes d'hémochromatose (d'après Pietrangelo, 2017).....	42
Tableau II : Liste des amorces de mutagenèse utilisées pour générer les différentes constructions plasmidiques ayant servi à étudier le rôle de l'acide aspartique 325.....	141
Tableau III : Amorces utilisées pour vérifier par séquençage la conformité de la séquence codante du gène <i>SLC40A1</i>	141
Tableau IV : Amorces de RTqPCR utilisées pour étudier l'expression des marqueurs M2 et de la ferroportine.....	181
Tableau V : Mutations observées dans les clones 28 et 39 à l'état hétérozygote au locus <i>SLC40A1</i>	194

Introduction

L'hémochromatose de type 4 est une maladie héréditaire du métabolisme du fer. Elle est engendrée par des mutations du gène *SLC40A1* qui code la seule protéine exportatrice de fer décrite chez les mammifères : la ferroportine 1.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux bases moléculaires de cette pathologie ainsi qu'aux mécanismes d'export du fer et de régulation de la ferroportine 1 par un petit peptide circulant nommé hepcidine.

Dans cette partie introductive, je souhaitais tout d'abord rappeler brièvement quelques généralités sur le métabolisme du fer et sur la régulation cellulaire et systémique de la ferroportine 1 avant de présenter la pathologie ainsi que les derniers éléments rapportés dans la littérature concernant la structure, le mécanisme d'export du fer et la régulation du transporteur par l'hepcidine.

N.B. Par choix, et puisque n'existe pas d'autre protéine exportatrice du fer chez les mammifères, j'utilise l'appellation « ferroportine » (FPN) dans l'ensemble du manuscrit au lieu de l'appellation ferroportine 1 (FPN1) qui est utilisée par différents auteurs.

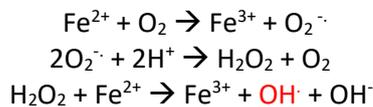
I- Le métabolisme du fer - Généralités

a- Importance et toxicité du fer dans l'organisme

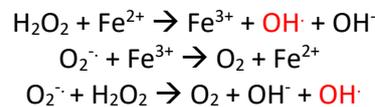
Par sa capacité à passer d'un état d'oxydation à un autre en gagnant ou en perdant un électron (fer ferreux Fe^{2+} / fer ferrique Fe^{3+}), le fer qui entre dans la composition de nombreuses métalloprotéines, régit une multitude de fonctions clés chez l'Homme. En tant que constituant de l'hémoglobine, le fer est indispensable au transport et à la distribution de l'oxygène par les globules rouges aux différents tissus et organes de l'organisme. Contenu dans la myoglobine, il permet le stockage et l'approvisionnement en oxygène des muscles. Le fer est également utilisé comme cofacteur par d'autres protéines : des enzymes héminiques ou non héminiques dont font partie les protéines à centre fer-soufre. Ces protéines sont impliquées dans différentes fonctions biologiques cruciales que représentent, par exemple, le métabolisme de l'oxygène (catalases, peroxydases), la respiration cellulaire et le transport d'électrons (cytochromes) ou bien encore la synthèse de l'ADN (ribonucléotide reductase) (Geissler & Singh, 2011; Ganz, 2013).

Bien que le fer soit indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, celui-ci peut s'avérer extrêmement dangereux. Ses capacités d'oxydo-réduction (fer ferreux Fe^{2+} / fer ferrique Fe^{3+}) en conditions aérobies sont à la base de sa toxicité. Le fer libre en excès agit comme catalyseur du stress oxydatif *via* les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, générant de manière incontrôlée des radicaux hydroxyles (OH \cdot), une espèce hautement réactive de l'oxygène (ROS – « Reactive Oxygen Species »).

Réaction de Fenton :



Réaction d'Haber-Weiss:



Les radicaux hydroxyles, en réagissant avec diverses biomolécules, peuvent entraîner de sérieux dommages cellulaires (mutagenèse de l'ADN, peroxydation lipidique, oxydation des protéines) (Valko *et al*, 2016). Par ailleurs, il est important de noter que la présence d'oxygène provoque une oxydation du fer ferreux en fer ferrique, qui, à pH physiologique est insoluble (Pantopoulos *et al*, 2012).

Ainsi, l'organisme fait face à un véritable défi: approvisionner les cellules en quantités de fer suffisantes à leur métabolisme tout en prévenant sa toxicité en conditions aérobies.

b- Répartition du fer dans l'organisme

Le métabolisme du fer, qui repose sur de nombreux flux de fer entre les différents organes et tissus de l'organisme, se déroule presque exclusivement en circuit fermé (Figure 1). Seuls 1 à 2 mg de fer, sur les 3 à 5 g que compte l'organisme d'un être humain adulte, sont perdus quotidiennement par desquamation ou saignements (Green *et al*, 1968). L'absorption intestinale de fer, permise par les entérocytes à partir du bol alimentaire, compense quotidiennement ces pertes.

La grande majorité du fer (60 à 70 %) est retrouvée dans l'hémoglobine des globules rouges circulants. Les flux de fer les plus importants de l'organisme (20 à 25 mg par jour) se concentrent au niveau de la boucle de recyclage des érythrocytes sénescents. Celle-ci s'établit entre la moelle osseuse, lieu de l'érythropoïèse, et les macrophages de la rate et du foie qui, suite à l'érythrophagocytose des globules rouges sénescents, recyclent et relarguent le fer dans le compartiment sanguin. Les hépatocytes, quant à eux, contiennent 20 à 30 % du fer de l'organisme. Celui-ci y est mis en réserve dans la ferritine, protéine de stockage cytosolique. Enfin, le fer est également retrouvé, en quantités moins importantes, dans d'autres organes et tissus, notamment dans les muscles (myoglobine). Les échanges continuels de fer entre les lieux d'absorption, d'utilisation, de recyclage et de stockage sont permis par la transferrine qui lie et transporte cet ion métallique à travers le compartiment sanguin. L'appellation « apotransferrine » distingue la transferrine non chargée en fer de la forme associée au métal nommée « holotransferrine » (Geissler & Singh, 2011; Ganz, 2013).

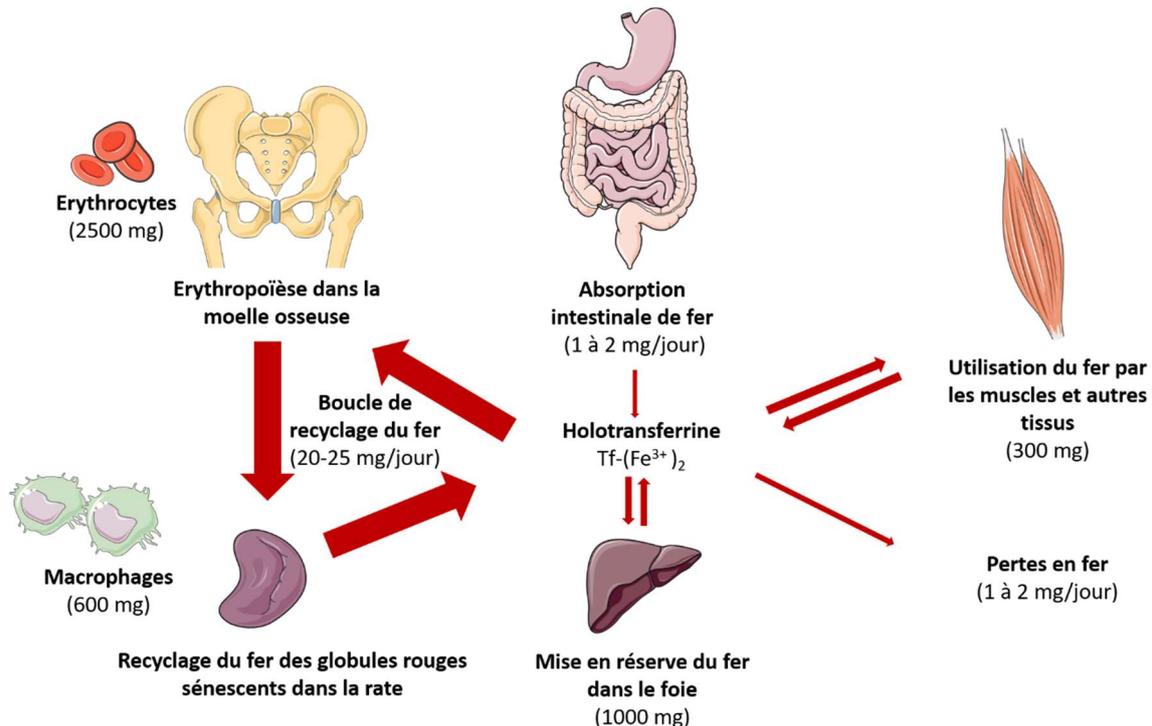


Figure 1 : Représentation schématique du métabolisme du fer chez l'Homme (d'après Papanikolaou & Pantopoulos, 2017) .

Les flux de fer les plus importants, 20 à 25 mg par jour, sont retrouvés dans la boucle de recyclage du fer située entre la moelle osseuse (érythropoïèse) et la rate (macrophages recyclant le fer des globules rouges sénescents). Le fer est principalement stocké dans les hépatocytes. Une quantité non négligeable de fer est également retrouvée au niveau musculaire, liée à la myoglobine. 1 à 2 mg de fer sont perdus chaque jour (desquamation, saignements), mais cette perte est compensée par l'absorption de fer alimentaire à travers les entérocytes.

c- Les cellules spécialisées du métabolisme du fer

Le métabolisme du fer s'appuie principalement sur 4 types cellulaires : les entérocytes, les érythroblastes, les macrophages et les hépatocytes. Ces cellules ainsi que le compartiment sanguin font intervenir une multitude de protéines régissant leurs fonctions, cruciales pour l'homéostasie du fer. En liant ou stockant le fer sous forme ferrique Fe^{3+} ou en le transportant sous forme ferreuse Fe^{2+}

au travers des membranes cellulaires, ces protéines évitent que celui-ci ne se retrouve sous forme libre, potentiellement toxique.

i. Absorption du fer alimentaire par les entérocytes

Le duodénum, ainsi que le segment proximal du jéjunum, représentent la seule voie d'entrée physiologique du fer dans l'organisme. Les entérocytes y absorbent quotidiennement des quantités modestes à savoir, 1 à 2 mg sur les 13 à 18 mg de fer contenus dans le bol alimentaire journalier d'un homme adulte. Le métal y est retrouvé sous deux formes différentes : le fer héminique, apporté principalement par la viande rouge, et le fer inorganique (ou non héminique) contenu notamment dans les légumes et les céréales (Fuqua *et al*, 2012).

L'absorption intestinale de ces deux formes de métal dont le taux d'assimilation diffère (la forme héminique étant mieux absorbée que l'inorganique), ne repose pas sur le même mécanisme de transport (Figure 2) (Layrisse *et al*, 1969) :

- Le fer inorganique qui arrive dans la lumière intestinale est majoritairement sous forme oxydée Fe^{3+} . Celui-ci est réduit par la ferri-reductase DCYTB (« Duodenal CYTochrome B ») en fer ferreux Fe^{2+} avant d'être importé à travers la membrane apicale des entérocytes par le transporteur de cations divalents DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 »), également appelé NRAMP2 ou SLC11A2 (McKie *et al*, 2001; Gunshin *et al*, 2005).
- Le mécanisme de transport permettant au fer héminique de pénétrer dans les entérocytes n'est, quant à lui, pas encore totalement élucidé. HCP-1 (« Heme Carrier Protein 1 ») a été proposé comme étant un possible transporteur de l'hème, libéré au préalable des hémoprotéines par protéolyse dans le tractus digestif (Conrad *et al*, 1967; Shayeghi *et al*, 2005). Cependant, Qiu et collaborateurs ont observé qu'HCP-1 transporte les folates avec une meilleure affinité que l'hème et qu'une mutation perte de fonction de ce transporteur entraîne un déficit héréditaire en folates (Qiu *et al*, 2006). Ces travaux suggèrent qu'il existe une (d') autre(s) voie(s) d'entrée de l'hème dans les entérocytes (Qiu *et al*, 2006) qui n'ont pas clairement été identifiées à ce jour (Wang & Babitt, 2019; Camaschella *et al*, 2020). Arrivé dans le cytoplasme, l'hème est catabolisé par l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Kappas *et al*, 1993).

Le fer libéré de l'hème va, au même titre que le fer inorganique importé par DMT1, servir au métabolisme de la cellule (notamment en étant utilisé pour la synthèse des groupements prosthétiques martiaux dans la mitochondrie) et/ou être mis en réserve dans la ferritine (ce pool de fer pourra être perdu par desquamation des entérocytes) et/ou être exporté dans le compartiment sanguin selon les besoins en fer de l'organisme. Pour cette dernière action, le fer ferreux Fe^{2+} va être transporté à travers la membrane basolatérale de l'entérocyte par le seul exportateur de fer connu chez les mammifères, la ferroportine (Donovan *et al*, 2005). Ce transport sera couplé à l'oxydation du fer ferreux Fe^{2+} en fer ferrique Fe^{3+} par l'héphaestine, ferroxidase exprimée à la membrane des entérocytes. L'observation d'une accumulation de fer dans les entérocytes de souris possédant une délétion partielle du gène codant cette ferroxidase, souligne la nécessité de cette dernière étape pour l'export du fer dans le compartiment sanguin (Vulpe *et al*, 1999).

Une fois oxydé, le fer va pouvoir être pris en charge dans le sang par la transferrine. Cette glycoprotéine produite majoritairement par le foie possède deux lobes homologues N et C-terminaux, tous deux en

capacité de lier un atome de fer Fe^{3+} (Jeffrey *et al*, 1998). La transferrine, en transportant le fer dans le compartiment sanguin à travers tout l'organisme, va approvisionner les différents tissus et organes en fer.

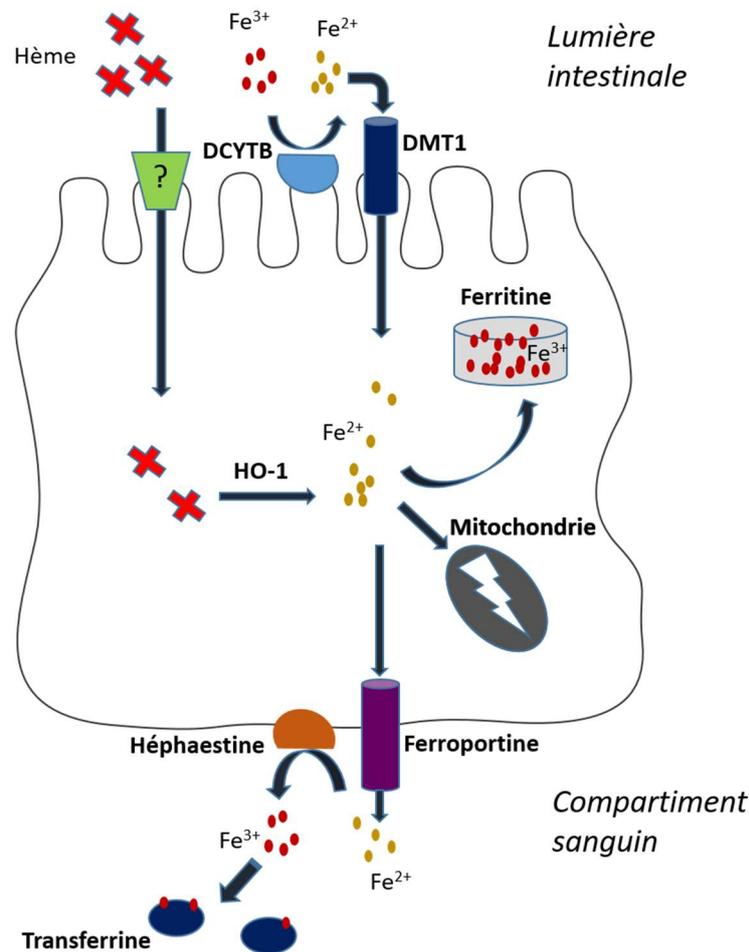


Figure 2 : Absorption du fer alimentaire par les entérocytes.

Le fer inorganique du bol alimentaire, majoritairement sous forme Fe^{3+} , est réduit en fer ferreux Fe^{2+} par la ferrireductase DCYTB (« Duodenal CYTochrome B ») avant d'être importé à travers la membrane apicale de l'entérocyte par DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 »). Le fer hémique pénètre sous forme d'hème dans l'entérocyte *via* un mécanisme de transport qui n'est pas encore élucidé. Dans la cellule, le fer est libéré de l'hème sous l'action de l'hème oxygénase-1 (HO-1). L'ensemble du fer importé va être utilisé pour le métabolisme de l'entérocyte et/ou être stocké dans la ferritine et/ou être exporté dans le compartiment sanguin par la ferroportine. Une fois exporté à travers la membrane basolatérale de l'entérocyte, le fer ferreux Fe^{2+} va être oxydé en fer ferrique Fe^{3+} par l'héphaestine avant d'être pris en charge dans le compartiment sanguin par la transferrine.

ii. Synthèse des érythrocytes dans la moelle osseuse

Deux cents milliards de globules rouges sont produits quotidiennement dans la moelle osseuse. Pour ce faire, 20 à 25 mg de fer sont nécessaires. L'holotransferrine apporte la quasi-totalité du fer qui est

incorporé par les cellules érythroïdes pour la synthèse de l'hémoglobine *via* le cycle de la transferrine, un mécanisme également utilisé par les autres types cellulaires de l'organisme (Figure 3).

Le récepteur TfR1 (« Transferrin Receptor 1 »), également appelé CD71, va tout d'abord lier avec une haute affinité l'holotransferrine circulante (constante de dissociation $\approx 10^{-9}$ M à pH 7,4) à la surface des cellules érythroïdes, ce qui va entraîner l'endocytose clathrine-dépendante de l'ensemble du complexe par ces cellules (Kleven *et al*, 2018). Le fer va ensuite être libéré de la transferrine en réponse à l'acidification des endosomes (pH 5,5), médiée par des pompes à protons ATP-dépendantes (van Renswoude *et al*, 1982; Paterson *et al*, 1984). Le fer ferrique Fe^{3+} nouvellement dissocié va être réduit en fer ferreux Fe^{2+} par la ferriréductase STEAP3 (« Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3 ») avant d'être transporté à travers la membrane endosomale vers le cytosol par DMT1 (Ohgami *et al*, 2005; Fleming *et al*, 1998; Su *et al*, 1998). Enfin, l'apotransferrine (transferrine sans fer) ainsi que le récepteur TfR1 vont être redirigés vers la surface des cellules où ils vont se dissocier sous l'effet du pH extracellulaire plus élevé (pH 7,4) (Dautry-Varsat *et al*, 1983). Ces deux acteurs protéiques, et notamment le récepteur TfR1, vont pouvoir être réutilisés dans ce cycle de la transferrine afin que la cellule érythroïde acquière la quantité de fer qui lui est nécessaire.

Le fer, transporté dans le cytosol par DMT1, va majoritairement être importé dans la mitochondrie par un transporteur nommé mitoferrine 1, associé à la protéine ABCB10 (« ATP-Binding Cassette sub-family B member 10 ») (Shaw *et al*, 2006; Chen *et al*, 2009). Dans l'organite, le métal va être utilisé pour la synthèse des protéines à centre fer-soufre mais aussi et surtout pour la formation de l'hème *via* son insertion dans la protoporphyrine IX grâce à l'intervention de la ferrochelatase FECH (Chen *et al*, 2010). L'hème ainsi obtenu sera ensuite exporté par l'isoforme 1b de FLVCR (« Feline Leukemia Virus subgroup C cellular Receptor ») dans le cytosol où il sera intégré à la globine pour former l'hémoglobine (Chiabrando *et al*, 2012).

Par ailleurs, il a été observé que les cellules érythroïdes, qui engrangent de grandes quantités de fer pour la synthèse de l'hémoglobine, expriment la ferroportine (Cianetti *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2009, 2018b, 2018a). En 2018, Zhang et collaborateurs ont rapporté que l'expression du transporteur dans ces cellules était critique pour l'homéostasie systémique du fer. Ils ont notamment observé que le taux de fer circulant diminuait de 20 % chez des souris invalidées pour le gène *Slc40a1* au niveau érythroblastique (Zhang *et al*, 2018a). Ils ont également montré que la ferroportine, en exportant le fer libre provenant de l'auto-oxydation de l'hémoglobine, « protégeait » les globules rouges contre le stress oxydatif (Zhang *et al*, 2018b, 2018a).

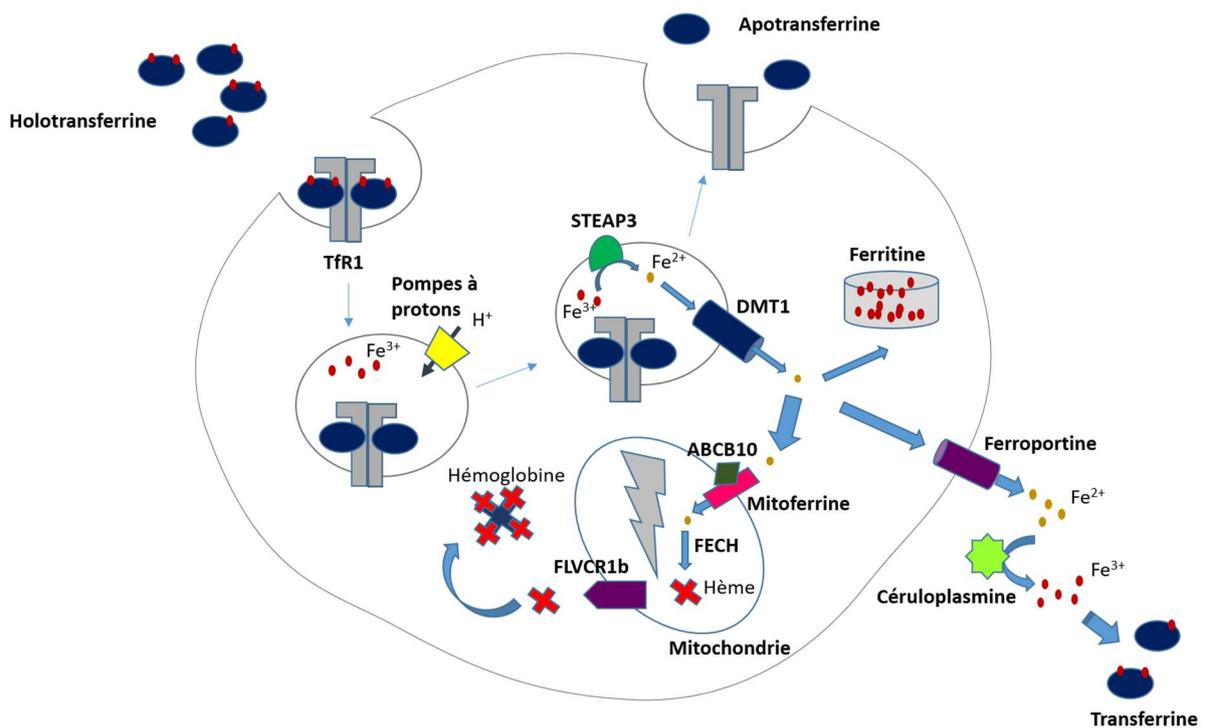


Figure 3 : Acquisition et utilisation du fer par les cellules érythroïdes.

L'holotransferrine représente la principale source de fer des cellules érythroïdes. Celle-ci se lie à son récepteur Tfr1 (« Transferrin Receptor 1 ») ce qui entraîne l'endocytose du complexe. Dans les endosomes, le fer est libéré de la transferrine grâce à l'acidification du pH engendrée par les pompes à protons. Le fer ferrique Fe^{3+} est ensuite réduit en fer ferreux Fe^{2+} par STEAP3 (« Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3 ») avant d'être transporté vers le cytosol par DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 »). Tfr1 et l'apotransferrine vont être redirigés vers la surface de la cellule pour y être recyclés. Le fer transporté dans le cytosol va quant à lui être stocké dans la ferritine et/ou exporté dans le compartiment sanguin par la ferroportine et/ou transporté dans la mitochondrie par la mitoferrine, transporteur stabilisé par ABCB10 (« ATP-Binding Cassette sub-family B member 10 »). La ferrocélatase FECH va y incorporer le fer dans la protoporphyrine IX. L'hème ainsi obtenu va être transporté vers le cytosol par l'isoforme 1b de FLVCR (« Feline Leukemia Virus subgroup C cellular Receptor ») où il va être intégré dans la globine pour former l'hémoglobine.

iii. Recyclage du fer des globules rouges sénescents par les macrophages

Une fois libéré dans la circulation sanguine, le globule rouge a une durée de vie comprise entre 70 et 140 jours (Franco, 2012). En « vieillissant », les érythrocytes vont accumuler différents signaux et/ou défauts membranaires conduisant à leur reconnaissance et à leur clairance par les macrophages de la pulpe rouge de la rate et les cellules de Kupffer (macrophages du foie) (Figure 4). Une rigidification de la membrane, la modification de la glycoprotéine membranaire bande 3, l'externalisation de la phosphatidylserine (PS) ou encore le changement conformationnel de CD47 (« Cluster of Differentiation 47 ») sont autant de paramètres qui ont été observés au niveau des globules rouges sénescents comme pouvant conduire à leur reconnaissance et leur phagocytose (Schroit *et al*, 1985; Lutz *et al*, 1987; Burger *et al*, 2012; Klei *et al*, 2017).

Les globules rouges phagocytés par les macrophages vont se retrouver dans des phagosomes qui vont fusionner progressivement avec des endosomes précoces, tardifs puis des lysosomes afin de former *in fine*, des phagolysosomes (Tjelle *et al*, 2000; Beaumont & Canonne-Hergaux, 2005). Exposés à des enzymes hydrolytiques et à des espèces réactives de l'oxygène notamment, les érythrocytes vont y être dégradés et l'hème va être libéré de l'hémoglobine. Ce dernier va être transporté vers le cytosol par le transporteur d'hème HRG1 (« Heme-Responsive Gene-1 ») où le fer va en être libéré sous l'action de l'hème oxygénase-1 (HO-1) (White *et al*, 2013; Poss & Tonegawa, 1997; Kovtunovych *et al*, 2010; Delaby *et al*, 2012).

Bien que le fer pénètre majoritairement dans les macrophages par le biais d'une érythrophagocytose, ces cellules sont aussi en capacité d'absorber de l'hémoglobine ou de l'hème. Complexés respectivement à l'haptoglobine et l'hémopexine, ils seront internalisés *via* les récepteurs membranaires CD163 et CD91 (Figure 4) (Kristiansen *et al*, 2001; Hvidberg *et al*, 2005).

Le pool de fer cytoplasmique obtenu sera utilisé par la cellule, stocké dans la ferritine et/ou exporté vers le compartiment sanguin par la ferroportine. La céruloplasmine assure ici l'oxydation du fer ferreux Fe^{2+} transporté, en fer ferrique Fe^{3+} afin que celui-ci soit pris en charge par la transferrine (Harris *et al*, 1999).

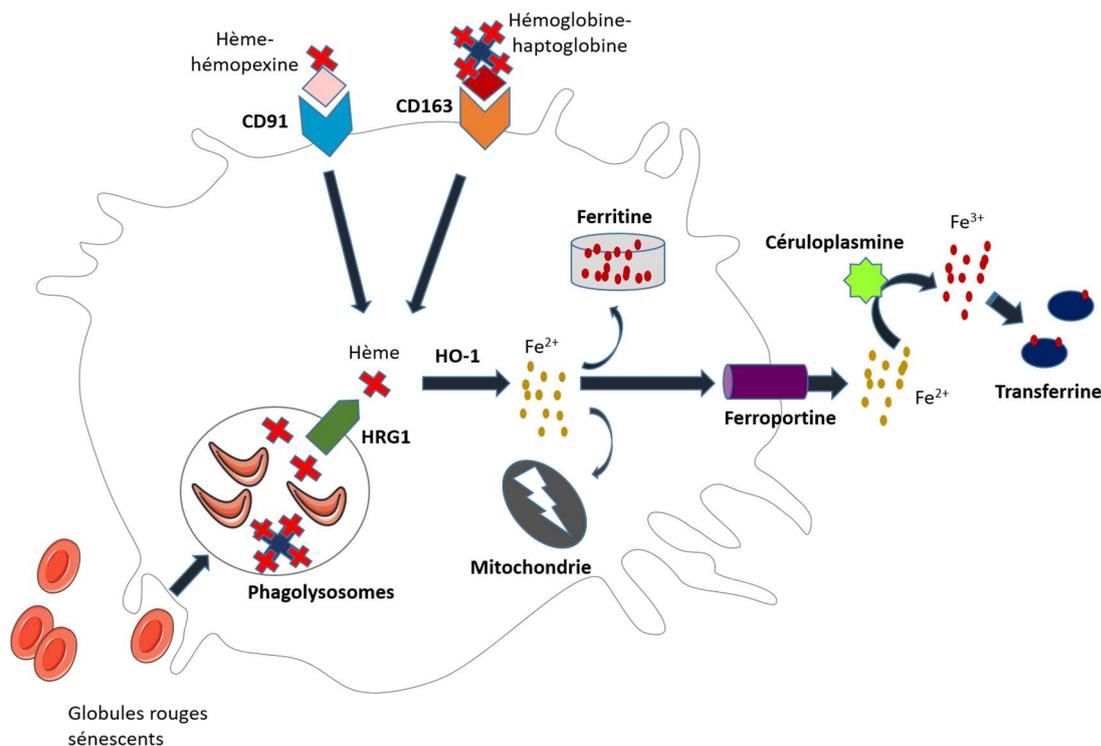


Figure 4 : Recyclage du fer des globules rouges sénescents par les macrophages.

Les globules rouges sénescents phagocytés par les macrophages vont être dégradés dans les phagolysosomes. L'hème ainsi libéré va être transporté vers le cytosol par HRG1 (« Heme-Responsive Gene-1 ») où il va être catabolisé par l'hème oxygénase-1 (HO-1). Le fer obtenu va être utilisé pour le métabolisme de la cellule et/ou stocké dans la ferritine et/ou exporté dans la circulation sanguine par la ferroportine. Le fer exporté sera oxydé par la céruloplasmine circulante en fer ferrique Fe^{3+} afin d'être pris en charge par la transferrine. Les macrophages sont également en capacité d'internaliser l'hème complexé à l'hémopexine et l'hémoglobine complexée à l'haptoglobine, respectivement *via* les récepteurs CD91 et CD163.

iv. Stockage du fer par les hépatocytes

La fraction de fer plasmatique qui ne répond pas aux besoins immédiats de l'organisme est principalement mise en réserve dans les hépatocytes (Figure 5). En le stockant dans la ferritine, ces cellules préviennent les effets potentiellement toxiques que pourrait avoir le surplus de fer libre. Ces réserves de métal restent mobilisables par l'organisme en cas de besoin. Il est important de souligner ici que ce processus de stockage constitue la première fonction essentielle du foie dans le métabolisme du fer.

Le fer en excès va pénétrer dans les hépatocytes par trois voies principales. En condition physiologique, le fer lié à la transferrine va constituer la majeure source de métal pour ces cellules. En exprimant le récepteur membranaire CD91, les hépatocytes sont également en mesure d'internaliser l'hème lié à l'hémopexine (Hvidberg *et al*, 2005). Lors de certaines surcharges en fer de l'organisme, comme dans le cas d'une hémochromatose par exemple, les quantités de fer plasmatique augmentent et avec elles, le coefficient de saturation de la transferrine. Au dessus de 45 %, une forme libre de fer s'accumule: le fer non lié à la transferrine ou NTBI (« Non-Transferrin-Bound Iron ») (Brissot *et al*, 2018). Ce fer « libre » va principalement être absorbé par les hépatocytes. Des expériences de surexpression et d'ARN interférence en lignées cellulaires ont révélé l'importance du transporteur ZIP14 (« ZRT/IRT-like Protein 14 ») encore nommé SLC39A14 (« Solute Carrier Family 39 member 14 ») dans ce processus (Liuzzi *et al*, 2006).

Si le pool de fer labile Fe^{2+} obtenu n'est pas utilisé par la cellule ou exporté dans le compartiment sanguin par la ferroportine, celui-ci va être acheminé vers la ferritine pour y être stocké. Les protéines chaperonnes PCBPs (« Poly(rC)-Binding Proteins »), cruciales pour la prise en charge et le transport du fer cytosolique entre les différents acteurs protéiques, seraient impliquées dans cet approvisionnement en fer de la ferritine (notamment PCBP1 et 2) que ce soit dans les hépatocytes mais aussi dans les différents types cellulaires précédemment présentés (Shi *et al*, 2008; Leidgens *et al*, 2013).

La ferritine est un hétéropolymère constitué de 24 sous-unités de chaînes lourdes H (« Heavy ») et de chaînes légères L (« Light »), codées respectivement par les gènes *FTH* et *FTL*. Les chaînes lourdes H oxydent le fer ferreux Fe^{2+} , potentiellement apporté par les protéines PCBPs, en fer ferrique Fe^{3+} tandis que les chaînes légères L sont impliquées dans la formation du noyau d'hydroxy-phosphate ferrique. Sous cette forme, la ferritine est en capacité de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer à l'intérieur de sa sphère creuse (Harrison & Arosio, 1996). Cette réserve peut être remise à disposition de la cellule et de l'organisme en cas de déficit en fer notamment grâce à un processus appelé « ferritinophagie ». Le faible taux de fer intracellulaire va diminuer l'interaction qui dépend de cet ion métallique, entre la protéine cargo NCOA4 (« Nuclear receptor CO-Activator 4 ») et l'ubiquitine ligase E3 HERC2. La protéine NCO4A, moins dégradée, va s'accumuler dans la cellule. En interagissant directement avec les chaînes lourdes de la ferritine, cette protéine cargo va conduire la protéine de stockage vers une structure de type autophagosome. Suite à la fusion autophagosome-lysosome, la ferritine va être dégradée et le fer qu'elle contenait, libéré (Mancias *et al*, 2014; Dowdle *et al*, 2014; Mancias *et al*, 2015).

Si la capacité de stockage de la ferritine est dépassée par les quantités de fer entrant dans la cellule, le métal libre, en s'accumulant, peut engendrer de graves dommages hépatiques. En générant différents modèles murins « knock-out », Jenkitkasemwong et collaborateurs, ont souligné le rôle extrêmement critique que jouait le transporteur ZIP14 dans ce type de complications. Les auteurs ont en effet observé que les souris double « knock-out » *Hfe*^{-/-}/*Zip14*^{-/-} ou *Hju*^{-/-}/*Zip14*^{-/-} accumulaient beaucoup

moins de fer dans leurs hépatocytes que les souris simple « knock-out » *Hfe* ou *Hjv*, modèles murins respectifs de l'hémochromatose de type 1 et de type 2A (voir partie III de l'introduction) (Jenkitkasemwong *et al*, 2015).

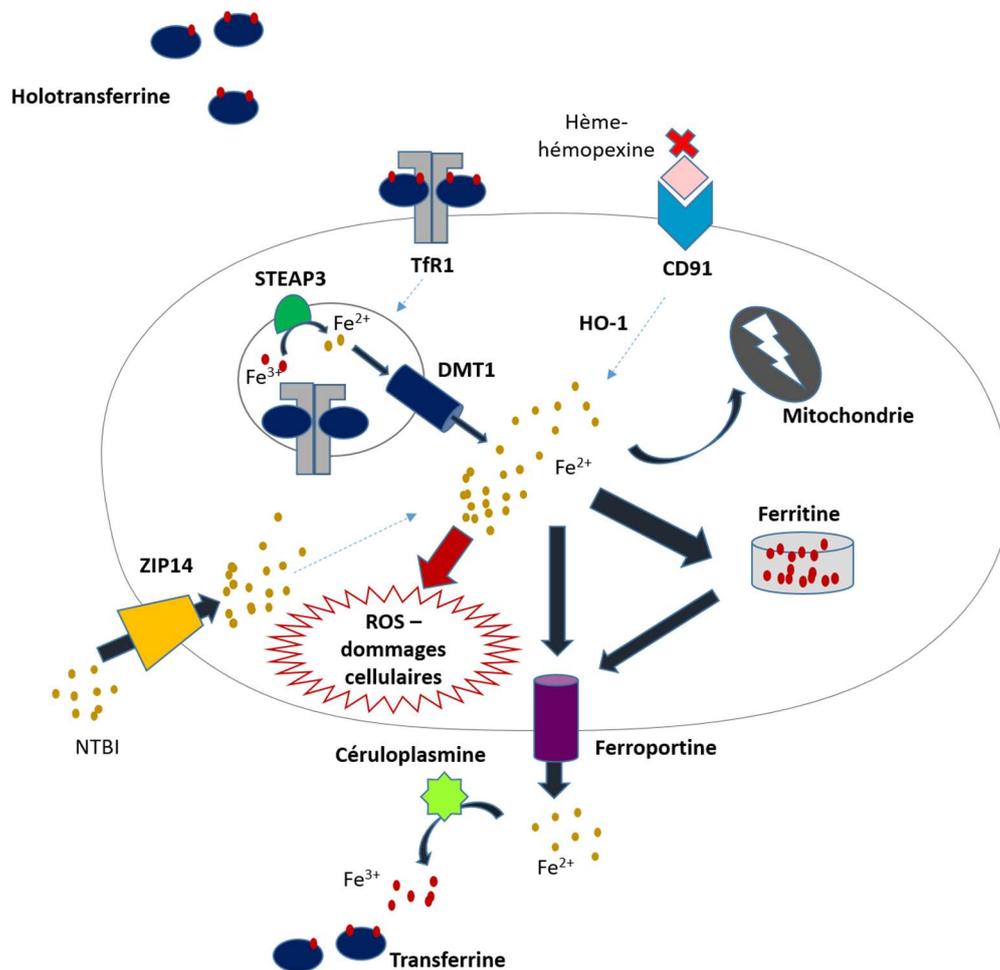


Figure 5 : Stockage du fer en excès par les hépatocytes.

L'holotransferrine représente la principale source de fer des hépatocytes en condition physiologique. Ces cellules peuvent également internaliser l'hème lié à l'hémopexine grâce au récepteur CD91 qu'elles expriment. Le fer résultant va être utilisé pour le métabolisme de la cellule et/ou stocké dans la ferritine et/ou exporté dans la circulation sanguine par la ferroportine. Le fer exporté sera oxydé par la céruloplasmine circulante en fer ferrique Fe³⁺ afin d'être pris en charge par la transferrine. Lors d'une surcharge en fer, les hépatocytes vont particulièrement être ciblés par le fer non lié à la transferrine (NTBI- « Non-Transferrin-Bound Iron »). Par le biais du transporteur ZIP14 (« ZRT/IRT-like Protein 14 »), particulièrement exprimé dans ce type cellulaire, le NTBI va dangereusement s'accumuler dans les hépatocytes. Cette entrée de fer incontrôlée va potentiellement générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant engendrer de graves dommages cellulaires.

II- Régulation cellulaire et systémique de la ferroportine

a- Mise en évidence du rôle de la ferroportine

La ferroportine représente l'unique voie de sortie du fer intracellulaire vers le compartiment sanguin chez les mammifères. Ce transporteur (code Uniprot Q9NP59), également appelé SLC40A1 (« Solute Carrier Family 40 member 1 »), IREG1 (« Iron-REgulated Gene 1 ») ou MTP1 (« Metal Transporter Protein 1 »), est codé par le gène *SLC40A1* situé sur le chromosome 2 en position q32. Trois équipes différentes l'ont identifié simultanément en 2000, en utilisant des approches différentes (Donovan *et al*, 2000; Abboud & Haile, 2000; McKie *et al*, 2000) :

- Donovan et collaborateurs ont révélé l'existence de la ferroportine grâce à une stratégie de clonage positionnel visant à identifier le gène responsable de l'anémie hypochrome du zebrafish mutant « weissherbst » (Donovan *et al*, 2000).
- Abboud et Haile ont, quant à eux, identifié le transporteur en recherchant de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme du fer *via* la construction d'une librairie d'ARN messagers porteurs du motif IRE (« Iron Responsive Element ») (Abboud & Haile, 2000). Le système IRE/IRP (« Iron Regulatory Protein ») régule l'expression post-transcriptionnelle de nombreuses protéines intervenant dans le métabolisme du fer en fonction de la concentration intracellulaire du métal (Anderson *et al*, 2012).
- Enfin, McKie et collaborateurs, en utilisant une stratégie de clonage soustractif, ont également isolé et caractérisé le gène codant la ferroportine. Pour cela, ils ont soustrait les ADN complémentaires d'une souris hypotransferrinémique hétérozygote à ceux d'une souris hypotransferrinémique homozygote présentant une plus forte expression des gènes impliqués dans l'absorption intestinale de fer (McKie *et al*, 2000).

La fonction de la ferroportine a été confirmée par des mesures d'export de fer radiomarqué à partir d'oocytes de xénopes dans lesquels de l'ARN codant la ferroportine avait été injecté, d'une part, et par l'observation d'une déplétion en fer de la lignée cellulaire embryonnaire de rein humaine HEK293T surexprimant le transporteur, d'autre part (Donovan *et al*, 2000; Abboud & Haile, 2000; McKie *et al*, 2000).

En utilisant des techniques tels que le northern blot, l'hybridation *in situ*, l'immunohistochimie ou bien encore le western blot, ces mêmes équipes ont étudié l'expression de la ferroportine dans différents tissus murins et humains. Ces expériences ont mis en évidence que la ferroportine était principalement exprimée à la membrane basolatérale des entérocytes, à la membrane des macrophages de la rate et du foie (cellules de Kupffer), des hépatocytes et des cellules du syncytiotrophoblaste (un des tissus qui composent le placenta). Ainsi la ferroportine permet respectivement, l'absorption intestinale de fer, la mise à disposition dans la circulation sanguine du fer issu du catabolisme des globules rouges sénescents et du fer de réserve, mais aussi l'apport de fer maternel au fœtus (Donovan *et al*, 2000; Abboud & Haile, 2000; McKie *et al*, 2000).

Par la suite, Donovan et collaborateurs ont souligné l'importance physiologique de la ferroportine pour l'homéostasie du fer en périodes pré et post-natales. Ces auteurs ont en effet montré que l'inactivation totale du gène codant la ferroportine entraînait la mort *in utero* des animaux. Cette mortalité embryonnaire a directement été reliée à un défaut de transport, par les cellules épithéliales de l'endoderme viscéral extra-embryonnaire, du fer maternel vers l'embryon; une forte expression de la ferroportine ayant été observée dans ces cellules chez les animaux « Wild-Type » (Donovan *et al*,

2005). En revanche, les souris pour lesquelles la ferroportine a été inactivée totalement, excepté dans les cellules épithéliales de l'endoderme viscéral extra-embryonnaire et dans les cellules du placenta, sont nées vivantes. Ces animaux ont, malgré tout, rapidement présenté une anémie et un retard de croissance. Cette anémie a été associée à d'importants dépôts de fer dans les entérocytes, les hépatocytes et les macrophages de la rate et du foie (Donovan *et al*, 2005).

Ensemble, ces travaux ont souligné le rôle crucial que jouait la ferroportine dans les cellules spécialisées du métabolisme du fer. Son importance a, par ailleurs, été rapportée dans d'autres types cellulaires. Par exemple, la délétion spécifique du transporteur dans les cardiomyocytes de souris a révélé que la ferroportine protégeait ces cellules d'une accumulation possiblement toxique de fer pouvant conduire au développement de complications cardiaques (Lakhal-Littleton *et al*, 2015). D'autre part, la ferroportine a été observée comme étant particulièrement exprimée dans le cerveau, organe au sein duquel, une dérégulation de l'homéostasie du fer a déjà été associée au développement de maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson. La ferroportine pourrait jouer un rôle critique dans le développement de ce type de pathologies, rôle qui reste, cependant, encore à définir (Raha *et al*, 2013; Lu *et al*, 2017; Baumann *et al*, 2019).

b- Régulation cellulaire de l'expression de la ferroportine

L'expression de la ferroportine est finement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ces différents niveaux de régulations font intervenir des mécanismes variés, eux-mêmes induits par divers stimuli pouvant différer en fonction du type cellulaire concerné. Des différences notables dans les voies de régulation de l'expression de la ferroportine ont notamment été rapportées entre les macrophages, cellules impliquées dans le recyclage des globules rouges sénescents, et les entérocytes, cellules responsables de l'absorption intestinale du fer (Drakesmith *et al*, 2015).

i. Dans les macrophages

Différents travaux, menés à partir de la lignée macrophagique de souris J774 ou de cultures primaires de macrophages murins, ont montré que la transcription du gène *Slc40a1* codant la ferroportine, augmentait quelques heures seulement après l'érythrophagocytose dans ces cellules (Knutson *et al*, 2003; Delaby *et al*, 2005b). Des analyses complémentaires ont révélé que l'hème, issu du catabolisme des globules rouges sénescents, était directement impliqué dans ce processus de régulation transcriptionnelle (Delaby *et al*, 2008; Marro *et al*, 2010). L'hème inhiberait d'une part, l'enzyme Keap1, ce qui conduirait à une accumulation du facteur de transcription Nrf2, et d'autre part, inactiverait le répresseur transcriptionnel Bach1. Nrf2 lierait alors, préférentiellement à Bach1, la séquence ARE/MARE (« Antioxidant Response Elements »/ « Maf Recognition Elements »), localisée dans le promoteur distal (7007 pb en amont du point +1 de transcription) du gène *Slc40a1*, augmentant ainsi sa transcription (Marro *et al*, 2010; Harada *et al*, 2011).

Lorsqu'une infection se déclare, une régulation transcriptionnelle de la ferroportine peut être observée au niveau macrophagique. Des expériences, réalisées chez la souris ou à partir de la lignée monocyttaire humaine THP-1 notamment, ont montré que la stimulation des récepteurs TLR (« Toll Like Receptors ») 1, 2 et 6 par des lipopeptides bactériens, pouvait engendrer une chute drastique de la

transcription du gène *SLC40A1* (Guida *et al*, 2015; Abreu *et al*, 2018). Cette modulation transcriptionnelle, dont le(s) mécanisme(s) associés ne sont pas encore totalement compris, pourrait favoriser ou pénaliser l'accès des pathogènes intra- ou extracellulaires au fer macrophagique (Guida *et al*, 2015; Willemetz *et al*, 2017).

Le fer issu de l'érythrophagocytose va également réguler post-transcriptionnellement l'expression de la ferroportine et ce, *via* le système IRE/IRP. Le transcrit de la ferroportine majoritairement exprimé dans les macrophages (isoforme 1a) contient, dans sa région 5'UTR (« UnTranslated Region ») une structure en tige boucle appelée « séquence IRE » (« Iron Responsive Element »). Lorsque le taux de fer intracellulaire est faible, les protéines IRP (« Iron Regulatory Protein ») s'y lient ce qui diminue la traduction du transporteur. En revanche, quand le taux de fer intracellulaire augmente, la protéine IRP1 va subir un changement conformationnel conséquent à la formation d'un complexe fer-soufre ce qui l'empêchera de lier la séquence IRE. La protéine IRP2, quant à elle, va être ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Anderson *et al*, 2012). La synthèse de la ferroportine sera alors augmentée (Lymboussaki *et al*, 2003).

ii. Dans les entérocytes

Dans les entérocytes, la transcription de la ferroportine est principalement gouvernée par l'hypoxie et le déficit en fer (Mastrogiannaki *et al*, 2009; Anderson *et al*, 2013; Taylor *et al*, 2011). Cette régulation repose sur un mécanisme plus général d'inductions transcriptionnelles médié par les facteurs de transcription HIFs (« Hypoxia-Inducible Factor »). Ce mécanisme utilisé par les cellules pour faire face à un manque d'oxygène, a été révélé par les travaux de Gregg L. Semenza, Peter J. Ratcliffe et William G. Kaelin qui leur ont valu le prix Nobel de médecine en 2019 (Semenza *et al*, 1991; Wang *et al*, 1995; Maxwell *et al*, 1999; Ivan *et al*, 2001; Jaakkola *et al*, 2001).

Les facteurs de transcription HIFs sont stabilisés par un manque d'oxygène et un déficit en fer. Ces derniers ne sont en effet plus hydroxylés par les enzymes PHD (« Prolyl-Hydroxylases »), dont l'activité dépend de l'oxygène et du fer, ce qui les préserve d'une dégradation protéasomale. Parmi ces facteurs de transcription, Hif2 α a été identifié comme critique pour l'induction transcriptionnelle du gène *Slc40a1* grâce à l'établissement de modèles murins invalidés au niveau intestinal pour le gène *Hif2a* (Mastrogiannaki *et al*, 2009; Anderson *et al*, 2013; Taylor *et al*, 2011). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont notamment montré que ce facteur de transcription, qui forme un hétérodimère avec l'ARNT (« Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator »), venait se fixer au niveau des séquences HRE (« HIF Response Elements ») du promoteur du gène *Slc40a1*, augmentant ainsi sa transcription (Taylor *et al*, 2011). L'élévation de l'absorption intestinale de fer qui s'ensuit permet de contrebalancer l'hypoxie et/ou le déficit en fer de l'organisme.

En 2009, Zhang et collaborateurs ont révélé l'existence d'un transcrit alternatif de la ferroportine dans les entérocytes. Ce second isoforme (1b), observé à hauteur de 20 % des transcrits totaux du gène *Slc40a1* dans le duodénum, se distingue de l'isoforme 1a par l'absence de séquence IRE dans sa région 5'UTR. Il est ainsi insensible à la répression post-transcriptionnelle opérée par le système IRE/IRP lors d'un déficit en fer. Cet isoforme permet de maintenir l'absorption intestinale de fer nécessaire aux besoins de l'organisme lorsque les entérocytes présentent un faible taux de fer intracellulaire, reflet

d'une carence martiale systémique et/ou d'une faible quantité de métal contenue dans le bol alimentaire (Zhang *et al*, 2009).

Il est important de souligner que les cellules érythroïdes expriment également l'isoforme 1b de manière importante (environ 60 % des transcrits *Slc40a1* dans ces cellules) (Cianetti *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2009). Ce transcrit sous-tendrait le rôle « altruiste » attribué aux érythroblastes, qui dans le cas d'un déficit en fer systémique, redistribueraient une part du métal acquis pour l'érythropoïèse afin de préserver les cellules particulièrement sensibles au manque de fer (neurones, cardiomyocytes...) (Zhang *et al*, 2018a; Drakesmith *et al*, 2015).

iii. Régulation post-transcriptionnelle de la ferroportine par les petits ARN non codants

Que ce soit dans les macrophages ou dans les entérocytes, un autre type de régulation post-transcriptionnelle semble se mettre en place lors d'un déficit en fer. Il a en effet été remarqué que l'expression du micro-ARN 485-3p augmentait dans les macrophages primaires humains déplétés en fer. Sangokoya et collaborateurs ont montré que ce micro-ARN diminuait la traduction de la ferroportine en s'hybridant au niveau de la région 3'UTR de son ARNm (Sangokoya *et al*, 2013). Le miR-20a, le miR-20b et le miR-194-5p, respectivement observés comme diminuant l'expression de la ferroportine dans des cellules cancéreuses pulmonaires, dans les entérocytes ou dans des cellules cancéreuses ovariennes, pourraient également participer à ce mécanisme qui contribuerait, avec le système IRE/IRP, à préserver le stock de fer intracellulaire, indispensable au métabolisme des cellules (Babu & Muckenthaler, 2016; Jiang *et al*, 2019; Wu *et al*, 2020).

La rétention de fer intracellulaire induite par ce mécanisme pourrait conférer un avantage aux cellules cancéreuses en favorisant leur prolifération (Babu & Muckenthaler, 2016).

c- Régulation systémique de la ferroportine par l'hepcidine

Jusqu'à il y a peu, il était très difficile d'obtenir des structures expérimentales de protéines membranaires eucaryotes. Composée de 571 acides aminés et de plusieurs hélices transmembranaires, la ferroportine humaine n'a pas échappé aux difficultés habituellement rencontrées.

Entre 2005 et 2014, différents travaux ont permis de démontrer l'appartenance de la ferroportine à la grande famille des transporteurs actifs secondaires MFS («Major Facilitator Family») (Liu *et al*, 2005; Wallace *et al*, 2010; Le Gac *et al*, 2013; Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014). Ces travaux ont conduit à l'élaboration des premiers modèles tridimensionnels (3D) de la ferroportine humaine, sur la base de structures expérimentales de transporteurs MFS bactériens. Ils ont été à l'origine d'une meilleure compréhension de l'organisation de la ferroportine dans la bicouche lipidique, d'une part, et, notamment, des bases moléculaires du mécanisme de régulation négative médié par l'hepcidine circulante, d'autre part (Nemeth *et al*, 2004b; Fernandes *et al*, 2009; Ross *et al*, 2012; Qiao *et al*, 2012).

L'apport de structures expérimentales de la ferroportine, dérivées d'un homologue bactérien (Taniguchi *et al*, 2015; Deshpande *et al*, 2018) et, très récemment, de la protéine humaine, grâce aux

progrès spectaculaires de la cryomicroscopie électronique (Billesbølle *et al*, 2020), sont décrits et commentés dans la dernière partie de l'introduction.

i. Généralités sur les protéines MFS

Les protéines MFS sont observées chez tous les êtres vivants. Plus de 100 transporteurs MFS ont été identifiés chez l'Homme. Ils sont impliqués dans différentes fonctions (transport de nutriments, de métabolites, clairance hépatique, rénale...) en permettant le passage de substrats très variés (ions, acides aminés, peptides...) à travers les membranes cellulaires (Yan, 2013, 2015; Quistgaard *et al*, 2016).

Malgré une faible identité de séquence, les protéines MFS partagent une même organisation et un même repliement structural. Ces dernières sont constituées de 12 hélices transmembranaires (TM) organisées en deux domaines pseudo-symétriques : le lobe N-ter (TM1-TM6) et le lobe C-ter (TM7-12). Chaque domaine contient deux répétitions inversées de trois hélices : lobe N-ter (TM1-3 et TM 4-6) et lobe C-ter (TM7-9 et TM10-12) (Figure 6).

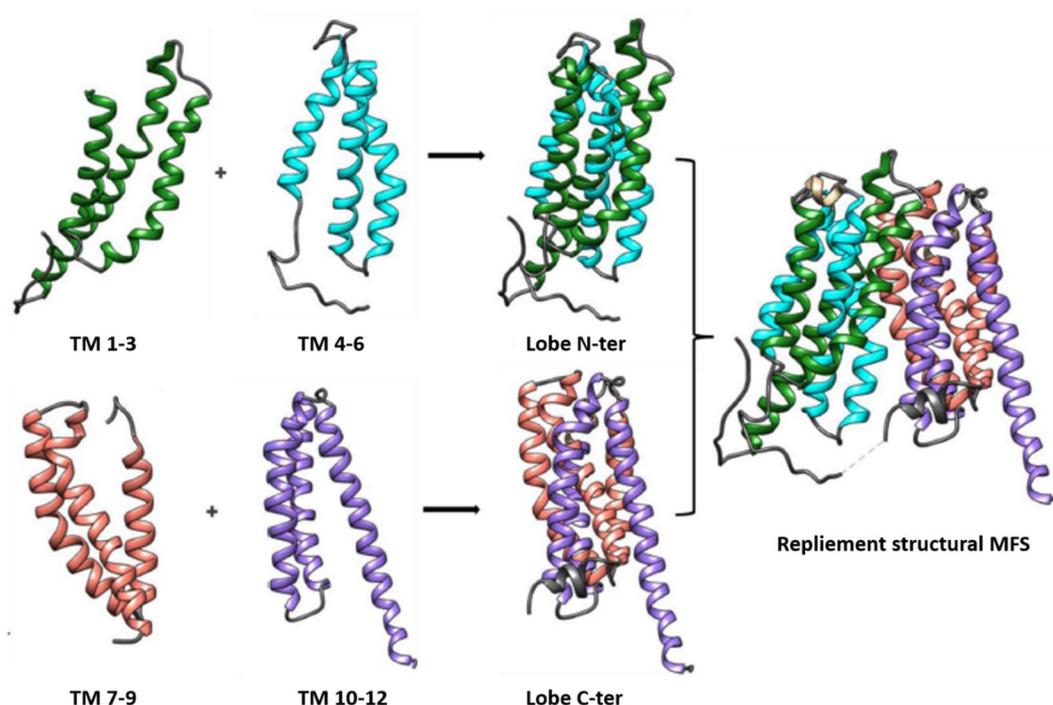


Figure 6 : Repliement des transporteurs MFS (d'après Vishwakarma *et al*, 2018).

Les protéines MFS possèdent 12 hélices transmembranaires réparties en deux lobes pseudo-symétriques N (TM1-6) et C-ter (TM7-12). Chaque lobe contient 2 répétitions inversées de trois hélices : lobe N-ter (TM1-3 et TM 4-6) et lobe C-ter (TM7-9 et TM10-12). Ici représenté, le modèle « inward-facing » (structure ouverte vers l'intérieur de la cellule) du transporteur MFS bactérien du glycerol-3-phosphate (GlpT) repris des structures publiées par Huang et collaborateurs en 2003 (PDB 1PW4) (Huang *et al*, 2003).

Cette organisation générale particulière est à la base d'un mécanisme de transport comparable des différents substrats. Un premier modèle, dit « d'accès alternatif », a été déduit des travaux publiés par Oleg Jardetzky en 1966. Dans ce modèle, les conformations extrêmes « inward- » et « outward-facing » (protéine ouverte vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule respectivement) se succèdent, permettant au substrat d'accéder à son site de liaison, situé au centre de la protéine à l'interface des deux lobes, avant d'être libéré de l'autre côté de la membrane (Jardetzky, 1966) (Figure 7). L'existence de ces changements conformationnels a été révélée par la cristallisation de transporteurs MFS dans ces deux conformations extrêmes mais également par d'autres types d'expériences de type smFRET (« single-molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer »), « cross-linking » ou DEER (« Double Electron-Electron Resonance ») par exemple (Majumdar *et al*, 2007; Smirnova *et al*, 2007; Zhou *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2014; Taniguchi *et al*, 2015). Par ces techniques, la dynamique de rapprochements et d'écartements entre les extrémités des deux lobes du transporteur MFS bactérien LacY, au cours de son cycle de transport, a pu être particulièrement étudiée (Majumdar *et al*, 2007; Smirnova *et al*, 2007; Zhou *et al*, 2008; Quistgaard *et al*, 2016). Une conformation transitoire, dite « occluded », où le substrat est confiné dans son site de liaison, est aussi généralement décrite (Figure 7) (Quistgaard *et al*, 2016).

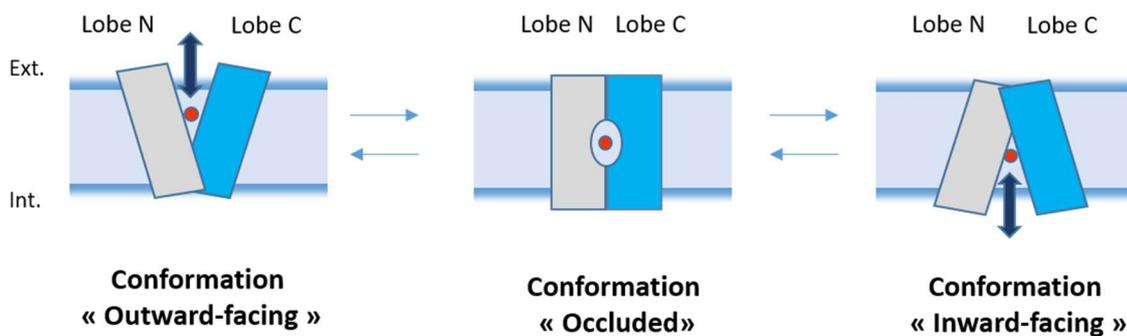


Figure 7 : Modèle de transport, dit d' « alternating access », utilisé par les protéines MFS pour transporter leurs substrats à travers les membranes cellulaires.

Les transporteurs MFS présentent alternativement une conformation « outward-facing » (ouverte vers l'extérieur de la cellule) et « inward-facing » (ouverte vers l'intérieur de la cellule) pour permettre au substrat d'accéder à son site de liaison localisé au centre de la protéine, ou à celui-ci d'être libéré de l'autre côté de la membrane. Au cours du cycle de transport, la conformation « occluded » séquestre le substrat dans son site de liaison.

Hormis la liaison du substrat, la liaison d'un co-facteur peut être nécessaire à l'induction des changements conformationnels opérés par les protéines MFS (Majumdar *et al*, 2007; Smirnova *et al*, 2007; Jiang *et al*, 2013). On distingue ainsi les uniporteurs qui transportent un substrat dans le sens de son gradient de concentration, des symporteurs et des antiporteurs qui tirent profit de l'énergie générée par le transport d'un co-facteur pour transporter le substrat dans un sens identique ou opposé respectivement (Yan, 2015).

ii. Premiers modèles de la structure tridimensionnelle de la ferroportine humaine

En 2005, sur la base d'une approche combinant prédictions *in silico* et données expérimentales, Liu et collaborateurs ont apporté de premiers éléments déterminants en définissant la structure secondaire du transporteur. Pour ce faire, ils ont déduit quelles étaient les boucles extra- et intracytoplasmiques de la ferroportine grâce à l'insertion d'épitopes (HA et myc) et de cystéines (insertions ou substitutions) tout au long de la séquence de la protéine murine (les ferroportines humaine et murine présentent 90 % d'identité de séquence). Par des expériences d'immunofluorescence et de réticulation thiol-dépendantes, sur cellules perméabilisées ou non et exprimant le transgène, ils ont pu évaluer l'accessibilité de ces épitopes et cystéines du milieu extracellulaire. Ainsi, Liu et collaborateurs ont proposé une première structure secondaire de la ferroportine avec 12 hélices transmembranaires et les extrémités N et C-terminales intracytoplasmiques (Figure 8) (Liu *et al*, 2005).

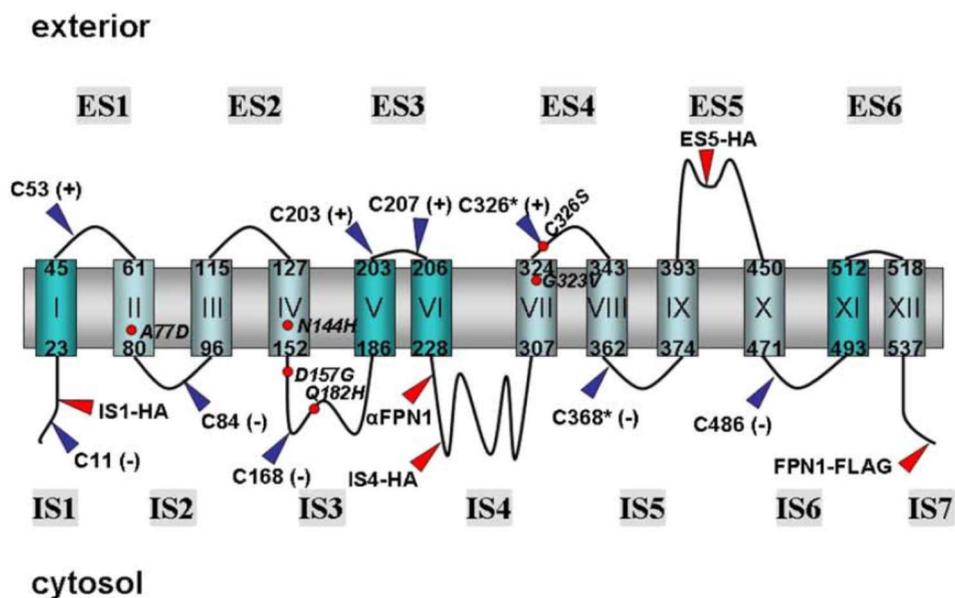


Figure 8 : Modèle bidimensionnel de la ferroportine proposé en 2005 par Liu et collaborateurs (Liu *et al*, 2005). Ce modèle propose une ferroportine à 12 hélices transmembranaires avec des extrémités N et C-terminales intracytoplasmiques. En bleu apparaissent les cystéines insérées, substituées ou natives (*) accessibles (+) ou non (-) à la biotine. Les épitopes ayant été insérés dans la séquence protéique sont représentés en rouge. Certaines mutations de la ferroportine retrouvées chez des patients ont été localisées sur ce modèle bidimensionnel (ronds rouges).

Différentes études ont permis de vérifier ces premiers éléments qui n'ont plus été contestés depuis 2010 (Schimanski *et al*, 2005; Drakesmith *et al*, 2005; Gonçalves *et al*, 2006; Rice *et al*, 2009; Wallace *et al*, 2010).

Le premier modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine a été proposé lors de cette même année par Wallace et collaborateurs (Wallace *et al*, 2010). Pour ce faire, l'équipe australienne s'est appuyée sur la structure secondaire du transporteur proposée par Liu et collaborateurs en 2005 (Liu *et al*, 2005). Par une construction *de novo*, ils ont proposé un repliement « brut » de la ferroportine. Ce repliement a ensuite été comparé aux structures expérimentales connues d'autres protéines. C'est

à ce moment que le premier lien avec les protéines MFS fut établi, puisque six protéines MFS différentes ont ainsi été identifiées. Wallace et collaborateurs se sont finalement appuyés sur la structure expérimentale du transporteur de glycerol-3-phosphate (GlpT-« glycerol-3-phosphate transporter ») d'*Escherichia coli* pour affiner un modèle 3D de la ferroportine dans une conformation « inward-facing » (ouverte vers l'intérieur de la cellule) (Wallace *et al*, 2010) (Figure 9).

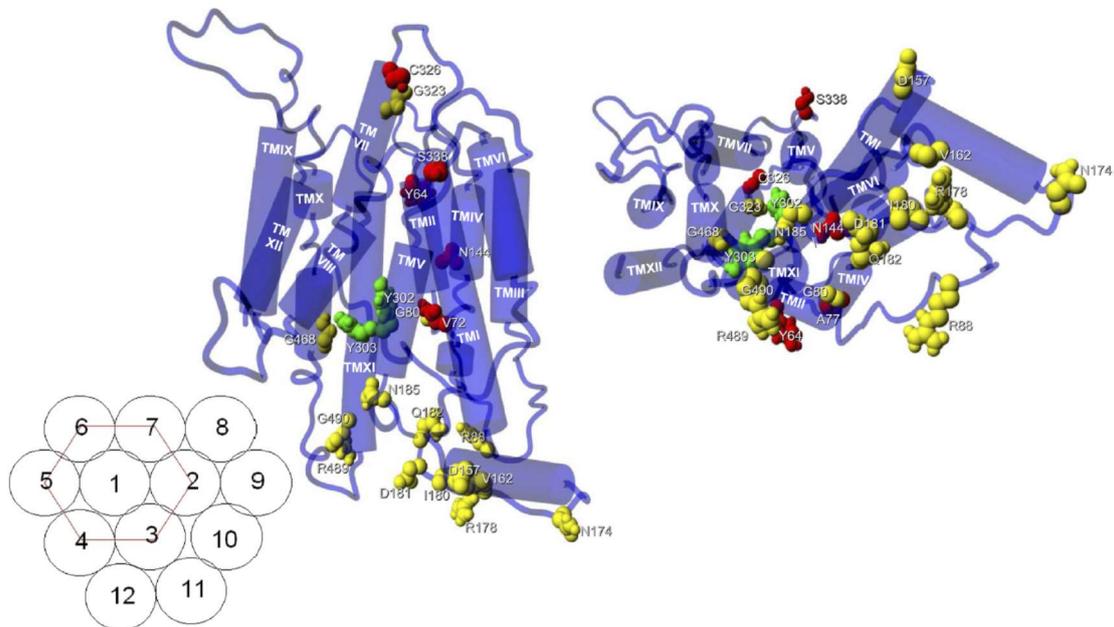


Figure 9 : Modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine proposé par Wallace et collaborateurs en 2010 (Wallace *et al*, 2010).

Ce premier modèle 3D du transporteur a été construit *de novo* en partant du modèle 2D proposé auparavant par Liu et collaborateurs, puis affiné en utilisant la structure expérimentale du transporteur MFS bactérien de glycerol-3-phosphate en conformation « inward-facing » (Liu *et al*, 2005). Les hélices apparaissent sous forme de cylindres. Certaines mutations de la ferroportine, identifiées chez des patients, ont été représentées sur le modèle 3D par des sphères. Une représentation schématique de l'organisation des hélices transmembranaires est également présentée à gauche.

En 2013, le Dr. Isabelle Callebaut, avec qui notre équipe collabore étroitement, a construit un modèle 3D de la ferroportine humaine par modélisation comparative. Pour cela, une recherche de similitudes avec d'autres protéines dont la structure 3D était connue a tout d'abord été réalisée grâce au logiciel Phyre (« Protein Homology/analogY Recognition Engine »). Les algorithmes d'alignement profil-profil prenant en compte les contraintes évolutives et structurales ont révélé, à nouveau, un alignement significatif de la ferroportine humaine avec 3 protéines appartenant à la famille MFS. Il s'agissait des transporteurs d'*E. coli* EmrD (« multidrug resistance protein D »), GlpT (« Glycerol-3-phosphate Transporter ») et LacY (« LacY-like proton/sugar symporter »). Les identités de séquences entre ces 3 protéines bactériennes et la ferroportine humaine sont très faibles (respectivement 13, 9 et 11 %) ; de l'ordre de celles observées au sein de cette superfamille de protéines. En dépit de ces faibles identités, les repliements observés des 12 hélices transmembranaires sont très proches, comme en atteste la superposition de leurs structures tridimensionnelles. Un alignement pertinent peut ainsi être réalisé entre la ferroportine et ces séquences, en prenant en compte la conservation des signatures structurales propres à cette superfamille, en particulier en utilisant l'approche « Hydrophobic Cluster Analysis » développée par Isabelle Callebaut et Jean-Paul Mornon (Callebaut *et al*, 1997). La protéine

EmrD, capturée dans une conformation « occluded » (hélices transmembranaires disposées autour d'un pore central, avec accès interne et externe obstrués) était le candidat le plus pertinent pour la construction d'un nouveau modèle 3D. A l'époque, cette conformation plus compacte paraissait plus cohérente avec le transport du fer qui ne nécessitait *a priori* pas de larges ouvertures intra- ou extracellulaires de la ferroportine. Le modèle 3D ainsi construit a permis de confirmer l'appartenance de la ferroportine à la famille des protéines MFS et de proposer des hypothèses quant à l'impact de mutations sur la structure et/ou la fonction de cette protéine (Figure 10) (Le Gac *et al*, 2013).

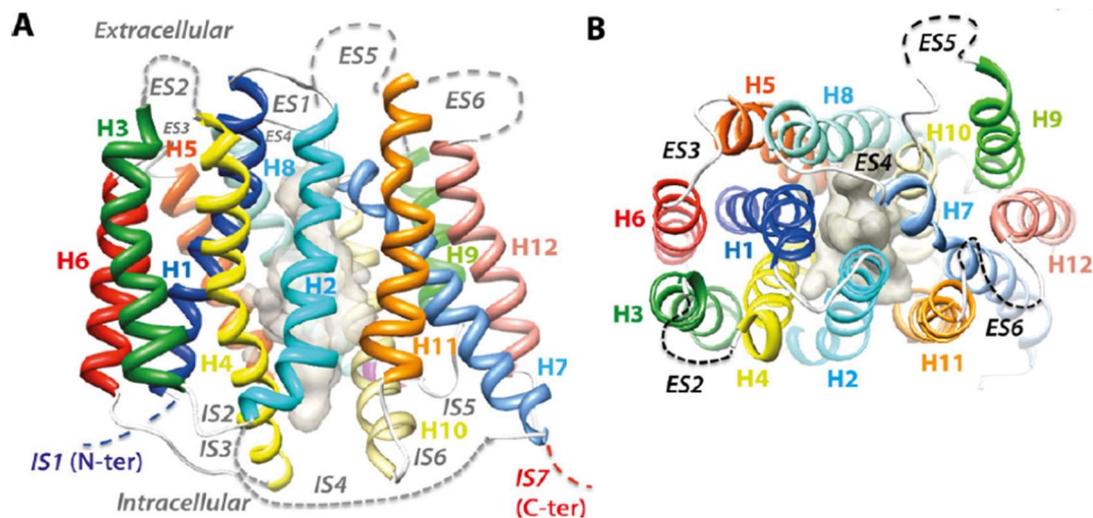


Figure 10 : Représentation en ruban du modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine construit en 2013 par le Dr. Isabelle Callebaut (d'après Le Gac *et al*, 2013).

Vue latérale (A) et extracellulaire (B) du modèle 3D de la ferroportine humaine construit à partir de la structure expérimentale du transporteur MFS bactérien EmrD en conformation « occluded ». La structure de la ferroportine s'organise en 2 lobes composés chacun de 6 hélices transmembranaires (H1-H6/H7-H12). Les boucles intra- (IS) et extracellulaires (ES) ainsi que les extrémités N (IS1) et C-terminales (IS7) intracytoplasmiques sont également représentées.

En 2014, Bonaccorsi di Patti et collaborateurs ont proposé deux nouveaux modèles 3D de la ferroportine humaine dont un en conformation « outward-facing » (ouverte vers l'extérieur de la cellule) (Figure 11). Ce dernier a été construit grâce au logiciel I-TASSER (« Iterative Threading ASSEMBLY Refinement ») à partir de la structure expérimentale du transporteur d'*E.coli* FucP (« L-fucose proton symporter »), seule protéine MFS cristallographiée en conformation « outward-facing » à l'époque (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014).

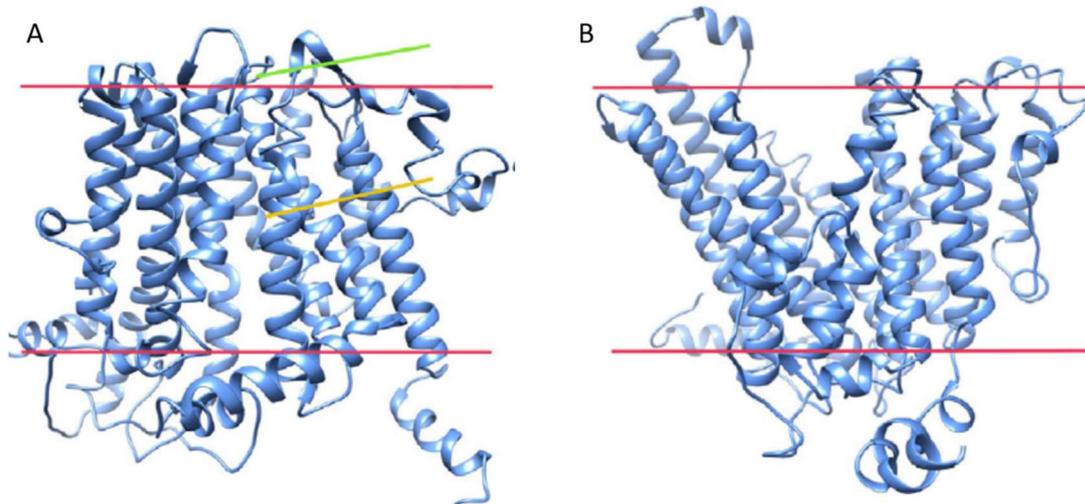


Figure 11 : Représentation en ruban des modèles tridimensionnels de la ferroportine humaine proposés par Bonaccorsi di Patti et collaborateurs en 2014 (d'après Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014).

(A) Vue latérale du modèle 3D de la ferroportine en conformation « inward-facing ». Ce modèle a été construit par modélisation moléculaire threading/ *ab initio* grâce au logiciel I-TASSER. Les structures expérimentales de GlpT et LacY, cristallisées en conformation « inward-facing », ont été sélectionnées par le logiciel pour servir de modèles. (B) Vue latérale du modèle 3D de la ferroportine en conformation « outward-facing », construit grâce au logiciel I-TASSER à partir de la structure expérimentale de FucP cristallisée en conformation « outward-facing ». Les lignes rouges représentent la membrane plasmique.

Les modèles 3D proposés par les trois équipes, sous trois conformations différentes (« inward-facing », « occluded » et « outward-facing ») ne s'opposaient pas. Au contraire, ils étaient complémentaires et permettaient déjà d'argumenter que, comme toute protéine MFS, la ferroportine adopte différentes conformations pour transporter son substrat.

iii. L'hépcidine

L'hépcidine, petit peptide de 25 acides aminés appartenant à la famille des β -défensines, a tout d'abord été décrite pour son activité antimicrobienne observée *in vitro* (Krause *et al*, 2000; Park *et al*, 2001). Son nom identifie d'ailleurs son lieu de production majoritaire (« hep-» pour hépatocyte) et ses propriétés bactéricides (« -idine ») (Park *et al*, 2001). Un lien avec le métabolisme du fer fut ensuite établi de manière concomitante par 2 équipes françaises : Pigeon et collaborateurs, ont remarqué, grâce à l'établissement d'une banque soustractive, que la transcription de l'ARN messager de l'hépcidine était augmentée chez des souris en situation de surcharge en fer (Pigeon *et al*, 2001). De leur côté, Nicolas et collaborateurs, par leurs travaux sur des souris involontairement invalidées pour le gène codant l'hépcidine suite au « knock-out » du gène adjacent *Usf2*, ont révélé le rôle crucial que jouait l'hépcidine dans la régulation de l'homéostasie du fer en observant une sévère surcharge martiale chez ces animaux (Nicolas *et al*, 2001). La mort rapide, après la naissance, liée à un grave déficit en fer de souris surexprimant l'hépcidine a, par la suite, confirmé l'activité hyposidérémiant de ce peptide (Nicolas *et al*, 2002a).

L'hépcidine est codée par le gène *HAMP*, situé sur le chromosome 19 en position q13.1. La forme mature et active de l'hépcidine est issue de deux clivages successifs d'un pré-propeptide de 84 acides

aminés. Le peptide signal (acides aminés 1 à 24) est d'abord éliminé, puis le pro-peptide (acides aminés 25 à 59) est clivé grâce à l'intervention d'une proconvertase, la furine, par reconnaissance de la séquence consensus « -RX(K/R)R- » (van de Loo *et al*, 1997). L'extrémité C-terminale de 25 acides aminés correspondant au peptide mature est sécrétée dans le plasma. La demi-vie de l'hepcidine sous sa forme plasmatique est estimée à moins de 24 h, son élimination étant assurée par la voie urinaire (Park *et al*, 2001; Ganz *et al*, 2008).

L'hepcidine de 25 acides aminés présente une structure en épingle à cheveux stabilisée par 4 ponts disulfures que forment 8 cystéines extrêmement conservées entre espèces. L'extrémité N-terminale est plus flexible et comporte 6 acides aminés (Figure 12) (Jordan *et al*, 2009).

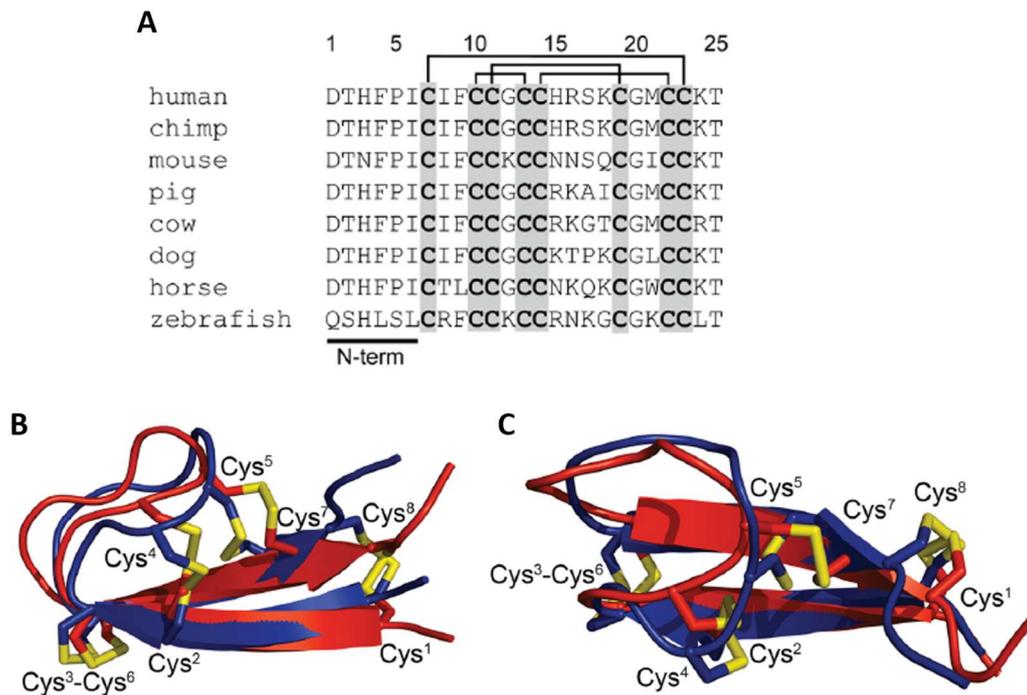


Figure 12 : Séquence protéique et structure tridimensionnelle de la forme mature et active de l'hepcidine (d'après Jordan *et al*, 2009 et Clark *et al*, 2011).

(A) Alignement des séquences protéiques de l'hepcidine de différentes espèces de vertébrés. Les 8 cystéines hautement conservées forment entre-elles 4 ponts disulfures comme indiqué par les accolades. (B) Représentation en ruban des structures 3D de l'hepcidine humaine déterminées par des expériences de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) réalisées à différentes températures : 325 K (en rouge) ou 253 K (en bleu). Les 4 ponts disulfures formés par les 8 cystéines apparaissent en jaune. (C) Structures présentées avec une rotation de 90° autour de l'axe Z.

Trois autres isoformes de l'hepcidine ont été retrouvées chez l'homme dans le sérum et les urines. Ces isoformes, ne comprenant que les 20, 22 ou 24 derniers acides aminés, ne montrent pas ou peu d'activité hyposidérémiant (Nemeth *et al*, 2004b, 2006). Ces peptides, qui pourraient correspondre à des produits de dégradation de la forme active, présenteraient possiblement une activité antimicrobienne résiduelle (Park *et al*, 2001; Laarakkers *et al*, 2013; Addo *et al*, 2016).

iv. Régulation de la ferroportine par l'hepcidine

En 2004, Nemeth et collaborateurs ont montré que l'hepcidine contrôlait le taux de fer circulant dans l'organisme en régulant post-traductionnellement l'expression en membrane plasmique de la ferroportine. Les auteurs ont observé par microscopie à épifluorescence que l'hepcidine induisait l'internalisation et la dégradation de la ferroportine dans la lignée cellulaire embryonnaire de rein humaine HEK293T, exprimant de façon stable et inductible le transporteur murin en fusion avec la protéine GFP (Nemeth *et al*, 2004b). D'après les connaissances actuelles, la régulation de la ferroportine par l'hepcidine emprunte au moins trois grandes étapes :

- Liaison de l'hepcidine à la ferroportine membranaire
- Ubiquitination du transporteur
- Internalisation et dégradation lysosomale de la ferroportine

1. Interaction hepcidine/ferroportine

Les acides aminés ainsi que la nature des interactions intervenants dans l'étape de fixation de l'hepcidine sur la ferroportine restent encore à définir. Différents travaux ont cependant révélé plusieurs éléments critiques.

Côté ferroportine, Fernandes et collaborateurs ont observé que la substitution de la cystéine en position 326 de la ferroportine, (p.Cys326Thr/Ser –la seconde substitution ayant été identifiée chez des patients atteints d'hémochromatose de type 4), inhibait totalement l'interaction hepcidine/ferroportine (Fernandes *et al*, 2009). De manière intéressante, d'autres mutations, localisées à proximité de ce résidu critique dans le lobe C-terminal du transporteur, ont globalement été évaluées *in vitro* comme induisant une plus forte résistance de la ferroportine à l'hepcidine que celles localisées dans le lobe N-terminal (Fernandes *et al*, 2009; Mayr *et al*, 2011; Preza *et al*, 2011; Détiavaud *et al*, 2013; Prashberger *et al*, 2014; Callebaut *et al*, 2014; Aschemeyer *et al*, 2018; Le Tertre *et al*, 2017). Le lobe C-terminal semble ainsi jouer un rôle particulièrement important dans cette première étape de fixation de l'hepcidine, notamment à travers le résidu Cys326.

Concernant l'hepcidine, il a été démontré par troncation séquentielle du peptide, que les 5 acides aminés en position N-terminale étaient indispensables à l'internalisation et à la dégradation de la ferroportine membranaire (Nemeth *et al*, 2006). Preza et collaborateurs ont observé, par la suite que les 9 acides aminés N-terminaux de l'hepcidine pouvaient, à eux seuls, réguler la présence membranaire du transporteur (Preza *et al*, 2011).

Dans l'optique de comprendre la nature de l'interaction hepcidine/ferroportine, les résidus extrêmement conservés de l'extrémité N-terminale du peptide régulateur ont été substitués. Par ces expériences, l'importance des acides aminés His3, Phe4, Ile6 et Phe9 a été mise en lumière (Clark *et al*, 2011; Preza *et al*, 2011). D'autre part, la substitution de l'unique cystéine contenue dans les 9 acides aminés N-terminaux de l'hepcidine (p.Cys7Ser) est apparue comme entraînant une chute drastique de la capacité du peptide tronqué (hep9) à dégrader la ferroportine en membrane plasmique. La même observation a été faite, lorsque la fonction thiol de ce résidu a été bloquée (Preza *et al*, 2011).

Suite à ces premiers résultats, l'hypothèse de l'établissement d'un pont disulfure dans un contexte hydrophobe entre l'hepcidine et la ferroportine a été formulée (Fernandes *et al*, 2009; Preza *et al*,

2011). Mais, Clark et collaborateurs, en défavorisant le potentiel établissement d'un pont disulfure hepcidine/ferroportine par la substitution des 8 cystéines du peptide régulateur en sélénocystéines, n'ont pas observé de conséquences sur l'activité régulatrice de l'hepcidine (Clark *et al*, 2011). Un constat similaire a été fait lorsque les ponts disulfures de l'hepcidine ont été remplacés par des liaisons thioéthers non réductibles (Huang *et al*, 2019).

Ainsi, l'existence et la nécessité d'une telle liaison covalente entre les deux acteurs protéiques est toujours questionnée à ce jour.

2. Ubiquitination de la ferroportine

Un premier mécanisme d'internalisation et de dégradation de la ferroportine en présence d'hepcidine avait été proposé par De Domenico et collaborateurs. Selon ces auteurs, la phosphorylation des tyrosines 302 et 303 de la ferroportine par la protéine JAK2 était requise pour induire l'internalisation du transporteur suite à la fixation de l'hepcidine. Une fois internalisée, la ferroportine aurait été ubiquitinylée avant d'être dégradée dans les lysosomes (De Domenico *et al*, 2007; Domenico *et al*, 2009).

L'importance de la phosphorylation pour l'internalisation du transporteur n'a pas été vérifiée par Ross et collaborateurs qui ont révélé dans deux études conjointes, qu'en présence d'hepcidine, la ferroportine était rapidement et uniquement ubiquitinylée (Ross *et al*, 2012; Qiao *et al*, 2012). En mutant différentes combinaisons de lysines cytoplasmiques, les auteurs ont souligné l'importance de la 3^{ème} boucle intracellulaire du transporteur dans ce processus. Ils ont observé que, contrairement à la protéine de type sauvage, des mutants de la ferroportine, triplement ou quadruplement mutés au niveau de lysines localisées dans la 3^{ème} boucle intracellulaire (p.Lys229Arg/Lys240Arg/Lys247Arg et Lys229Arg/Lys240Arg/Lys247Arg/Lys258Arg respectivement), ne montraient pas une augmentation de l'ubiquitination en réponse à l'hepcidine. Cette observation était corrélée avec un important retard d'endocytose (Qiao *et al*, 2012).

3. Internalisation et dégradation de la ferroportine

Nemeth et collaborateurs ont montré en 2004 que la ferroportine, en présence d'hepcidine était internalisée et dégradée dans les lysosomes. Des expériences d'immunofluorescence ont en effet révélé que la présence d'hepcidine engendrait une co-localisation de la ferroportine avec Lamp-1, un marqueur des endosomes tardifs et du lysosome. Les auteurs ont vérifié que suite à l'inhibition de l'activité protéasique du lysosome, le signal de la protéine de fusion ferroportine-GFP augmentait dans les vésicules intracellulaires (Nemeth *et al*, 2004b).

4. Régulation de la ferroportine par l'hepcidine sans endocytose

Récemment, des travaux ont souligné que l'hepcidine pouvait inhiber la fonction de la ferroportine sans induire son endocytose. Zhang et collaborateurs, après avoir montré que les globules rouges exprimaient fortement la ferroportine, ont ainsi remarqué que l'hepcidine diminuait l'export du fer sans affecter la présence du transporteur à la membrane de ces cellules, dépourvues de machinerie d'endocytose (Zhang *et al*, 2018b). Aschemeyer et collaborateurs ont généré, quant à eux, un variant

de la ferroportine qui comptait 8 substitutions de lysines en arginines au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire. Ce variant était ainsi peu ubiquitinylé et internalisé en présence d'hepcidine. Toutefois, les auteurs ont remarqué que l'ajout du peptide régulateur dans le milieu des cellules HEK293T ou d'oocytes de xénope exprimant ce variant, diminuait significativement l'export de fer (Aschemeyer *et al*, 2018).

Ces différents travaux suggèrent que la liaison du peptide régulateur à la ferroportine pourrait suffire à inhiber la fonction du transporteur.

v. Les principales voies de régulation de la synthèse hépatique d'hepcidine

Bien que l'hepcidine soit principalement produite et libérée par le foie, ce peptide est également synthétisé, en quantités moindres, par d'autres cellules, tissus et organes de l'organisme que sont les macrophages, les adipocytes, la rétine, les reins, les poumons, la prostate, le placenta, l'estomac, le cerveau, le cœur ou bien encore le pancréas (Daher *et al*, 2019).

Des expériences de « knock-out » conditionnel chez la souris ont montré que cette production extra-hépatique d'hepcidine ne contribuait que très peu à la régulation systémique du métabolisme du fer, médiée principalement par l'hepcidine d'origine hépatique. Ainsi, la délétion hépato-spécifique du gène *Hamp1* codant l'hepcidine a engendré un phénotype sévère de surcharge en fer similairement observé chez les animaux pour lesquels le gène *Hamp1* avait été inactivé à l'échelle de l'organisme entier (augmentation du fer sérique associée à une importante accumulation de fer dans le parenchyme hépatique) (Zumerle *et al*, 2014).

L'expression hépatique de l'hepcidine est modulée par une multitude de signaux dont certains restent encore à définir. Toutefois, il est clairement établi qu'une augmentation plasmatique et tissulaire en fer ainsi que l'inflammation induisent la synthèse du peptide régulateur. Celle-ci est en revanche réprimée par un déficit en fer et par l'érythropoïèse (Figure 13) (Nicolas *et al*, 2002b; Wang & Babitt, 2019).

1. Le fer

En réponse à une élévation du taux de fer, le foie va synthétiser et sécréter de l'hepcidine par le biais de mécanismes qui ne sont pas encore totalement élucidés. Ces derniers diffèrent en fonction de l'origine tissulaire ou plasmatique du fer, mais, ils reposent sur une voie de signalisation commune, la voie BMP/SMAD. Il est important de remarquer que ces mécanismes impliquent des protéines qui ont été associées aux différentes formes d'hémochromatose 1, 2A et 3 lorsqu'elles sont mutées: HFE, HJV et TfR2 (Figure 13). On peut également souligner l'importance du foie dans la régulation de l'homéostasie du fer, ce qui a d'ailleurs conduit Antonello Pietrangelo à présenter l'hémochromatose comme une maladie hépatique endocrine (Pietrangelo, 2007).

L'élévation du fer tissulaire va entraîner une augmentation de la synthèse de BMP6 (« Bone Morphogenetic Protein 6 ») et, dans une moindre mesure, de BMP2, des protéines BMPs principalement produites et sécrétées par les cellules endothéliales sinusoidales du foie (Kautz *et al*, 2008; Andriopoulos *et al*, 2009; Meynard *et al*, 2009; Koch *et al*, 2017; Canali *et al*, 2017a, 2017b; Lim *et al*, 2019). A la membrane des hépatocytes avoisinants, BMP6 et BMP2 vont interagir avec les

récepteurs BMP de type 1 (ALK2/ALK3) et de type 2 (ACVR2A/BMP2) et leur co-récepteur, l'hémojuvéline (HJV). Les complexes actifs de signalisation qui vont en résulter vont phosphoryler les effecteurs cytoplasmiques SMAD (« (Small) Mothers Against Decapentaplegic ») 1, 5 et 8 qui vont ensuite s'associer à SMAD4 (Wang *et al*, 2005; Babitt *et al*, 2006; Xia *et al*, 2008; Steinbicker *et al*, 2011; Wu *et al*, 2012). Le complexe protéique formé va être transloqué dans le noyau où il va induire la transcription du gène *HAMP* en se fixant sur des séquences BMP-RE (« Bone Morphogenetic Protein-Responsive Elements ») du promoteur (Casanovas *et al*, 2009).

Bien que les principaux acteurs protéiques aient été identifiés, beaucoup de questions restent encore posées autour de l'activation et de la régulation, dépendantes du fer, de cette voie de signalisation BMP/SMAD. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'expression des différents ligands BMPs suite à une élévation du fer tissulaire ne sont par exemple par encore totalement élucidés tout comme la « composition » exacte (ligands BMPs/récepteurs BMP de type 1, de type 2, HJV) des complexes actifs de signalisation qui semble varier en fonction de la quantité de fer tissulaire observée (Silvestri *et al*, 2019; Wang & Babitt, 2019).

L'élévation du taux de fer plasmatique engendre, quant à elle, une augmentation de la transcription du gène *HAMP* via la cascade de signalisation SMAD1/5/8, sans augmenter la synthèse hépatique de BMP6 (Corradini *et al*, 2011). Le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas encore totalement élucidé mais celui-ci pourrait notamment impliquer 3 protéines à la surface des hépatocytes: HFE et les deux récepteurs à la transferrine TfR1 et TfR2. Lorsque le taux de fer circulant est faible, HFE interagirait avec TfR1 au niveau de son site de fixation de la transferrine. Cette interaction serait rompue par compétition lors d'une élévation du taux d'holotransferrine circulante. Cela permettrait d'une part, l'incorporation du fer lié à la transferrine par le récepteur TfR1 nouvellement libéré et favoriserait d'autre part, une interaction HFE/TfR2. Différents mécanismes, par lesquels ces deux protéines induiraient la transcription du gène *HAMP* en potentialisant la cascade de signalisation BMP/SMAD, ont été proposés. Ces protéines pourraient, d'une part, former un complexe avec HJV et/ou HFE pourrait, d'autre part, lier le récepteur BMP de type 1 ALK3 et augmenter sa stabilité en membrane en interférant avec les mécanismes conduisant à sa dégradation (Gao *et al*, 2009; D'Alessio *et al*, 2012; Wu *et al*, 2014; Traeger *et al*, 2018).

Lors d'un déficit en fer, la synthèse hépatique d'hepcidine va être réprimée. TMPRSS6, également nommée matriptase-2, joue un rôle clé dans ce processus. Cette protéase, stabilisée par le faible taux de fer intracellulaire, va en effet diminuer l'activation de la cascade de signalisation BMP/SMAD, en clivant l'hémojuvéline membranaire (Zhang *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2015; Silvestri *et al*, 2008).

2. L'inflammation

L'inflammation va induire une expression hépatique d'hepcidine et ce principalement en réponse à une libération d'interleukine-6 (IL-6) par les cellules inflammatoires (Figure 13). L'interleukine-6, par liaison à son récepteur à la surface des hépatocytes, va activer des enzymes Janus Kinases (JAK). Ces dernières vont phosphoryler STAT3 (« Signal Transducer and Activator of Transcription 3 »), ce qui va entraîner sa dimérisation et sa translocation dans le noyau. Le complexe STAT3, en se fixant sur le site de liaison « STAT3-responsive element » situé sur le promoteur du gène *HAMP*, va engendrer la synthèse de l'hepcidine (Nemeth *et al*, 2004a; Wrighting & Andrews, 2006).

L'activine B et l'interleukine-1 β , en activant les récepteurs BMP de type 1 ou en induisant l'expression de BMP2 respectivement, seraient deux autres cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la

synthèse du peptide régulateur *via* l'activation de la voie de signalisation BMP/SMAD (Besson-Fournier *et al*, 2012; Shanmugam *et al*, 2015).

Cette libération hépatocytaire d'hepcidine, pourrait participer à la protection de l'organisme contre certaines infections en réduisant les quantités de fer circulantes, indispensables à la prolifération de certains pathogènes (Stefanova *et al*, 2018).

3. L'érythropoïèse

L'hypoxie, l'anémie ou bien encore une synthèse de globules rouges anormale sont autant de facteurs nécessitant un ajustement de l'activité érythropoïétique. La libération d'érythropoïétine (EPO) par les reins qui va en résulter va notamment stimuler la sécrétion d'érythroferrone (ERFE) par les érythroblastes. L'ERFE va inhiber l'expression de l'hepcidine, augmentant ainsi la disponibilité du fer dans le plasma pour l'érythropoïèse (Figure 13) (Kautz *et al*, 2014).

Le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) par le(s)quel(s) l'EPO et l'ERFE répriment l'expression de l'hepcidine ne sont pas encore totalement identifiés et compris. La voie de signalisation BMP/SMAD semble toutefois à nouveau impliquée, comme en témoigne la diminution de la phosphorylation des effecteurs cytoplasmiques SMAD1 et 5 observée en présence d'EPO et d'ERFE chez la souris et dans la lignée hépatocytaire humaine Hep3B (Wang *et al*, 2017). De récents travaux suggèrent que l'ERFE pourrait diminuer l'activation de la voie BMP/SMAD en séquestrant certains ligands BMPs (Arezes *et al*, 2018; Wang *et al*, 2019).

4. Autres signaux

Divers autres signaux moduleraient également l'expression hépatique de l'hepcidine, tels que le stress du réticulum endoplasmique, les hormones, les facteurs de croissance ou bien encore d'autres voies de signalisation (Muckenthaler *et al*, 2017).

Pour exemple, des travaux menés chez la souris ont souligné l'effet répresseur sur l'expression de l'hepcidine qu'entraînait la testostérone, ce qui pourrait expliquer, en partie, la plus forte sévérité des surcharges en fer observée chez les hommes (Latour *et al*, 2014).

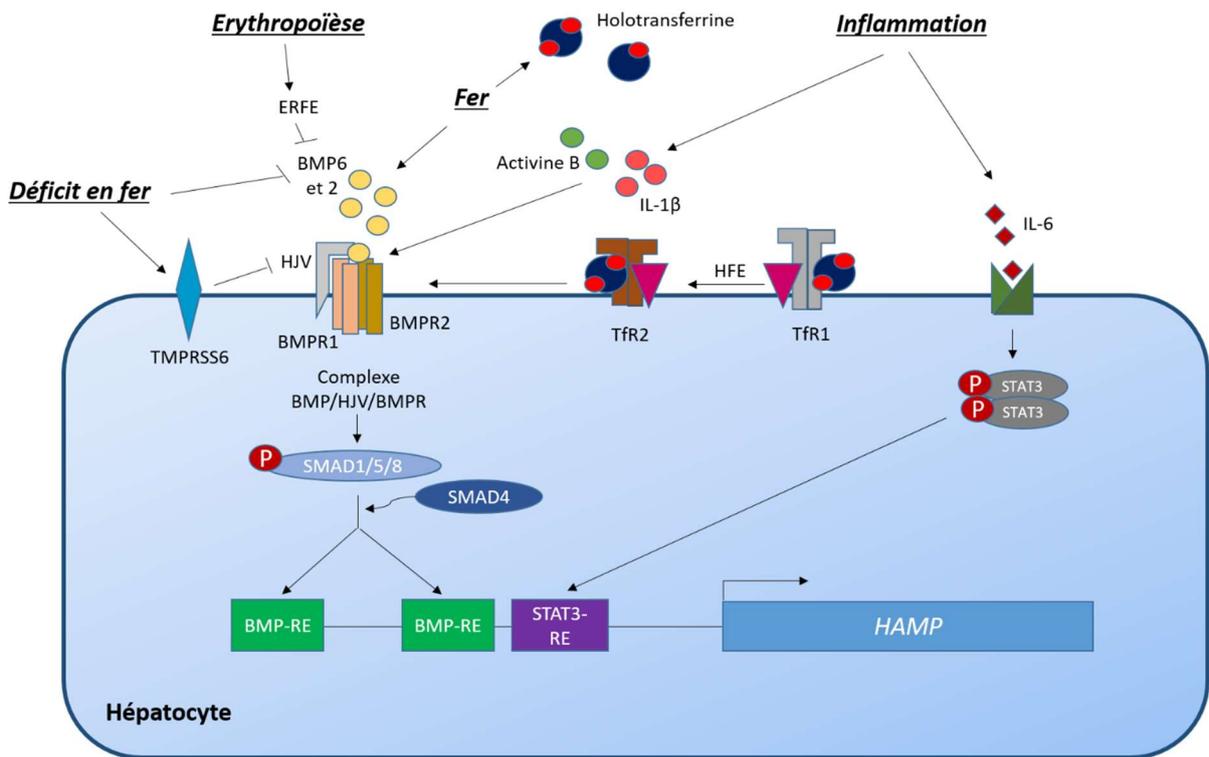


Figure 13 : Les principales voies de régulation de l'expression hépatique d'hepcidine.

Le fer tissulaire augmente la synthèse de BMP6 et 2 qui, par fixation à leurs récepteurs de type 1 et 2 (BMPR1 et BMPR2) et co-récepteur HJV, vont activer la voie de signalisation BMP/SMAD conduisant à la synthèse d'hepcidine par les hépatocytes. Une concentration importante en holotransferrine plasmatique va favoriser une interaction HFE/Tfr2 au détriment d'une interaction HFE/Tfr1 ce qui va potentialiser la voie de signalisation BMP/SMAD et l'expression de l'hepcidine. Lors d'un déficit en fer, cette même voie de signalisation va être régulée négativement en partie par TMPRSS6 qui va cliver HJV. L'inflammation va provoquer une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'IL-6, par liaison à son récepteur, va entraîner la translocation du dimère STAT3 dans le noyau et la transcription du gène *HAMP*. L'activine B et l'IL-1 β quant à elles, vont engendrer l'expression d'hepcidine *via* la voie de signalisation BMP/SMAD. Une forte activité érythropoïétique va conduire à une sécrétion d'ERFE par les érythroblastes ce qui va inhiber la transcription du gène *HAMP* par la voie de signalisation BMP/SMAD.

III- L'hémochromatose de type 4 ou maladie de la ferroportine

L'hémochromatose de type 4 s'inscrit dans un groupe de surcharges en fer héréditaires rassemblées sous l'appellation « hémochromatose ». Les différentes formes actuellement recensées de la maladie se distinguent en fonction du gène impliqué, de la répartition mondiale, du mode de transmission, du profil histologique de la surcharge en fer ou bien encore du type et de la sévérité des manifestations cliniques observées (Tableau I) (Le Gac & Férec, 2005; Pietrangelo, 2017).

Tableau I : Les différentes formes d'hémochromatose (d'après Pietrangelo, 2017).

Type d'hémochromatose	Gène affecté (nom et position chromosomique)	Fonction du produit génique	Répartition mondiale	Mode de transmission	Mécanisme conduisant aux dépôts de fer intracellulaires	Expression clinique (âge)	Manifestations cliniques principales	Evolution clinique
Type 1	<i>HFE</i> (6p21.3)	La protéine HFE régule l'expression de l'hepcidine	Affecte les caucasiens d'origine nord-européenne	Autosomique récessif	Augmentation de l'accumulation de fer dans les cellules parenchymales causée par une élévation de l'import du fer lié ou non à la transferrine	40 - 50 ans	Pathologies hépatiques Arthropathie Cardiomyopathie Endocrinopathie	Modérée à sévère
Type 2A	<i>HJV</i> (1p21)	L'hémojuvéline (HJV) régule l'expression de l'hepcidine	Affecte les caucasiens et non caucasiens			Avant 20 ans*	Hypogonadisme et cardiomyopathie Pathologies hépatiques	Sévère
Type 2B	<i>HAMP</i> (19q13.1)	L'hepcidine régule l'export du fer dans le compartiment sanguin en réduisant l'expression membranaire de la ferroportine				30 - 40 ans	Pathologies hépatiques Arthropathie Cardiomyopathie Endocrinopathie	Modérée à sévère
Type 3	<i>TFR2</i> (7q22)	Le récepteur à la transferrine de type 2 (TfR2) régule l'expression de l'hepcidine				Tout âge	Pathologies hépatiques Faible anémie	Modérée
Type 4A	<i>SLC40A1</i> (2q32)	La ferroportine exporte le fer intracellulaire (des macrophages, des entérocytes, des hépatocytes, des érythrocytes et des syncytiotrophoblastes principalement) vers le compartiment sanguin	Affecte les caucasiens et non caucasiens	Autosomique dominant	Rétention de fer intracellulaire engendrée par un défaut d'export de fer vers le compartiment sanguin	Tout âge	Pathologies hépatiques Faible anémie	Modérée
Type 4B				Augmentation de l'accumulation de fer dans les cellules parenchymales causée par une élévation de l'import du fer lié ou non à la transferrine	40 - 50 ans	Pathologies hépatiques Arthropathie Cardiomyopathie Endocrinopathie	Modérée à sévère	

* Pour l'hémochromatose de type 2A liée au gène *HJV*, des cas moins sévères de surcharges en fer ont été rapportés chez l'adulte (Takami *et al*, 2020).

a- L'hémochromatose de type 1

L'hémochromatose a longtemps été associée au seul gène *HFE*, localisé sur le bras court du chromosome 6. L'hémochromatose de type 1 constitue, de fait, un modèle de référence pour la description de l'ensemble des formes génétiques de surcharges en fer aujourd'hui associées au terme « hémochromatose ».

i. Cause génétique

L'hémochromatose de type 1 est causée par des mutations du gène *HFE*, identifié en 1996 par Feder et collaborateurs (Feder *et al*, 1996) (Tableau I). Ce gène code la protéine HFE qui intervient dans la synthèse hépatique de l'hepcidine. Cette pathologie autosomique récessive, touchant presque exclusivement la population caucasienne, est principalement causée par la mutation p.Cys282Tyr à l'état homozygote. La prévalence de cette homozygotie, qui varie selon l'origine géographique des individus, a été mesurée à une valeur moyenne de 0.4 % dans les populations européennes (Hanson *et al*, 2001). La mutation p.Cys282Tyr empêche l'établissement d'un pont disulfure dans le domaine α 3-immunoglobulin-like de la protéine HFE ce qui perturbe grandement son interaction avec son partenaire protéique, la β 2-microglobuline. L'adressage en membrane plasmique de la protéine HFE est ainsi affecté (Feder *et al*, 1997; Le Gac *et al*, 2003; Ka *et al*, 2005). L'absence d'expression d'HFE à la surface des hépatocytes entraîne un défaut de synthèse hépatique d'hepcidine par des mécanismes moléculaires sous-jacents qui ne sont pas encore clairement identifiés (Brissot *et al*, 2018).

ii. Manifestations biologiques

Le défaut d'expression d'hepcidine entraîne une régulation non optimale de l'expression membranaire de la ferroportine. Les quantités de fer libérées dans le plasma augmentent ainsi considérablement. Le premier signe biologique communément observé chez les patients hémochromatosiques est une élévation du coefficient de saturation de la transferrine au-delà des valeurs normales (>45 %). A ce stade, une nouvelle forme de fer plasmatique apparaît : le NTBI (« Non-Transferrin Bound Iron »). Cette forme de fer libre est principalement responsable de la surcharge cellulaire et tissulaire en fer observée chez les patients atteints d'hémochromatose. Le NTBI va être fortement absorbé par les cellules parenchymateuses, notamment par les hépatocytes, les cellules pancréatiques et les cardiomyocytes. Lorsque le coefficient de saturation de la transferrine atteint des valeurs supérieures à 75 %, le NTBI peut se révéler extrêmement dangereux. En s'accumulant de manière incontrôlée dans les cellules, ce fer augmente le risque de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – « Reactive Oxygen Species »). Ces dernières peuvent être responsables de dommages cellulaires et tissulaires pouvant conduire à la défaillance de certains organes tels que le foie, le cœur ou bien encore le pancréas (Brissot *et al*, 2012, 2018).

L'augmentation de la ferritine sérique (ou hyperferritinémie), au-delà de 200 μ g/L pour les femmes non ménopausées et 300 μ g/L pour les hommes, reflète le début d'une surcharge tissulaire en fer. Au-delà de 1000 μ g/L, le risque de fibrose hépatique et de cirrhose est significativement plus important (Guyader *et al*, 1998; Beaton *et al*, 2002; Morrison *et al*, 2003).

iii. Expression clinique

L'hémochromatose de type 1 est une maladie qui évolue progressivement au cours de la vie. 5 stades phénotypiques successifs peuvent être observés chez les patients. Cette classification repose sur l'évaluation de plusieurs paramètres qui sont : l'augmentation du coefficient de saturation de la transferrine, l'élévation de la ferritine sérique, la dégradation de la qualité de vie et l'engagement du pronostic vital (Figure 14).

Dans les premières années de vie et jusqu'au début de l'âge adulte, aucune expression phénotypique n'est observée (coefficient de saturation de la transferrine inférieur à 45 %, ferritinémie normale- « stade zéro »). Le premier stade phénotypique de la maladie correspond à une élévation de la quantité de fer dans le compartiment sanguin qui se traduit par une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine. Une surcharge en fer s'installe au niveau tissulaire, ce qui correspond au 2^{ème} stade phénotypique de l'hémochromatose et est révélée par une élévation de la ferritine sérique. Les premières manifestations cliniques de la maladie, affectant la qualité de vie des patients, ne se déclarent que tardivement et traduisent la survenue du 3^{ème} stade phénotypique. Une fatigue chronique ainsi que des douleurs articulaires et abdominales peuvent être observées chez les patients. Arrive ensuite le 4^{ème} stade phénotypique de l'hémochromatose et les manifestations cliniques tardives qui lui sont associées. Des complications hépatiques (cirrhose, carcinome hépatocellulaire), cardiaques (hypertrophie, insuffisance, arythmie cardiaque) ainsi qu'une atteinte des glandes endocriniennes (diabète insulino-dépendant) se développent et peuvent compromettre le pronostic vital de ces patients (Brissot *et al*, 2008; Rochette *et al*, 2010).

En général, les premiers symptômes apparaissent relativement tard, à partir de 30-40 ans chez les hommes contre 40 à 50 ans chez les femmes.

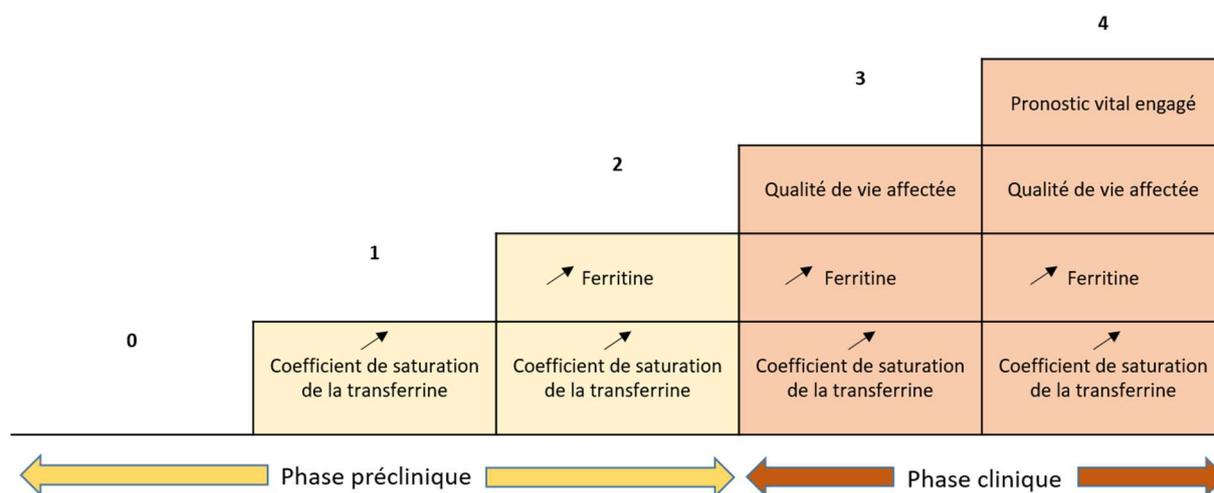


Figure 14 : Les 5 stades phénotypiques de l'hémochromatose de type 1 (d'après Brissot *et al*, 2008).

Leur classification repose sur 4 paramètres : l'élévation du coefficient de saturation de la transferrine, de la ferritine sérique, l'atteinte de la qualité de vie ainsi que l'engagement du pronostic vital des patients atteints d'hémochromatose. Deux phases sont observées : la phase préclinique regroupant les 3 premiers stades phénotypiques et la phase clinique comprenant les 2 derniers stades phénotypiques de la maladie.

Les différents stades phénotypiques associés à l'histoire naturelle de l'hémochromatose liée au gène *HFE* ne sont pas observés chez tous les patients. L'étude de la pénétrance du génotype p.[Cys282Tyr];[Cys282Tyr] a en effet révélé que certains patients ne développaient jamais de surcharge en fer et ce, même à un âge avancé (Coppin *et al*, 2003). Par ailleurs, la maladie ne progresse pas au-delà d'une hyperferritinémie et de l'observation de signes cliniques modérés chez une majorité de patients, même en l'absence de traitement (Olynyk *et al*, 2004; Andersen *et al*, 2004; Gurrin *et al*, 2008; Pankow *et al*, 2008). Des facteurs modificateurs génétiques (*HAMP*, *HJV*, *DCYTB*...) ou environnementaux (consommation d'alcool, perte de fer physiologiques (menstruations, grossesse, allaitement), testostérone diminuant la synthèse de l'hepcidine, teneur en fer de l'alimentation, poids corporel...) peuvent moduler l'expression phénotypique de la maladie (Scotet *et al*, 2003; Jacolot *et al*, 2004; Le Gac *et al*, 2004b; Rochette *et al*, 2010).

iv. Diagnostic et traitement

Bien que l'augmentation du coefficient de saturation de la transferrine et de la ferritine sérique puisse indiquer la présence d'une hémochromatose, la prudence est de mise quant à l'établissement d'un tel diagnostic. En effet, l'hémochromatose peut être confondue avec des causes non génétiques (secondaires) fréquentes et diverses affectant ces deux paramètres biologiques. Ainsi, le coefficient de saturation de la transferrine peut être mesuré à de hautes valeurs suite à une cytolyse, une hémolyse ou une protéinurie par exemple. L'hyperferritinémie, quant à elle, peut résulter d'un syndrome métabolique, d'une consommation excessive d'alcool, d'une inflammation, ou d'une cytolyse importante (Ong *et al*, 2016; Brissot *et al*, 2018).

Une hémochromatose peut être suspectée seulement après avoir exclu l'existence des causes secondaires principales. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut être utilisée pour vérifier et quantifier la surcharge en fer hépatique des patients (Pietrangelo, 2017). D'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé, un test génétique doit être effectué si la personne présente au cours de deux dosages différents, un coefficient de saturation de la transferrine supérieur à 45 %.

Si le diagnostic d'hémochromatose est confirmé, le patient doit être pris en charge en conséquence afin de prévenir et/ou limiter les graves complications que représentent les dommages irréversibles d'organes dus à la toxicité du fer en excès. La saignée, ou phlébotomie, est le principal traitement de la maladie. Cela permet de soustraire une quantité importante de globules rouges aux patients. L'érythropoïèse, mobilisant le fer en excès dans l'organisme, est alors stimulée pour synthétiser de nouveaux érythrocytes. Ce traitement peu coûteux, montre une très bonne efficacité. En effet, une amélioration de la fatigue chronique, de la fonction cardiaque ainsi qu'une stabilisation des atteintes hépatiques et même une réversion de la fibrose hépatique peuvent être observées chez les patients (Rombout-Sestrienkova *et al*, 2016; Brissot *et al*, 2018).

Une minorité d'entre-eux peuvent cependant mal tolérer la phlébotomie par rapport aux effets secondaires qu'elle peut provoquer (vertiges, malaises), en raison d'un accès veineux difficile ou pour des questions de peurs ou de croyances religieuses par exemple (Preza *et al*, 2011). Des chélateurs de fer peuvent alors être prescrits, mais ces derniers ne procurent pas toujours de réels bénéfices et peuvent entraîner d'importants effets secondaires (Adams & Barton, 2010). Certaines approches thérapeutiques en cours de développement, qui visent à contrer l'installation d'une surcharge en fer, pourraient présenter une autre alternative. Celles-ci reposent sur différentes stratégies. La

supplémentation en hepcidine synthétique est une première piste grâce notamment aux « mini-hepcidines » développées sur la base des 9 premiers acides aminés de l'hepcidine, indispensables à sa fonction (Preza *et al*, 2011; Ramos *et al*, 2012). La stimulation de la synthèse endogène d'hepcidine est une seconde piste. Des oligonucléotides anti-sens ainsi que des siRNAs ciblant TMPRSS6, un inhibiteur de la voie de signalisation BMP-SMAD impliquée dans la synthèse de l'hepcidine, ont été évalués (Guo *et al*, 2013; Schmidt *et al*, 2013). Enfin, un inhibiteur de la ferroportine a également été développé (Richard *et al*, 2020). Certaines de ces molécules ayant montré des effets prometteurs chez la souris entrent ou sont déjà en essai clinique (Porter *et al*, 2018; Casu *et al*, 2018; Richard *et al*, 2020).

b- L'hémochromatose de type 2A, 2B et 3

Il existe d'autres formes d'hémochromatose, bien plus rares que celle de type 1 (Tableau I) (Wallace & Subramaniam, 2016; Pietrangelo, 2017). Parmi celles-ci, les deux formes 2A et 2B sont causées respectivement par des mutations du gène *HJV*, codant l'hémojuvéline (HJV), et du gène *HAMP*, codant l'hepcidine (Papanikolaou *et al*, 2004; Roetto *et al*, 2003). Ces mutations affectent dans le premier cas, l'induction de l'expression de l'hepcidine et dans le second cas, la fonctionnalité du peptide régulateur. Ces deux formes d'hémochromatose, dites « juvéniles », sont les plus rares mais également les plus sévères de la maladie. Elles se distinguent par leur expression clinique précoce qui se caractérise par de sévères lésions hépatiques (cirrhose), une cardiomyopathie et un hypogonadisme.

Un phénotype intermédiaire peut être observé chez les patients atteints de l'hémochromatose de type 3 (Le Gac *et al*, 2004a). Cette forme résulte de mutations du gène *TFR2*, codant le récepteur à la transferrine de type 2 (TfR2), également impliqué dans la régulation de l'expression de l'hepcidine (Camaschella *et al*, 2000).

c- L'hémochromatose de type 4 ou maladie de la ferroportine

Ce sont des mutations du gène *SLC40A1* codant la ferroportine qui sont à l'origine de l'hémochromatose de type 4, également appelée maladie de la ferroportine. L'hémochromatose de type 4 est considérée comme l'une des formes les plus communes de surcharge en fer héréditaire après l'hémochromatose de type 1 (Mayr *et al*, 2010; Pietrangelo, 2017). Celle-ci se distingue des autres formes d'hémochromatose par son mode de transmission autosomique dominant ainsi que par les mécanismes physiopathologiques et la localisation des dépôts de fer qui lui sont associés (Tableau I).

Cette pathologie se décline sous deux formes : l'hémochromatose de type 4A et l'hémochromatose de type 4B.

i. L'hémochromatose de type 4A

L'hémochromatose de type 4A aussi nommée « forme classique de la maladie de la ferroportine » résulte de mutations dites « perte de fonction » qui affectent la présence membranaire et/ou la

fonction d'export du fer de la ferroportine (Montosi *et al*, 2001; Schimanski *et al*, 2005; Le Gac *et al*, 2013; Callebaut *et al*, 2014; Ka *et al*, 2018).

Le défaut fonctionnel de la ferroportine va entraîner une rétention préférentielle du métal dans les macrophages de la rate, du foie et de la moelle osseuse. Ainsi, les patients vont présenter un coefficient de saturation de la transferrine normal à bas, reflet des quantités limitées de fer libérées dans le compartiment sanguin. Une hyperferritinémie traduisant la surcharge tissulaire en fer sera également observée (Mayr *et al*, 2010; Pietrangelo, 2017).

L'expression clinique de l'hémochromatose de type 4A est généralement modérée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les macrophages de la rate, du foie (cellules de Kupffer) et de la moelle osseuse montrent une résistance plus élevée que les cellules parenchymateuses à l'accumulation toxique de fer intracellulaire. Cependant, ces macrophages et notamment les cellules de Kupffer, essentielles à la protection du foie (production de médiateurs fibrogéniques, surveillance immunologique des tumeurs, élimination des hépatocytes transformés) peuvent, à terme, voir leur fonction altérée. La saturation du système réticulo-endothélial peut engendrer une libération du fer dans le plasma, pouvant conduire, avec l'âge, à l'apparition d'une surcharge mixte avec des dépôts de fer hépatocytaires. Par ces diverses conséquences, le défaut fonctionnel de la ferroportine peut favoriser la fibrogenèse et la carcinogenèse (Pietrangelo, 2017).

L'hémochromatose de type 4A peut être suspectée chez des patients présentant une hyperferritinémie associée à une absence d'élévation du coefficient de saturation de la transferrine (<45 % en France ou <50 % chez les femmes et < 60 % chez les hommes dans les pays anglo-saxons). Une IRM abdominale est recommandée avant tout test génétique afin de vérifier le développement d'une surcharge en fer au niveau du foie, de la rate et/ou de la moelle osseuse. En l'absence de surcharge en fer tissulaire avérée (par IRM notamment), les causes secondaires d'hyperferritinémie (syndrome métabolique, alcoolisme, inflammation, cytolysse...) doivent impérativement avoir été exclues.

Le principal traitement de l'hémochromatose de type 4A est également la saignée. Cependant, les patients atteints de cette pathologie peuvent mal tolérer les phlébotomies qui peuvent conduire à une anémie. Pour éviter cela, le taux d'hémoglobine doit être particulièrement surveillé et le rythme des saignées éventuellement adapté (Pietrangelo, 2017).

ii. L'hémochromatose de type 4B

L'hémochromatose de type 4B également nommée « forme non classique de la maladie de la ferroportine » résulte, quant à elle, de mutations dites « gain de fonction » du gène *SLC40A1*. Ces mutations, en entravant une ou plusieurs étapes nécessaires à la dégradation de la ferroportine par l'hepcidine, génèrent une résistance plus ou moins prononcée du transporteur à la régulation négative médiée par ce peptide (Njajou *et al*, 2001; Drakesmith *et al*, 2005; Fernandes *et al*, 2009; Létocart *et al*, 2009; Ross *et al*, 2012; Qiao *et al*, 2012; Aschemeyer *et al*, 2018).

Les manifestations phénotypiques associées à ce type d'hémochromatose sont généralement superposables à celles observées chez les individus atteints de l'hémochromatose liée au gène *HFE*. En effet, la ferroportine qui n'est plus régulée de manière adéquate va libérer d'importantes quantités de fer dans le compartiment sanguin. Cela va engendrer une élévation du coefficient de saturation de la transferrine qui précèdera une augmentation de la ferritine sérique et une surcharge en fer ciblant

préférentiellement le parenchyme hépatique. Tout comme l'hémochromatose de type 1, la phlébotomie en est le principal traitement (Vlasveld *et al*, 2019).

iii. Evolution de la nomenclature

La définition physiopathologique de l'hémochromatose fait encore l'objet de débats. Dorénavant, différents auteurs s'accordent à définir ce terme comme désignant uniquement les surcharges en fer systémiques d'origine génétique, engendrées par une synthèse insuffisante ou une activité altérée de l'hepcidine vis-à-vis de sa cible, la ferroportine. La surcharge en fer héréditaire appelée « hémochromatose de type 4A », qui se distingue clairement des autres formes de la maladie, tant du point de vue du mécanisme physiopathologique que de sa présentation biologique et clinique n'est alors plus considérée comme une forme d'hémochromatose. Le terme de « maladie de la ferroportine » se généralise pour décrire cette forme différente de surcharge en fer tandis que les appellations « hémochromatose associée à la ferroportine » ou « hémochromatose de type 4 » ont été proposées pour remplacer la dénomination « hémochromatose de type 4B » (Pietrangelo, 2017; Brissot *et al*, 2018; Vlasveld *et al*, 2019; Piperno *et al*, 2020).

iv. Hétérogénéité phénotypique de l'hémochromatose de type 4

L'hémochromatose de type 4, au sens historique du terme (hémochromatose de type 4A et 4B), présente une forte hétérogénéité phénotypique dont l'importance reste encore grandement incomprise. Les deux catégories de mutations « perte » et « gain de fonction » du gène *SLC40A1*, à l'origine de phénotypes distincts, ne suffisent pas à expliquer cette situation (Schimanski *et al*, 2005; Drakesmith *et al*, 2005; Mayr *et al*, 2010; Le Lan *et al*, 2011).

L'étude des quelques familles disponibles suggère l'existence d'un défaut de pénétrance de certains génotypes, défaut qui serait particulièrement prononcé chez les femmes et les jeunes individus (Pelucchi *et al*, 2008; Létocart *et al*, 2009; Le Lan *et al*, 2011; Moreno-Carralero *et al*, 2014; Ka *et al*, 2018).

En raison du caractère rare et parfois privé des variants du gène *SLC40A1*, il est compliqué d'identifier des facteurs modificateurs génétiques et environnementaux qui pourraient, à l'image de l'hémochromatose de type 1, moduler l'expression phénotypique de l'hémochromatose de type 4 (gènes modificateurs, poids, consommation d'alcool, teneur en fer du bol alimentaire, pertes en fer liées aux menstruations, à la grossesse, à l'allaitement, à des dons de sang répétés...) (Le Lan *et al*, 2011).

Au-delà de la rareté des variants du gène *SLC40A1*, quatre points très importants méritent d'être soulevés :

- La très forte hétérogénéité des données biologiques et cliniques associées aux différents variants dans la littérature qui limite fortement les possibilités de comparaisons.
- Le trop faible nombre d'études familiales pour une pathologie pourtant transmise sur un mode autosomique dominant et dont le diagnostic dépend de marqueurs biologiques et radiologiques relativement accessibles.
- La très forte proportion de variants faux-sens associés à la maladie qui ne sont pas systématiquement documentés sur une base fonctionnelle.

- La diversité des modèles cellulaires et des tests fonctionnels proposés par différentes équipes pour tester la causalité des variants faux-sens. La crainte principale est celle d'une distinction éronnée entre des variants délétères, des variants neutres, et des variants plus ambigus car hypomorphes (Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019; Callebaut *et al*, 2014).

Des stratégies expérimentales moins hétérogènes et moins basées sur des modèles de surexpression pourraient permettre de limiter certaines des contradictions pointées dans la littérature (Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019). Mais une trop grande uniformité pourrait aussi réduire la capacité des différentes équipes de recherche à identifier des éléments originaux qui mériteraient des investigations plus approfondies. A ce stade, on peut remarquer que les outils employés ont permis la description de différents mécanismes physiopathologiques (Nemeth *et al*, 2004b; Schimanski *et al*, 2005; Drakesmith *et al*, 2005; Ross *et al*, 2012; Qiao *et al*, 2012; Fernandes *et al*, 2009; Ka *et al*, 2018; Aschemeyer *et al*, 2018), mais qu'ils restent néanmoins perfectibles et que l'utilisation de modèles dits « plus physiologiques » (modèles de cellules primaires sans surexpression de la ferroportine) devra certainement être privilégiée à l'avenir.

IV- Bases moléculaires de l'export du fer et de la régulation par l'hepcidine

Dans cette quatrième et dernière partie de mon introduction, je souhaite mettre en avant des résultats récents qui permettent de formuler de nouvelles hypothèses dans l'optique d'une compréhension plus aboutie de l'organisation structurale, du mécanisme d'export du fer et de la régulation par l'hepcidine de la ferroportine.

a- Structures expérimentales de la ferroportine

La cristallisation d'un homologue bactérien de la ferroportine en 2015 a marqué un véritable tournant dans l'appréhension de l'organisation structurale du transporteur humain en membrane plasmique (Taniguchi *et al*, 2015). Identifié chez *Bdellovibrio bacteriovorus* et nommé Bd2019 ou BbFpn, le transporteur bactérien présente 24 % d'identité de séquence et 40 % de similarité avec la protéine humaine (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2015; Taniguchi *et al*, 2015).

BbFpn a été cristallisée dans deux conformations extrêmes « inward- » (PDB 5AYO ; résolution 3,30 Å) et « outward-facing » (PDB 5AYN ; résolution 2,20 Å / PDB 5AYM ; résolution 3,00 Å). Les structures capturées présentaient 12 hélices transmembranaires réparties en deux lobes pseudo-symétriques N et C-terminaux, ce qui acte plus définitivement l'appartenance de la ferroportine à la grande famille des transporteurs MFS.

Conformément à ce qui est habituellement décrit chez les protéines MFS, Taniguchi et collaborateurs ont également identifié des réseaux d'interactions non covalentes extra- et intracytoplasmiques (Solcan *et al*, 2012; Stelzl *et al*, 2014; Fowler *et al*, 2015; Quistgaard *et al*, 2016; Taniguchi *et al*, 2015). Ces réseaux, qui forment les « gates » extra- et intracellulaires, stabilisent les conformations extrêmes « inward- » et « outward-facing » au travers de liaisons intra- et inter-lobes.

L'équipe japonaise a, par ailleurs, décrit un site de liaison du fer au sein du lobe N-terminal. La localisation était conforme aux conclusions de travaux plus anciens menés par Bonaccorsi di Patti et collaborateurs (voir ce qui suit), quoique peu commune au regard de ce qui est habituellement observé chez les protéines MFS (Yan, 2013, 2015; Taniguchi *et al*, 2015; Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014).

Les structures expérimentales de BbFpn ainsi qu'un travail d'alignement des séquences bactérienne et humaine ont permis au Dr. Isabelle Callebaut de construire de nouveaux modèles tridimensionnels de l'exportateur de fer humain dans les deux conformations « inward- » et « outward-facing » (Figure 15) (Ka *et al*, 2018).

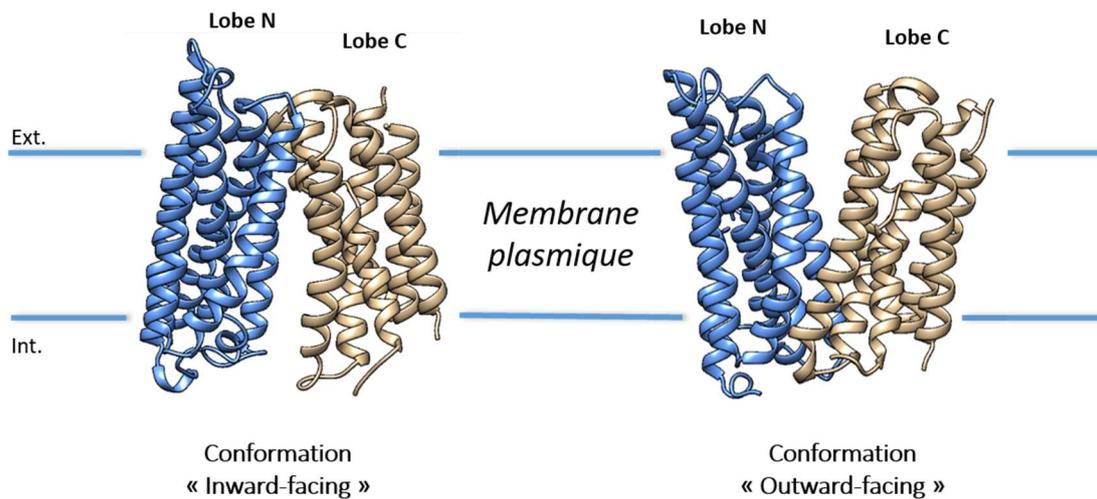


Figure 15 : Modèles tridimensionnels de la ferroportine humaine construits par le Dr. Isabelle Callebaut à partir des structures expérimentales de l'homologue bactérien BbFpn, cristallisé par Taniguchi et collaborateurs en 2015.

Vue latérales des modèles 3D de la ferroportine humaine en conformation « inward- » et « outward-facing » (Taniguchi *et al*, 2015; Ka *et al*, 2018).

Par la suite, Deshpande et collaborateurs ont cristallisé cet homologue bactérien en présence de calcium (PDB 6BTX ; résolution 3,20 Å) (voir ce qui suit) (Deshpande *et al*, 2018).

Ce n'est que très récemment, en Août 2020, que Billesbølle et collaborateurs ont publié les premières structures expérimentales de la ferroportine humaine, obtenues par cryomicroscopie électronique (Billesbølle *et al*, 2020). Ces structures, déterminées en absence (PDB 6W4S) ou en présence de cobalt et d'hepcidine (PDB 6WBV), présentent de bonnes résolutions globales (3,20 et 2,50 Å respectivement). Un manque d'homogénéité peut toutefois limiter la mise en évidence ou l'étude de certaines interactions à une échelle plus locale.

Il est important de souligner que les structures expérimentales publiées par Billesbølle et collaborateurs sont très proches des modèles 3D de la ferroportine humaine construits par le Dr. Isabelle Callebaut à partir des structures expérimentales de BbFpn.

b- Mécanisme d'export du fer de la ferroportine

Bien que l'homologue bactérien ait été cristallisé dans les deux conformations extrêmes « inward- » et « outward-facing », les mécanismes moléculaires permettant à la ferroportine de basculer d'un état conformationnel à l'autre ne sont pas encore clairement élucidés.

Une étape très importante a sans doute été franchie suite à la publication de Deshpande et collaborateurs en 2018 (Deshpande *et al*, 2018). Dans cette publication, les auteurs indiquent que le calcium extracellulaire est un co-facteur indispensable au transport du fer. L'existence d'un co-facteur est classique sans être indispensable chez les protéines MFS. Lorsqu'il est nécessaire, il induit un changement de conformation qui permet au transporteur soit de transporter le substrat et le co-facteur dans la même direction (symporteur), soit de les transporter dans des directions opposées (antiporteur) (Yan, 2015). L'hypothèse retenue par le groupe américain est celle d'une protéine qui fixerait le calcium extracellulaire dans une conformation « outward-facing », pour ensuite basculer

vers une structure « inward-facing » compatible avec la prise en charge du fer intracellulaire. Deux sites distincts sont identifiés pour les deux cations divalents : au sein du lobe N-ter pour le Ca^{2+} , et au sein du lobe C-ter pour le Fe^{2+} .

Cette hypothèse a le mérite de répondre aux interrogations de Taniguchi et collaborateurs quant à la localisation peu classique du site de liaison du substrat au sein du lobe N-ter pour une protéine appartenant à la famille des transporteurs MFS (Taniguchi *et al*, 2015; Yan, 2015). On doit par ailleurs remarquer qu'elle n'annule pas totalement les résultats de différentes équipes qui ont cherché à identifier les acides aminés critiques pour la liaison du fer dans le lobe N-ter, puisque certains de ces acides aminés peuvent tout à fait participer à la coordination du calcium.

La question du site de liaison du fer dans le lobe C-ter et des acides aminés qui le composent est ouverte, avec des résultats très intéressants qui viennent d'être publiés par Billesbølle et collaborateurs (Billesbølle *et al*, 2020).

i. Site de liaison du calcium dans le lobe N-ter

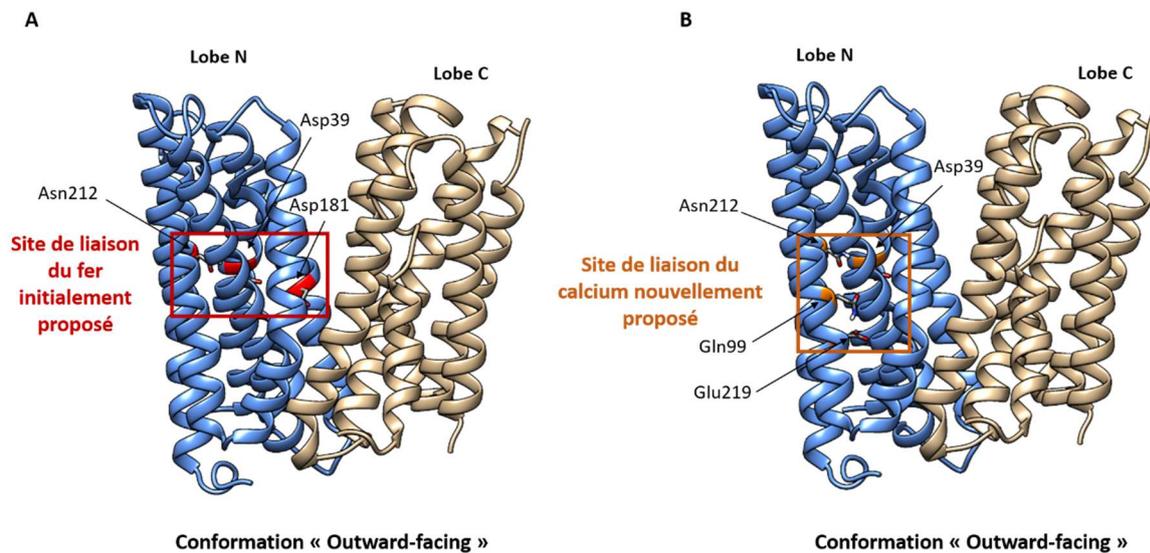
C'est en cherchant à identifier une structure locale enrichie en acides aspartiques et glutamiques ainsi qu'en histidines, que l'équipe de Bonaccorsi di Patti et collaborateurs avaient initialement identifié deux résidus candidats pour la fixation du fer dans le lobe N-ter de la ferroportine (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014). *Via* leurs chaînes latérales chargées négativement (Asp/Glu) ou contenant un noyau imidazole (His), ces acides aminés interviennent, en effet, communément dans les sites de liaison du fer de différentes protéines non héminiques que sont par exemple la transferrine, la lactoferrine, la céruloplasmine ou encore DMT1 (Lindley *et al*, 1997; Baker *et al*, 2003; Ehrnstorfer *et al*, 2014; Dudev & Nikolova, 2016). Les conclusions de l'équipe italienne étaient en partie basées sur des expériences d'accumulation intracellulaire de ^{55}Fe , réalisées à partir de cellules HEK293T surexprimant la ferroportine humaine de type sauvage ou mutée. Dans ce modèle, les mutations p.Asp39Ala et p.Asp181Val réduisaient fortement la capacité de la ferroportine à exporter le fer (Figure 16A).

L'année suivante, Taniguchi et collaborateurs ont cristallisé l'homologue bactérien de la ferroportine (BbFpn) en présence de Fe^{2+} . Une intensité de signal différente est apparue au centre du lobe N-terminal semblant confirmer l'existence d'un site de liaison du substrat impliquant les résidus Thr20, Asp24, Asn196, Ser199 et Phe200 (correspondant respectivement aux résidus Ser35, Asp39, Asn212, Ser215 et Met216 chez l'Homme). En mesurant l'activité de transport et l'affinité de liaison pour le fer et le cobalt (un autre substrat de la ferroportine) du transporteur de type sauvage ou muté, Taniguchi et collaborateurs ont insisté, une fois de plus, sur l'importance du résidu Asp24 (Asp39 chez l'Homme) pour la fonction d'export du fer de la ferroportine. Le rôle critique de l'asparagine 196 (Asn212 chez l'Homme) a également été rapporté (Figure 16A) (Taniguchi *et al*, 2015).

La structure expérimentale de BbFpn obtenue par Deshpande et collaborateurs en présence de CaCl_2 (PDB 6BTX) suggère que le calcium vient se loger au sein du lobe N-terminal, au niveau d'un site de liaison formé par les résidus Asp24, Gln84, Asn196 et Glu203. L'importance de ces acides aminés, extrêmement conservés entre espèces et correspondant respectivement chez l'Homme aux résidus Asp39, Gln99, Asn212 et Glu219, a été étudiée *in vitro*. Les résultats d'expériences de titration calorimétrique isotherme (à partir de calcium et de protéines bactérienne et murine de type sauvages ou mutées) et d'export de fer (à partir d'oocytes de xénopes exprimant la ferroportine humaine de type sauvage ou mutée) confortent l'hypothèse d'une liaison importante des 4 résidus identifiés avec

le calcium et d'une étape indispensable à la prise en charge et à l'export du fer intracellulaire (Deshpande *et al*, 2018).

On remarque que le site de liaison du calcium ne recouvre que partiellement celui qui avait été initialement proposé pour le fer (Figure 16B) (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014; Taniguchi *et al*, 2015; Deshpande *et al*, 2018). De nouveaux travaux seront nécessaires pour préciser le mode de coordination du calcium par la ferroportine et identifier de nouveaux acides aminés critiques.



ii. Site de liaison du fer dans le lobe C-ter

Leurs travaux attribuant le site de liaison localisé au sein du lobe N-terminal à la coordination du calcium, Deshpande et collaborateurs ont reposé la question du positionnement du site de liaison du métal (Deshpande *et al*, 2018).

L'observation de la structure expérimentale de l'homologue bactérien les a conduits à s'intéresser tout particulièrement à l'hélice transmembranaire 7 du lobe C-terminal. Cette hélice possède une conformation spécifique avec un segment « déroulé » qui la divise en deux parties bien distinctes : TM7a et TM7b. Au contact des hélices 8, 10 et 11, ce segment « déroulé » pourrait former une « poche » susceptible d'accueillir le fer. Par ailleurs, les auteurs ont observé, en comparant les conformations « outward- » et « inward-facing » de BbFpn, que la partie TM7b fermait partiellement cette poche en se déplaçant latéralement ce qui participerait à la séquestration du substrat pendant le basculement conformationnel « inward- »/« outward-facing ». Ce type de configuration a été

proposé pour les sites de liaison du substrat de différentes autres protéines MFS, comme le transporteur de fructose GLUT5 et le transporteur de xylose Xyle (Nomura *et al*, 2015).

Dans leur article, Deshpande et collaborateurs identifient l'acide aspartique 325 comme étant un résidu clé de la coordination du fer. Ces auteurs avaient initialement établi un lien entre ce résidu et l'histidine 261 qui aurait permis la coordination directe du cation divalent Ni^{2+} sur une structure nouvellement cristallisée de l'homologue bactérien BbFpn. Leur hypothèse est notamment confortée par des expériences de relargage de ^{55}Fe montrant que les mutations p.Asp325Ala, p.Asp325His, p.Asp325Asn affectent significativement la capacité de la ferroportine humaine à exporter le fer contenu dans des oocytes de xénopes (Deshpande *et al*, 2018).

Il est important de souligner ici que Billesbølle et collaborateurs, qui viennent tout juste de publier les premières structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine, confirment l'existence d'un site de liaison du fer dans le lobe C-terminal. En plus de Asp325, ils identifient les résidus Asp504 et His507 comme étant des acides aminés critiques pour la coordination du fer (Figure 17) (Billesbølle *et al*, 2020).

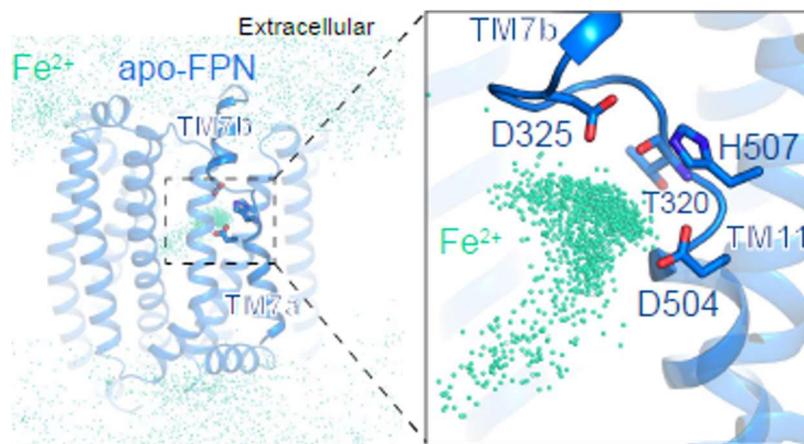


Figure 17 : Site de liaison du fer identifié par Billesbølle et collaborateurs dans le lobe C-terminal de la ferroportine par des simulations de dynamique moléculaire (Billesbølle *et al*, 2020).

Ces simulations ont été réalisées en présence de Fe^{2+} à partir de la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine déterminée par cryomicroscopie électronique en absence d'hepcidine et de cobalt (PDB 6W4S).

iii. Modèle du cycle de transport du fer par la ferroportine selon Deshpande et collaborateurs

Le modèle du cycle de transport du fer par la ferroportine finalement proposé par Deshpande et collaborateurs est le suivant (Deshpande *et al*, 2018) :

- (i) Le calcium extracellulaire viendrait tout d'abord se fixer au niveau de son site de liaison, situé au sein du lobe N-terminal, lorsque la ferroportine se trouverait en conformation « outward-facing » (conformation de base) (Figure 18A).
- (ii) La fixation du cation divalent entraînerait le basculement de la protéine en conformation « inward-facing ». Le fer viendrait alors se loger dans la poche, formée notamment par l'acide aspartique 325 au niveau du TM7 du lobe C-terminal (Figure 18B).

- (iii) La ferroportine rebasculerait ensuite dans sa conformation initiale « outward-facing », permettant ainsi la libération du fer dans le compartiment sanguin (Figure 18C).

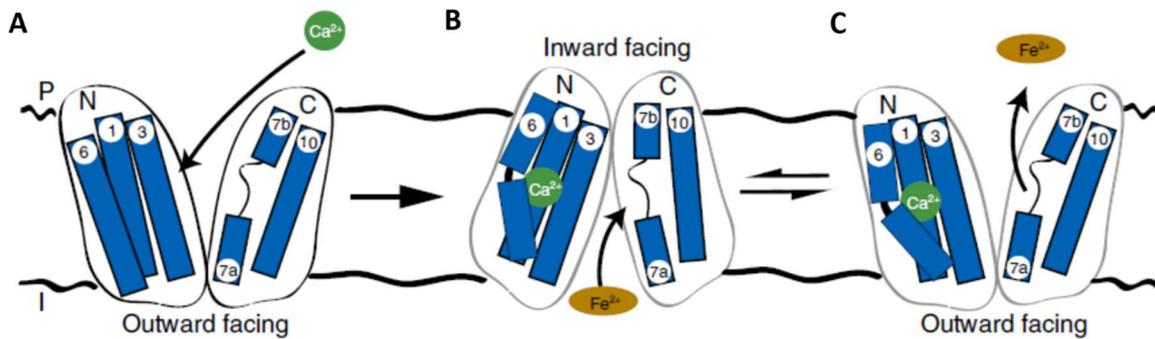


Figure 18 : Modèle du mécanisme d'export du fer de la ferroportine proposé par Deshpande et collaborateurs en 2018 (Deshpande *et al*, 2018).

(A) Le calcium extracellulaire se fixe au niveau du lobe N-terminal de la ferroportine en conformation « outward-facing ». (B) La protéine bascule alors en conformation « inward-facing » et le fer intracellulaire vient se fixer au niveau du lobe C-terminal. (C) La ferroportine va à nouveau subir un changement conformationnel pour revenir à sa conformation « outward-facing » initiale afin d'expulser le fer dans le compartiment sanguin.

Le rôle du calcium dans le mécanisme d'export du fer nécessite d'être confirmé par d'autres équipes. En ce sens, nous pouvons déjà remarquer que, bien qu'ils n'aient pas observé de Ca^{2+} au niveau du lobe N-terminal de la ferroportine humaine par cryomicroscopie électronique, Billesbølle et collaborateurs rapportent que la présence de calcium augmente la capacité de la ferroportine à exporter le fer d'environ 40 % (Billesbølle *et al*, 2020).

Au-delà du modèle ici présenté, de nombreuses questions demeurent quant à la façon dont le fer et son co-facteur transitent vers leurs sites de coordination respectifs et quelles conséquences leurs fixations ont sur le repositionnement de certaines hélices et les changements de conformations du transporteur. Une interrogation subsiste également sur le devenir du calcium fixé par la ferroportine, puisque celui-ci ne semble pas être libéré lors de l'ouverture du transporteur vers le cytoplasme (Deshpande *et al*, 2018) ; comme nous pourrions pourtant l'attendre pour un antiporteur. L'importance des « gates » extra- et intracellulaires dans la stabilité des conformations « inward- » et « outward-facing » ainsi que dans la dynamique du transport du fer mérite également une attention particulière (voir ce qui suit).

iv. Les « gating-residues »

1. Implication des « gating-residues » dans le cycle de transport des protéines MFS

Les premières structures expérimentales de transporteurs MFS ont été publiées en 2003. Depuis, leur nombre n'a cessé d'augmenter, permettant une comparaison plus aboutie de différentes protéines

dans différentes conformations (Abramson *et al*, 2003; Huang *et al*, 2003; Quistgaard *et al*, 2016). Le modèle général de transport des protéines MFS, basé sur un accès alternatif au substrat et deux conformations extrêmes « inward- » et « outward-facing », comme proposé par Oleg Jardetzky en 1966, a ainsi peu à peu évolué (Jardetzky, 1966).

Le modèle aujourd'hui retenu est celui du « clamp-and-switch ». Dans ce modèle, la fixation du substrat provoque la flexion de certaines hélices transmembranaires ce qui a pour effet d'isoler le substrat du milieu intra- ou extracellulaire. C'est le « clamping ». La protéine bascule ensuite vers la conformation extrême inverse afin de permettre la libération du substrat de l'autre côté de la membrane. Il s'agit du « switching ». Les mêmes étapes permettent au transporteur de se repositionner dans sa conformation basale (Figure 19) (Quistgaard *et al*, 2016). On peut remarquer que le premier changement de conformation peut dépendre d'un co-facteur et le second du substrat.

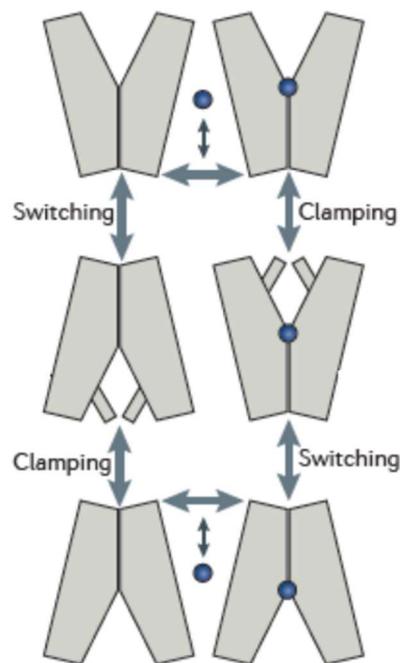


Figure 19 : Modèle du « clamp-and-switch » (Quistgaard *et al*, 2016).

La fixation du substrat entraîne un déplacement de plusieurs hélices transmembranaires qui vont fermer l'accès au site de liaison du substrat (étape de « clamping »). S'ensuivra un basculement complet des deux lobes N et C-terminaux dans la conformation extrême inverse (étape de « switching ») ce qui conduira à la libération du substrat de l'autre côté de la membrane.

Les changements conformationnels successifs entre les deux conformations extrêmes « inward- » et « outward-facing » sont finement orchestrés par des réseaux d'interactions intra- et inter-lobes. Des liaisons non covalentes (ponts salins, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) s'établissent et se défont tout au long du cycle de transport entre des acides aminés particuliers appelés « gating-residues ». Ces réseaux d'interactions, qui se forment aux extrémités intra- et extracellulaires des lobes N et C-terminaux, constituent respectivement les « gates » intra- et extracellulaires. Ces dernières isolent tour à tour le site de liaison du substrat du cytoplasme ou du milieu extracellulaire et évoluent

pour favoriser les changements de conformations (Solcan *et al*, 2012; Stelzl *et al*, 2014; Fowler *et al*, 2015; Quistgaard *et al*, 2016).

L'importance des « gating-residues » pour la fonction des transporteurs MFS a notamment été démontrée chez le transporteur PepT_{St} de *Streptococcus thermophilus*. En mutant différents acides aminés polaires en alanine, Solcan et collaborateurs ont montré que l'établissement de ponts salins entre différentes hélices des lobes N et C-terminaux était indispensable pour stabiliser le transporteur en conformation « inward-facing », les mutations ayant pour conséquence d'empêcher ou de réduire le transport du substrat (Solcan *et al*, 2012).

2. « Gates » intra- et extracellulaire de BbFpn

Les travaux de Taniguchi et collaborateurs ont permis d'obtenir des représentations 3D de l'homologue bactérien BbFpn à l'échelle atomique. Cela a permis aux auteurs d'identifier des résidus susceptibles de participer à l'établissement des « gates » intra- et extracellulaires au niveau de la protéine bactérienne et, par homologie, au niveau de la protéine humaine (Taniguchi *et al*, 2015).

L'analyse de la structure expérimentale de BbFpn en conformation « inward-facing » a révélé que la « gate » extracellulaire repose sur des interactions hydrophobes entre les résidus Phe29, Phe33, Leu36 et Leu 43 du lobe N-ter et les résidus Val263, Ala267, Ile280 et Phe402 du lobe C-ter. Seuls les résidus Phe29, Leu43 et Phe402 sont hautement conservés entre espèces. Ces derniers correspondent respectivement chez l'Homme aux acides aminés Phe44, Leu58 et Phe520 (Figure 20).

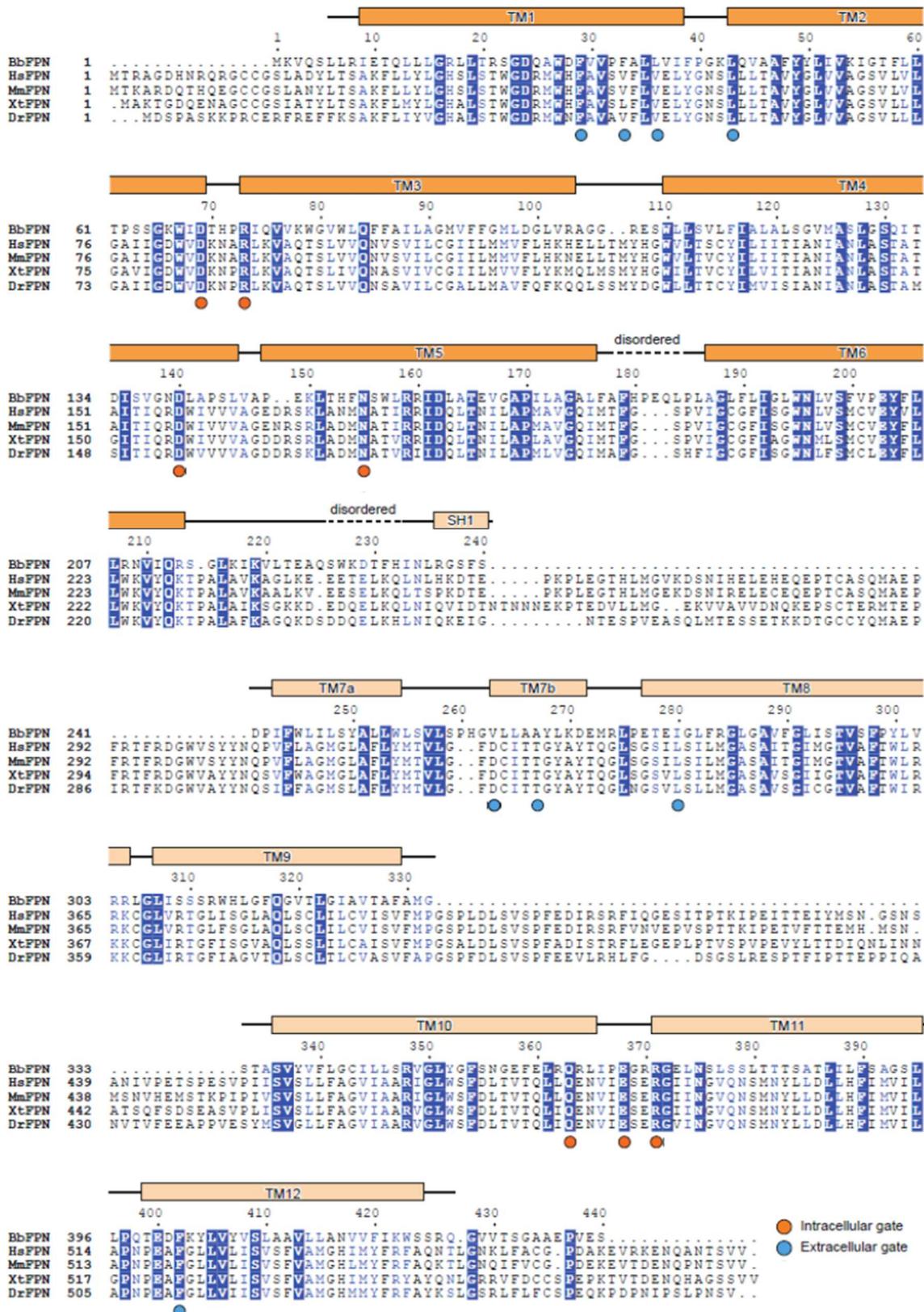


Figure 20 : Alignement de la séquence protéique de BbFpn avec celles de différentes ferroportines (FPN) eucaryotes (Taniguchi *et al*, 2015).

HsFpn (*Homo sapiens*), MmFpn (*Mus musculus*), XtFpn (*Xenopus tropicalis*) et DrFpn (*Danio rerio*).

La « gate » intracellulaire, quant à elle, comprend deux sous-réseaux d'interactions qui stabilisent BbFpn en conformation « outward-facing » *via* des ponts salins et des liaisons hydrogènes (Figure 21). Le premier réseau s'établit entre les hélices transmembranaires 2, 3, 4 et 11. L'Asp140 forme des ponts salins avec l'Arg371 et l'Arg73, qui, elle-même interagit avec Glu368 également par l'intermédiaire d'un pont salin. L'Asp69, quant à elle, établit une liaison hydrogène avec Glu373. La liaison hydrogène entre les résidus Asn155 et Gln363 constitue un second réseau d'interaction entre les hélices transmembranaires 5 et 10. On peut remarquer que tous les résidus identifiés par l'équipe japonaise comme participant à la « gate » intracellulaire de la protéine bactérienne, à l'exception de Glu373, sont hautement conservés entre espèces. Ces derniers correspondent chez l'Homme, respectivement aux résidus Asp157, Arg489, Arg88, Glu486, Asp84, Asn174 et Gln481 (Figures 20 et 21).

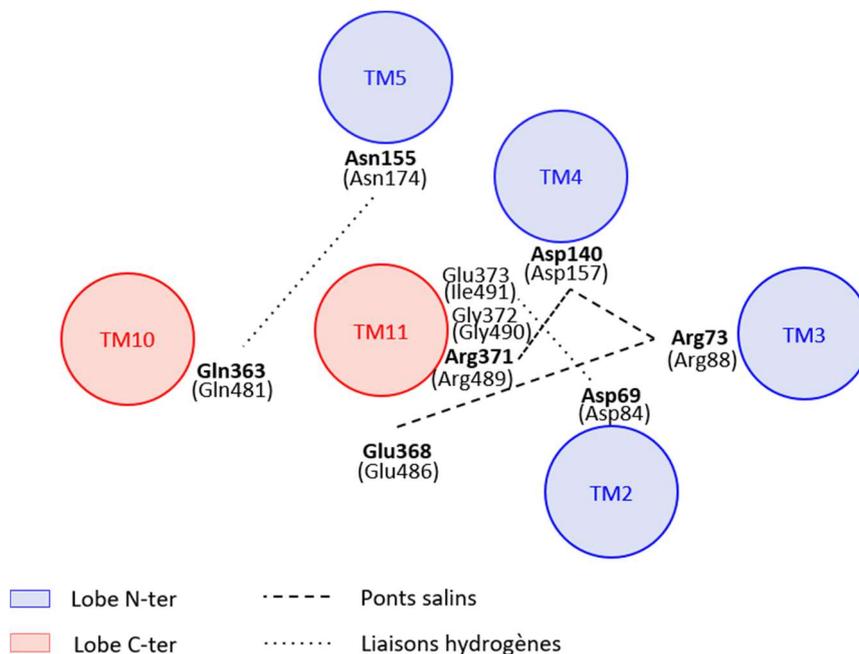


Figure 21 : Réseaux d'interactions intra- et inter-lobes formant la « gate » intracellulaire de l'homologue bactérien BbFpn; décrits par Taniguchi et collaborateurs en 2015 (d'après Guellec *et al*, 2019).

Les résidus bactériens apparaissent en gras, les résidus orthologues humains entre parenthèses (Taniguchi *et al*, 2015).

3. Première étude structure/fonction de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine

En 2005, le laboratoire de génétique moléculaire du CHRU de Brest a identifié la variation faux-sens p.Arg178Gln chez un patient présentant un phénotype évocateur d'hémochromatose de type 4A ou maladie de la ferroportine. En collaborant avec différentes équipes au niveau européen, le laboratoire est parvenu à identifier un total de 22 patients porteurs de la variation p.Arg178Gln et à conforter l'hypothèse d'une surcharge en fer associée à une perte de fonction de la ferroportine. Les tests fonctionnels alors réalisés par l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse ont révélé un défaut d'export du fer sans diminution de la présence de la protéine mutée à la surface des cellules. Le Dr. Isabelle Callebaut a alors été sollicitée afin de comprendre l'importance structurale et/ou fonctionnelle de

l'arginine 178 et d'évaluer l'impact de sa substitution en glutamine. La cristallisation de l'homologue bactérien de la ferroportine a permis de construire un modèle de la ferroportine humaine en conformation « outward-facing » et de poser l'hypothèse de la perte d'un pont salin entre Arg178 (TM5) et Asp473 (TM10) (Figure 22).

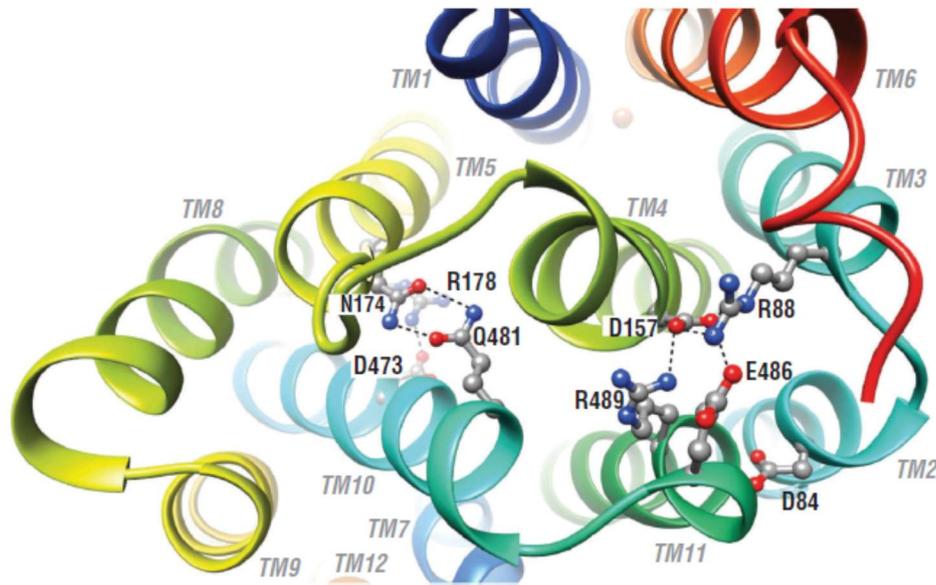


Figure 22 : Représentation en ruban du modèle 3D de la ferroportine humaine construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « outward-facing », avec les différents réseaux d'interactions qui formeraient la « gate » intracellulaire.

Les deux réseaux d'interaction suggérés par Taniguchi et collaborateurs entre les hélices transmembranaires 2, 3, 4, 11 et 5 et 10 ainsi que le pont salin entre Arg178 (TM5) et Asp473 (TM10) révélé par l'équipe sont représentés (Taniguchi *et al*, 2015; Ka *et al*, 2018).

Plus de 12 ans auront été nécessaires pour caractériser le variant faux-sens p.Arg178Gln sur le plan clinique et fonctionnel. Ce travail a permis de proposer un nouveau mécanisme physiopathologique basé sur l'importance des « gating-residues » (Ka *et al*, 2018; Vlasveld & Swinkels, 2018). Il a surtout été à l'origine de travaux plus aboutis, auxquels j'ai participé et qui permettent aujourd'hui d'avoir une vision très fine des réseaux d'interactions qui composent la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine. Des différences importantes ont été observées par rapport aux propositions initialement formulées par Taniguchi et collaborateurs sur la base de la structure de l'homologue bactérien de la ferroportine (voir résultats) (Taniguchi *et al*, 2015; Guellec *et al*, 2019).

c- Régulation post-traductionnelle de la ferroportine par l'hepcidine

Bien que des étapes clés intervenant dans la régulation post-traductionnelle de la ferroportine par l'hepcidine aient été identifiées (liaison de l'hepcidine à la ferroportine membranaire, ubiquitination du transporteur, internalisation et dégradation de la ferroportine), certaines questions restent posées.

L'implication du lobe N-terminal dans le mécanisme d'internalisation et de dégradation du transporteur en présence d'hepcidine était, en particulier et jusque très récemment, assez mal comprise. On remarque que le lobe N-ter concentre des variations qui ont été associées à des résistances partielles de la ferroportine à l'hepcidine (Le Tertre *et al*, 2017). C'est notamment le cas

des variations faux-sens p.Asn144Thr et p.Asn144Asp qui avaient initialement été évaluées comme n'empêchant pas la liaison de l'hepcidine à la ferroportine mais qui avaient pourtant été associées à une moindre internalisation du transporteur en présence du peptide régulateur (Drakesmith *et al*, 2005; Fernandes *et al*, 2009). Une première hypothèse a consisté à dire que le lobe N-terminal de la ferroportine, à défaut d'être directement impliqué dans la fixation de l'hepcidine, prenait part à des changements conformationnels du transporteur lors de la fixation du peptide régulateur. Ces remaniements structuraux auraient permis la libération de la grande boucle intracellulaire (IC3) contenant les lysines sensibles à l'action d'ubiquitines ligases, dont la lysine 240 (Fernandes *et al*, 2009; Taniguchi *et al*, 2015; Ross *et al*, 2012; Qiao *et al*, 2012) .

Fin 2018, Aschemeyer et collaborateurs ont publié les résultats d'une étude structurale et fonctionnelle portant sur 11 variations faux-sens, précédemment identifiées chez des patients atteints d'hémochromatose de type 4B (Aschemeyer *et al*, 2018). Les auteurs suggèrent que les acides aminés Tyr64, His507, Ser71, Gly204, Asp270 et Ser338 sont impliqués dans des changements conformationnels de la ferroportine à la suite de la fixation de l'hepcidine, changements qui, de part la localisation des différents résidus, impliqueraient à la fois le lobe N-ter et le lobe C-ter. Ils indiquent par ailleurs que les résidus Cys326, Tyr501, Asp504, Asn144 et Val72, localisés sur les deux lobes du transporteur, pourraient intervenir directement dans la liaison hepcidine/ferroportine.

Ces différentes observations, qui sont en partie corroborées par les résultats très récents de Billesbølle et collaborateurs (Billesbølle *et al*, 2020), mettent en lumière une coopération fonctionnelle entre les deux lobes de la ferroportine. L'hepcidine viendrait se loger à l'interface des hélices 2, 4, 7 et 11, en établissant toutefois des interactions plus nombreuses avec le lobe C-ter (Figure 23A). Cette fixation provoquerait des changements de conformation à l'échelle de l'ensemble de la protéine (Figure 23B).

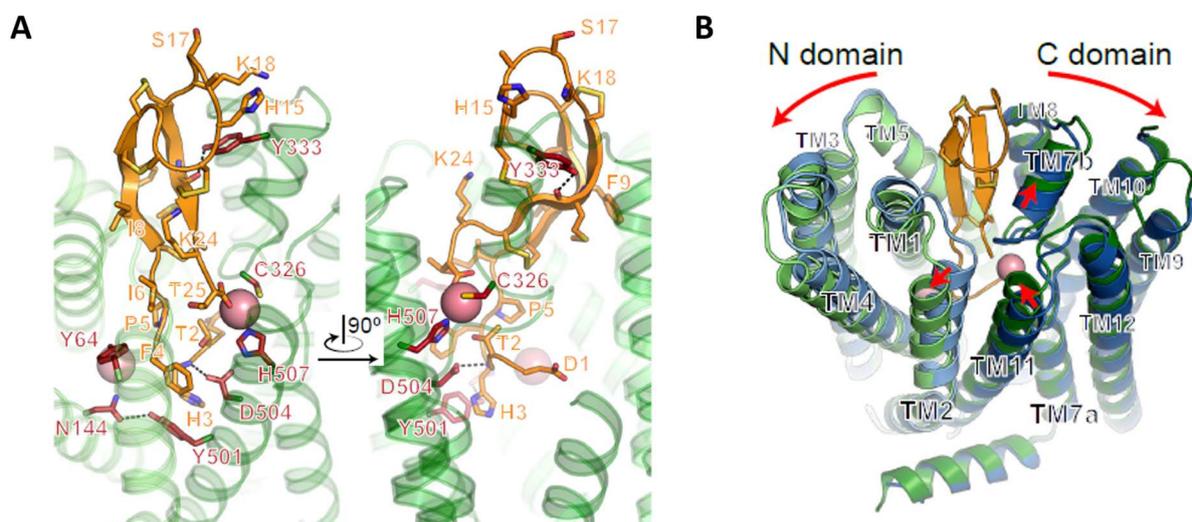


Figure 23 : Fixation de l'hepcidine et changements conformationnels de la ferroportine (d'après Billesbølle *et al*, 2020).

(A) Représentation en ruban du complexe ferroportine/hepcidine en présence de cobalt (un autre substrat du transporteur) dont la structure a été déterminée par cryomicroscopie électronique. La ferroportine apparaît en vert, l'hepcidine en jaune et le cobalt en rose. (B) Superposition des représentations en ruban des structures de la ferroportine seule (en bleu) et de la ferroportine (en vert) en présence d'hepcidine (en jaune) et de cobalt (en rose) qui ont été déterminées par cryomicroscopie électronique. Les changements conformationnels du transporteur, induits par la fixation du peptide régulateur, sont matérialisés par des flèches rouges.

En plus d'apporter une meilleure vision de l'interaction hepcidine/ferroportine et des remaniements structuraux qui s'ensuivent, les travaux de cryomicroscopie électronique, menés par Billesbølle et collaborateurs, ont révélé que les deux sites de coordination, situés dans les lobes N et C-terminaux du transporteur, liaient le métal (correspondant dans ce cas à du cobalt). Des simulations de dynamique moléculaire, réalisées en présence de Fe^{2+} , les ont toutefois conduits à observer que le fer se logeait principalement dans le lobe C-terminal, au niveau des résidus Asp325, Asp504 et His507, et que celui-ci n'interagissait qu'occasionnellement avec l'Asp39 du lobe N-terminal.

Les auteurs ont mis en évidence une liaison plus importante de l'hepcidine à la ferroportine en présence de fer. Différentes interactions, impliquant notamment les résidus Cys326, His507 et Asp325 du lobe C-terminal, ont été observées entre la ferroportine, le métal (cobalt) et l'hepcidine sur la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, déterminée par cryomicroscopie électronique. A l'issue de leurs travaux, les auteurs ont proposé un nouveau modèle de régulation de la ferroportine par l'hepcidine : l'affinité plus forte de l'hepcidine pour la ferroportine en présence de fer permettrait au peptide régulateur de cibler préférentiellement les ferroportines « actives », chargées en fer (Billesbølle *et al*, 2020).

Objectifs

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'unité mixte de recherche 1078 (Inserm, Université de Bretagne Occidentale, Etablissement Français du Sang) dans le groupe « Maladies Héréditaires du Métabolisme du Fer et Groupes Sanguins » co-dirigé par le Pr. Gérard Le Gac et le Dr. Yann Fichou. Je me suis intéressée aux bases moléculaires de l'hémochromatose de type 4 et au mécanisme d'export du fer intracellulaire chez l'Homme en réalisant différentes expériences de génétique fonctionnelle.

Une partie de mes travaux se sont inscrits dans la continuité de la collaboration mise en place par le Pr. Gérard Le Gac et le Dr. Isabelle Callebaut (UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, Sorbonne Université, Paris). Cette collaboration répond à un double objectif : i) caractériser sur le plan clinique et fonctionnel un ensemble de variants faux-sens rares ou privés associés à l'hémochromatose de type 4, et ii) étudier le mécanisme d'export du fer et la régulation de la ferroportine par l'hepcidine au travers d'une approche combinant analyses structurales par modélisations et tests fonctionnels *in vitro*. Les questions posées se situent à l'interface d'une recherche clinique et d'une recherche plus fondamentale. C'est de cette façon que les équipes brestoïse et parisienne ont récemment pu proposer un nouveau mécanisme physiopathologique en démontrant que la substitution p.Arg178Gln empêchait l'établissement d'un pont salin entre l'arginine 178 et l'acide aspartique 473, avec pour conséquences de déstabiliser la ferroportine dans la conformation « outward-facing » et de réduire l'export du fer sans limiter la présence de la protéine à la membrane plasmique (Ka *et al*, 2018).

Une partie de mon travail de thèse a ainsi consisté à identifier d'autres acides aminés qui forment la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine au travers de liaisons non covalentes présentes du côté cytoplasmique. Un échange entre données théoriques, issues de l'observation des structures et de leur dynamique, et données expérimentales a permis de mettre en lumière de probables changements structuraux qui précèderaient le basculement vers les conformations « occluded » et « inward-facing » et qui joueraient probablement un rôle essentiel dans le mécanisme de transport du fer intracellulaire. Cela a également permis de conforter l'hypothèse selon laquelle les mutations de « gating-residues » interviennent de façon récurrente dans la survenue des surcharges en fer observées chez les patients atteints d'une hémochromatose de type 4A, ou maladie de la ferroportine (articles 1, et article 2 en cours de rédaction).

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à étudier les bases moléculaires d'un mécanisme de résistance partielle à l'hepcidine attribué à des variations faux-sens localisées dans le lobe N-ter de la ferroportine. J'ai réalisé ces travaux en collaboration avec le Dr. Kévin Uguen, que j'ai co-encadré durant son Master 2 avant qu'il décide de rejoindre notre groupe pour réaliser une thèse de sciences. En focalisant notre attention sur les variants p.Gly204Ser et p.Ser47Phe, nous confirmons certains des résultats obtenus par d'autres groupes, notamment ceux publiés par Aschemeyer et collaborateurs en 2018. Mais nous avançons également l'idée de mutations ambivalentes qui conduisent à une perte de la fonction d'export du fer tout en limitant la capacité de l'hepcidine à provoquer l'internalisation puis la dégradation du transporteur (article 3, et article 4 en cours d'écriture).

La troisième partie de mon travail de thèse est liée à des échanges au sein de notre groupe de recherche, en lien avec le Dr. Isabelle Callebaut, au sujet de différentes publications. J'ai tout d'abord été intriguée par certains des résultats présentés par Deshpande et collaborateurs au sujet du rôle attribué à l'acide aspartique 325 au niveau du site de liaison du fer nouvellement positionné dans le lobe C-terminal de la ferroportine humaine. L'acide aspartique est l'un des trois acides aminés (avec l'acide glutamique et l'histidine) qui sont régulièrement identifiés au sein des sites de liaison du fer de différentes protéines. Je n'ai néanmoins pas été convaincue des résultats présentés par l'équipe américaine suggérant que les variations p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn conduisent toutes les trois à un défaut d'export du fer sans modification de la présence des trois protéines mutées à la

membrane plasmique en comparaison de la protéine de type sauvage. J'ai souhaité répliquer ces résultats sur la base des méthodologies développées dans notre laboratoire. J'apporte des résultats contradictoires. Ces résultats sont encore insuffisants pour être valorisés, mais ils posent les bases d'une exploration plus aboutie du site de liaison du fer par nos deux équipes. La seconde interrogation a porté sur un possible effet des mutations faux-sens associées à l'hémochromatose de type 4 sur l'épissage de l'ARN pré-messager du gène *SLC40A1*. Les variations exoniques sont de plus en plus associées à des anomalies d'épissage et, pour certaines, à des effets au niveau de l'ARN et de la protéine. Compte-tenu de l'hétérogénéité phénotypique observée dans l'hémochromatose de type 4, et de l'expertise développée dans le groupe « Maladies Héritaires du Métabolisme du Fer et Groupes Sanguins » sur l'analyse *in vitro* des variants d'épissage, j'ai engagé une étude systématique de l'effet des variations faux-sens du gène *SLC40A1* associées à un phénotype de surcharge en fer. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 5.

Enfin, au cours de ma thèse, il m'a été demandé de participer à la mise en place d'un nouveau modèle d'étude *in vitro* de la ferroportine. A terme, l'objectif est de pouvoir étudier les protéines ferroportines de type sauvage et mutées dans un environnement physiologique et sans surexpression. Le modèle ciblé est le macrophage de type M2 (non pro-inflammatoire et capable d'érythro-endocytose) qui peut être directement généré à partir de monocytes isolés de patients. Au moment de débiter ma thèse, l'accès à des monocytes de patients ou de donneurs sains n'avait pas encore été organisé. Le protocole pour différencier les monocytes en macrophages naïfs et les polariser en macrophages de type M2 n'était pas validé. Surtout, les bases expérimentales permettant de détecter la protéine endogène, de quantifier sa capacité à exporter le fer et d'apprécier sa sensibilité à l'hepcidine n'avaient pas été consolidées, voire établies. Pour débiter le projet nous avons opté pour la lignée monocyttaire humaine THP-1 et la création de quelques mutants par édition génique de type CRISPR-Cas9. Cette partie de ma thèse a enrichie mon expérience à la pailasse mais elle a aussi été très difficile à faire progresser. Le travail méthodologique réalisé et les quelques résultats obtenus sont présentés à la fin de la partie « Résultats ».

Résultats

I- Organisation structurale et fonctionnelle de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine

Après avoir associé la mutation p.Arg178Gln à un nouveau mécanisme physiopathologique de l'hémochromatose de type 4, les équipes UMR1078 et UMR7590 ont engagé une étude approfondie de l'organisation structurale et fonctionnelle de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine. Ces travaux ont donné lieu à deux nouveaux articles (Guellec *et al*, 2019)(Le Tertre *et al*, 2020 ; en cours de rédaction).

a- Article “Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A “

Dans ce premier article, l'objectif principal était de comparer le modèle 3D de la ferroportine humaine, en conformation « outward-facing », à la structure expérimentale de l'homologue bactérien, publiée par Taniguchi et collaborateurs (Taniguchi *et al*, 2015), afin d'identifier des résidus participants à la formation et à la stabilisation de la « gate » intracellulaire chez l'Homme (Guellec *et al*, 2019).

Des études *in vitro*, combinées à l'analyse de la structure statique du modèle 3D de la ferroportine humaine, nous ont permis de vérifier l'implication des résidus Asp84, Arg88, Asp157, Asn174 et Arg489 dans l'établissement de ponts salins et de liaisons hydrogènes. L'importance des résidus Gln481 et Glu486 n'a en revanche pas été confirmée. Des simulations de dynamique moléculaire, réalisées sur un temps court (100 ns), nous ont permis d'expliquer ces différents résultats en révélant le caractère stable ou transitoire (voire très transitoire) des interactions formées par ces différents acides aminés. Par ailleurs, ces simulations ont mis en lumière de nouvelles interactions impliquant parfois des résidus spécifiques de la ferroportine humaine. C'est le cas du résidu Gln478 dont l'importance a été confirmée *in vitro*.

Cette première étude structure/fonction, qui nous a permis de dépasser les propositions initialement formulées par Taniguchi et collaborateurs, souligne l'importance des simulations de dynamique moléculaire par rapport à la seule analyse du modèle 3D de la ferroportine humaine en mode statique. D'autre part, l'identification de 10 nouveaux « gating-residues » (Asp81, Asp84, Lys85, Arg88, Asp157, Asn174, Gln478, Arg489, Gly490 et Ile491), nous a conduit à observer que 7 d'entre eux (Asp84, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Arg489, et Gly490) avaient été associés à 13 mutations décrites chez des patients présentant un phénotype évocateur de l'hémochromatose de type 4A. Ce constat confirme ainsi de manière plus définitive l'importance de ce nouveau mécanisme physiopathologique dans la maladie (Ka *et al*, 2018; Vlasveld & Swinkels, 2018).

N.B. Dans ce projet, j'ai participé aux analyses expérimentales en soutien du travail réalisé en grande partie par Julie Guellec, également doctorante dans l'équipe.

Cet article, présenté ci-dessous, a été publié dans le « FASEB Journal » en novembre 2019 (Guellec *et al*, 2019).

Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A

Julie Guellec,^{*,†} Ahmad Elbahnsi,[‡] Marlène Le Tertre,^{*,§} Kévin Uguen,^{*,§} Isabelle Gourlaouen,^{*} Claude Férec,^{*,†,§} Chandran Ka,^{*,§,¶} Isabelle Callebaut,^{‡,1} and Gérald Le Gac^{*,§,¶,1,2}

*INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR) 1078, Etablissement Français du Sang–Bretagne, Institut Brestois Santé-Agro-Matière, Université Bretagne Loire–Université de Brest, Brest, France; †Association Gaetan Saleun, Brest, France; ‡Muséum National d’Histoire Naturelle, UMR Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Sorbonne Université, Paris, France; §Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) de Brest, Hôpital Morvan, Brest, France; and ¶Laboratory of Excellence Laboratory of Excellence (GR-Ex), Paris, France

ABSTRACT: Ferroportin 1 (FPN1) is a major facilitator superfamily transporter that is essential for proper maintenance of human iron homeostasis at the systemic and cellular level. FPN1 dysfunction leads to the progressive accumulation of iron in reticuloendothelial cells, causing hemochromatosis type 4A (or ferroportin disease), an autosomal dominant disorder that displays large phenotypic heterogeneity. Although crystal structures have unveiled the outward- and inward-facing conformations of the bacterial homolog *Bdellovibrio bacteriovorus* Fpn (or Bd2019) and calcium has recently been identified as an essential cofactor, our molecular understanding of the iron transport mechanism remains incomplete. Here, we used a combination of molecular modeling, molecular dynamics simulations, and Ala site-directed mutagenesis, followed by complementary *in vitro* functional analyses, to explore the structural architecture of the human FPN1 intracellular gate. We reveal an interdomain network that involves 5 key amino acids and is likely very important for stability of the iron exporter facing the extracellular milieu. We also identify inter- and intradomain interactions that rely on the 2 Asp84 and Asn174 critical residues and do not exist in the bacterial homolog. These interactions are thought to play an important role in the modulation of conformational changes during the transport cycle. We interpret these results in the context of hemochromatosis type 4A, reinforcing the idea that different categories of loss-of-function mutations exist. Our findings provide an unprecedented view of the human FPN1 outward-facing structure and the particular function of the so-called “gating residues” in the mechanism of iron export.—Guellec, J., Elbahnsi, A., Le Tertre, M., Uguen, K., Gourlaouen, I., Férec, C., Ka, C., Callebaut, I., Le Gac, G. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB J.* 33, 000–000 (2019). www.fasebj.org

KEY WORDS: MFS transporters • gating residues • alternating access mechanism • molecular dynamics simulations • iron metabolism

Ferroportin 1 (FPN1, also referred to as SLC40A1; Uniprot Q9NP59) is the only known iron exporter in mammals and is considered to be a key player in both cellular and systemic iron homeostasis (1–3). FPN1 is expressed in all

types of cells that handle major iron flow, including macrophages, duodenal enterocytes, hepatocytes, and placenta syncytiotrophoblasts (4). Cell surface expression is predominantly regulated by the liver-derived peptide hepcidin (5), which induces internalization and degradation of FPN1, decreasing iron delivery to plasma (2). The hepcidin-ferroportin axis plays an important role in the pathogenesis of inherited and acquired iron metabolism disorders, including iron overload diseases and iron-restricted anemia (6).

FPN1 dysfunction is responsible for hemochromatosis type 4, an inborn error of iron metabolism that is transmitted as an autosomal dominant trait, and is characterized by wide clinical heterogeneity. This is only partially explained by the existence of mutations with opposing effects. Patients with loss-of-function mutations usually

ABBREVIATIONS: β -gal, β -galactosidase; 3D, 3-dimensional; BbFpn, *Bdellovibrio bacteriovorus* Fpn; FPN1, ferroportin 1; HEK, human epithelial kidney; MD, molecular dynamic; MFS, major facilitator superfamily; TM, transmembrane; WT, wild type

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brest, Hôpital Morvan, Bat 5bis, Laboratoire de Génétique Moléculaire et d’Histocompatibilité, 2 Ave. Foch, 29200 Brest, France. E-mail: gerald.legac@univ-brest.fr

doi: 10.1096/fj.201901857R

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

present mesenchymal or mixed iron overload (corresponding to early iron deposition within Kupffer cells) and markedly elevated serum ferritin concentrations contrasting with normal or transferrin saturation levels. This phenotypic presentation is commonly referred to as ferroportin disease, or hemochromatosis type 4A. Gain-of-function mutations, which are less frequent, result in partial to complete resistance to hepcidin; patients usually display elevated transferrin saturation levels. Hyperferritinemia is secondary to plasma iron burden and is mostly associated with iron deposits in hepatocytes. These biologic and histologic features mimic the natural history of HFE-related hemochromatosis; hence, gain-of-function FPN1 mutations are associated with hemochromatosis type 4B.

Important progress has been made these last 5 yr in understanding FPN1 structural biology. We and others first provided evidence of the relatedness of FPN1 to the major facilitator superfamily (MFS) (7–9). The MFS structural core consists of 12 transmembrane (TM) helices organized into 2 structurally similar domains: N-domain (TM1–TM6) and C-domain (TM7–TM12) (10). Taniguchi *et al.* then identified Bd2019 [*Bdellovibrio bacteriovorus* Fpn (BbFpn) (11)] as a bacterial homolog of the human iron exporter and solved its structures in both the outward- and inward-facing states (12). The X-ray structures of BbFpn confirmed the typical MFS fold and provided important clues about the mechanism of iron egress and FPN1 regulation by hepcidin. Deshpande *et al.* (13) very recently reported the crystal structure of Ca²⁺-bound BbFpn in an inward-facing conformation and demonstrated that human FPN1 iron transport activity is dependent on extracellular Ca²⁺. The authors proposed an alternate access mechanism, which is characteristic of MFS transporters (10, 14), to explain how iron is exported by FPN1 across the plasma membrane, comprising 3 fundamental steps: 1) in the outward-facing structure, Ca²⁺ binds to FPN1 and initiates a conformational change that enables transition from open outward-facing to open inward-facing states; 2) in the inward-facing structure, Fe²⁺ binds to FPN1 and triggers a return to the outward-facing open state; and 3) in the extracellular milieu, Fe²⁺ is oxidized to Fe³⁺, which is taken up by the plasma transferrin and delivered to various tissues throughout the body (2).

Fundamental questions still remain unanswered about the molecular mechanisms associated with the conformational changes underlying the iron transport cycle, as well as on those ensuring the stability of the outward- and inward-facing conformations. In MFS transporters, a set of specific, so-called “gating” residues, has been suggested to be the key actor in interactions between helices from the N- and C-domains that alternately move to form the outward- and inward-facing conformations, as well as a series of intermediate states (10). Salt bridges and hydrogen bonds are considered particularly important for stabilizing MFS transporters in the outward-facing state. In line with this idea, we recently provided evidence of the formation of a noncovalent, electrostatic interaction between Arg178 and Asp473 on the intracellular side of human FPN1. After also investigating phenotypes related to the recurrent p.Arg178Gln missense mutation, we postulated that the

shift of the equilibrium toward the inward-facing state because of a deficient role of gating residues in the intracellular gate could represent a new molecular mechanism of loss of FPN1 function (15).

Here, using comparative modeling and molecular dynamic (MD) simulations, we predict atomic details for the organization of human FPN1 in the outward-facing open state. *In vitro* evaluation of Ala mutants in different TM helices is interpreted relative to the expected role of the corresponding nonmutated residues in forming noncovalent bonds (salt bridges or hydrogen bonds) between the N-domain and the C-domain of human FPN1. We identified 5 key residues that play an essential function in the intracellular gate and iron transport cycle. Comparing BbFpn and FPN1 3-dimensional (3D) structures revealed interactions that may play an important role in the stability of the gate and in the modulation of the conformational changes in the human transporter, some of which cannot be formed in the bacterial homolog. We finally highlight some critical residues that are mutated in patients with a typical hemochromatosis type 4A phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Modeling and MD simulations

As previously reported (15), a model of the 3D structure of human FPN1 was built using Modeler v.9.15 (16) considering the sequence alignment reported by Taniguchi *et al.* (12) and, as template, the experimental 3D structure of *B. bacteriovorus* iron transporter Bd2019 in an outward-facing conformation (Protein Data Bank 5AYM). Some large regions were discarded from the FPN1 model because no template was available for accurate modeling: aa 1 to 21 (N-terminal sequence), aa 237–301 (linker between the N- and the C-domain), and aa 396–450 (TM9–TM10 loop).

An MD simulation was run for 100 ns using the human FPN1 3D structure model. This was embedded in a membrane bilayer composed of 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine molecules and solvated within a rectangular box of explicit water molecules and 15 mM NaCl. The simulation box (105 × 105 × 100 Å³) contained the protein, 275 lipids, 49 Na⁺ ions (18), 53 Cl⁻ ions (19), and 18,409 TIP3P water molecules regularly filling the pore and the full box. (20) Minimization, equilibration, and production phases or steps used the Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM36) force field (21, 22) in Not Another Molecular Dynamics (NAMD) 2.9 (23) following the protocol described in Hoffmann *et al.* (17). The root mean square deviations between the initial model and each snapshot from the MDs are given in Supplemental Fig. S2. The time of 25 ns appeared sufficient to achieve stable models. Distances between some atoms from critical amino acids along the simulation are provided in Fig. 4.

An additional simulation was carried out with 70 mM CaCl₂, other parameters being equal, to take account of the role of Ca²⁺ in FPN1-mediated metal efflux. Both simulations (Na⁺/Ca²⁺) were performed in absence of iron, for which the binding site remained to be explored at the experimental level in the outward-facing conformation. The results of the 2 simulations were quite similar, especially regarding the bond network analyzed here (Supplemental Fig. S3). Na⁺ ions, however, fluctuated, whereas several Ca²⁺ ions were trapped in some regions during simulation, one of them artifactually interacting with a carboxyl group (Lys236) introduced after the truncation of the protein after the N-terminal domain. However, it is worth noting, that

overestimated binding affinities of divalent ions are a known problem in classic force fields (24).

Plasmid constructs

The wild-type (WT) FPN1-V5/CD8 bicistronic plasmid construct was generated by cloning full-length human *SLC40A1* and CD8 cDNA (Genbank: NM_0414585.5 and NM_001145873.1) into the pIRES2 DsRed-Express2 vector (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA); the DsRed-Express2 fluorescent protein coding sequence was removed and replaced by CD8 cDNA, whereas a V5 epitope tag (GKPIPNNLLGLDST) was introduced in the fifth extracellular loop of FPN1 to facilitate detection on flow cytometry. Iron release measurement used a pcDNA3.1-FPN1-V5(C-ter) construct (7). All ferroportin mutations were introduced in the pIRES_FPN1-V5_CD8 and pcDNA3.1_FPN-V5 vectors using the QuickChange Site-Directed mutagenesis kit, according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sequencing analyses were performed to check the integrity of all plasmid constructs (full-length *SLC40A1* cDNA sequenced after each site-directed mutagenesis).

Culture and transfection of human epithelial kidney 293T cells

Human epithelial kidney (HEK)293T cells, from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in DMEM (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were transiently transfected using JetPEI (Polyplus, Illkirch-Graffenstaden, France), according to the manufacturer's instructions, and a 2:1 transfection reagent (μl)/plasmid DNA ratio (μg).

Flow cytometry

HEK293T cells (1.9×10^5 cells/well in 12-well plates) transfected with the pIRES_FPN1-V5_CD8 constructs were harvested with trypsin 36 h after transfection. Samples were pelleted (500 g, 5 min) and resuspended in PBS (pH 7.4) containing 1 mM EDTA and 10% fetal bovine serum, before being incubated for 30 min at 4°C with anti-V5-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD8-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Stained cells were pelleted (500 g, 5 min, 4°C) and resuspended in 400 μl PBS-EDTA. Cells were analyzed using a BD Accuri C6 flow cytometer [Becton Dickinson (BD), San Diego, CA, USA] and Flowlogic software (Miltenyi Biotec). Events were gated to exclude cell debris and aggregates, and to select cells with the desired levels of CD8 and FPN1-V5 expression; the windows were set up to exclude CD8- or FPN1-V5-negative cells (using mock-transfected cells as control), as well as cells with very high fluorescent intensity.

Intracellular ⁵⁵Fe measurements

⁵⁵Fe loading of human apotransferrin was performed as previously described (25). HEK293T cells (1.7×10^5 cells/well in 12-well plates) were transfected with WT or mutated pcDNA3.1_FPN-V5 constructs for 24 h, before being cultured in Pro293a-CDM serum-free medium (Lonza) and preloaded with 20 μg/ml ⁵⁵Fe-transferrin for 16 h. Each pcDNA3.1_FPN-V5 construct was codelivered with the pSV-β-galactosidase (β-gal) vector (Promega, Madison, WI, USA). Cells were harvested with trypsin, mixed with liquid scintillation fluid (Ultima Gold MV; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) and counted for 2 min in a

TRI-CARB 1600 CA scintillation counter (PerkinElmer). ⁵⁵Fe radioactivity was normalized on total protein content and β-gal activity.

Statistical analysis

Data are presented as means (column bars) + sd. Comparisons used 2-tailed Student's *t* tests.

RESULTS

Model of the 3D structure of the outward-facing conformation of human FPN1

As previously reported (15), a model of the 3D structure of human FPN1 in an outward-facing conformation was built using the BbFpn structure (Bd2019; Protein Data Bank 5AYM) as template (see Materials and Methods). On the intracellular side (cytoplasmic gate), TM2, TM3, TM4, and TM5 (N-domain) interact tightly with TM10 and TM11 (C-domain) (Fig. 1A). Human FPN1 conserves the amino acid atoms thought to play a critical role in the BbFpn cytoplasmic gate (12). Asp157 (TM4, *BbFpn Asp140*) forms salt bridges with Arg88 (TM3, *BbFpn Arg73*) and Arg489 (TM11, *BbFpn Arg371*), whereas Arg88 also forms a salt bridge with Glu486 (preceding TM11, *BbFpn Glu368*) (Fig. 1A, green box at right). This network is completed with that provided by H-bonds formed, on the one hand, between the side-chain oxygens of Asp84 (TM2, *BbFpn Asp69*) and the main-chain nitrogen atoms of Gly490 and Ile491 (TM11) (*BbFpn Gly372 and Glu373*) (Fig. 1A, green box at right) and, on the other hand, between the side chains of Asn174 (TM5, *BbFpn Asn155*) and Gln481 (TM10, *BbFpn Gln363*) (Fig. 1A, orange box at left). The previously reported salt bridge between Arg178 and Asp473 also participates in this network (15).

A simplified view of the interdomain and intradomain interactions for both the bacterial and the human iron exporter is provided in Supplemental Fig. S1.

In vitro evaluation of 7 candidate gating residues

To experimentally test the 3D model for the intracellular gate, we individually mutagenized Arg88, Asp157, Glu486, Arg489, Asp84, and Gln481 to Ala. Ala is the second smallest amino acid after Gly. This nonpolar amino acid has the highest propensity of all 20 natural amino acids for the α-helical state (26). The selected Ala substitutions were thus likely to have limited impact on local human FPN1 structure. Only Asn174 was mutated to isoleucine, as the p.Asn174Ile missense mutation was previously proved to be defective for iron egress while being normally addressed to the cell surface (7, 27).

A bicistronic construct was used to evaluate the concurrent plasma membrane expression of human FPN1 (conjugated with a V5 epitope) and CD8 on flow cytometry. Taking account of the level of CD8 in HEK293T cells, which do not normally express this membrane protein, enabled correction for differences in transfection efficiency

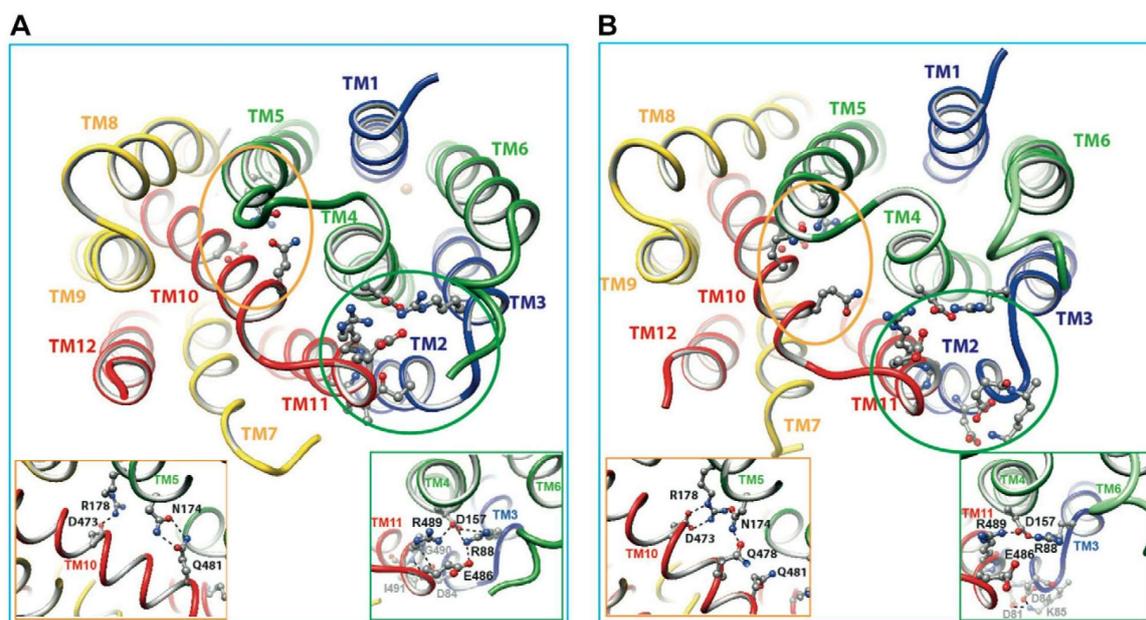


Figure 1. Model of the 3D structure of the human FPN1 cytoplasmic gate. Before (0-ns) (A) and after (100-ns) (B) MD simulation. The 3D structure is shown in a ribbon representation, with amino acids involved in salt bridges or H-bonds depicted in a ball-and-stick representation. TM helices are labeled and colored (TM1–TM3: blue, TM4–TM6: green, TM7–TM9: yellow, TM10–TM12: red). This figure was drawn using chimera. For convenience, amino acids are described by a 1-letter code, instead of the 3-letter code used in the main text.

between samples. The p.Ala77Asp missense mutation, which significantly damages FPN1 structure and is known to prevent cell surface localization, was used as negative control. It was noteworthy that expression of FPN1-V5 fusion proteins was lower than the CD8 control in all analyzed cell populations (cells expressing WT FPN1-V5 fusion displayed >40% reduction); this suggests differences in the levels of FPN1 and CD8 translation initiated from the bicistronic mRNA. An important difference was observed in the proportions of FPN1-WT⁺/CD8⁺ and FPN1-A77D⁺/CD8 cells ($P < 0.001$), confirming that the p.Ala77Asp mutant causes FPN1 mislocalization (Fig. 2A). Expression of the p.Asp84Ala mutant also differed significantly from the WT protein ($P < 0.05$). The other 6 variants reached the plasma membrane correctly.

Radioactively labeled iron accumulation was measured in HEK293T cells transiently transfected with pcDNA3.1 plasmids encoding FPN1-V5 fusion proteins, using cells transfected with the commercial pcDNA3.1-V5-His empty vector as control. pcDNA3.1 plasmids were codelivered with a normalization vector encoding the β -gal enzyme. A total of 24 h after transfection, HEK293T cells were cultured in serum-free medium and preloaded with 20 $\mu\text{g/ml}$ ^{55}Fe -transferrin for 16 h. The cell lysates were assayed for ^{55}Fe quantity, β -gal activity (to correct for differences in transfection efficiency) and total protein concentration (to correct for differences in final cell number). As shown in Fig. 2B, cells transfected with the WT FPN1-V5 fusion protein displayed 2- to 3-fold lower iron accumulation. The p.Arg88Ala, p.Asp157Ala, p.Arg489Ala, p.Asp84Ala, and p.Asn174Ile mutants were not able to

export ^{55}Fe iron in amounts comparable with WT FPN1. Two mutants, p.Gln481Ala and p.Glu486Ala, retained their ability to export iron out of the cell.

Taken together, the results shown in Fig. 2A, B demonstrate that Arg88, Asp157, Arg489, and Asn174 are important for iron export. In contrast, Gln481 and Glu486 can be changed to Ala without altering FPN1 function. In the light of this, we then investigated the function of the p.Gln481Ala-Glu486Ala double mutant. Figure 3A, B shows that it localized to the cell surface in the same way as the WT protein and that it retained export function.

MD simulations

To further understand the differences observed for the mutants tested, molecular dynamics simulations were run on the human FPN1 3D structure model in an appropriate environment (Materials and Methods). Root mean square deviations for the protein backbone during 100-ns MD simulation were calculated relative to the coordinates of the initial structures (Supplemental Fig. S2). More constant values were observed from 20 to 25 ns onward, after an initial 10-ns fast-rise region, indicating that the model structure had reached conformation steady state.

Comparing conformations in this steady state (illustrated here at 100 ns; Fig. 1B) to the initial 3D structure (0 ns; Fig. 1A) revealed a slight reorganization of the intracellular gate bond network. Although the salt bridges between Asp157 and Arg88 and Asp157 and Arg489 appeared very stable throughout the simulation, as assessed by monitoring the distances between the

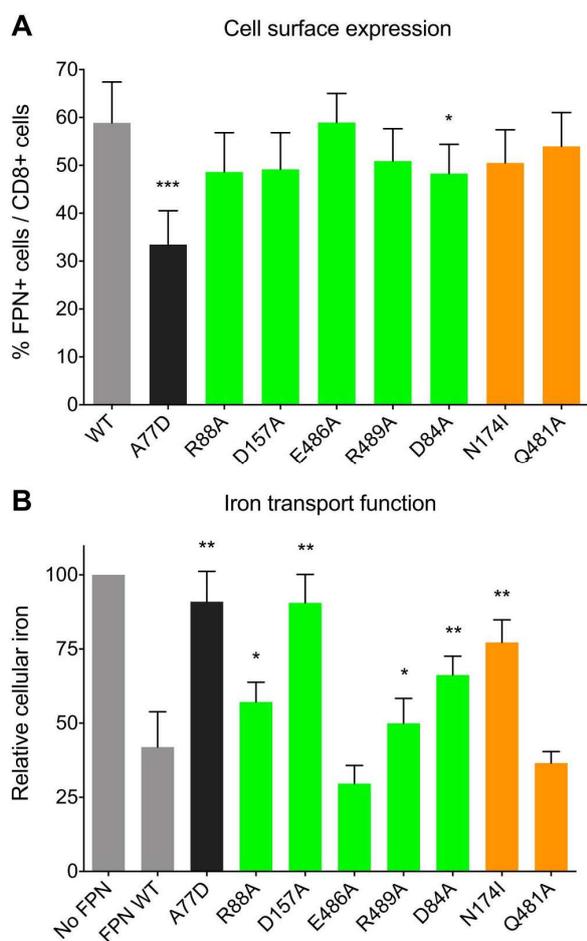


Figure 2. Effect on cell surface expression and iron export of Ala or isoleucine substitutions for amino acids predicted to be involved in interactions between the N- and the C-lobe of human FPN1 in the outward-facing state. Green bars indicate residues predicted to form salt bridges or hydrogen bonds between helices 2, 3, 4, and 11. Orange bars indicate residues predicted to form a hydrogen bond between helices 5 and 10. For convenience, amino acids are described by a 1-letter code, instead of the 3-letter code used in the main text. **A)** HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1 and CD8. A 14-aa V5 epitope (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) was inserted in the fifth extracellular loop of FPN1 to allow plasma membrane detection. After 36 h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 6 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. **P* < 0.05, ****P* < 0.001. **B)** HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and then fed with 20 μ g/ml 55 Fe-transferrin for 16 h. Cells were then washed and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -gal activity. Empty vector (No FPN) samples taken as 100% values generally achieved 1000–2500 cpm. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with WT FPN1.

involved atoms (Fig. 4A), Glu486 moved away, with its 2 side-chain oxygen atoms usually free from any interaction. Interestingly, the 2 H-bonds between Asp84 and the main-chain N atoms of Gly490 and Ile491 were rapidly lost and only occasionally reformed (Fig. 4B), whereas one of the side-chain oxygen atoms of Asp84 was able to form a salt bridge with Lys85, itself bound to Asp81 (Fig. 4C). This double salt bridge was not constant throughout the simulation, with variable positions of Lys85 side-chain and transient H-bonds of Asp84 with Gly490 and Ile491 main-chain N atoms, suggesting that this feature may be a key-point for conformational change during the human FPN1 cycle. It was noteworthy that these bonds could not be formed in the BbFpn structure because the amino acids homologous to Asp81 and Lys85 are Lys66 and Thr70,

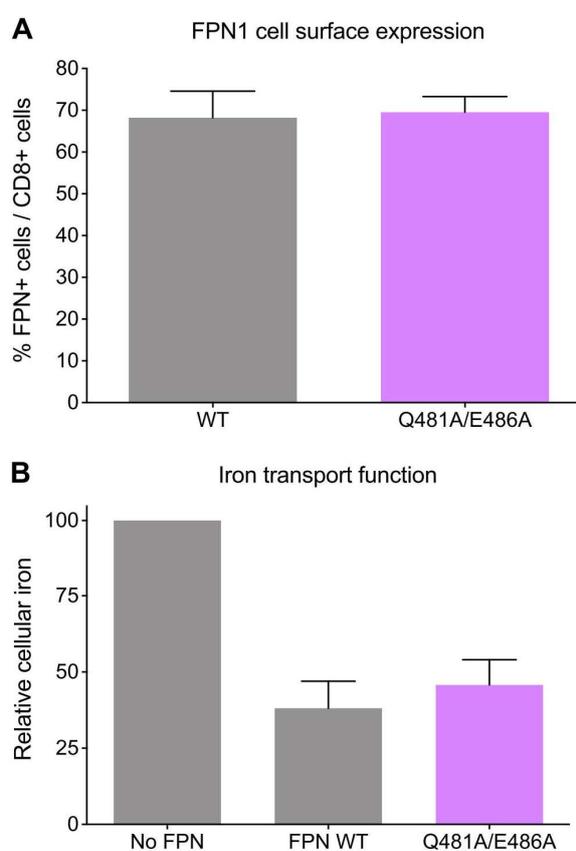


Figure 3. Cell surface expression and iron export ability of the Gln481Ala-Glu486Ala double mutant. **A)** HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1 and CD8. After 36 h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm sd of 4 independent experiments. **B)** HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and then fed with 20 μ g/ml of 55 Fe-transferrin for 16 h. Cells were then washed and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -gal activity. Each bar represents the means \pm sd of 5 independent experiments.

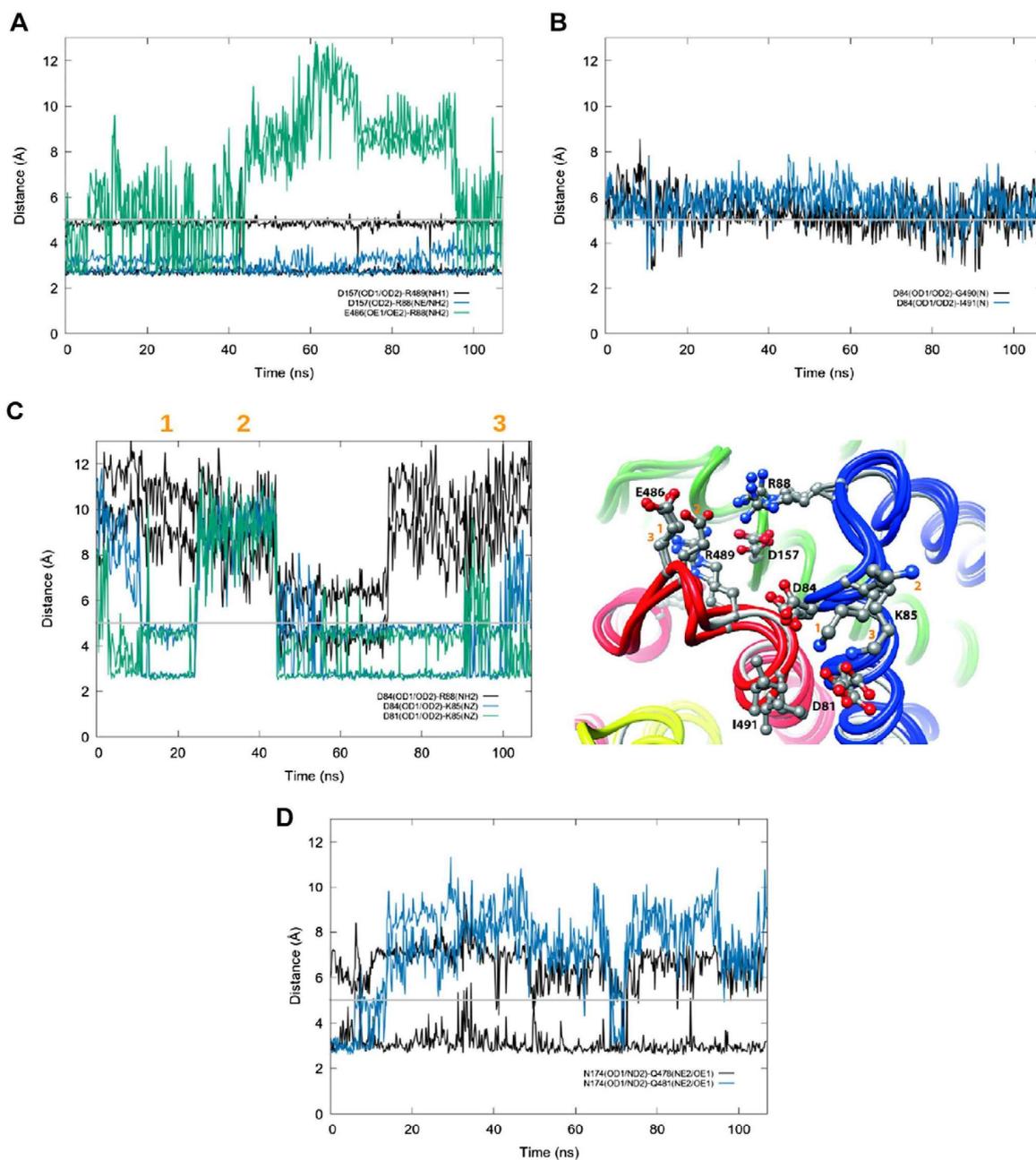


Figure 4. Evolution, along the MD simulation, of the distances between atoms involved in noncovalent bonds. Distances were plotted (using gnuplot) as a function of trajectory time between pairs of atoms (N, OD1, OD2, OE1, OE2, ND2, NE1, NH1, NH2, NZ), which may be involved in noncovalent bonds and are reported here considering the groups depicted in Fig. 1. The distance of 5 Å (horizontal gray line) is indicated as a reference, below which bonds can be observed. *A–C*) Green box of Fig. 1: interhelical side-chain–side-chain interactions involving TM3 (Arg88), TM4 (Asp157), and TM11 (Glu486, Arg489) (*A*); interhelical side-chain–main-chain interactions involving oxygen atoms (OD1/OD2) of the side chain of Asp84 and the nitrogen main-chain atom (N) of Gly490 and Ile491 (*B*); intrahelical side-chain–side-chain interactions at the level of TM2 involving Asp84, Lys85, Asp88, and Arg88 (*C*). At right are represented 3 different conformational states extracted from the simulation, illustrating different positions of the side chains of Glu486 and Lys85. *D*) Orange box of Fig. 1: interhelical side-chain–side-chain interactions involving TM5 (Asn174) and TM10 (Gln478 and Gln481). The inset between panels *C* and *D* represents 3 different conformational states extracted from the simulation, illustrating different positions of the side chains of Glu486 and Lys85. This figure was drawn using chimera (54). For convenience, amino acids are described by a 1-letter code, instead of the 3-letter code used in the main text.

respectively. Finally, the H bond between Gln481 and Asn174 was also not maintained, and it occurred very rarely during the simulation (Fig. 4D). In contrast, Asn174 made other H-bonds with Gln478 on TM10 and Arg178 on TM5, Arg178 also forming an interlobe salt bridge with Asp473, as previously reported (15).

In conclusion, these results explain the noncritical role of Gln481 and Glu486 for the FPN1 function, highlight an alternative functional role of Asp84 in a dynamic network, and suggest a critical role for Gln478, interacting with Asn174, itself included in a wide bond network involving Arg178 and Asp473. These 3 features were not anticipated from the experimental static 3D structure of BbFpn.

In vitro evaluation of the Gln478Ala mutant

To check our predictions, we also evaluated the effects of the Gln478Ala mutant. The mutant was detected on the surface of HEK293T transiently transfected cells at levels similar to those seen with the WT protein (Fig. 5A). Its ability to export iron out the cell was, however, markedly reduced (Fig. 5B). Of note, functional consequences of the Gln478Ala mutant were comparable to those observed for the Asn174Ile mutant (Fig. 2A, B).

Genotype-phenotype correlations

Based on the literature, we identified 13 missense mutations that affect 7 different gating residues (Asp84, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Arg489, and Gly490) and have been reported in a total of 77 patients (32 female, 45 male; Table 1). As summarized in Fig. 6, most patients presented serum ferritin >1000 µg/L and transferrin saturation <50% (females) or <60% (males) at diagnosis. This is characteristic of the hemochromatosis type 4A subtype and FPN1 loss-of-function (28, 29).

DISCUSSION

In-depth knowledge of the main elements of normal FPN1 physiology is an important prerequisite for understanding the mechanism of iron export in mammals. Here, we investigated the structure-function relationships of a set of amino acids previously predicted, from the bacterial homolog BbFpn 3D structure, as key elements for stabilizing the protein in the outward-facing state. This revealed non-covalent interactions between several amino acids that are conserved between species and form a first essential interaction network. Moreover, MD simulations performed on the model of the human FPN1 3D structure led to explain the noncritical role of a few amino acids and to reveal other critical ones, which were further supported at the experimental level. These additional residues are also permanently involved in noncovalent interactions, with either a unique or multiple partners, within networks that are specific to human FPN1. This study thus provides for the first time an accurate topological description of the human FPN1 intracellular gate.

MFS transporters must undergo large conformational changes to transport substrates across membranes through

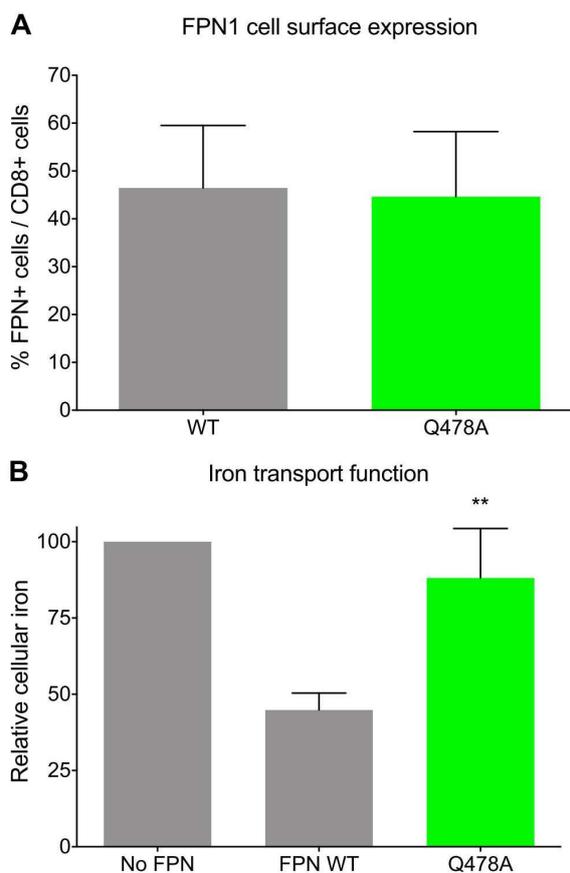


Figure 5. Cell surface expression and iron export ability of the Gln478Ala mutant. A) HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human FPN1 and CD8. After 36 h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentages of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the means \pm SD of 3 independent experiments. B) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24 h, and then fed with 20 µg/ml of ⁵⁵Fe-transferrin for 16 h. Cells were then washed and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -gal activity. Each bar represents the means \pm SD of 5 independent experiments. *P* values were calculated by a Student's *t* test. ***P* < 0.01 compared with WT FPN1.

alternate access mechanism. Accordingly, gates are found at each end of the protein, which open and lock in concert to allow passage of substrates. Gating residues comprise amino acids that mediate interactions between the N- and C- domains in 1 conformational state. Such contacts are important not only for stabilizing the different conformational states but also for ensuring cooperation in conformational changes, preventing forbidden states with both gates open (10). Gating residues in MFS proteins often involve charged residues forming salt bridges (30, 31), but this appears to be a recurrent feature of several membrane systems (32). Salt bridges can also be found in the central cavities of

TABLE 1. List of mutations in the *SLC40A1* gene that affect an FPN1 gating residue

Mutation	Gender	Age at diagnosis (yr)	Reference
p.Asp84Glu	Female (<i>n</i> = 1)	26	40
p.Arg88Thr	Female (<i>n</i> = 1)	18	41
	Male (<i>n</i> = 6)	15–61	
p.Arg88Gly	Female (<i>n</i> = 2)	41–77	38, 42
	Male (<i>n</i> = 2)	38–41	
p.Asp157Ala	Female (<i>n</i> = 2)	Not provided	43–46, 48
	Male (<i>n</i> = 5)	58–66	
p.Asp157Gly	Female (<i>n</i> = 2)	42–66	38, 47
	Male (<i>n</i> = 2)	61–64	
p.Asp157Asn	Female (<i>n</i> = 4)	22–76	36, 49
	Male (<i>n</i> = 1)	20	
p.Asp157Tyr	Male (<i>n</i> = 1)	64	38
p.Asn174Ile	Female (<i>n</i> = 2)	38–66	27, 50
	Male (<i>n</i> = 1)	45	
p.Arg178Gln	Female (<i>n</i> = 8)	11–72	15, 42, 51
	Male (<i>n</i> = 17)	6–71	
p.Arg489Lys	Female (<i>n</i> = 4)	39–60	39
	Male (<i>n</i> = 2)	28–54	
p.Arg489Ser	Male (<i>n</i> = 4)	43–81	45, 52
p.Gly490Asp	Female (<i>n</i> = 4)	23–54	38, 53
	Male (<i>n</i> = 3)	31–47	
p.Gly490Ser	Female (<i>n</i> = 2)	27–71	38, 42
	Male (<i>n</i> = 1)	24	

membrane domains, stabilizing specific conformations (17, 33). The 3D structure of BbFpn suggests that the intra- and extracellular gates clearly differ, involving salt bridge or H-bonds and hydrophobic contacts, respectively (12).

Investigating both the 3D structure of human FPN1 and the cellular effects of Ala-substituted mutants (Figs. 1 and 2) confirmed the existence of salt bridges between Arg88 (TM3), Asp157 (TM4), and Arg489 (TM11). These electrostatic interactions, involving conserved residues and appearing very stable along MD simulations (Supplemental Fig. S3A), are completed by another interdomain salt bridge between Arg178 (TM5) and Asp473 (TM10), as we demonstrated very recently (15). Interestingly, this last salt bridge appears specific to human FPN1; it cannot exist in the BbFpn structure because the residue equivalent to Asp473 is Ser355. The whole salt-bridge network described

here is likely very important for stabilization of human FPN1 in the outward-open conformation.

An intriguing issue was the observation that Gln481 (TM10) and Glu486 (preceding TM11), which were predicted from the BpFpn structure (corresponding amino acids Gln363 and Glu368) as also involved in the intracellular gate, are not essential to human FPN1 activity. These observations were reinforced by the study of the Gln481Ala-Glu486Ala double mutant, which was indistinguishable from the WT protein for cell surface expression and iron export ability (Fig. 3). This marks a clear difference from hypotheses based on the bacterial homolog outward-facing structure, and this can only be explained after MD simulations and refinement of the model of the 3D structure of human FPN1. Hence, Gln481 is thought to interact only transiently with Asn174 (TM5),

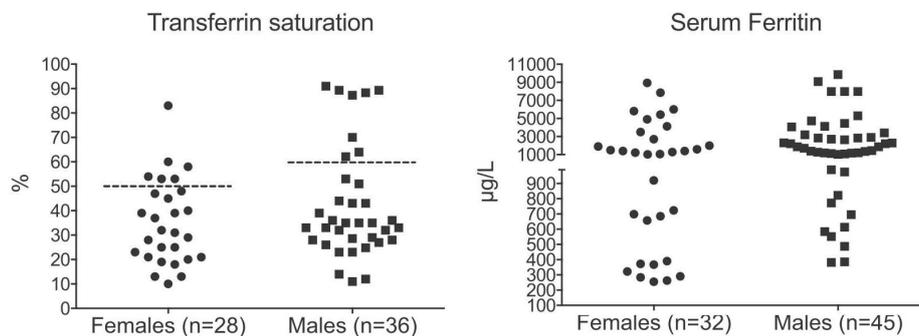


Figure 6. Distribution of iron parameters among suspected hemochromatosis type 4A patients with a missense mutation affecting an FPN1 gating residue. Serum ferritin and transferrin saturation (when available) values were extracted from the literature for 11 missense mutations (listed in Table 1) and 67 patients. Data are presented by gender because penetrance of the hemochromatosis type 4A-related genotypes at the *SLC40A1* locus are known to be lower in females.

which actually forms quasi-stable H-bonds with both Gln478 (TM10) and Arg178 (TM5) (Figs. 1 and 4). The 2 side-chain oxygen atoms in Glu486 are very often free of any interaction (Figs. 1 and 4A), and Glu486 is thus unable to actively participate in the interaction network formed by Arg88, Asp157, and Arg489. The situation of Asp84 is even more complex because it relies on local interactions that do not exist in the bacterial homolog BbFpn. Indeed, Asp84 is expected to briefly form H-bonds with both the main-chain N atoms of Gly490 and Ile491, when not forming a salt bridge with Lys85. The local network involving Asp84 and Lys85 in TM2 can be reinforced by an additional bond between Lys85 and Asp81 (Figs. 1 and 4B–D). Important conclusions to our study, which are supported at the experimental level, are thus the identification of Gln478 as an additional critical actor of the human FPN1 intracellular gate and of the involvement of Asn174 and Asp84 in multiple bonds also playing a fundamental role in this gate. Interestingly, these networks of interactions involve residues that are specific to human FPN1: Asp473, Gln478, Asp81, and Lys85 (Ser355, Glu360, Lys66, and Thr70, respectively, in BbFpn).

Worth noting is the potential role that surrounding phospholipids may play in the structural rearrangements enabling alternate access mechanism by interfering with the conserved network of interactions in the cytoplasmic gate. In particular, phosphatidylethanolamine lipids may directly interact with some acidic residues of the intracellular gate charged network, such as Asp84, and stabilize the inward-facing conformation by interfering with contacts between the cytoplasmic ends of the N- and C-lobe. The role of such molecular switches in the dynamic interconversion underpinning transport cycle has been described for some other MFS transporters (34, 35); it should be further investigated in the particular case of FPN1.

Like other adult-onset autosomal dominant diseases, hemochromatosis type 4A (or ferroportin disease) is characterized by incomplete penetrance and wide phenotypic heterogeneity. So far, 51 missense mutations have been associated with the disease (28, 36, 37). Not all have been functionally investigated, and not all have been definitively identified as disease-causing. It is, however, interesting that 13 missense mutations map to the FPN1 intracellular gate. They correspond to 7 gating residues (Asp84, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Arg489, and Gly490) that, according our investigations, are involved in the formation of noncovalent interactions at the interface between the N- and the C-domains (Fig. 1). As illustrated in Fig. 6, patients with these missense mutations generally present high serum ferritin concentrations (>1000 µg/L), suggesting significant iron overload in tissue, related to serious FPN1 dysfunction. The p.Asp157Gly, p.Asp157Tyr, and p.Arg489Lys substitutions are known to cause FPN1 mislocalization (38, 39). This likely results from folding defects in TM helices 2, 4, or 11 or local instability of the structure, or any combination thereof. By contrast, the p.Arg88Gly, p.Asp157Ala, p.Asn174Ile, and p.Arg178Gln substitutions reduce the ability of FPN1 to export iron without defective cell surface expression (7, 15, 27). This is now explained by the loss of interdomain interactions in the outwardly oriented FPN1 state. The p.Arg88Thr, p.Asp157Asn, and p.Arg489Ser substitutions have not yet been studied

experimentally; in light of the above observations, however, it can reasonably be anticipated that they are all deleterious.

In summary, the present study provides an unprecedented view of the interactions needed to form and stabilize the FPN1 intracellular gate. It highlights intra- and interdomain interactions, some of which are not existing in the bacterial homolog BbFpn, thus identifying the fundamental role of a set of specific residues in the iron transport cycle in humans. It also confirms that hemochromatosis type 4A is not restricted to missense mutations that cause protein mislocalization, thus increasing our ability to interpret rare genetic variants at the *SLC40A1* locus. This will have profound implications for patient management. More extensive MD simulations are warranted to understand the mechanisms associated with the conformational changes leading to the inward-facing conformation and the influence of iron and calcium binding and release. Particular attention should also be paid to the identification of hydrophobic interdomain interactions in the inward-facing structure of FPN1. This is necessary in order to identify the entire network of gating residues that participate in the global transition from the outward-facing to the inward-facing state and *vice versa* (36, 40–53). FJ

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank George Gao and Alain R.M. Townsend (Weatherall Institute, Oxford University, Oxford, United Kingdom) for the generous gift of the CD8 expression vector. The protocol used for molecular dynamics simulation was developed during the research work on the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) protein, which was supported by the French Association “Vaincre La Mucoviscidose,” and performed using High-Performance Computing (HPC) resources from Grand Equipement National de Calcul Intensif (GENCI)/Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur (CINES) (Grants 2017-A0020707206, 2018-A0040707206, and 2019-A0060707206). This work was also supported by grants from the French Hospital Clinical Research Program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2009; Brest University Hospital; UF0857), the Gaetan Saleun Association, and the Laboratory of Excellence (GR-Ex) (ANR-11-LABX-0051). The labex GR-Ex is funded by the Investissement D'avenir d'Excellence (IdEx) program “Investissements d'avenir” of the French National Research Agency (ANR-18-IDEX-0001). The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. Guellec, A. Elbahnsi, M. Le Tertre, K. Uguen, I. Gourlaouen, and I. Callebaut conducted experiments; C. Férec, C. Ka, I. Callebaut, and G. Le Gac analyzed data; I. Callebaut and G. Le Gac designed the study and wrote the manuscript; and all authors contributed to the editing of the final manuscript.

REFERENCES

1. Anderson, G. J., and Frazer, D. M. (2017) Current understanding of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **106**(Suppl 6), 1559S–1566S
2. Drakesmith, H., Nemeth, E., and Ganz, T. (2015) Ironing out ferroportin. *Cell Metab.* **22**, 777–787

3. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**, 24–38
4. Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S., and Andrews, N. C. (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* **1**, 191–200
5. Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093
6. Girelli, D., Nemeth, E., and Swinkels, D. W. (2016) Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* **127**, 2809–2813
7. Le Gac, G., Ka, C., Joubrel, R., Gourlaouen, I., Lehn, P., Mornon, J.-P., Férec, C., and Callebaut, I. (2013) Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum. Mutat.* **34**, 1371–1380
8. Wallace, D. F., Harris, J. M., and Subramaniam, V. N. (2010) Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C75–C84
9. Bonaccorsi di Patti, M. C., Polticelli, F., Cece, G., Cutone, A., Felici, F., Persichini, T., and Musci, G. (2014) A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS J.* **281**, 2851–2860
10. Quistgaard, E. M., Löw, C., Guettou, F., and Nordlund, P. (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 123–132
11. Bonaccorsi di Patti, M. C., Polticelli, F., Tortosa, V., Furbetta, P. A., and Musci, G. (2015) A bacterial homologue of the human iron exporter ferroportin. *FEBS Lett.* **589**, 3829–3835
12. Taniguchi, R., Kato, H. E., Font, J., Deshpande, C. N., Wada, M., Ito, K., Ishitani, R., Jormakka, M., and Nureki, O. (2015) Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat. Commun.* **6**, 8545
13. Deshpande, C. N., Ruwe, T. A., Shawk, A., Xin, V., Vieth, K. R., Valore, E. V., Qiao, B., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B., and Jormakka, M. (2018) Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat. Commun.* **9**, 3075
14. Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **211**, 969–970
15. Ka, C., Guellec, J., Pepermans, X., Kannengiesser, C., Ged, C., Wuyts, W., Cassamin, D., de Ledinghen, V., Varet, B., de Kerguenec, C., Oudin, C., Gourlaouen, I., Lefebvre, T., Férec, C., Callebaut, I., and Le Gac, G. (2018) The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica* **103**, 1796–1805
16. Webb, B., and Sali, A. (2017) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* **1654**, 39–54
17. Hoffmann, B., Elbahnsi, A., Lehn, P., Décourt, J. L., Pietrucci, F., Mornon, J. P., and Callebaut, I. (2018) Combining theoretical and experimental data to decipher CFTR 3D structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3829–3855
18. Lamoureux, G., and Roux, B. (2006) Absolute hydration free energy scale for alkali and halide ions established from simulations with a polarizable force field. *J. Phys. Chem. B* **110**, 3308–3322
19. Beglov, D., and Roux, B. (1994) Finite representation of an infinite bulk system: solvent boundary potential for computer simulations. *J. Chem. Phys.* **100**, 9050
20. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926
21. Jo, S., Cheng, X., Lee, J., Kim, S., Park, S.-J., Patel, D. S., Beaven, A. H., Lee, K. I., Rui, H., Park, S., Lee, H. S., Roux, B., MacKerell, A. D., Jr., Klauda, J. B., Qi, Y., and Im, W. (2017) CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. *J. Comput. Chem.* **38**, 1114–1124
22. Hart, K., Foloppe, N., Baker, C. M., Denning, E. J., Nilsson, L., and Mackerell, A. D., Jr. (2012) Optimization of the CHARMM additive force field for DNA: improved treatment of the BI/BII conformational equilibrium. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 348–362
23. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802
24. Heinz, L. P., Kopec, W., de Groot, B. L., and Fink, R. H. A. (2018) *In silico* assessment of the conduction mechanism of the Ryanodine Receptor 1 reveals previously unknown exit pathways. *Sci. Rep.* **8**, 6886
25. Ka, C., Le Gac, G., Dupradeau, F.-Y., Rochette, J., and Férec, C. (2005) The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for the mutated 282Y HFE protein. *Hum. Genet.* **117**, 467–475
26. Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B., and Mornon, J. P. (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 621–645
27. De Domenico, I., McVey Ward, D., Nemeth, E., Ganz, T., Corradini, E., Ferrara, F., Musci, G., Pietrangelo, A., and Kaplan, J. (2006) Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin. *Haematologica* **91**, 1092–1095
28. Pietrangelo, A. (2017) Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* **102**, 1972–1984
29. Vlasveld, L. T., and Swinkels, D. W. (2018) Loss-of-function ferroportin disease: novel mechanistic insights and unanswered questions. *Haematologica* **103**, 1753–1755
30. Fowler, P. W., Orwick-Rydmark, M., Radestock, S., Solcan, N., Dijkman, P. M., Lyons, J. A., Kwok, J., Caffrey, M., Watts, A., Forrest, L. R., and Newstead, S. (2015) Gating topology of the proton-coupled oligopeptide symporters. *Structure* **23**, 290–301
31. Solcan, N., Kwok, J., Fowler, P. W., Cameron, A. D., Drew, D., Iwata, S., and Newstead, S. (2012) Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *EMBO J.* **31**, 3411–3421
32. Latorraca, N. R., Fastman, N. M., Venkatakrishnan, A. J., Frommer, W. B., Dror, R. O., and Feng, L. (2017) Mechanism of substrate translocation in an alternating access transporter. *Cell* **169**, 96–107.e12
33. Stelzl, L. S., Fowler, P. W., Sansom, M. S. P., and Beckstein, O. (2014) Flexible gates generate occluded intermediates in the transport cycle of LacY. *J. Mol. Biol.* **426**, 735–751
34. Martens, C., Shekhar, M., Borysik, A. J., Lau, A. M., Reading, E., Tajkhorshid, E., Booth, P. J., and Politis, A. (2018) Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. *Nat. Commun.* **9**, 4151
35. Corradi, V., Sejdiu, B. I., Mesa-Galoso, H., Abdizadeh, H., Noskov, S. Y., Marrink, S. J., and Tieleman, D. P. (2019) Emerging diversity in lipid-protein interactions. *Chem. Rev.* **119**, 5775–5848
36. Majore, S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Valiante, M., Polticelli, F., Cortese, A., Di Bartolomeo, S., De Bernardo, C., De Muro, M., Faienza, F., Radio, F. C., Grammatico, P., and Musci, G. (2018) Characterization of three novel pathogenic SLC40A1 mutations and genotype/phenotype correlations in 7 Italian families with type 4 hereditary hemochromatosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1864**, 464–470
37. Wang, Y., Du, Y., Liu, G., Guo, S., Hou, B., Jiang, X., Han, B., Chang, Y., and Nie, G. (2017) Identification of novel mutations in HFE, HFE2, TFR2, and SLC40A1 genes in Chinese patients affected by hereditary hemochromatosis. *Int. J. Hematol.* **105**, 521–525
38. Callebaut, I., Joubrel, R., Pissard, S., Kannengiesser, C., Gérolami, V., Ged, C., Cadet, E., Cartault, F., Ka, C., Gourlaouen, I., Gourhant, L., Oudin, C., Goossens, M., Grandchamp, B., De Verneuil, H., Rochette, J., Férec, C., and Le Gac, G. (2014) Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4479–4490
39. Griffiths, W. J. H., Mayr, R., McFarlane, I., Hermann, M., Halsall, D. J., Zoller, H., and Cox, T. M. (2010) Clinical presentation and molecular pathophysiology of autosomal dominant hemochromatosis caused by a novel ferroportin mutation. *Hepatology* **51**, 788–795
40. Wallace, D. F., McDonald, C. J., Ostimi, L., Iser, D., Tuckfield, A., and Subramaniam, V. N. (2017) The dynamics of hepcidin-ferroportin internalization and consequences of a novel ferroportin disease mutation. *Am. J. Hematol.* **92**, 1052–1061
41. Bach, V., Remacha, A., Altés, A., Barceló, M. J., Molina, M. A., and Baiget, M. (2006) Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with two novel Ferroportin 1 mutations in Spain. *Blood Cells Mol. Dis.* **36**, 41–45
42. Cunat, S., Giansily-Blaizot, M., Bismuth, M., Blanc, F., Dereure, O., Larrey, D., Quéllec, A. L., Poudroux, P., Rose, C., Raingeard, I., Renard, E., Schved, J. F., and Aguilar-Martinez, P.; CHU Montpellier AOI 2004 Working Group. (2007) Global sequencing approach for characterizing the molecular background of hereditary iron disorders. *Clin. Chem.* **53**, 2060–2069
43. Saja, K., Bignell, P., Robson, K., and Provan, D. (2010) A novel missense mutation c.470 A>C (p.D157A) in the SLC40A1 gene as a cause of ferroportin disease in a family with hyperferritinaemia. *Br. J. Haematol.* **149**, 914–916

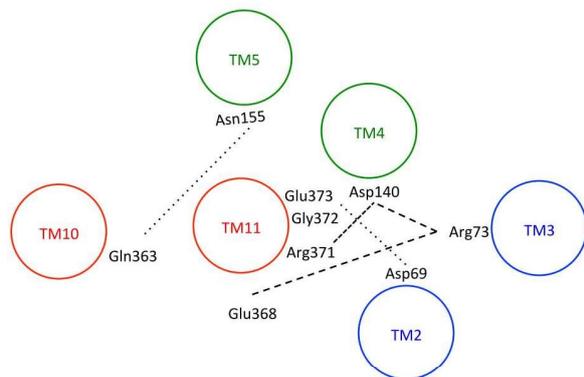
44. Muehlenberg, K., Faltermeier, N., Lohse, P., Tannapfel, A., and Pech, O. (2014) [Family with marked hyperferritinemia as a result of hemochromatosis type 4 (ferroportin disease)]. *Z. Gastroenterol.* **52**, 1075–1080
45. Hattori, A., Miyajima, H., Tomosugi, N., Tatsumi, Y., Hayashi, H., and Wakusawa, S. (2012) Clinicopathological study of Japanese patients with genetic iron overload syndromes. *Pathol. Int.* **62**, 612–618
46. Yamashita, T., Morotomi, N., Sohda, T., Hayashi, H., Yoshida, N., Ochi, K., Ohkura, I., Karita, M., Fujiwara, H., Yamashita, H., Hattori, A., and Tatsumi, Y. (2014) A male patient with ferroportin disease B and a female patient with iron overload similar to ferroportin disease B. *Clin. J. Gastroenterol.* **7**, 260–264
47. Hetet, G., Devaux, I., Soufir, N., Grandchamp, B., and Beaumont, C. (2003) Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations. *Blood* **102**, 1904–1910
48. Kaneko, Y., Miyajima, H., Piperno, A., Tomosugi, N., Hayashi, H., Morotomi, N., Tsuchida, K., Ikeda, T., Ishikawa, A., Ota, Y., Wakusawa, S., Yoshioka, K., Kono, S., Pelucchi, S., Hattori, A., Tatsumi, Y., Okada, T., and Yamagishi, M. (2010) Measurement of serum hepcidin-25 levels as a potential test for diagnosing hemochromatosis and related disorders. *J. Gastroenterol.* **45**, 1163–1171
49. Pelucchi, S., Mariani, R., Salvioni, A., Bonfadini, S., Riva, A., Bertola, F., Trombini, P., and Piperno, A. (2008) Novel mutations of the ferroportin gene (SLC40A1): analysis of 56 consecutive patients with unexplained iron overload. *Clin. Genet.* **73**, 171–178
50. Corradini, E., Montosi, G., Ferrara, F., Caleffi, A., Pignatti, E., Barelli, S., Garuti, C., and Pietrangelo, A. (2005) Lack of enterocyte iron accumulation in the ferroportin disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 315–318
51. Speletas, M., Kioumi, A., Loules, G., Hytiroglou, P., Tsitouridis, J., Christakis, J., and Germenis, A. E. (2008) Analysis of SLC40A1 gene at the mRNA level reveals rapidly the causative mutations in patients with hereditary hemochromatosis type IV. *Blood Cells Mol. Dis.* **40**, 353–359
52. Koyama, C., Wakusawa, S., Hayashi, H., Ueno, T., Suzuki, R., Yano, M., Saito, H., and Okazaki, T. (2005) A Japanese family with ferroportin disease caused by a novel mutation of SLC40A1 gene: hyperferritinemia associated with a relatively low transferrin saturation of iron. *Intern. Med.* **44**, 990–993
53. Jouanolle, A.-M., Douabin-Gicquel, V., Halimi, C., Loréal, O., Fergelot, P., Delacour, T., de Lajarte-Thirouard, A. S., Turlin, B., Le Gall, J. Y., Cadet, E., Rochette, J., David, V., and Brissot, P. (2003) Novel mutation in ferroportin 1 gene is associated with autosomal dominant iron overload. *J. Hepatol.* **39**, 286–289
54. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612

*Received for publication July 23, 2019.
Accepted for publication September 23, 2019.*

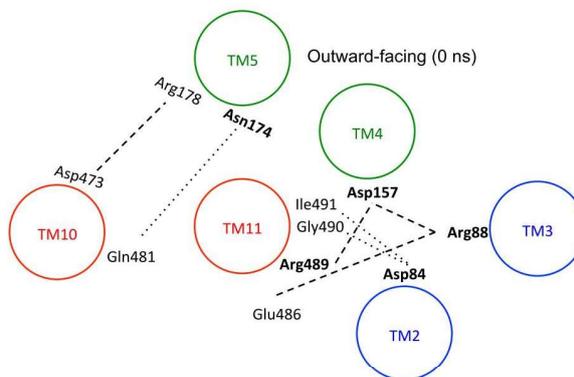
Supplementary Data

Supplemental Figure 1.

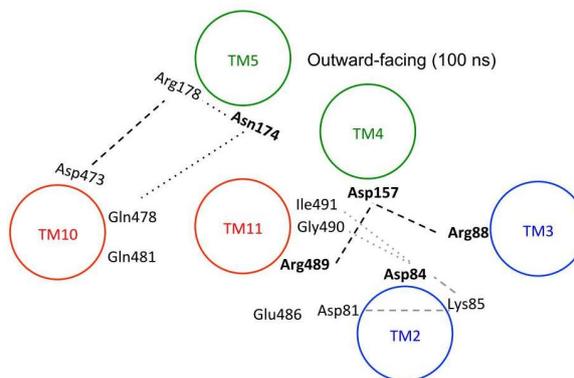
Taniguchi *et al.* (*Bdellovibrio bacteriovorus* Fpn1)



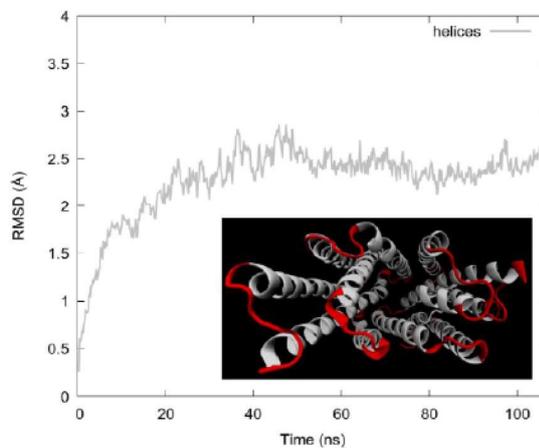
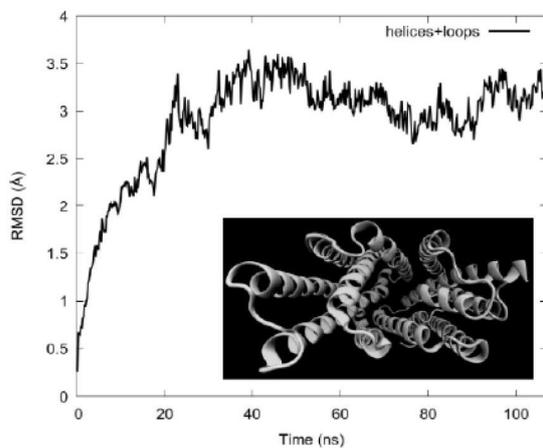
This study (human FPN1)



- Salt-bridge
- Salt-bridge (alternatively formed and broken during MD simulations)
- Hydrogen bonds
- Hydrogen bonds (alternatively formed and broken during MD simulations)



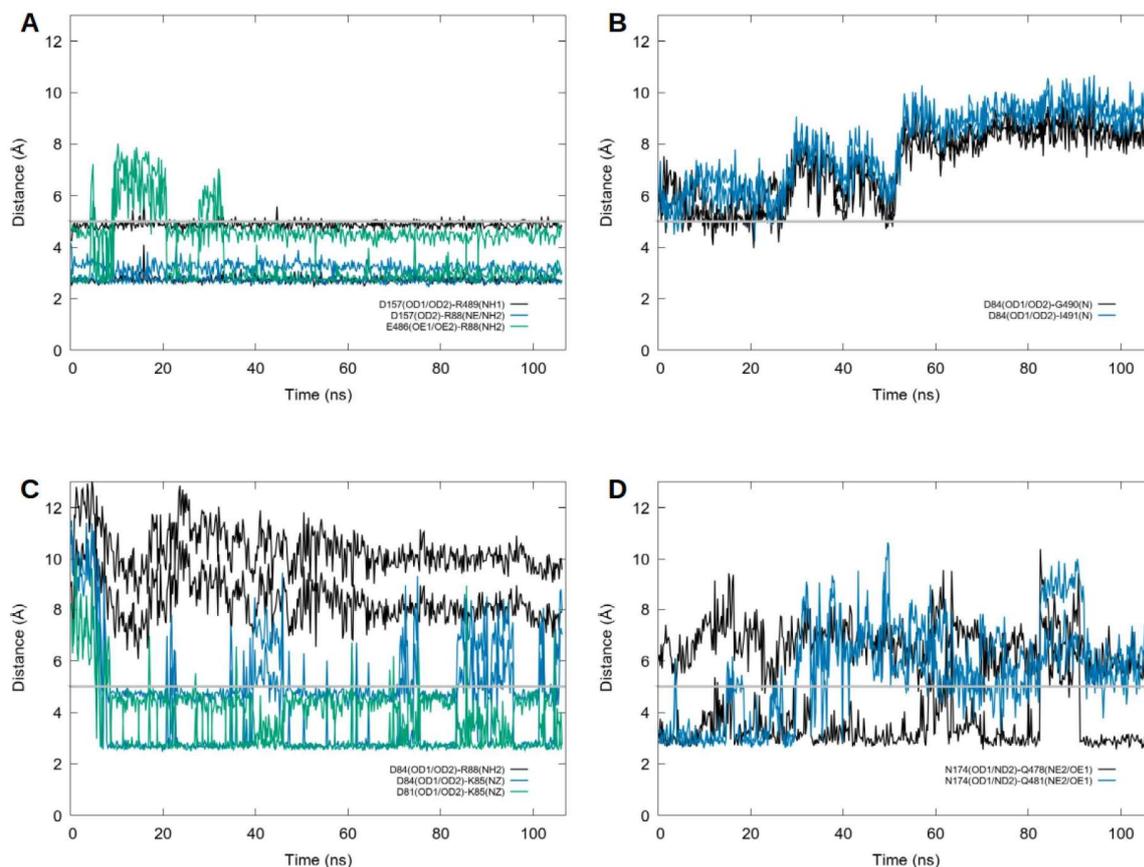
Supplemental Figure 2.



MD simulation (NaCl).

The RMSDs are calculated between the initial model and the simulation snapshots, using the backbone heavy atoms, and plotted as a function of time. In the left panel, RMSDs of the full-length model are plotted whereas in the right panel flexible loops (red regions) were discarded from the analysis.

Supplemental Figure 3.



MD simulation (CaCl²).

Distances between atoms involved or not in non-covalent bonds (hydrogen bonds or salt bridges) are plotted as a function of time during the simulation FPN1 model in presence of 70mM of CaCl².

The plots for the NaCl simulation presented in Figure 1 remain globally similar to these ones, with the following main conclusions : A. a labile (although less pronounced) salt-bridge between E486 and R88 (green line), B. an absence (more pronounced) of H-bonds between D84 and G490/I491, C. the presence of a salt-bridge network involving D81/K85 (blue) and D84/K85 (green), D. a quasi permanent H-bond (black line) between N174 and Q478 (and only occasional one between N174 and Q481, blue line).

b- Article “New insights into the step-by-step mechanism of iron export by human ferroportin and the underlying molecular basis of disease”

L'identification et la caractérisation fonctionnelle de la mutation p.Gln478Arg, affectant le « gating-residue » Gln478 nouvellement révélé, nous ont amené à poursuivre nos travaux autour de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine (Le Tertre *et al.* 2020, en cours de rédaction).

Dans ce second article, nous avons tiré profit des simulations de dynamique moléculaire, réalisées à partir du modèle de la ferroportine humaine sur un temps court de 100 ns, pour proposer l'hypothèse d'un nouveau pont salin inter-lobes entre les résidus Arg167 et Glu482. Les explorations *in vitro* ont révélé que les mutants p.Arg167Ala et p.Glu482Ala étaient bien exprimés en membrane plasmique et que seul le changement de l'acide glutamique en position 482 était péjoratif pour l'export du fer. Des simulations de dynamique moléculaire plus longues (1 μ s) ont été engagées pour essayer de comprendre la différence observée entre les deux mutants et étudier plus amplement le paysage conformationnel de la « gate » intracellulaire.

Outre le fait qu'elles nous aient permis d'observer le caractère très transitoire de ce pont salin, ces simulations plus longues ont amélioré la perception que nous avons de la dynamique des réseaux d'interactions formant la « gate » intracellulaire. D'une part, elles nous ont permis de confirmer l'importance des « gating-residues » Arg178, Asp473, Arg88 et Asp157 qui ont été observés comme établissant des interactions particulièrement stables. D'autre part, ces simulations nous ont permis d'apprécier le déplacement de certaines hélices les unes par rapport aux autres, s'opérant, en particulier, *via* des mouvements en corps rigide du lobe N-ter par rapport au lobe C-ter. Des liaisons plus transitoires, qui impliquent notamment les résidus Gln478, Arg156, Asp84 et Glu482, ont été observées et pourraient sous-tendre la dynamique d'association/dissociation des hélices transmembranaires 4/5 et 10/11. Nous avons également pu remarquer un rapprochement entre les hélices transmembranaires 7 et 10 grâce, notamment, à l'établissement d'une liaison hydrogène entre les acides aminés Asp473 et Tyr318. Ensemble, ces remaniements structuraux pourraient constituer les prémisses d'un basculement conformationnel de la ferroportine en conformation « inward-facing ».

Ci-dessous est présenté l'article, en fin de rédaction, qui relate ces travaux.

New insights into the step-by-step mechanism of iron export by human ferroportin and the underlying molecular basis of disease

Running title: FPN1 intracellular gate and pathogenic mutations

Marlène Le Tertre,^{1,2*} Ahmad Elbahnsi,^{3*} Cécile Ged,⁴ Kévin Uguen,^{1,2} Isabelle Gourlaouen,¹ Claude Férec,^{1,2,5} Chandran Ka^{1,2,6}, Gérald Le Gac^{1,2,6§}, Isabelle Callebaut^{2§}

^{*},[§]: These authors contributed equally to this work.

¹Univ Brest, Inserm, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France

²CHRU de Brest, F-29200 Brest, France

³Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, IRD, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France

⁴ Service de Biochimie-Analyses génétiques, CHU de Bordeaux, Inserm U1035, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

⁵Association Gaétan Saleün, F-29200, France

⁶Laboratory of Excellence GR-Ex, F-75015, France

Corresponding Author: Gerald Le Gac, Institut Brestois de Recherche en Bio-Santé, UFR Médecine et Sciences de la Santé, UMR1078, 22 rue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France. Tel: (+33) 2 98 01 79 69; E-mail: gerald.legac@univ-brest.fr

Abstract

Ferroportin 1 (FPN1) is the sole iron export protein reported in mammals. As a Major Facilitator Superfamily member, this protein is organized in two lobes of 6 transmembrane helices (TM) that orchestrate conformational changes between outward- (OF) and inward-facing (IF) conformations to transport iron across the lipid bilayer. We previously showed that missense mutations abolish non-covalent interactions between the N- and C-lobes, thus leading to an altered equilibrium between the OF and IF conformations and the development of ferroportin disease phenotypes. Experimental and theoretical 3D structures have accumulated recently, providing an accurate topological description of human FPN1 in its OF basal state. However, the sequential process of events that brakes intracellular interactions between the N- and C-lobes and allows the iron transporter to progress through a series of discrete states in the transition from the OF structure to the IF structure is still unknown. Based on long molecular dynamics simulations and *in vitro* functional analyses, we present here a detailed study of the dynamic network of the cytoplasmic gate involving TM4, TM5, TM10 and TM11 and a subset of key residues (Arg156, Gln478, Glu482 and Tyr318). Our results identify salt-bridges and hydrogen bonds that stabilize the OF conformation, some of which however braking to promote a relative sliding of the TM4/TM5 pair (N-lobe) against the TM10/TM11 pair (C-lobe). These concerted movements are likely to unlock the intracellular gate, opening the way towards larger conformational transitions. We interpret these findings in the context of the newly identified p.Gln478Arg missense variation and pathogenic mutations that only alter the iron export function of FPN1.

Keywords: Ferroportin disease, FPN1 intracellular gate, long-term molecular dynamics simulations, molecular mechanism of disease, molecular basis of iron export.

Introduction

Ferroportin 1 (FPN1), also referred to as the solute-carrier family 40 member 1 (SLC40A1; Uniprot #Q9NP59), is the sole iron export protein reported in mammals. It is expressed in highly specialized cells of iron metabolism, including macrophages, hepatocytes, duodenal enterocytes and placenta syncytiotrophoblasts.¹ Cell surface expression is predominantly regulated by the liver-derived peptide hepcidin,² which induces internalization and degradation of FPN1, decreasing iron delivery to plasma.³ The hepcidin-FPN1 axis plays an important role in the pathogenesis of inherited and acquired iron metabolism disorders, including iron overload diseases and iron-restricted anemia.⁴

Patients with iron overload due to loss-of-function mutations of FPN1 usually present with hyperferritinemia, low plasma iron and preferential iron accumulation in reticuloendothelial cells. This biological and histological picture is commonly referred to as ferroportin disease (FD), a clinically heterogeneous adult-onset disorder transmitted through autosomal dominant inheritance; FD was previously classified as hemochromatosis type 4A.⁵⁻⁷ What is remarkable is that, with the exception of the c.1402G>A splicing mutation and the p.Val162del single amino-acid deletion, the disease has only been associated with missense variations.⁸ Dozens of amino acid substitutions have been studied *in vitro* and associated with either a decrease in iron export or a reduction in FPN1 expression at the plasma membrane.^{9,10} However, the molecular mechanism by which missense variations lead to the failure of FPN1 to adopt functionally active conformations or trigger FPN1 misfolding is not known.

FPN1 belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS),¹¹⁻¹³ a large family of secondary active transporters that control the flow of a wide variety of molecules (nutrients, metabolites, toxins, drugs, and other substrates) into and out of the cell. Despite low sequence identities, all MFS members share a common structural architecture of two 6 transmembrane helices bundles (N-lobe: TM1-TM6; C-lobe: TM7-TM12) that interact together and orchestrate transitions between cytoplasmic (inward-facing; IF) and periplasmic (outward-facing; OF) open conformations. According to the so-called “alternative access” mechanism, the conformational transitions are accompanied by the opening and closing of molecular gates, resulting in a transporter that does not open simultaneously to the intra- and the extracellular milieu.^{14,15}

We recently provided evidence that the change of arginine 178 to glutamine in FPN1, which is one of the most frequent missense mutation reported in FD patients, represents a new category of loss-of-function mutations. This substitution abolishes a salt bridge between the N and C lobes of human FPN1, leading to a less stable OF state and, thus, to an altered

equilibrium between the OF and IF conformations.¹⁶ Using a model of the 3D structure of human FPN1 in an OF conformation, built by homology with the X-ray structure of the bacterial homolog Bd2019 determined by Taniguchi et al.,¹⁷ short molecular dynamics simulations and *in vitro* assays, we then revealed that the FPN1 intracellular gate is stabilized by non-covalent interactions (salt bridges and hydrogen bonds) between the transmembrane helices TM2, TM3, TM4 and TM11, on the one hand, and the transmembrane helices TM5 and TM10, on the other hand. We identified twelve residues (Asp81, Asp84, Lys85, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Asp473, Gln478, Arg489, Gly490, Ile491) that are critical for the inner gate structure or dynamics during the iron transport cycle, seven of which (Asp84, Arg88, Asp157, Asn174, Arg178, Arg489 and Gly490) being recurrently mutated in FD patients (Supplementary Figure 1).¹⁸ The inner gate is particularly built around two salt-bridges formed between the amino acids pairs Arg178 (TM5) - Asp473 (TM10) and Arg88 (TM3) - Asp157 (TM4), the latter amino acid also interacting with Arg489 (TM11) (Figure 1). These ion-pair interactions between the N- and C-ter lobes were also identified by Billesbølle *et al.*, who very recently solved the structure of human FPN1 at atomic resolution using cryo-electron microscopy.¹³

Herein, we characterize the newly identified p.Gln478Arg missense mutation, which changes the Gln478 gating residue (TM10) that is specific to the human FPN1 intracellular gate and was reported to form H-bonds with Asn174 (TM5),¹⁸ constituting like a second rung to the TM5-TM10 ladder in addition to the Arg178-Asp473 one (Figure 1). We take advantage of microsecond molecular dynamic (MD) simulations to highlight possible molecular switches that involve Gln478 and some other amino acids which can not be anticipated by considering only static 3D structures and shorter simulation times. Together, our results lead us to consider a sliding of the two pairs of transmembrane helices TM4/TM5 and TM10/TM11. The breaking of inter-lobe bounds and the subsequent formation of novel intra-lobe bounds orchestrate a concerted movement of the four helices, which is likely to unlock the intracellular gate. These observations shed new light on the effects of missense variations associated with FD on the structure and biology of FPN1.

Methods

Genetic analysis

Sanger sequencing was used to analyze the coding exons and intron/exon junctions of the all hemochromatosis genes (*HFE*, *HFE2*, *HAMP*, *TFR2* and *SLC40A1*); details available upon request.

Plasmid constructs

All ferroportin mutations were introduced by the QuickChange Site-Directed mutagenesis kit according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies) in the pIRES_FPN1-V5_CD8 and pcDNA3.1_FPN-V5 plasmid constructions, previously described. The full length *SLC40A1* cDNA was checked by sequencing analyses after each site-directed mutagenesis.

Culture and transfection of human epithelial kidney (HEK)293T cells

HEK293T cells, from the American Type Culture Collection, were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio). Cells were transiently transfected using JetPEI (Polypus), according to the manufacturer's instructions, and a 2:1 transfection reagent (μL)/plasmid DNA ratio (μg).

Isolation of Cell Surface Proteins and Western Blot Analysis

Membrane proteins were biotinylated and purified using the Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL). Western blot analysis was performed using a mouse monoclonal primary antibody against V5 (Invitrogen) and then a polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako) as secondary antibody. The membranes were incubated with the Immobilon Forte Western HRP substrate as directed by the manufacturer

(Merck Millipore) and digitized for pattern analysis using the GeneGnome (Syngene).

Densitometry Study

To quantitate ferroportin expression levels on the cell surface, the optic density of *SLC40A1/V5* and *HLA-A/V5* protein bands were measured from the digital images by the GeneTools software

(Syngene). Two normalizations were performed. First, the expression of ferroportin was normalized with cotransfected *HLA(A)*. Second, the expression of WT ferroportin was set as 100%, and the expression of ferroportin variants was normalized to the expression of WT ferroportin.

Flow cytometry experiments

Flow cytometry experiments were lead as previously described. Cells were analyzed using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and the Flowlogic software (Miltenyi Biotec). Events were gating as previously explained.

Intracellular ⁵⁵Fe measurements

⁵⁵Fe loading of human apotransferrin was performed as previously described (Ka *et al*, 2005). HEK293T cells (1.7×10^5 cells per well in 12-well plates) were transfected with wild-type or mutated pcDNA3.1_FPN-V5 constructs for 24h, before being cultured in Pro293a-CDM serum-free medium (Biowhittaker) and preloaded with 20 μ g/mL ⁵⁵Fe-transferrin for 16h. Each pcDNA3.1_FPN-V5 construct was co-delivered with the pSV- β -Galactosidase vector (Promega). Cells were harvested with trypsin, mixed with liquid scintillation fluid (Ultima Gold MV, Perkin Elmer) and counted for 2 min in a TRI-CARB 1600 CA scintillation counter (Perkin Elmer). ⁵⁵Fe radioactivity was normalized on total protein content and β - GAL activity.

Modelling and molecular dynamics simulations

A model of the 3D structure of the human FPN1 in its outward-facing state,¹⁸ based on the experimental 3D structure of BbFnp (Protein Data Bank 5AYM) and on the sequence alignment reported by Taniguchi and collaborators,¹⁷ was used here as a starting structure for molecular dynamics (MD) simulations. The wild type and mutants (Q478R, Q478A, E482A, R156A and R167A) were prepared using the CHARMM-GUI server.²⁰ The models were embedded in a 1-palmytoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) bilayer and solvated in a 150 mM NaCl solution. The CHARMM36 force field was used for the protein, lipids and ions, and the TIP3P model for water.²¹

Minimization, equilibration and production steps were performed on the occigen/cines supercomputer using Gromacs 2019.1.²¹ The standard CHARMM-GUI inputs were used for the minimization and equilibration of the systems. During these steps, harmonic restraints applied to the protein heavy atoms and the lipid heads and were gradually released during 1.2 ns. The production dynamics were then performed in the NPT ensemble without any restraints. Nose-Hoover thermostat and Parrinello-Rahman barostat to keep the temperature and the pressure constant at 310 K and 1 bar.^{22,23} Periodic boundary conditions were used and the particle mesh ewald algorithm was applied to treat long-range electrostatic interactions.²⁴ A switching function was applied between 10 and 12 Å for the non-bonded interactions. LINCS was applied to constrain the bond lengths involving hydrogen atoms.²⁵ The integration timestep was set to 2 fs and the overall length of the trajectories was 1 μ s for each system. Analysis of MD simulations was made by following RMSD (Supplementary

Figure 2), as well as measuring distances between critical residues. RMSD on 367 C α atoms: 1.9 Å.

We furthermore conducted an additional 1 μ s MD simulation with the experimental 3D structure of human FPN1 in an apo-state (pdb 6W4S) in the same conditions as described above.

Statistical analysis

Data are presented as mean (column bars) with standard deviation. Comparisons used two-tailed Student t-test.

Results

Clinical data and Molecular genetics results

The patient was a 45-year-old man of French origin. He was referred to a gastroenterology unit because of unexplained hyperferritinemia. There was no history of hematological disease, blood transfusions or excess iron intake. Serology for hepatitis B and C virus infection was negative. The patient denied any history of alcohol abuse (alcohol intake <40g/day). He was not suspected of metabolic syndrome since his body mass index was 21.2 kg/m², his blood pressure was normal and his serum triglyceride and HDL cholesterol levels were within normal ranges. At diagnosis, serum ferritin was 1200 µg/L and transferrin saturation was 14%. The patient had moderately elevated liver enzymes (aspartate aminotransferase: 52 UI/L; alanine aminotransferase: 69 UI/L; gamma-glutamyl transferase: 69 UI/L). He also showed a slight increase in fasting blood glucose (6.7 mmol/L; normal range: 4.0-6.1), while hemoglobin A1c was right underneath the upper reference limit (5.9%; upper reference limit = 6.0). This was rapidly corrected by a reduction in calories and the discontinuation of energetic nutriment, which were regularly used by the patient due to intensive sport activity. Abdominal Magnetic Resonance Imaging revealed a reduction in the signal intensity of the liver, consistent with a significant hepatic iron overload (Hepatic Iron Concentration estimated at 160 µmol/g). Liver rigidity measurements (5.0, 6.1 and 4.8 kPa, respectively over a 31 months period) using Fibroscan were all under the considered cut-off level for significant fibrosis (7.1 kPa)²⁶.

Sanger sequencing of the all hemochromatosis genes identified a novel A>G transition at position 1433 of the *SLC40A1* coding region (c.1433 A>G; NM_014585.5), which changes glutamine 478 to arginine (p.Gln478Arg). This novel missense variation, which was detected at the heterozygous state (Supplementary Figure 3), is not referenced in the following international databases: gnomAD (Genome Aggregation Database), ExAC (Exome Aggregation Consortium) and HGMD (Human Gene Mutation Database). Furthermore, it is absent in FREX (French Exome Project; <http://lysine.univ-brest.fr/FrExAC/>), meaning that frequency of the c.1433G allele in the French population is estimated at 0.0009 on Wald's method (not detected on the 1148 tested chromosomes).

Functional characterisation of the FPN1 p.Gln478Arg missense variation

The functional significance of the p.Gln478Arg variant was investigated in HEK293T cells as we have done previously for a total of 34 *SLC40A1* missense variations^{10,11,27}. As shown in Figure 2, the p.Gln478Arg variant did not properly reach the plasma membrane. The reduction in cell surface expression was similar to that of the well known p.Val162del loss-of-

function mutation²⁸⁻³¹. Accordingly, the p.Gln478Arg variant was not able to export iron in amounts comparable with wild type FPN1.

Roles of Gln478 and neighbouring amino acids as predicted from short MD simulations

We previously built a model of the 3D structure of human FPN1 considering the sequence alignment reported by Taniguchi *et al.*¹² and, as template, the experimental 3D structure of Bd2019 (now referred to as BbFpn) in an outward-facing conformation.¹⁰ Based on this model, which was then refined by short MD simulations,¹⁸ we reported non-covalent interactions between transmembrane helices 5 and 10 (salt-bridge between Arg178 and Asp473 and hydrogen bonds between Gln478 and Asn174; Figure 1). These interactions are part of the intracellular gate, which is formed by two networks of charged residues and is considered critical for stabilizing FPN1 in its basal state.^{18,32} We also previously investigated the p.Arg178Gln, p.Asp473Ala, p.Asn174Ile and p.Gln478Ala mutants, which were found to reduce iron export while being correctly expressed at the cell surface.¹⁸ Identification of the novel p.Gln478Arg causative mutation and observation of different functional effects led us to go for further investigations of the cytoplasmic TM5-TM10 network.

We assumed that Arg167 forms another salt-bridge with Glu482, thus establishing a third rung to the TM5-TM10 ladder (Figure 1). To test this new hypothesis, we individually mutagenized arginine 167 and glutamic acid 482 to alanine. For these mutagenesis experiments, we considered a bicistronic construct, which was previously used to evaluate the concurrent plasma membrane expression of FPN1 (conjugated with a V5 epitope) and cluster of differentiation 8 (CD8) on flow cytometry.¹⁸ Taking into account the level of CD8 in HEK293T cells, which do not normally express this membrane protein, enabled correction for differences in transfection efficiency between samples. The p.Val162del and p.Gln478Arg loss-of-function mutants (also evaluated by western blot and densitometry in Figure 2) were used as negative controls, as well as the p.Glu478Ala mutant. Important differences were observed in the proportions of FPN1-WT+/CD8+ and FPN1-Val162del+/CD8+ and FPN1-Gln478Arg+/CD8+ cells ($p < 0.001$), confirming that the p.Val162del and p.Gln478Arg mutants cause ferroportin 1 mislocalization (Figure 3A). The two p.Arg167Ala and p.Glu482Ala variants reached the plasma membrane correctly. As shown in Figure 3B, they were only differentiated by the iron export function. Indeed, the p.Glu482Ala variant was related to a loss of FPN1 function whereas the p.Arg167Ala variant was found to export iron in levels similar to the wild-type protein.

During the completion of this work, a cryo-electron microscopy 3D structure of human FPN1 was published in an outward-facing conformation.¹³ We compared our 3D model of the human FPN1 structure to this experimental structure and found that the two static structures

well superimposed, with highly similar positions of amino acids participating in the inner gate (Supplementary Figure 4 and Figure 4 - 3D structures before any MD simulation shown in the top and middle panels). In particular, we observed interactions between Asn174 and Gln481 and between Arg167 and Glu482. The Asn174-Gln478 interaction was observed only after MD refinement of our 3D model. The importance of the latter rather than the former interaction was supported by site-directed mutagenesis showing a non-critical effect of the Gln481Ala mutation.¹⁸ This prompted us to perform longer MD simulations in order to better understand the dynamics of the two networks participating in the intracellular gate and the different behaviour of the p.Glu482Ala and p.Arg167Ala variants.

Long Molecular Dynamics investigation of the human FPN1 intracellular gate

We performed two runs of 1 μ s MD simulations on the wild type protein in an explicit membrane environment (see the Material and Methods section). We first considered our previous 3D model of human FPN1 in an OF conformation, made on the basis of the BbFpn experimental structure. In light of the recent publication by Billesbølle *et al.*,¹³ we then considered the experimental 3D structure of human apo-FPN1.

The experimental structure of human apo-FPN1 appeared to be very stable, as illustrated by an ensemble of distances between amino acids participating in the inner gate (Figure 4; far right and left top panels). This is consistent with the results of simulations performed on the experimental 3D structure of BbFpn in the OF conformation,³² as well as simulations performed on other MFS transporters in the same conformation.³³ Indeed, equilibrium, all-atom MD simulations did generally not yield to observe transition towards another conformational state, which would require longer times, use of advanced methods of simulation or specific signals.³⁴ Conversely, we observed with our 3D model an evolution of the cytoplasmic gate network, which leads to a slight sliding of TM10-TM11 against TM5-TM4 through a rigid body movement of the two N- and C-domains, consistent with the trajectories presumed to occur in the conformational transitions leading to the IF state (Figure 4; top-middle versus bottom panels).

Gating behavior of the wild type protein

We first analysed the TM5-TM10 network (Figure 4- bottom panel, left). As appreciated by inter-residue distances monitored along the MD simulations and illustrated with the 3D structure observed after 1 μ s MD simulation, the Arg178-Asp473 bond (black line) is reinforced and particularly stable, with an additional H-bond occurring between Asp473 and Tyr318 (grey line), whereas bonds of the Gln478 side chain appeared to shift from Asn174 (purple line) to Glu482 (blue line). In contrast, Arg167 appeared to only interact

with the Glu482 side chain in the first part of the MD simulation (<10 %, red line). The importance of Glu482 thus likely comes from its interaction potential with Gln478, rather than with Arg167. Altogether, these observations highlighted the critical role of Gln478 at the centre of a dynamic network involving, on the one hand, Asn174 and, on the other hand, Glu482, both amino acids for which we demonstrated the critical role at the experimental level. The importance of the Tyr318 residue was further confirmed by *in vitro* assays showing a strong negative effect of p.Tyr318Ala substitution on the iron export function despite a conserved expression of FPN1 at the cell surface (Figure 3 C-D).

Looking at the TM2-TM3-TM4-TM11 network (Figure 4- bottom panel, right), we revealed an evolving landscape characterized by the loss of interaction between Asp157 (TM4) and Arg489 (TM11) (see Figure 4, middle panel as a reference for the initial situation) and the appearance of a salt-bridge between Arg156 (TM4) and Asp84 (TM2) (black line), correlated to the sliding of the two TM pairs against each other. This new interaction comes in support to the nearby and previously identified Asp157 (TM4)-Arg88 (TM3) stable salt-bridge (red line).¹⁸ In fact, the pivotal loss of the Asp157-Arg489 bond appears to be the founding event in the remodelling of the TM2-TM3-TM4-TM11 network, followed by substantial change in the TM5-TM10 network. Functional evaluations showed a strong negative effect of p.Arg156Ala substitution on the iron export function despite a relatively conserved expression of FPN1 at the cell surface (Figure 3 E-F); expression of the p.Arg156Ala mutant differed significantly from the wild type protein ($p < 0.05$), but the difference was low and similar to that of the previously investigated p.Asp84Ala mutant.¹⁸

Perturbation of the cytoplasmic networks upon mutations

To further support the critical roles of Gln478, Glu482, Arg156 and Tyr318 in intra- and inter-domain interactions within the intracellular gate, we also performed MD simulations over 1 μ s on the mutated proteins.

The change of glutamine 478 to alanine led to a dramatic instability of the critical Arg178-Asp473 salt-bridge (black line), whereas mutations of amino acids interacting with this pivotal actor of the TM5-TM10 network (namely p.Glu482Ala and p.Arg156Ala) were associated with a more fluctuating Arg178-Asp473 ionic interaction than in the wild-type situation. It can be emphasized that the p.Arg156Ala substitution modifies a TM4 residue which interacts with the TM5-TM10 network in the OF conformation before the sliding event observed through the MD simulation (details of the MD simulations are given in the Supplementary Figure 5). The loss of the Arg178-Asp473 salt-bridge was also evident in the p.Gln478Arg MD simulation. An additional deleterious effect was predicted for this newly identified pathogenic variant, in which the charged groups of the arginine, exposed to lipids,

are likely to disturb the stability of the protein in the plasma membrane (Supplementary Figure 6A). In contrast, consistent with the *in vitro* assays which did not reveal any reduction of the iron export function (Figure 3B), a quite stable network of critical bonds (similar to that found in the WT situation) was observed around the two critical salt bridges (Arg178-Asp473 and Asp157-Arg88) in the Arg167Ala MD simulation (Supplementary Figure 6B).

Altogether, these results suggest that the inner gate is controlled by two major and stable salt-bridges (Arg178-Asp473 and Arg88-Asp157), regulated by a dynamic balance between the TM5-TM10 and TM4-TM11, in which Gln478 play a key role together with the newly highlighted Arg167, Tyr318 and Glu482.

Discussion

In recent years, decisive progress has been made toward a better understanding of the molecular mechanisms related to iron export of FPN1, a member of the major facilitator superfamily. Taniguchi *et al.* first identified Bd2019 (now referred to as BbFpn) as a bacterial iron transporter, with 24% sequence identity and 40% similarity with human FPN1. The authors solved BbFpn X-ray structures in both the outward- and inward-facing states conformations, with pointing the particular feature of transmembrane (TM) helix 7 that is interrupted by a short non-helical stretch of 6 residues (resulting in a long TM7a and a short TM7b transmembrane helices), while identifying a putative Fe²⁺-binding site in a pocket buried within the N-ter lobe. They also revealed hydrophobic and charged residues that form inter- and intra-lobe interactions on the peri- and cytoplasmic sides of the plasma membrane, respectively, thus stabilizing the inward-facing (IF) and outward-facing (OF) conformations.¹⁷ Deshpande *et al.* then reported the crystal structure of Ca²⁺-bound BbFpn in an IF conformation and argued that human FPN1 iron transport activity is dependent on extracellular Ca²⁺, which was proposed to bind in the N-ter lobe pocket, while Fe²⁺ should be in the C-ter lobe, at the level of the TM7 interruption. The authors proposed an alternative-access mechanism, which is characteristic of the MFS proteins and relies on various conformational states ranging from OF to IF.³⁵ Billesbølle *et al.* very recently reported the first experimental structures of human FPN1, obtained through cryo-electron microscopy of the protein in lipid nanodiscs. The authors settled the question of the Fe²⁺ binding site(s) by highlighting the presence of metal in both the the N- and C-ter domain, further revealing the coordinating function of Asp325 (TM7b), Asp504 (TM11) and His507 (TM11) in the second site and the coupling with hepcidin binding.¹³ All of these findings may lead to a better understanding of the pathological mechanisms underlying functional impairment in FD.

The alternative access model first proposed to account for the transport cycle of MFS proteins has evolved in recent years. The OF conformation can be converted to an IF conformation by concerted conformational changes of the two lobes over a rotation axis that crosses a central-binding site and involves occluded intermediates, and *vice versa* (IF to OF). The transitions between the different states involve not only rigid-body rotations, in accordance with the “rocker-switch” model, but also structural changes in individual transmembrane helices. In the more recent and so-called “clamp-and-switch” model, it has been suggested that occlusion of the binding site from the cytoplasmic side is mainly achieved through bending of the cytoplasmic ends of helices TM4 and TM10, and occasionally the flanking helices TM5 and TM11, whereas occlusion from the extracellular side is mainly achieved through bending of the extracellular ends of helices TM1 and TM7 and flanking TM2 and TM8 helices. The conformational transitions are orchestrated by the

formation and disruption of non-covalent inter- and intra-domain interactions, among which salt bridges are identified as particularly important. This provides a more complete picture of the gating topology of MFS transporters.^{14,15}

It is worth mentioning that variations exist between MFS transporters and between species for a considered MFS member. This applies to FPN1 whose OF conformation within the lipid bilayer is stabilized by salt bridges and hydrogen bonds with charged and polar residues, some of which are specific to either human or bacterial protein.^{12,18,32} Here, we provide further evidence of the importance of such residues not only for the stabilization of FPN1, but also probably for the dynamic behavior of the gate, which is likely critical for switching towards the IF conformation upon appropriate signals. We indeed highlighted, from analysis of MD simulations performed with our model of the human FPN1 OF conformation, remodeling of the inter-lobe network, giving rise to a relative sliding of the lobes against each other and an associated unlocking of the gate, which may represent a founding event for larger conformational transitions. This slight “unlocking” of the cytoplasmic gate, which is not observed in the MD simulation with the cryo-EM 3D structure, may be due to the stochasticity of the dynamics or to the intrinsically less stable structure of the model, due to slight conformational differences between the BbFpn and human ferroportin 3D structures at the level of the short non-helical segment interrupting TM7. Additional MD simulations, in presence of anions and/or specific lipids (see below), should be performed in order to support the relevance of the present unlocking in the whole transition towards the IF state.

The newly identified non-covalent interactions involve inner residues that are responsible for important structural and functional outcomes if mutated. This is well demonstrated with the p.Gln478Arg missense mutation that we identified in a 45-year-old man of European descent with characteristic signs of FD, namely: serum ferritin >1000 µg/L, hepatic iron overload and low plasma iron. We previously reported that the Gln478 residue (TM10) forms hydrogen bonds with Asn174 (TM5), thus being involved in the stabilization of the FPN1 OF conformation. Based on long-MD simulations performed with a model of the human ferroportin 3D structure, we here reveal that Gln478 shifts toward the Glu482 residue (TM10) to form a new intra-lobe interaction. This shift appears correlated to loss of other inter-lobe bonds, such as that linking Arg489 to Asp157, and appearance of intra-lobe bonds, such as between Arg156 and Asp84, and to the associated sliding of the N- and C-lobe against each other. This likely contributes to unlock the intracellular gate, leading to a less stable association of helices TM10 and TM11 (C-ter lobe) with helices TM4 and TM5 (N-ter lobe), which could represent a first step in the conformational transition toward the IF state. The change of glutamine 478 (TM10) by an alanine prevents the establishment of hydrogen bonds with asparagine 174 (TM5), with also limiting the formation of a salt bridge between

aspartic acid 473 (TM10) and arginine 178 (TM5). However, it has no effect on the key Arg88 (TM3) - Asp157 (TM4) - Arg489 (TM11) network. This correlates with a decrease in the ability of FPN1 to export iron, with no change in the expression of the iron exporter on the cell surface (Figure 3). The p.Gln478Arg mutant reproduces the structural effects attributed to the p.Gln478Ala mutant, but it also favours the aberrant displacement of TM11 towards TM3 and TM2. This is likely to decrease the stability and abundance of FPN1 in the plasma membrane, in accordance with the experimental results presented in Figures 2 and 3A.

Another important aspect of the MFS biology is to understand how the transporters manage to overcome energy barriers and organize molecular switches within the lipid bilayer. This has only been studied in a few MFS transporters. With regard to the iron exporter, one may consider that Tortosa *et al.* reached an important starting point. The authors very recently investigated the IF and OF structures of BbFpn with and without an excess of iron ions to explore the relationship between the protein's dynamics and the ligand recognition mechanism. They provided evidences that the OF conformation of BbFpn with no iron represents an energetically most-favorable arrangement.³² Considering the OF conformation as a basal state and taking into account structural and experimental information derived from plasma membrane proteins,³⁶⁻³⁸ it can be assumed that FPN1 conformational dynamics is regulated by lipid-interactions and that the two intracellular networks of charged and polar residues forming the inner gate are key players of this regulation. As a recent example, Martens *et al.* provided solid evidences of direct interaction between two acidic residues of the intracellular gate of the MFS-related Xyle sugar transporter and the amine headgroup of phosphatidylethanolamine (PE). The authors proposed an updated alternative access mechanism where the motion of PE inside the Xyle transporter favors inward opening by disturbing the cytoplasmic charge networks.³⁹ It remains to be seen whether such lipid-protein interactions, which involve charged residues and phospholipids, contribute to the iron transport cycle.

Figure legends

Figure 1. View of the 3D model of human FPN1 in an outward-facing conformation, made on the basis of BbFpn experimental structure. The picture focuses on transmembrane helices 4, 5 (in green) and 10, 11 (in red) and salt-bridges, which are part of the intracellular gate, as well as on additional H-bonds linking TM5 and TM10.

Figure 2. Effect of the p.Gln478Arg FPN1 variant on cell surface expression and intracellular iron accumulation. (A) HEK293T cells were transiently co-transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His (WT or variant) and pcDNA3.1-HLA-A-V5-His vectors. Human leukocyte antigen (HLA)-A was used as a control and as a standard for normalization, being a cell-surface protein with no known role in iron metabolism. Cell-surface proteins were selectively purified 48 h after transfection and analyzed by Western blotting using a peroxidase-conjugated mouse anti-V5 antibody. Densitometric scans of FPN1 levels (normalized to HLA-A) are shown in the lower part of the figure. The error bars represent the standard deviation of 3 independent experiments. (B) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24h00, and then fed with 20 $\mu\text{g/mL}$ ^{55}Fe -transferrin for 16h. Cells were then washed, and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -Gal activity. Empty vector (No FPN) samples taken as 100% values generally achieved 900 – 2,200 cpm. Each bar represents the mean \pm standard deviation of 5 independent experiments. P values were calculated on Student t-test; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with wild type FPN1.

Figure 3. Effect on cell-surface expression and iron export of alanine substitutions for amino acids predicted to be involved in interactions between the N- and the C-lobe of human ferroportin 1 in the outward-facing state.

(A-C-E) HEK293T cells were transiently transfected with the bicistronic pIRES2 plasmid encoding both full-length human ferroportin 1 and the cluster of differentiation antigen 8 (CD8). A 14-amino-acid V5 epitope (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) was inserted in the fifth extracellular loop (ES5) of FPN1 to allow plasma membrane detection. After 36h, cells were double-stained for CD8 (APC) and the FPN1-V5 fusion protein (FITC) and analyzed by 2-color flow cytometry. Data are presented as percentage of FPN1-positive over CD8-positive events. Each bar represents the mean \pm standard deviation of 5 independent experiments. P values were calculated on Student t-test; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$. (B-D-F) HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1-FPN1-V5-His vectors, grown for 24h00, and then fed with 20 $\mu\text{g/mL}$ ^{55}Fe -transferrin for 16h. Cells were then washed, and counted. Counts per minute (cpm) were normalized by total protein and β -Gal activity. Each bar represents the mean \pm standard deviation of 5

independent experiments. P values were calculated on Student t-test; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with wild type FPN1.

Figure 4. Fluctuations, along MD simulations of the wild-type (WT) FPN1 (Experimental 3D structure – top panel, model of the 3D structure – bottom panels), of the minimum donor-acceptor distances between atoms involved in non-covalent bonds. Distances were plotted using gnuplot as a function of trajectory time (from 0 to 1000 ns). The considered pairs are at left: R178-D473 (black line), Y318-D473 (grey line), N174-Q478 (purple line), E482-Q478 (blue line) and R167-E482 (red line), at right: R156-D84 (black line), R156-Q481 (blue line) and D157-R88 (red line). At the center of the figure are shown views of the initial 3D structures (model and cryo-EM 3D structure) and last frame (model) of the MD simulations (after 1 μ s), illustrating non-covalent bonds which are formed between the amino acids and followed along the whole MD simulations by distance monitoring.

Supplementary Figure 1. Ribbon representation of the model of the 3D structure of human FPN1 in its OF conformation, highlighting residues that were defined as critical for the inner gate structure or dynamics during the iron transport cycle.¹⁸ These amino acids are shown in details at right, with amino acids recurrently mutated in FD patients highlighted in red boxes.

Supplementary Figure 2. The C α root-mean-square distance (RMSD) of the protein with respect to the initial FPN1 model stays stable during all the simulations, indicating an overall stability in the OF conformation.

Supplementary Figure 3. Sequencing electropherogram showing the mutated *SLC40A1* exon X forward heterozygous sequence. Position of the c.1433A>G nucleotide change is indicated by the arrow.

Supplementary Figure 4. Superimposition of the 3D structures of human FPN1, as modeled starting from the BbFPN1 3D structure (pink) and as observed by cryo-EM (brown). A) Global view of the 3D structures, from the cytoplasmic gate, B and C) Focus of the two networks of interacting amino acids.

Supplementary Figure 5. Fluctuations, along MD simulations of the wild-type (WT) and mutated FPN1, of the minimum donor-acceptor distances between atoms involved in non-covalent bonds. Distances were plotted using gnuplot as a function of trajectory time (from 0 to 1000 ns). The considered pairs are at left: R178-D473 (black line), Y318-D473 (grey line), N174-Q478 (purple line), E482-Q478 (blue line) and R167-E482 (red line), at right: R156-D84 (black line), R156-Q481 (blue line) and D157-R88 (red line). At the center of the figure are shown views of the last frames of the MD simulations (after 1 μ s), illustrating non-

covalent bonds which are formed between the amino acids and followed along the whole MD simulations by distance monitoring.

Supplementary Figure 6. Analysis of the MD simulations of (A) p.Gln478Arg and (B) p.Arg167Ala FPN1

References

1. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1(3):191–200.
2. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306(5704):2090–2093.
3. Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 2015;22(5):777–787.
4. Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Heparin in the diagnosis of iron disorders. *Blood.* 2016;127(23):2809–2813.
5. Pietrangeli A. The ferroportin disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2004;32(1):131–138.
6. Cremonesi L, Cemonesi L, Forni GL, et al. Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *Br. J. Haematol.* 2005;131(5):663–670.
7. Piperno A, Pelucchi S, Mariani R. Inherited iron overload disorders. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 2020;5:25.
8. Vlasveld LT, Janssen R, Bardou-Jacquet E, et al. Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features. *Pharm. Basel Switz.* 2019;12(3):.
9. Vlasveld LT, Swinkels DW. Loss-of-function ferroportin disease: novel mechanistic insights and unanswered questions. *Haematologica.* 2018;103(11):1753–1755.
10. Ka C, Guellec J, Pepermans X, et al. The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica.* 2018;
11. Le Gac G, Ka C, Joubrel R, et al. Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum. Mutat.* 2013;34(10):1371–1380.
12. Taniguchi R, Kato HE, Font J, et al. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat. Commun.* 2015;6:8545.
13. Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature.* 2020;
14. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17(2):123–132.
15. Fowler PW, Orwick-Rydmark M, Radestock S, et al. Gating topology of the proton-coupled oligopeptide symporters. *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2015;23(2):290–301.
16. Ka C, Guellec J, Pepermans X, et al. The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica.* 2018;103(11):1796–1805.
17. Taniguchi R, Kato HE, Font J, et al. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat. Commun.* 2015;6:8545.
18. Guellec J, Elbahnsi A, Le Tertre M, et al. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2019;33(12):14625–14635.

19. Ka C, Le Gac G, Dupradeau F-Y, Rochette J, Férec C. The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for the mutated 282Y HFE protein. *Hum. Genet.* 2005;117(5):467–475.
20. Jo S, Cheng X, Lee J, et al. CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. *J. Comput. Chem.* 2017;38(15):1114–1124.
21. Kasimova MA, Tewari D, Cowgill JB, et al. Helix breaking transition in the S4 of HCN channel is critical for hyperpolarization-dependent gating. *eLife.* 2019;8:.
22. Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 1984;52(2):255–268.
23. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 1981;52(12):7182–7190.
24. Darden TA, Pedersen LG. Molecular modeling: an experimental tool. *Environ. Health Perspect.* 1993;101(5):410–412.
25. Hess B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 2008;4(1):116–122.
26. Adhoute X, Foucher J, Laharie D, et al. Diagnosis of liver fibrosis using FibroScan and other noninvasive methods in patients with hemochromatosis: a prospective study. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2008;32(2):180–187.
27. Callebaut I, Joubrel R, Pissard S, et al. Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(17):4479–4490.
28. Zoller H, McFarlane I, Theurl I, et al. Primary iron overload with inappropriate hepcidin expression in V162del ferroportin disease. *Hepatol. Baltim. Md.* 2005;42(2):466–472.
29. Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, et al. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood.* 2002;100(2):692–694.
30. Lim FL, Dooley JS, Roques AW, et al. Hepatic iron concentration, fibrosis and response to venesection associated with the A77D and V162del “loss of function” mutations in ferroportin disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2008;40(3):328–333.
31. Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, et al. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood.* 2005;105(10):4096–4102.
32. Tortosa V, Bonaccorsi di Patti MC, Iacovelli F, et al. Dynamical Behavior of the Human Ferroportin Homologue from *Bdellovibrio bacteriovorus*: Insight into the Ligand Recognition Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(18):.
33. Immadisetty K, Hettige J, Moradi M. What Can and Cannot Be Learned from Molecular Dynamics Simulations of Bacterial Proton-Coupled Oligopeptide Transporter GkPOT? *J. Phys. Chem. B.* 2017;121(15):3644–3656.
34. Li J, Wen P-C, Moradi M, Tajkhorshid E. Computational characterization of structural dynamics underlying function in active membrane transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015;31:96–105.
35. Deshpande CN, Ruwe TA, Shawki A, et al. Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat. Commun.* 2018;9(1):3075.
36. Cong X, Liu Y, Liu W, Liang X, Laganowsky A. Allosteric modulation of protein-protein interactions by individual lipid binding events. *Nat. Commun.* 2017;8(1):2203.
37. Corradi V, Sejdiu BI, Mesa-Galoso H, et al. Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions. *Chem. Rev.* 2019;119(9):5775–5848.
38. Conrard L, Tyteca D. Regulation of Membrane Calcium Transport Proteins by the Surrounding Lipid Environment. *Biomolecules.* 2019;9(10):.
39. Martens C, Shekhar M, Borysik AJ, et al. Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. *Nat. Commun.* 2018;9(1):4151.

Figure 1

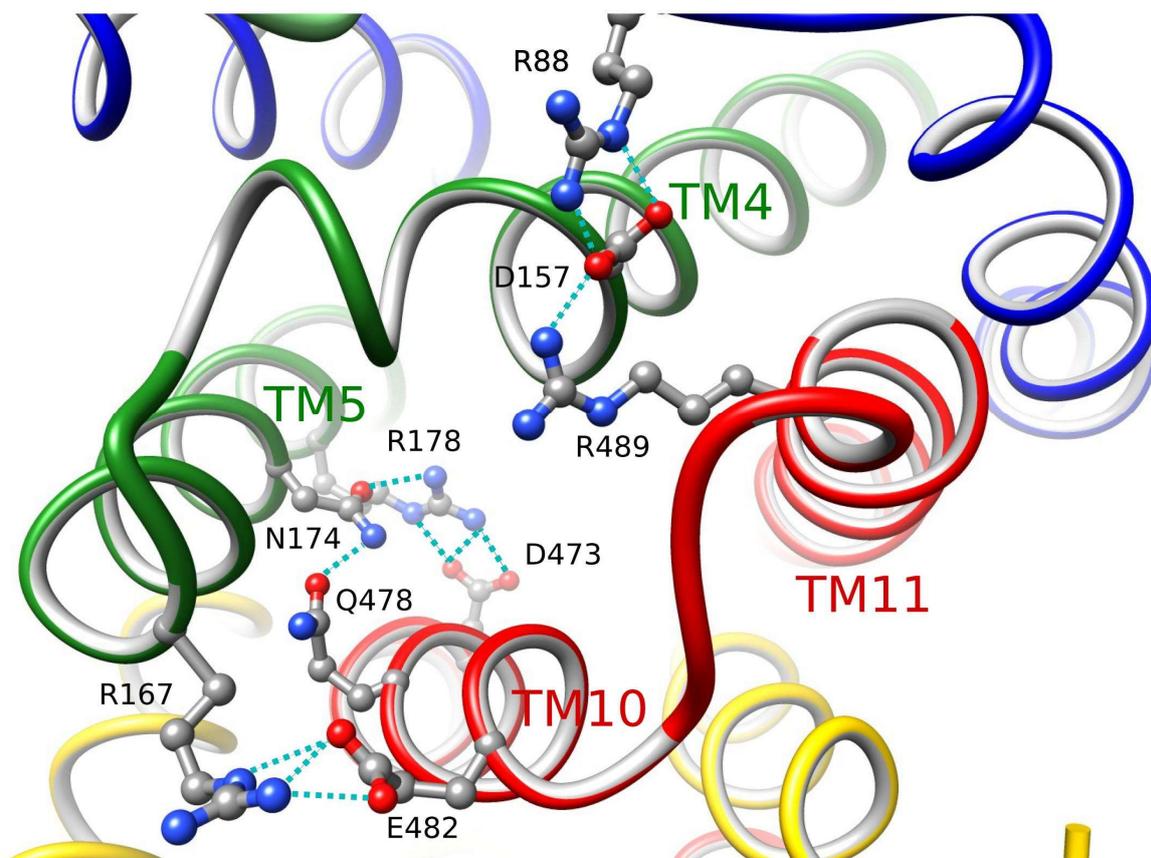
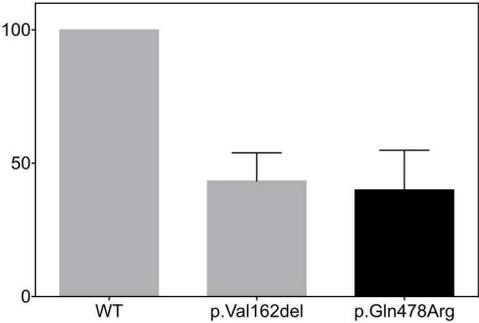
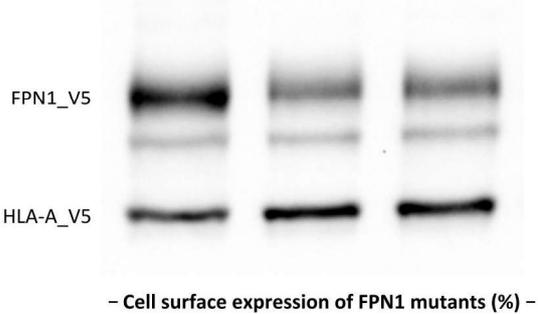


Figure 2.

A



B

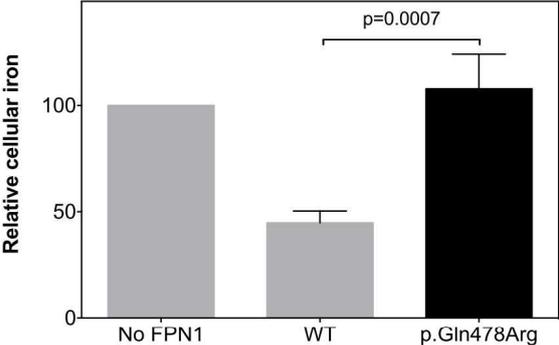


Figure 3.

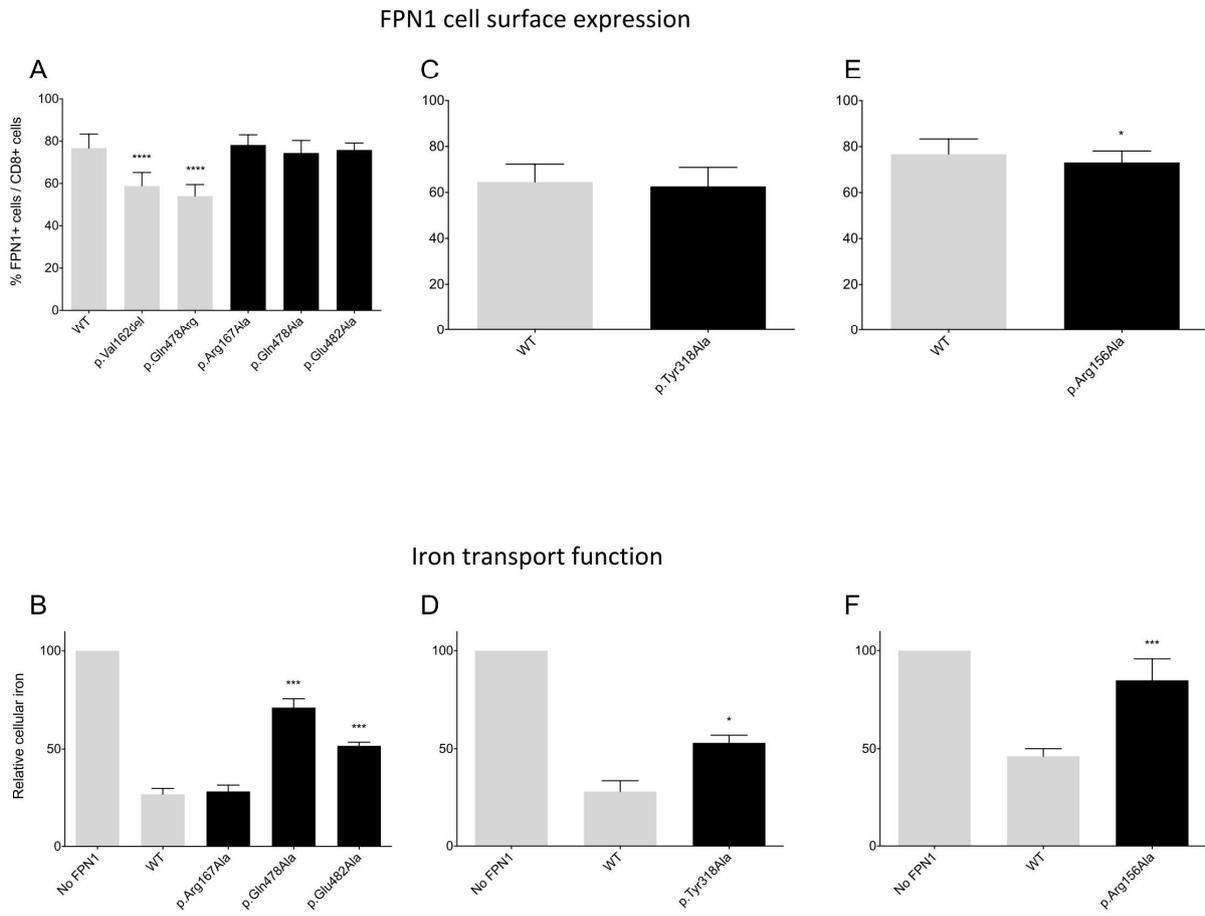
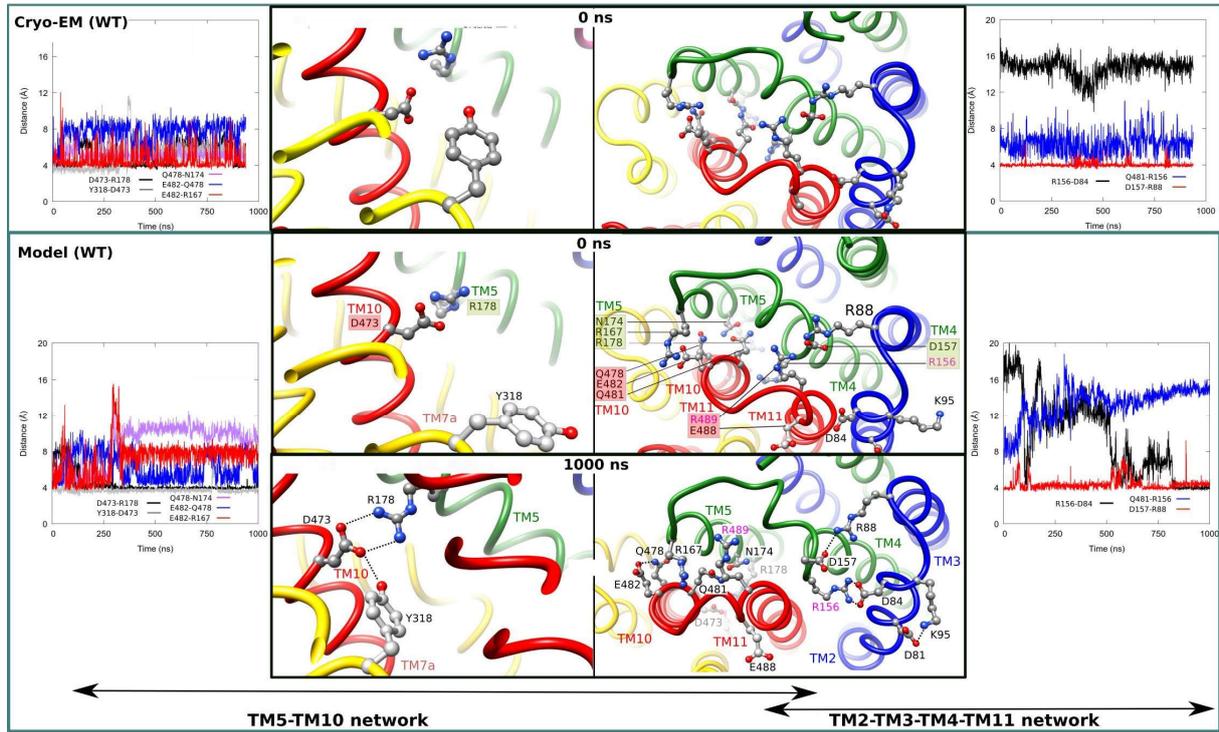
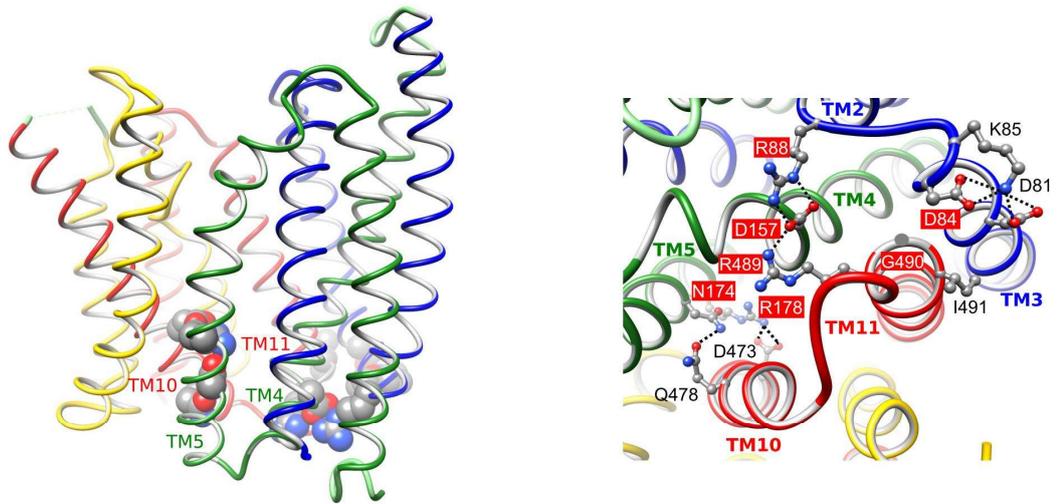


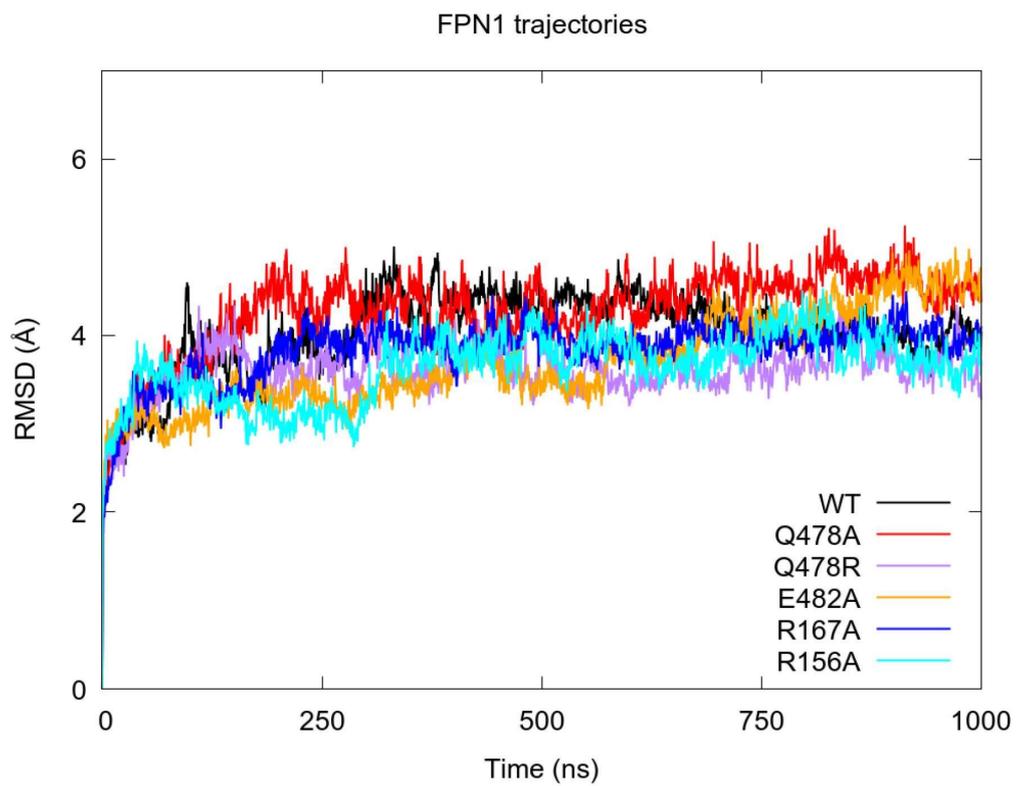
Figure 4



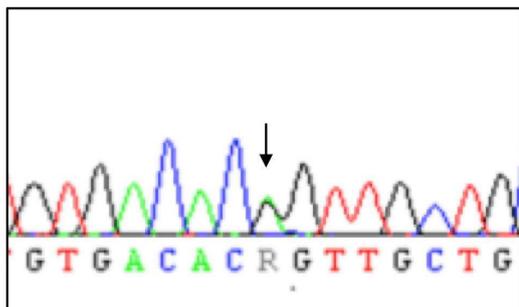
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

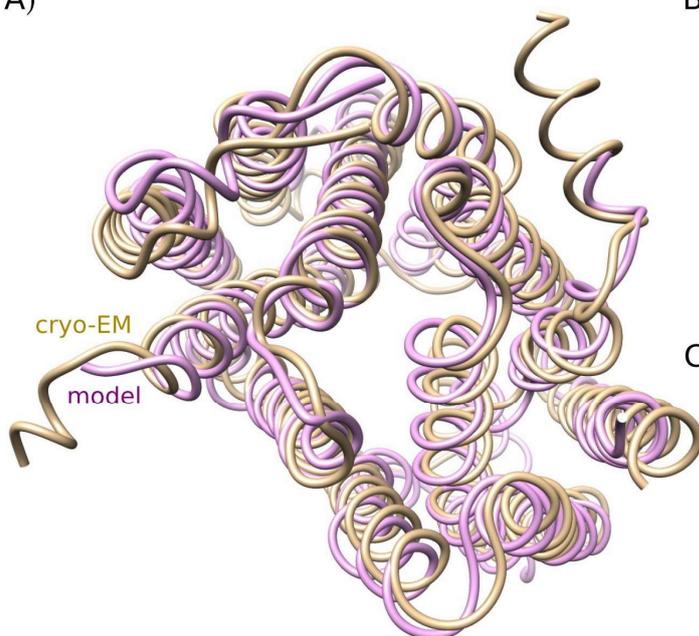


Supplementary Figure 3

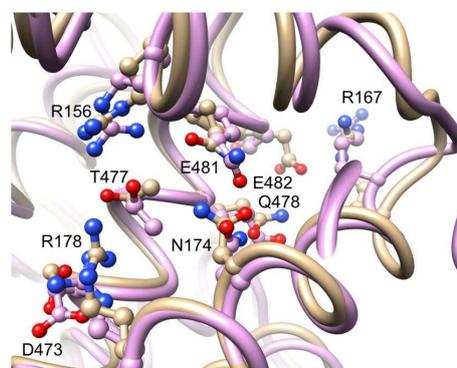


Supplementary Figure 4

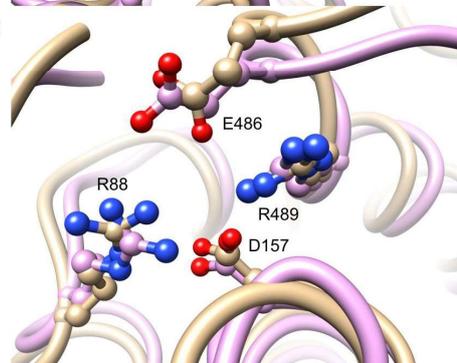
A)



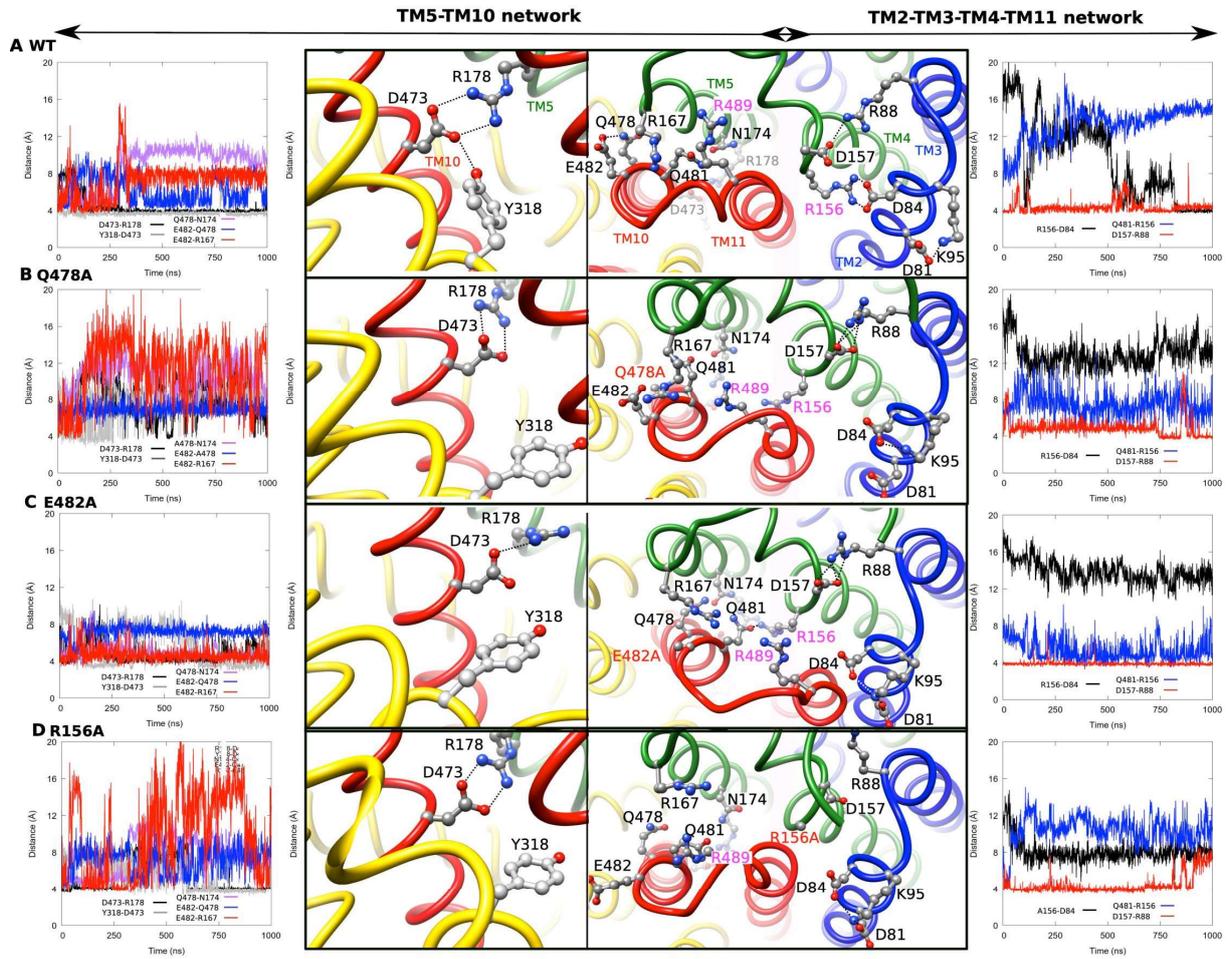
B)



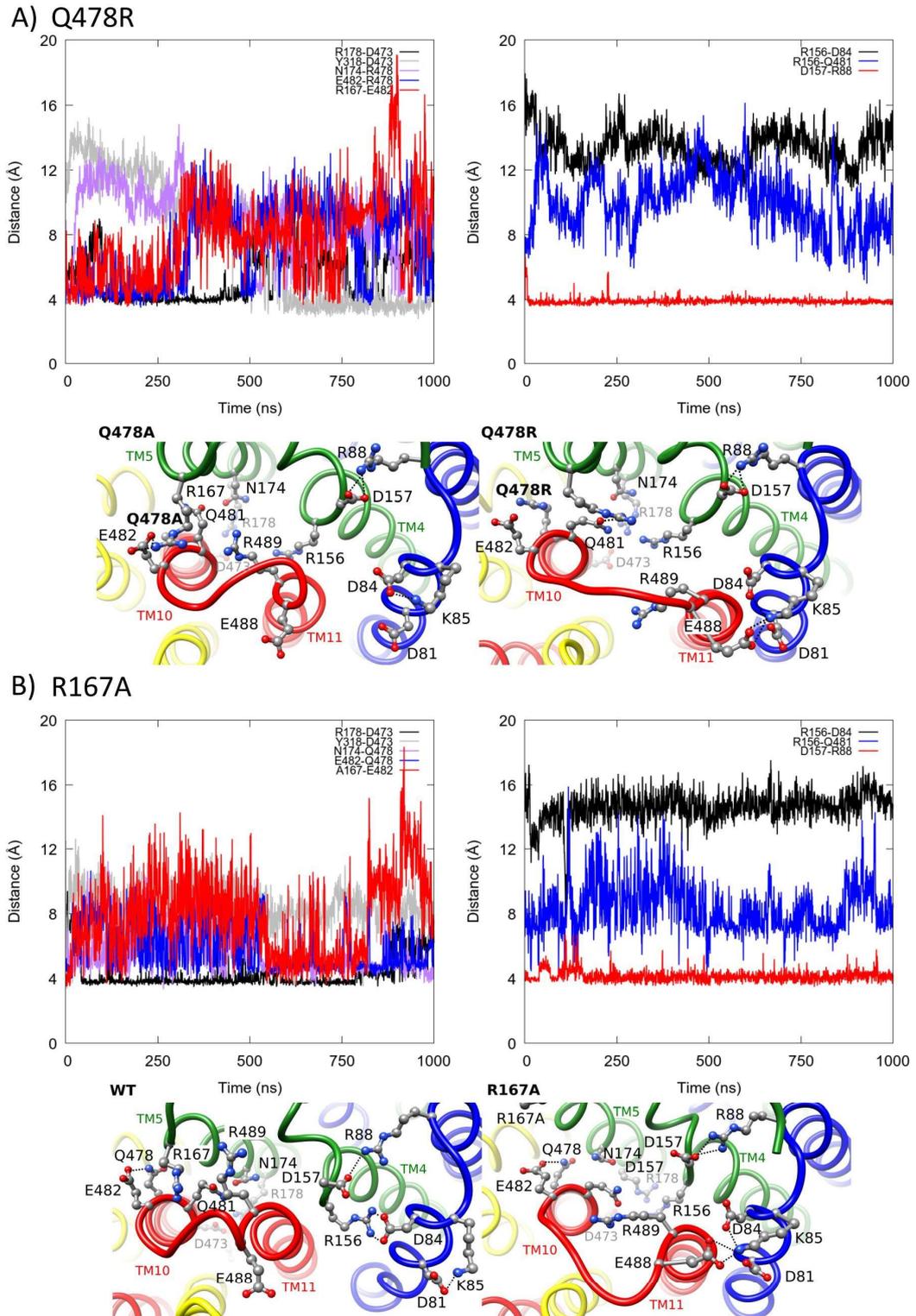
C)



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



II- Bases moléculaires du mécanisme de résistance partielle à l'hepcidine

a- Contexte

Dès le début de ma thèse, nous étions particulièrement intrigués par la dichotomie qui semblait exister entre des variants localisés dans le lobe C-ter de la ferroportine, plutôt associés à des mécanismes de résistance forte, voire totale, à l'hepcidine et des variants localisés dans le lobe N-ter du transporteur, plutôt associés à des mécanismes de résistance partielle à l'hepcidine.

Sur la base des différentes étapes du processus de régulation de la ferroportine par l'hepcidine et de différentes observations faites dans la littérature, nous suspicions que :

- L'hepcidine venait se fixer principalement au niveau du lobe C-terminal de la ferroportine ; étape impliquant la cystéine 326, portée par l'hélice transmembranaire 7, mais aussi d'autres acides aminés localisés dans le lobe C-terminal comme l'histidine 507 (TM11).
- La fixation de l'hepcidine induisait des changements conformationnels du lobe N-terminal de la ferroportine qui permettaient la libération de la grande boucle intracellulaire portant les lysines dont l'ubiquitination entraîne l'internalisation et la dégradation du transporteur ; étape impliquant notamment les résidus Tyr64 (TM2) et Asn144 (TM4).

Cette réflexion a donné lieu à un article (présenté ci-dessous) qui a été publié en août 2017 dans le journal « Transfusion Clinique et Biologique » (Le Tertre *et al*, 2017).



ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

TRANSFUSION
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

Transfusion Clinique et Biologique xxx (2017) xxx–xxx

Research perspectives

Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients

*Mécanismes de résistance de la ferroportine à l'hepcidine : analyses structure/fonction de mutations
faux-sens rares du gène SLC40A1 identifiées chez des patients présentant une surcharge en fer
typique de l'hémochromatose de type 4*

M. Le Tertre^{a,b,c,*}, C. Ka^{a,b,c}, J. Guellec^{a,b,e}, I. Gourlaouen^{a,b,d},
C. Férec^{a,c,d}, I. Callebaut^f, G. Le Gac^{a,b,c,d}

^a Inserm UMR1078, faculté de médecine et des sciences de la santé, université Bretagne Loire–université de Bretagne Occidentale, IBSAM, IBRBS, 22, rue Camille-Desmoulins, 29200 Brest, France

^b Laboratory of Excellence GR-Ex, institut Imagine, 24, boulevard du Montparnasse, 75015, Paris, France

^c Laboratoire de génétique moléculaire et histocompatibilité, hôpital Morvan, CHRU de Brest, 2, avenue Foch, 29200 Brest, France

^d Établissement français du sang, Bretagne, site de Brest, 46 rue Félix-Le-Dantec, 29200 Brest, France

^e Association Gaetan-Saleun, 29, rue Félix-Le-Dantec, 29200 Brest, France

^f Muséum d'histoire naturelle, IRD UMR 206, case 115, IMPMC, Sorbonne universités–UMR CNRS 7590, UPMC université Paris 06, 4, place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

Abstract

Genetic medicine applied to the study of hemochromatosis has identified the systemic loop controlling iron homeostasis, centered on hepcidin-ferroportin interaction. Current challenges are to dissect the molecular pathways underlying liver hepcidin synthesis in response to circulatory iron, HFE, TFR2, HJV, TMPRSS6 and BMP6 functions, and to define the major structural elements of hepcidin-ferroportin interaction. We built a first 3D model of human ferroportin structure, using the crystal structure of EmrD, a bacterial drug efflux transporter of the Major Facilitator Superfamily, as template. The model enabled study of disease-associated mutations, and guided mutagenesis experiments to determine the role of conserved residues in protein stability and iron transport. Results revealed novel amino acids that are critical for the iron export function and the hepcidin-mediated inhibition mechanism: for example, tryptophan 42, localized in the extracellular end of the ferroportin pore and involved in both biological functions. Here, we propose a strategy that is not limited to structure analysis, but integrates information from different sources, including human disease-associated mutations and functional *in vitro* assays. The first major hypothesis of this PhD thesis is that ferroportin resistance to hepcidin relies on different molecular mechanisms that are critical for ferroportin endocytosis, and include at least three fundamental steps: (i) hepcidin binding to ferroportin, (ii) structural reorganization of the N- and C-ter ferroportin lobes, and (iii) ferroportin ubiquitination. © 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Iron metabolism; Hemochromatosis; Ferroportin; Hepcidin; Gain-of-function mutations

Résumé

L'étude des formes rares d'hémochromatose a contribué à une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et systémiques qui participent au maintien de l'homéostasie du fer et qui dépendent de l'axe hepcidine-ferroportine. Des questions fondamentales majeures restent posées sur les voies d'activation de la synthèse d'hepcidine en fonction de la quantité de fer plasmatique et de l'action à la surface des hépatocytes des protéines

* Corresponding author.

E-mail address: marlene.letertre@etudiant.univ-brest.fr (M. Le Tertre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.traccli.2017.07.002>

1246-7820/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.traccli.2017.07.002>

HFE, TFR2, HJV, TMPRSS6 et BMP6, ainsi que sur les bases structurales de l'interaction hepcidine-ferroportine. Nous avons construit un premier modèle tridimensionnel de la ferroportine humaine à partir de la structure cristallographiée d'EmrD, un exportateur de drogues bactérien qui appartient à la famille des transporteurs secondaires MFS (« Major Facilitator Superfamily »). Cette modélisation a permis, en lien avec l'étude fonctionnelle de mutations faux-sens identifiées chez des patients présentant des phénotypes typiques d'hémochromatose de type 4, d'identifier des acides aminés qui ont une fonction critique dans la stabilité de la ferroportine, la fonction d'export du fer, ou la régulation par l'hepcidine. Le tryptophane en position 42 s'est, par exemple, révélé important à la fois pour la prise en charge du fer et l'endocytose de la ferroportine à la suite de la fixation de l'hepcidine. Nous proposons ici une stratégie qui combine analyses structurales, corrélations génotype/phénotype et tests fonctionnels *in vitro*. Ce travail de thèse vise à révéler les différents mécanismes moléculaires qui sous-tendent le processus de dégradation de la ferroportine. Ce processus semble comprendre trois étapes essentielles : (i) fixation de l'hepcidine à la ferroportine, (ii) réorganisation structurale des lobes N et C-terminaux de la ferroportine, et (iii) ubiquitination et internalisation du transporteur.

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Métabolisme du fer ; Hémochromatose ; Ferroportine ; Hepcidine ; Mutations « gain-de-fonction »

1. Introduction

Iron is essential to normal cell biology. As a component of heme, it is particularly important for erythropoiesis and oxygen transport. However, iron excess and “free” reactive iron is toxic. Body iron loss is insufficient, and intertwined mechanisms have evolved to maintain intracellular and systemic iron homeostasis. Ferroportin (FPN1, also referred to as SLC40A1, SLC11A1, MTP1 and IREG1) is the only known iron exporter in mammals and is considered a key coordinator of iron balance between the two compartments [1].

Ferroportin is expressed in all types of cell that handle major iron flow, including iron-recycling macrophages, absorptive enterocytes and storing hepatocytes (Fig. 1). Ferroportin is predominantly regulated by the liver-derived peptide hepcidin, which binds ferroportin on the cell surface, inducing internalization and degradation [2]. Hepcidin-ferroportin interaction is critical in both normal iron homeostasis and in common iron metabolism pathologies, including not only inherited disorders and iron overload but also non-genetic diseases and anemia [3].

1.1. Regulation of ferroportin activity

Ferroportin expression is regulated transcriptionally, post-transcriptionally, and post-translationally. At the cellular level, ferroportin synthesis is regulated via the iron-responsive element/iron regulatory proteins system. This system orchestrates the post-transcriptional regulation of several other important iron metabolism genes [4]. At the level of the organism, ferroportin is subject to post-translational downregulation via the liver-derived peptide hepcidin [2,5]. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin downregulation is not fully understood, but includes at least three fundamental steps:

- hepcidin binding to ferroportin, a step that involves amino acid residue p.Cys326 [6];
- ferroportin ubiquitination, a step that is thought to involve several lysine residues between positions 229 and 269 [7];
- ferroportin trafficking to the multivesicular body and degradation in the late endosome/lysosome compartment [8].

1.2. Dichotomous patterns of human SLC40A1 mutation

In humans, most ferroportin mutations affect plasma membrane location and/or iron export ability. These loss-of-function mutations explain the classical reports of isolated serum ferritin elevation, relative plasma iron deficiency and preferential iron retention in cells of the reticuloendothelial system. This histological picture is commonly referred to as ferroportin disease [9].

In contrast, some SLC40A1 mutations do not impair the ability of ferroportin to export iron but result in partial to complete resistance to hepcidin. Patients with these gain-of-function mutations (hemochromatosis type 4) usually display histological and clinical presentations similar to those of the typical HFE-related hemochromatosis. More especially, due to greater flow of iron through iron-recycling macrophages and increased iron absorption, transferrin saturation is expected to be markedly elevated in these patients [10,11].

1.3. Ferroportin structure

The structural organization of human ferroportin in the lipid bilayer is controversial. Wallace and collaborators reported the first model of the 3D structure of human ferroportin, with 12 predicted transmembrane helices built *de novo* (i.e., without homology). They subsequently fitted the model to experimental data, using *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate (GlpT) transporter as template [12]. This template belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS), which is the largest group of secondary active membrane transporters, transporting a range of diverse substrates across membranes.

Bonaccorsi di Pati and collaborators described a fairly similar 3D model of ferroportin, based on threading/*ab initio* modeling [13]. This is not surprising, since, independently of the algorithms used, the Italian group predicted an inward-open conformation of the ferroportin iron transporter, using GlpT as template. They used a different MFS member, *E. coli* L-fucose proton symporter (FucP), to build an outward-open conformation of ferroportin. The switch between the two conformations is believed to drive iron transport across the plasma membrane.

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare SLC40A1 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.002>

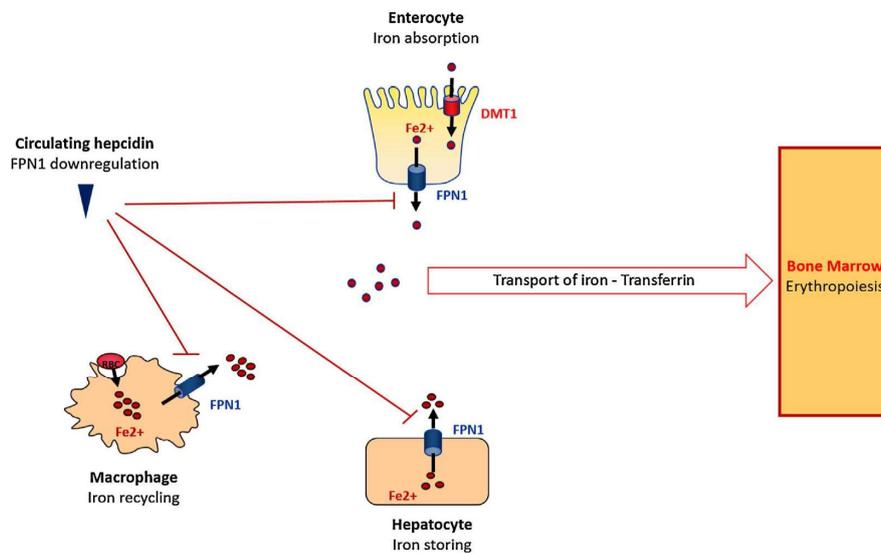


Fig. 1. Schematic representation of iron metabolism. Iron is partly imported in duodenal enterocytes by DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), stored in hepatocytes and recycled from senescent red blood cells (RBC) in macrophages. Ferroportin (FPN1) mediates iron export into the bloodstream from iron-absorptive enterocytes, iron-recycling macrophages and iron-storing hepatocytes. The iron released into the plasma is transported by transferrin mainly to the bone marrow for erythropoiesis. Cellular iron export is regulated by hepcidin, which directly binds ferroportin and leads to its internalization and degradation.

We built a third 3D model of ferroportin, using a true comparative modeling approach, with sensitive methods for remote homology detection based on profile-profile alignments, and for alignment refinement (specific hydropathy profiles, deduced from hydrophobic cluster analysis), and validating the use of the crystal structure of one MFS antiporter, *E. coli* multidrug efflux protein D (EmrD), as template [14]. The structure of EmrD was determined in an occluded state. It is more compact than the crystal structure of GlpT, and the 12 transmembrane helices are arranged around a central pore.

A comparison of the 3D models of all possible states accompanying iron transport is essential for understanding the structure and biology of human ferroportin. In addition to the outward and inward-facing states, MFS transporters are thought to form a transitional occluded state, in which the substrate is sequestered from both sides of the membrane. The recent report of the crystal structures of a putative bacterial homologue of ferroportin (BbFPN) and the description of intra-domain conformational rearrangements during iron transport opens up new avenues for predicting the atomic details of the organization of ferroportin transmembrane helices and elucidating the detailed mechanisms of iron egress and hepcidin-mediated downregulation [15].

2. Objectives

Fundamental questions concerning ferroportin structure and biology remain to be answered. Based on structural and mutational analyses, we aim to:

- get insight into the interaction of hepcidin with ferroportin;

- characterize sequence invariants that may play a key role in conformational changes following hepcidin binding;
- improve interpretation of rare missense mutations found in suspected hemochromatosis patients.

Our research project is organized around three questions.

2.1. How can the study of missense mutations identified in hemochromatosis patients help to reveal the molecular mechanisms underlying phenotypic variability and to shed light on protein function?

As mentioned above, ferroportin gene mutations fall into 2 functional categories, responsible for different phenotypes (hemochromatosis type 4 vs. ferroportin disease). Most are unable to export iron (loss-of-function mutants; ferroportin disease), while others retain full capability but are insensitive to down-regulation by hepcidin (gain-of-function mutants; hemochromatosis type 4). Most ferroportin mutants are private, and most alter amino acids. This hinders both diagnosis and therapeutic decision-making, but structure-function studies may shed light on ferroportin function and its relationship with hepcidin. This is exemplified by the results of two previous studies: the first studied disease-causing mutations and revealed a clear dichotomy between gain-of-function mutations, which clustered in a region exposed to the extracellular milieu, accessible to hepcidin, and loss-of-function mutations, located at the cytoplasmic interface, where intracellular iron is delivered to ferroportin for export [14]; the second functionally characterized missense mutations of unknown significance and identified novel critical amino acids [11].

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.002>

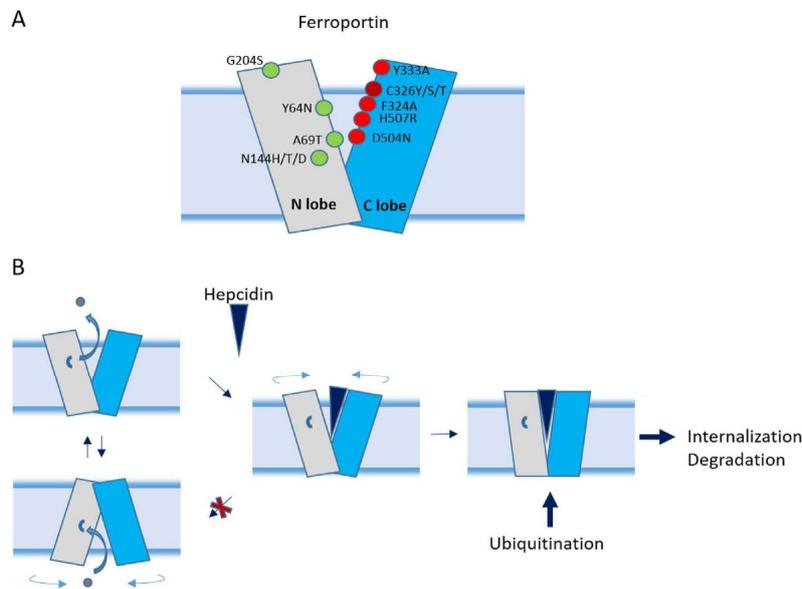


Fig. 2. Ferroportin down-regulation mechanisms. A. Gain-of-function ferroportin mutations identified in patients and functionally characterized. Substitution residues generating partial resistance of ferroportin to hepcidin are labeled in green, and those generating strong resistance in red. B. Model of hepcidin-mediated down-regulation of ferroportin. Hepcidin binds to the ferroportin C-ter lobe, preventing its return to the inward conformation. Intracellular loop access is improved, enabling ubiquitination by ubiquitin ligases, triggering internalization and degradation of the iron exporter (adapted from Taniguchi et al., 2015 [15]).

2.2. How to improve our knowledge of the hepcidin docking process?

A critical point in the elucidation of the structure and biology of ferroportin was reached with the recent publication of the outward- and inward facing structures of a putative bacterial homologue of ferroportin (BbFPN). Taniguchi and collaborators supplied very important clues for identifying amino acids involved in the iron-binding site and for deciphering interaction networks between transmembrane helices in the outward- and inward-facing extreme structures. They further revealed the pivotal role of a central cavity that hosts the iron-binding site in the intra- and extra-cellular open states of BbFPN and is likely to be targeted by hepcidin in the outward-facing conformation of human ferroportin [15]. Although very important, these data are not the last word, but will serve as the starting point to predict atomic details of the organization of ferroportin transmembrane helices and to achieve accurate modeling of the human ferroportin 3D structure.

It noteworthy that missense mutations leading to the highest degrees of hepcidin resistance are located in the C-ter lobe of ferroportin [6,11,16–18], in the vicinity of Cys326, which is known to be essential to hepcidin/ferroportin interaction, while several missense mutations located in the N-ter lobe have proved to induce partial resistance to hepcidin (Fig. 2A) [6,16,19,20]. Results, however, are conflicting, probably because different concentrations of hepcidin and different experimental procedures were used by the various groups. Furthermore, many missense mutations identified in patients with a typical hemochromatosis phenotype have not been evaluated

functionally. Homogenous procedures are needed, to better discern gain-of-function mutations and confirm the existence of a functional dichotomy between the N- and C-ter ferroportin lobes.

2.3. How to identify ferroportin domains that are important for hepcidin-induced endocytosis?

In general, ligand-induced endocytosis of plasma membrane transporters is triggered by a conformational change followed by phosphorylation and/or ubiquitination of their cytoplasmic segments [21]. Qiao et al. demonstrated that the ubiquitination of lysines between residues 229 and 269 in the third intracellular loop of ferroportin is the major signal for incorporation into the multivesicular body and degradation in the late endosome compartment. They further showed that the human ferroportin mutation p.Lys240Glu (K240E) caused resistance to hepcidin *in vitro* by interfering with ferroportin ubiquitination [7]. The specific details of ferroportin's cellular internalization process, including which ubiquitin-binding adaptor proteins may be involved, remain to be determined. In addition, nothing is yet known about the conformational changes that result from the interaction of hepcidin with ferroportin.

The fact that several missense mutations in the N-ter lobe are associated with partial resistance to hepcidin without affecting the primary docking step [6] suggests that local changes in the first six helices play an important role (Fig. 2B). Here, we plan to functionally characterize 10 missense mutations located in transmembrane helices 1, 2, 4, 5 and 6. This could help identify inter-domain interactions and residues that are critical for

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.002>

hepcidin-induced endocytosis, in a step that depends on hepcidin binding and comes before ubiquitination of lysines between residues 229 and 269.

3. Experimental procedures

3.1. Genetic studies

In recent years, we contributed to reporting a handful of new mutations and disease phenotypes in patients with iron overload. We will capitalize on our expertise to investigate new *SLC40A1* missense mutations in patients with well-defined phenotypes. This will be facilitated by a national medical research program (PHRC) to determine the prevalence and severity of ferroportin-associated iron overload. Eighteen missense mutations, found in 44 French patients, have already been reported and functionally characterized [11]. Five missense mutations are still under investigation, and we can confidently predict that a few others will be identified in the coming two years.

3.2. Functional in vitro testing

To test the degree of resistance of the ferroportin variants to hepcidin, we will use Western blot analysis, flow cytometry and measurements of radiolabeled ⁵⁵Fe. We will use the HEK293T cells as a cellular model to transiently or stably (tetracyclin-inducible system) overexpress ferroportin, while human hepcidin will be produced in stably transfected Hep3B cells. This will enable us to perform co-culture experiments and improve our ability to reveal subtle differences between mutations that cause resistance to hepcidin. A C-ter biotinylated hepcidin synthetic peptide will be used in pull-down and Western blotting experiments to test the interaction between hepcidin and ferroportin mutants. ¹²⁵I-Hepcidin uptake experiments and global analysis of lysine ubiquitination will be performed to investigate amino acids that do not directly interact with hepcidin but could be involved in ferroportin endocytosis.

3.3. Structural studies

We will seek to provide a refined model of human ferroportin despite a relatively low level of sequence identity (24%) with the bacterial template. This will be completed by a molecular-docking approach to study the interaction between hepcidin and ferroportin. This theoretical analysis, combined with experimental testing, will benefit from our past experience in membrane protein modeling (e.g., CFTR) [22,23].

4. Milestones

- M1- Accurate structure prediction of human ferroportin;
- M2- Better definition of the hepcidin-binding site on ferroportin;
- M3- Identification of the functional network (key residues and interactions) that orchestrate hepcidin-induced ferroportin endocytosis;

- M4- Better understanding of the molecular and physiological bases of hemochromatosis, by characterizing new mutations and reporting well-defined phenotypes.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24–38.
- [2] Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090–3.
- [3] Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:538–42.
- [4] Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 2008;28:197–213.
- [5] Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011;117:4425–33.
- [6] Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, et al. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* 2009;114:437–43.
- [7] Qiao B, Sugianto P, Fung E, del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M-J, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 2012;15:918–24.
- [8] De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18:2569–78.
- [9] Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:131–8.
- [10] Anderson GJ, McLaren GD. Iron physiology and pathophysiology in humans. New York: Humana Press; 2012.
- [11] Callebaut I, Joubrel R, Pissard S, Kannengiesser C, Gérolami V, Ged C, et al. Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Hum Mol Genet* 2014;23:4479–90.
- [12] Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C75–84.
- [13] Bonaccorsi di Patti MC, Polticelli F, Cece G, Cutone A, Felici F, Persichini T, et al. A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS J* 2014;281:2851–60.
- [14] Le Gac G, Ka C, Joubrel R, Gourlaouen I, Lehn P, Mornon J-P, et al. Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (*SLC40A1*): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum Mutat* 2013;34:1371–80.
- [15] Taniguchi R, Kato HE, Font J, Deshpande CN, Wada M, Ito K, et al. Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nat Commun* 2015;6:8545.
- [16] Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* 2005;106:1092–7.
- [17] Mayr R, Griffiths WJH, Hermann M, McFarlane I, Halsall DJ, Finkenstedt A, et al. Identification of mutations in *SLC40A1* that affect ferroportin function and phenotype of human ferroportin iron overload. *Gastroenterology* 2011;140:2056–63 [e1].
- [18] Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, et al. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest* 2011;121:4880–8.

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.002>

- [19] Praschberger R, Schranz M, Griffiths WJH, Baumgartner N, Hermann M, Lomas DJ, et al. Impact of D181V and A69T on the function of ferroportin as an iron export pump and hepcidin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1406–12 [Mol Basis Dis].
- [20] Détiavaud L, Island M-L, Jouanolle A-M, Ropert M, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, et al. Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mutat* 2013;34:1529–36.
- [21] Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 2003;72:395–447.
- [22] Mornon J-P, Lehn P, Callebaut I. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2594–612.
- [23] Mornon J-P, Hoffmann B, Jonic S, Lehn P, Callebaut I. Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1377–403.

Please cite this article in press as: Le Tertre M, et al. Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare *SLC40A1* missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique et Biologique* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.002>

Pour mieux comprendre le rôle du lobe N-terminal dans ce processus de régulation post-traductionnel, nous avons choisi de prendre comme modèles les variations p.Gly204Ser et p.Ser47Phe, localisées respectivement sur les hélices transmembranaires 6 et 1 (Figure 24).

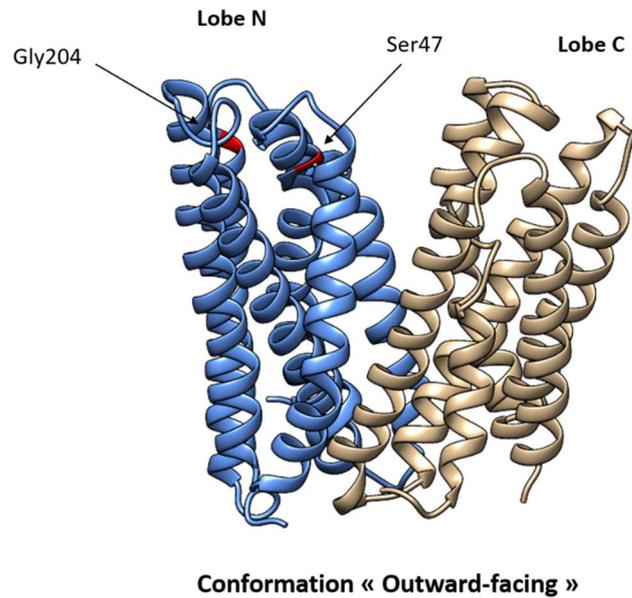


Figure 24 : Localisation des acides aminés ciblés par les variations p.Ser47Phe et p.Gly204Ser sur le modèle 3D de la ferroportine humaine, construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « outward-facing ».

Ce projet a fait l'objet du stage de Master 2 du Dr. Kevin Uguen que j'ai co-encadré. Les résultats que nous avons obtenus vont prochainement faire l'objet d'un article. Pour l'instant, seuls le « matériel et méthodes » et les « résultats » de la partie expérimentale ont été rédigés, et sont ici présentés. La partie « analyse *in silico* » de ce projet n'est pas encore écrite mais est discutée à la suite de la partie « Résultats ».

b- Matériel et méthodes

Methods

Plasmid constructs

For iron release measurement, the wild-type (WT) FPN1-V5 plasmid construct was generated by cloning full-length human *SLC40A1* cDNA (Genbank accession number NM_014585.5) into the pcDNA3.1-V5-HisTOPO vector (ThermoFisher Scientific). The same strategy was adopted to generate the HLA(A)-V5 plasmid construct. For cytometry analysis, the wild-type FPN1-V5/CD8 bicistronic plasmid construct was generated by cloning full length human *SLC40A1* and *CD8* cDNA (Genbank accession number: NM_001145873.1) into the pIRES2 DsRed-Express2 vector (Clontech); the DsRed-Express2 fluorescent protein coding sequence was removed and replaced by *CD8* cDNA, while a V5 epitope tag (GKPIPPLLGLDST) was introduced in the fifth extracellular loop of FPN1 to facilitate cell surface FPN1 detection by flow cytometry. For stable cell generation, the wild-type FPN1-V5 plasmid construct was generated by cloning full-length human *SLC40A1* cDNA into the pcDNA5-FRT-TO vector (ThermoFisher Scientific). All ferroportin mutations were introduced in the different vectors by using the QuikChange Site-Directed mutagenesis kit, according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). Sequencing analyses were performed to check the integrity of all plasmid constructs (full length *SLC40A1* cDNA sequenced after each site-directed mutagenesis).

Culture and transfection of human embryonic kidney HEK293T cells

HEK293T cells, from the American Type Culture Collection, were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were transiently transfected using JetPEI (Polyplus), according to the manufacturer's instructions, and a 2:1 transfection reagent (μL)/plasmid DNA ratio (μg).

Isolation of cell surface proteins and western blot analysis

Membrane proteins were biotinylated and purified using the Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit, according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific). The membranes were incubated with the Luminata Forte substrate, according to the manufacturer's instructions (Merck-Millipore), and digitized for pattern analysis using the GeneGnome system (Syngene).

Densitometry study

To quantitate ferroportin expression levels on the cell surface, the optic density of SLC40A1/V5 and HLA-A/V5 protein bands was measured on digital images by the GeneTools software (version 4.4, Syngene). Two normalizations were performed: ferroportin expression was first normalized with cotransfected HLA(A); then, wild-type ferroportin expression was set at 100% and the expression of ferroportin variants was normalized to the expression of wild-type ferroportin.

⁵⁵Fe release measurements

⁵⁵Fe loading of human apotransferrin was performed as previously described¹. For iron release experiments, a modification of the protocol described by Schimanski et al.² was used. Briefly, HEK293T cells were seeded at 1×10^5 cells per well in 12-well plates, grown for 24h in supplemented DMEM, and preloaded with 20 $\mu\text{g/ml}$ ⁵⁵Fe-transferrin for 24h before transfection with wild-type or mutated FPN1-V5 plasmid constructs. Fifteen hours post-transfection cells were washed once with PBS and cultured in Pro293a-CDM serum-free medium (BioWhittaker) for up to 36h. ⁵⁵Fe exported into the supernatant was collected, mixed with liquid scintillation fluid (Ultima Gold MV, Packard Bioscience)

and counted for 10 min in a TRICARB 1600 CA scintillation counter (Packard). Percentage of ^{55}Fe export was calculated using the following formula: (^{55}Fe in the supernatant at end point, divided by cellular ^{55}Fe at time zero) x 100.

Human hepcidin-25 synthesis and secretion by T-Rex-293 cells

Human *HAMP* cDNA was amplified with reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from total ribonucleic acid (RNA) isolated from human liver hepatocellular carcinoma HepG2 cells (ATCC). The PCR product was cloned into the PCR2.1 vector using the TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), subcloned into the pcDNA4™/TO tetracycline-regulated mammalian expression vector (Thermo Fisher Scientific), and checked by sequencing. T-Rex-293 cells (Thermo Fisher Scientific) were stably transfected with calcium phosphate, and colonies were selected in the presence of 1.5 mg/ml blasticidin and 100 mg/ml zeocin for four weeks. Tetracycline (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to induce expression of the 84 amino acids hepcidin pre-propeptide from 1.10^6 T-Rex-293 cells. After 48h the cell supernatant was collected, filtered through a hydrophilic nylon membrane (pore size: 0.2 μm), and measured for hepcidin-25 levels using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA; Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA, USA). The supernatant was stored at -20°C until used.

Flow cytometry analysis

HEK293T cells were seeded at 1.75×10^5 cells per well in 12-well plates and grown for 8h in supplemented DMEM before transfection. 24h after transfection with the pIRES_FPN1-V5_CD8 constructs, cells were treated (or not) with 4,3 nM of human hepcidin-25 for 16 hours. Then, cells were trypsinised, transferred in hemolyse tubes and pelleted at 500 g for 5 minutes at 4°C . Cells were resuspended in 100 μl of PBS-EDTA (Lonza) supplemented with 10% of fetal bovine serum (i.e. flow

cytometry buffer), and exposed to anti-V5-FITC (1.13 µg/tube) (ThermoFisher Scientific) and anti-CD8-APC (Miltenyi Biotec) (2 µl/tube) antibodies for 30 minutes at 4 °C in the dark. Stained cells were pelleted at 500 g for 5 minutes at 4°C and resuspended in 400 µl of flow cytometry buffer. Fluorescence intensities were analysed using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and the FlowLogic™ software (Miltenyi Biotec).

Stable expression Flp-In T-Rex cell lines generation

HEK293 cells stably expressing the WT and mutant FPN1 were generated through the Flp-In T-Rex system (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. This construction enables a stable and tetracycline-inducible expression of the protein of interest. HEK293 cells were transfected with the different pcDNA5-FRT-TO plasmid constructs and pOG44 vector (ThermoFisher Scientific) using the TransIT2020 protocol (Mirus Bio LLC), and selected in the presence of blasticidin (150 µg/mL) and hygromycin (300 µg/mL) for 3 weeks. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and propagated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, blasticidin (150 µg/mL) and hygromycin (300 µg/mL). *SLC40A1* cDNA integration was verified by Sanger sequencing, while FPN1 expression was assessed by Western-Blotting.

Hepcidin binding analysis

Flp-In T-Rex cells expressing different FPN1 mutants were seeded at 4×10^5 cells per well in 6-well plates for 24 h before FPN1 expression induction with 1 µg/mL of tetracyclin. 24h after induction, cells were treated with 10 µg/mL of C-terminus biotinylated hepcidin (Bachem) for 30 minutes at 37°C. Proteins were extracted using RIPA buffer (Boston BioProducts, Ashland, MA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), and protein concentration determined by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein lysates were co-immunoprecipitated using the Dynabeads® MyOne™

Streptavidin T1 kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific). The membranes were revealed as described above.

Immunoprecipitation and western-blot for ubiquitination

Flp-In T-Rex cells expressing different FPN1 mutants were seeded at 4×10^5 cells per well in 6-well plates for 24h before FPN1 expression induction with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tetracyclin. 24h after induction, cells were treated with 1 mL of human hepcidin-25 for 30 to 120 minutes. Proteins were extracted using RIPA buffer supplemented with protease inhibitor cocktail, and protein concentration determined by the BCA assay. V5-tagged proteins were purified using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2 (MBL International Corporation) according to the manufacturer's instructions. Western blot analysis was performed using mouse horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody against V5 (ThermoFisher Scientific), or primary anti-mono/poly ubiquitin monoclonal antibody FK2 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) followed by HRP-coupled secondary antibody. The membranes were revealed as described above.

References

1. Ka C, Le Gac G, Dupradeau F-Y, Rochette J, Férec C. The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for the mutated 282Y HFE protein. *Hum. Genet.* 2005;117(5):467–475.
2. Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, et al. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood.* 2005;105(10):4096–4102.

c- Résultats

Results

Clinical data and segregation analysis

The previously known p.Gly204Ser variation was found in two unrelated patients with high serum ferritin levels (>800 µg/L) and elevated transferrin saturation levels (> 60%). Hepatic iron concentration was evaluated using the Gandon's magnetic resonance imaging (MRI) method in the two patients with values greater than 250 µmol/g (Table 1).

The newly identified p.Ser47Phe (NM_014585.5: c.140C>T) variation was identified in a pedigree originating from northeast France (Figure 1). It co-segregated with hyperferritinemia (≥ 1000 µg/L) in four family members (cases II.3, II.5, III.4 and III.7) and was absent in three non-affected members of the third generation (subjects III.1, III.5 and III.6). Incomplete penetrance was suggested to explain normal iron indices in a 53-year old woman (subject III.3). The situation was less obvious in a 78-year old woman who showed a slight increase in serum ferritin (377 µg/L) while being negative for the p.Ser47Phe variant (subject II.4), and even more in a 83-year-old man who had high serum ferritin levels (804 µg/L; subject II.1).

The p.Ser47Phe was also identified in three unrelated patients (Table 1). In total, it was observed in 7 men, ages 33-75 years at diagnosis, who displayed significant hyperferritinemia (889-2000 µg/L) and non- or lowly-elevated transferrin saturation (24-67%). In fact, only males with serum ferritin concentrations greater than 1700 µg/L had a transferrin saturation level greater than 60%. The two considered patients also had very important increases in hepatic iron store (HIC ≥ 300 µmol/g). The only expressive woman was 50 years old at the time of diagnosis. She presented with a transferrin saturation of 52% and a serum ferritin concentration of 609 µg/L. Abdominal MRI revealed a moderate increase in hepatic iron store (100 µmol/g).

Overall, the phenotypes observed in the p.Ser47Phe positive patients were suggestive of a loss of ferroportin function.

All patients were negative for causative mutations at the *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* and *FTL* loci.

Functional characterization of the p.Ser47Phe and p.Gly204Ser variants

Cell surface expression and iron export ability

The cell surface expression of the p.Ser47Phe and p.Gly204Ser variants was assayed in transiently transfected HEK293T cells, as previously reported.¹ The Human Leukocyte Antigen HLA-A was used as a control and a standard for normalization because it is a cell surface protein with no known role in iron metabolism. As expected, the exogenous expression of WT FPN1 resulted in cell surface localization, whereas the well-known p.Ala77Asp loss-of-function mutant showed markedly reduced localization (Figure 2). The two tested FPN1 variants did not cause obvious mislocalization of the iron transporter.

The iron-exporting function of the p.Ser47Phe and p.Gly204Ser variants was assessed using radioactively labeled iron. HEK293T cells were grown in 20 µg/mL ⁵⁵Fe-transferrin for 24 hr, transiently transfected, washed and placed in a serum-free medium. The amount of ⁵⁵Fe exported into the supernatant was measured after a 36-hr period using cells transfected with the commercial pcDNA3.1-V5-His vector as negative control (no FPN1). As shown in Figure 2B, cells transfected with WT ferroportin 1-V5 displayed a 3-fold increase in iron release. The p.Ser47Phe variant was not able to export ⁵⁵Fe in amounts comparable with WT FPN1 ($p < 0.01$), but was more active than the p.Ala77Asp control ($p < 0.0001$). The p.Gly204Ser variant did not alter the exporting function of FPN1.

Resistance to hepcidin

To investigate whether the p.Ser47Phe and p.Gly204Ser missense mutations could modify response to hepcidin, transiently transfected HEK293T cells were cultured for 24 hr with conditioned media derived from T-Rex-293 cells stably expressing the full-length human *HAMP* cDNA. Two known FPN1 mutants served as positive controls: p.Asn144His, which shows partial resistance to hepcidin inhibition² and p.Cys326Tyr, which abolishes hepcidin binding to ferroportin 1 and is responsible for complete resistance.³ As expected, the addition of hepcidin to cells expressing WT FPN1 resulted in the disappearance of the iron exporter from the plasma membrane. The western blot pattern of the

p.Gly204Ser variant was similar to that of the p.Asn144His control, whereas the p.Ser47Phe variant showed intermediate resistance between the p.Asn144His and p.Cys326Tyr controls (Supplementary Figure 1).

We confirmed these results using a pre-validated independent flow cytometry method,⁴ where HLA-A was replaced by cluster of differentiation 8 (CD8) and FPN1 and CD8 co-expressed from a transiently transfected bicistronic construct (Figure 3A). The flow cytometry method was also better suited to test lower concentrations of native human hepcidin-25 and try to detect differences between FPN1 variants. As shown in Figure 3B, expression of WT FPN1 at the plasma membrane of HEK293T cells decreased as a function of hepcidin concentrations. The p.Gly204Ser variant decreased less than the wild-type protein for all hepcidin concentrations, but still more than the p.Asn144His control ($p < 0.05$); the largest differences being observed at 0.54 nM hepcidin (Figure 3C).

Fernandes and collaborators demonstrated that the cysteine to serine and cysteine to threonine changes at position 326 of the human FPN1 C-ter domain prevent hepcidin binding, whereas the p.Asn144Asp and p.Asn144Thr missense mutations do not.³ We obtained comparable results using stably transfected T-Rex-293 cells expressing, upon induction by tetracycline, either the WT-FPN1-V5 fusion protein or the p.Cys326Tyr-V5 and p.Asn144His-V5 mutants. FPN1 expressing cells were treated with C-ter biotinylated hepcidin-25 for 30 minutes before being washed and lysed. The FPN1-hepcidin complexes were purified on streptavidin beads and revealed by western blot analysis with V5 antibody (Figure 4A). We then tested the p.Ser47Phe and p.Gly204Ser variants, also expressed from stably transfected T-Rex-293 cells. As shown in Figure 4B, the two FPN1 variants co-purified with hepcidin in amounts similar to that of WT FPN1 (Figure 4B).

Ubiquitination is a requirement for internalization and degradation of FPN1 following exposure to hepcidin.⁵ We studied the ubiquitination of the iron transporter before and after hepcidin treatment. T-Rex-293 cells stably expressing the different FPN1 variants were treated with human native hepcidin-25, and after V5-tagged protein purification, the ubiquitination was revealed by

Western blotting with an anti-poly/mono ubiquitin (FK2, Cell Signaling) antibody. As previously described,⁵ we showed that the detection of WT FPN1 ubiquitination was possible after 30 minutes of hepcidin treatment (Figure 5A). We used the p.Cys326Tyr mutant as a control. As displayed in Figure 5B, the p.Ser47Phe variant showed lower amounts of ubiquitination than the WT FPN1 after hepcidin treatment, while the p.Gly204Ser variant is comparable to the WT protein. These results are in concordance with the flow cytometry experiments.

References

1. Le Gac G, Ka C, Joubrel R, et al. Structure-Function Analysis of the Human Ferroportin Iron Exporter (SLC40A1): Effect of Hemochromatosis Type 4 Disease Mutations and Identification of Critical Residues. *Hum. Mutat.* 2013;34(10):1371–1380.
2. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood.* 2005;106(3):1092–1097.
3. Fernandes A, Preza GC, Phung Y, et al. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood.* 2009;114(2):437–443.
4. Guellec J, Elbahnsi A, Le Tertre M, et al. Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2019;fj201901857R.
5. Qiao B, Sugianto P, Fung E, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab.* 2012;15(6):918–924.

Figure legends

Table 1. Biological and clinical data of index cases and their relatives. *Age at diagnosis. **Moderate: up to 1 drink per day for women and up to 2 drinks per day for men. SF: serum ferritin (normal value: < 200 µg/L in females, < 300 in males); TS: transferrin saturation (normal value < 45%); HIC: hepatic iron concentration (normal value < 36 µmol/g); AST: aspartate aminotransferase (normal range: 5-50 IU/L); ALT: alanine aminotransferase (normal range: 5-50 IU/L); GGT: gamma-glutamyl transferase (normal range: 5-55 IU/L); RBC: red blood cell (normal range: 4.0-5.7 x 10¹²/L); Hb: hemoglobin (normal range: 12.0- 18.0 g/dL); Ht: hematocrit (normal range: 37-52 %); MCV: mean corpuscular volume (normal range: 80-95 fL).

Figure 1. Family study and pedigree with the p.Ser47Phe missense mutation. Arrow indicates the index case.

Figure 2. Effect of FPN1 variants on cell-surface expression and iron export. (A) HEK293T cells were transiently co-transfected with plasmids encoding either a V5-tagged FPN1 protein (WT or variant) or a V5-tagged HLA-A protein. Human leukocyte antigen (HLA)-A was used as a control and as a standard for normalization, being a cell-surface protein with no known role in iron metabolism. At 24 h after transfection, cell-surface proteins were selectively purified and analyzed by Western blotting using a peroxidase-conjugated mouse anti-V5 antibody. Densitometric scans of FPN1 levels (normalized to HLA-A) are shown in the upper part of the figure. The error bars represent the standard deviation of 3 independent experiments. (B) HEK293T cells were grown in 20 µg/mL ⁵⁵Fe-transferrin for 24 h before being transiently transfected with wild-type or mutated FPN1-V5 expression plasmids. After 15 h, cells were washed and then serum-starved. The graph shows the percentage of ⁵⁵Fe collected from the supernatant of FPN1-transfected and no-FPN1-transfected cells at 36 h. The error bars represent the standard deviation of 5 independent experiments (performed in triplicate). *P* values were calculated using Student's t-test. ** *p*<0.01 and **** *p*<0.0001.

Figure 3. FPN1 expression upon hepcidin treatment. (A) HEK293T cells were transiently transfected with WT or mutant pIRES2-FPN1(V5)-CD8 plasmid constructs. The following day cells were (black bar) or not (grey bar) treated with 4,3 nM of physiological hepcidin for 16 hours, and harvested for flow cytometry analysis. The median of fluorescence intensity (MFI) of the different populations was calculated using the FlowLogic (Milteniy Biotec) software, reported to the CD8-APC fluorescence and is displayed as a percentage of the MFI of the untreated control. (B) FPN1 surface expression of WT, N144H and G204S variants upon treatment with different concentrations of hepcidin. HEK293T cells were transfected with the different plasmid constructs, treated with different concentrations of hepcidin for 18 hours and harvested for flow cytometry analysis. (C) Focus on the results at the concentration of 0.54 nM. P-values were calculated using Student's t-test in comparison to the WT control. **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. N=5.

Figure 4. Hepcidin binding assay. (A and B) T-Rex-293 cells stably expressing the wild-type or mutants V5-tagged FPN1 were induced with tetracyclin and treated with 10mg/mL of C-ter biotinylated hepcidin for 30 minutes. Hepcidin/ferroportin complexes were pulled-down using the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 kit, and analysed by Western blotting using a peroxidase conjugated mouse anti-V5 antibody. The results of two independent experiments are presented (B).

Figure 5. FPN1 ubiquitination upon hepcidin treatment. (A) T-Rex-293 cells stably expressing the wild-type V5-tagged FPN1 were induced by tetracyclin and treated with 4,3nM of physiological hepcidin for 30 minutes to 2 hours. V5-tagged proteins were purified from cell lysates using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2, and eluates were blotted with anti-poly/monoUb Ab (FK2) and anti-V5 Ab. (B) T-Rex-293 cells stably expressing the different V5-tagged FPN1 variants were induced by tetracyclin and treated with 4,3 nM of physiological hepcidin for 30 minutes. V5-tagged proteins were purified from cell lysates using the V5- tagged Protein Purification Kit Ver.2, and eluates were blotted with anti-poly/monoUb Ab (FK2) and anti-V5 Ab. The results of three independent experiments are presented.

Supplementary Figure 1. Cell surface expression of WT and mutated FPN1 upon hepcidin treatment.

HEK293T cells were transiently co-transfected with plasmids expressing HLA(A)-V5 and either wild-type SLC40A1-V5 (WT) or SLC40A1-V5 variants. At 16h post-transfection, the cells were incubated in the presence or absence of hepcidin for 3 h. Plasma membrane proteins were purified and analyzed by Western blotting.

Table 1

Variant (p.)	Gender	Family Relationships	Age	TS	SF	ASAT	ALAT	GGT	PAL	RBC	Hb	Ht	VGM	Clinical observations	HIC ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	Alcohol consumption
Ser47Phe	M	Index case	49	66	2000			25		5	16	46	90		300	Daily
Ser47Phe	M	Brother	40	67	1769	22	35								340	Daily <60
Ser47Phe	M	Father	71													
Ser47Phe	F	First cousin	53	14	36	15	16	29	84	4,5	12,7	38,2	84	coronaropathy, high blood pressure		Abstinent
Ser47Phe	M	First cousin														
Ser47Phe	M	Uncle	65	59	1000		20	18			14,8		96,9	Cataract	80	Occasional
Ser47Phe	M	Uncle	75	58	1166											
Ser47Phe	F	Index case	50	52	609	16	18	21	4	4,01	12,7	37	92,4		100	Occasional
Ser47Phe (EMSAI)	M	Index case	70	50	944	21	12	13	83				96		160	Occasional
Ser47Phe (EMSAI)	M	Index case	33	24	889	77	36	14	100				93		210	Abstinent
Gly204Ser	M	Index case	60	66	842	32	50	24	61	4,76	14,4	43,9	92	arthralgias	280	Abstinent
Gly204Ser	F	Index case	47	100	1170	36	59	19	81	4,4	14,3	42	95		320	Abstinent

Figure 1

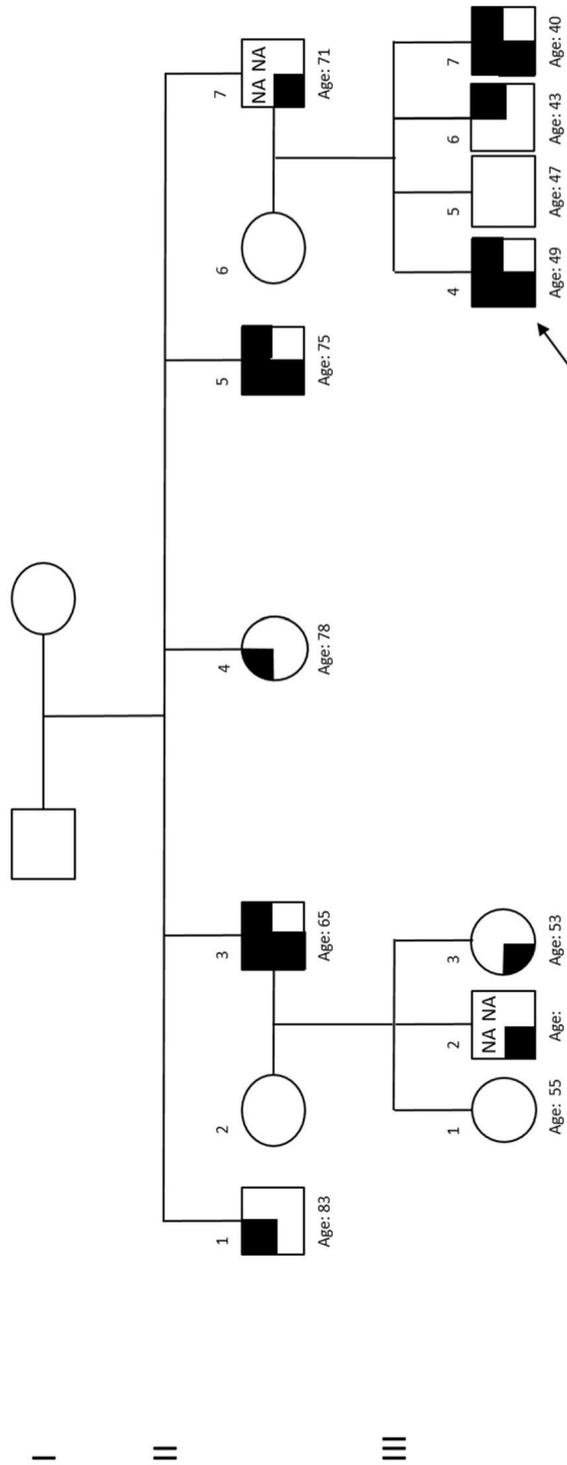
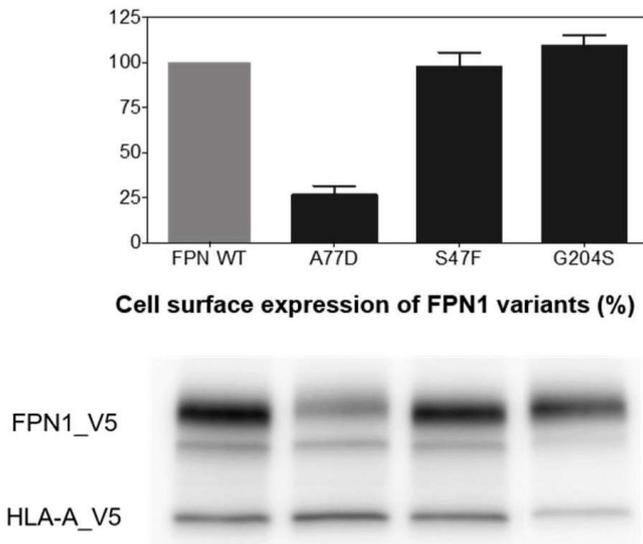


Figure 2

A



B

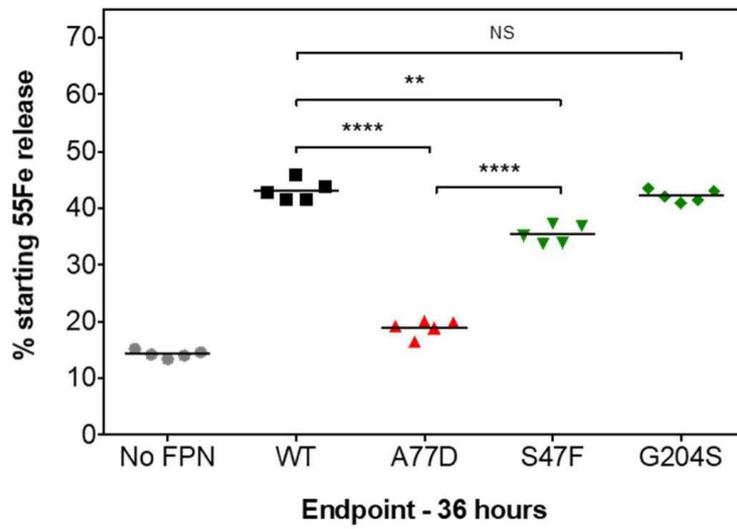


Figure 3

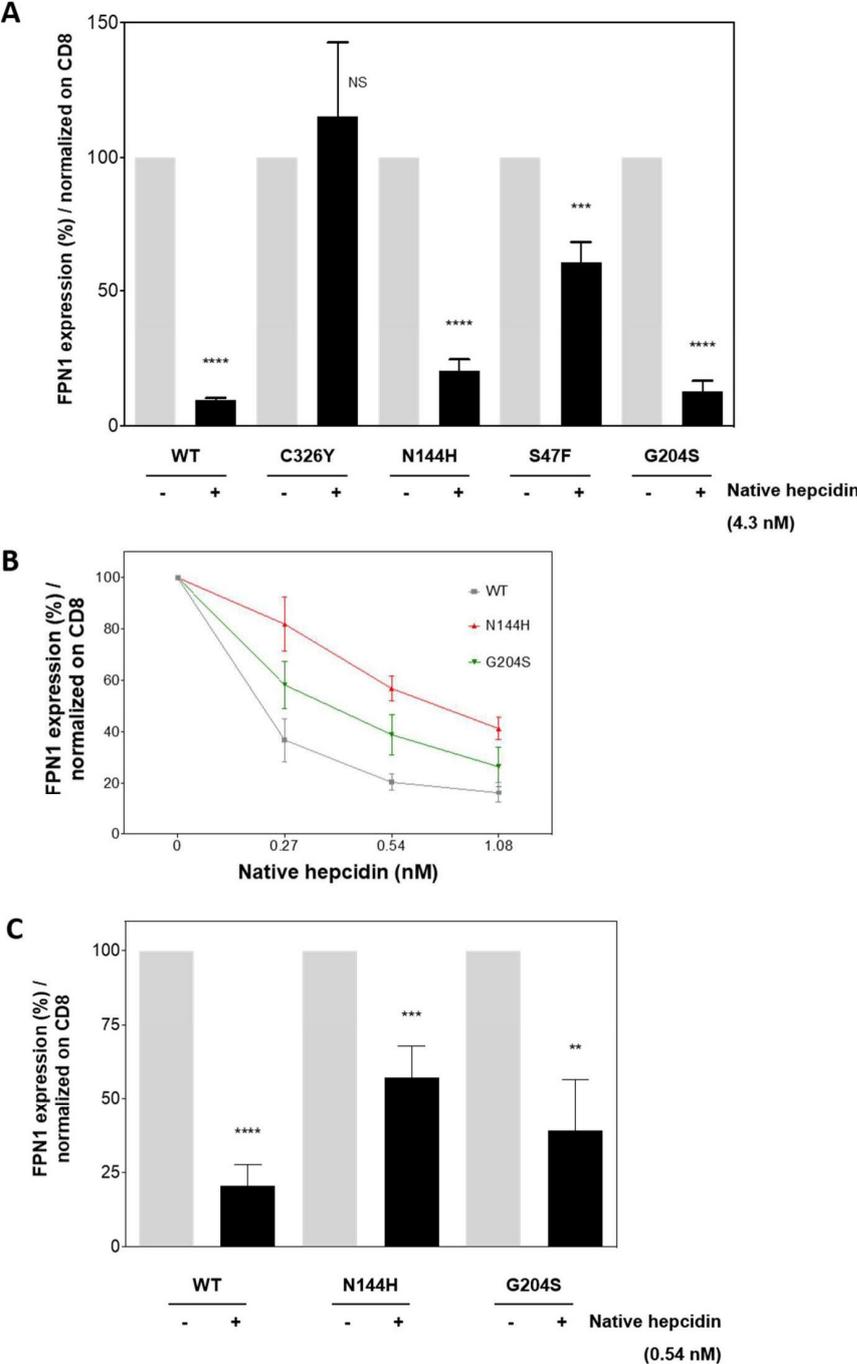
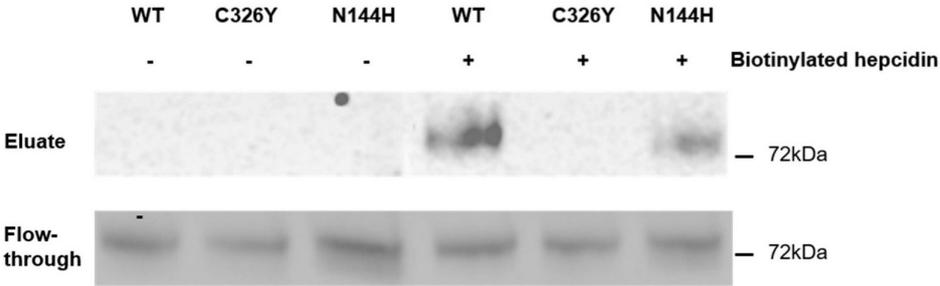


Figure 4

A



B

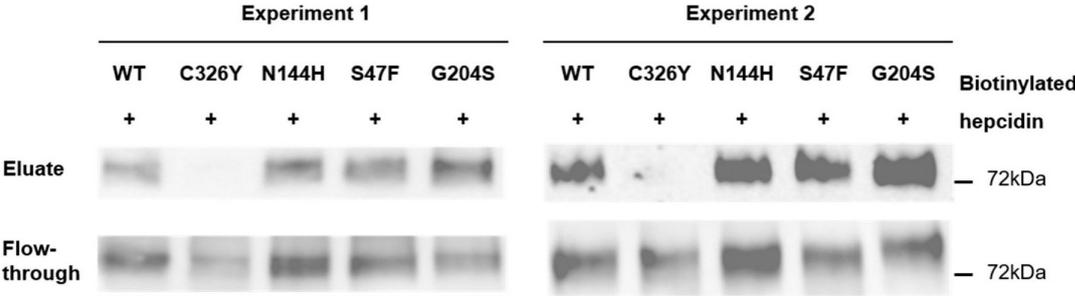
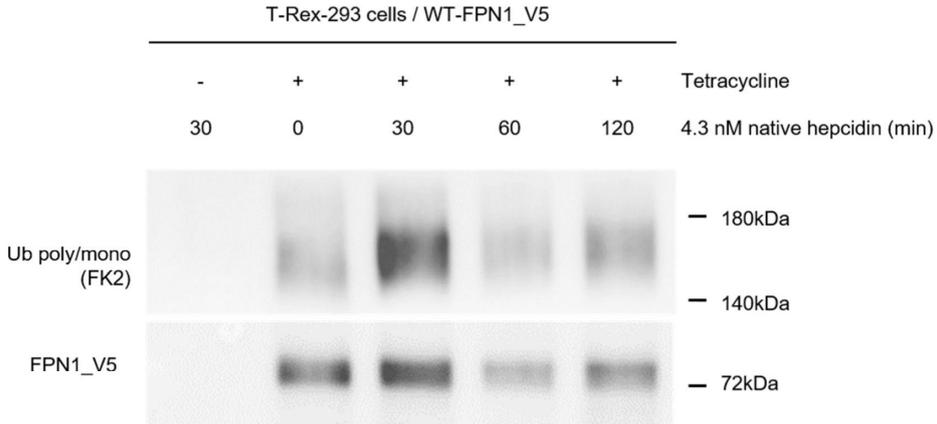
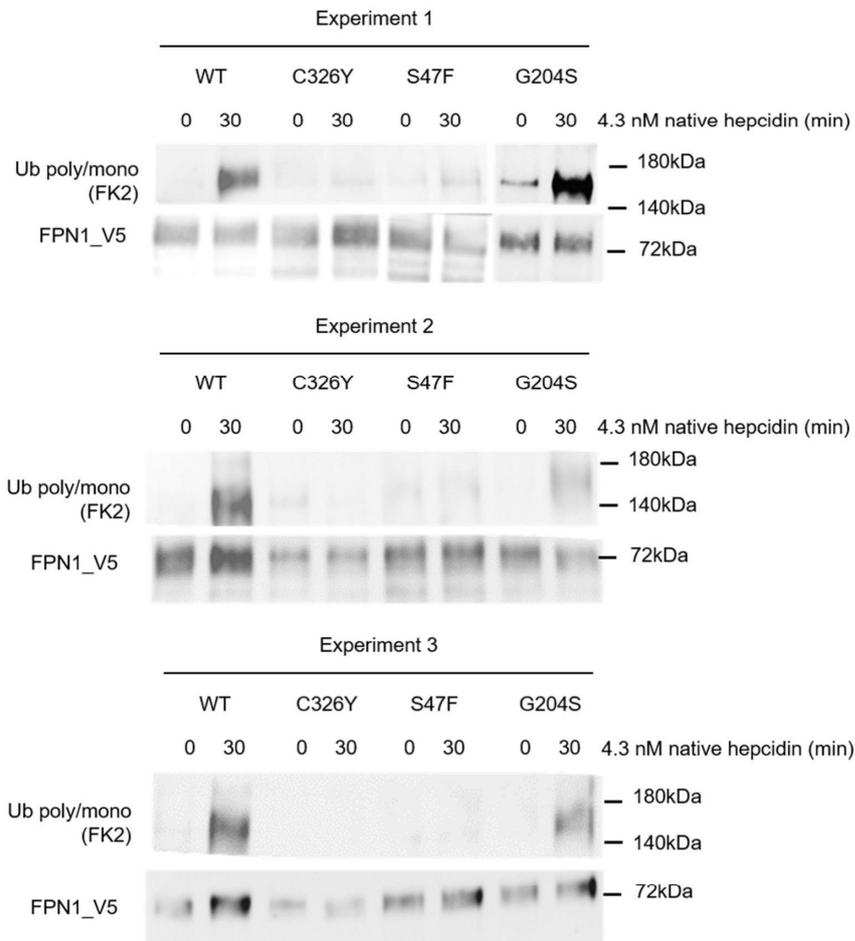


Figure 5

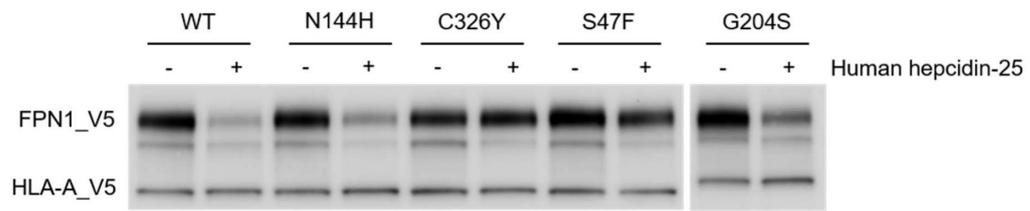
A



B



Supplementary Figure 1



Cette étude nous a permis de confirmer certaines observations déjà faites par d'autres équipes mais aussi de formuler de nouvelles hypothèses.

Contrairement à la mutation p.Ser47Phe, la mutation p.Gly204Ser avait déjà été rapportée dans la littérature. Cette mutation avait été identifiée chez des patients présentant un phénotype plutôt évocateur d'une hémochromatose de type 4B, ce qu'on retrouve bien ici (Santos *et al*, 2011; Le Lan *et al*, 2011). Les analyses *in vitro* nous ont permis d'observer que cette mutation n'entraînait pas de défaut de présence en membrane plasmique ni d'export du fer mais une résistance de la ferroportine à l'hepcidine comme l'avaient rapporté Détivaud et collaborateurs en 2013, puis Aschemeyer et collaborateurs en 2018 (Détivaud *et al*, 2013; Aschemeyer *et al*, 2018). L'utilisation d'une gamme de faibles concentrations d'hepcidine physiologique, nous a permis d'insister sur le caractère très partiel de cette résistance.

La caractérisation *in vitro* de la mutation p.Ser47Phe nous a permis, quant à elle, de mettre en lumière un phénomène original d'ambivalence. En effet, cette mutation a été observée comme entraînant un défaut fonctionnel du transporteur, mais également comme lui conférant une résistance partielle à l'hepcidine. Ce caractère ambivalent n'est pas sans rappeler la particularité du résidu Trp42 dont la substitution en alanine avait été observée, par l'équipe en 2013, comme engendrant à la fois une perte et un gain de fonction du transporteur (Le Gac *et al*, 2013).

Les patients porteurs de la mutation p.Ser47Phe présentent des phénotypes évocateurs d'une hémochromatose de type 4A, suggérant que l'effet « perte de fonction » de la mutation prime sur son effet « gain de fonction ». Cette observation paraît cohérente avec la fonction d'export du fer qui est permanente alors que la régulation par l'hepcidine du transporteur n'intervient que lors d'un excès de fer.

Pour mieux comprendre les résultats obtenus *in vitro*, le Dr. Isabelle Callebaut a étudié la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, déterminée en présence d'hepcidine et de cobalt (PDB 6WBV), qui vient tout juste d'être publiée par Billesbølle et collaborateurs (Figure 25) (Billesbølle *et al*, 2020).

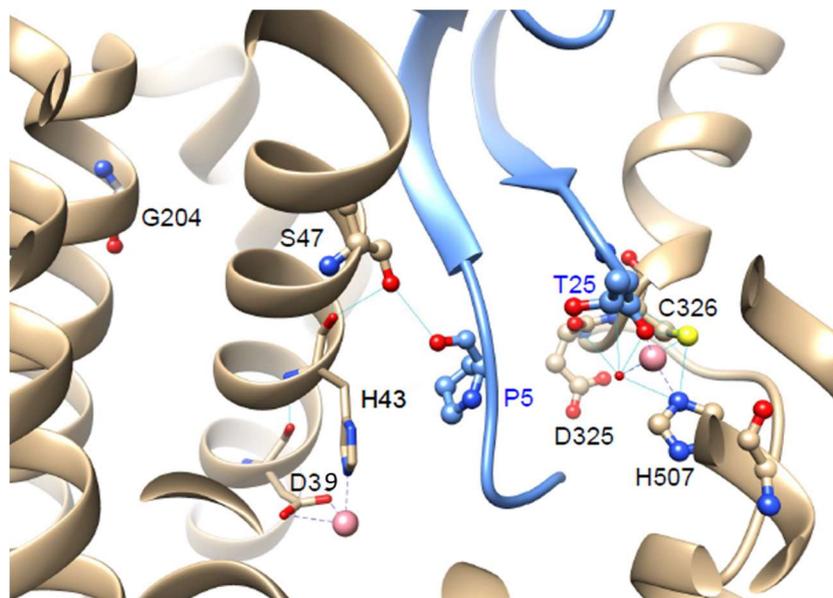


Figure 25 : Etude *in silico* de l'importance structurale et fonctionnelle des résidus Gly204 et Ser47.

Pour réaliser cette analyse, le Dr. Isabelle Callebaut a étudié la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, obtenue par cryomicroscopie électronique en présence d'hepcidine et de cobalt (PDB 6WBV ; résolution 2,50 Å) par Billesbølle et collaborateurs (Billesbølle *et al*, 2020). Pour ce faire, le logiciel «UCSF Chimera» a été utilisé. Le parcours de la chaîne polypeptidique est représenté sous forme de ruban, permettant de visualiser les structures secondaires régulières (hélices et brins). Quelques acides aminés clés sont montrés en représentation atomique, accompagnés de leurs numéros. La ferroportine apparaît en beige, l'hepcidine en bleu, les ions Co^{2+} en rose.

L'analyse *in silico* suggère qu'en position 204, la glycine, qui est le plus petit des acides aminés, permet un rapprochement très étroit entre les hélices transmembranaires 5 et 6. Ce « packing » serait critique pour l'organisation générale du lobe N-terminal, à l'image de l'importance structurale donnée à ce résidu pour le rapprochement hélice/hélice chez d'autres protéines MFS et notamment chez le transporteur de nitrate NrTA d'*Aspergillus nidulans* (Unkles *et al*, 2012). La mutation p.Gly204Ser perturbe une structure locale dans une région importante pour la liaison à l'hepcidine. Cela pourrait avoir un retentissement indirect sur l'interaction entre l'hepcidine et le lobe N-terminal de la ferroportine et/ou limiter certains des changements conformationnels qui doivent accompagner l'ubiquitination des lysines de la boucle intracellulaire 3 (IC3). Nos expériences *in vitro* ne nous ont pas permis de vérifier ces hypothèses, probablement parce que les techniques mises en œuvre manquent de sensibilité pour révéler cet ou ces événement(s) très certainement « subtil(s) ». Il est toutefois intéressant de rappeler qu'Aschemeyer et collaborateurs avaient rapporté, en 2018, que cette mutation était associée à une moindre ubiquitination du transporteur en présence du peptide régulateur. Comme nous, l'équipe américaine n'avait en revanche pas observé de défaut d'interaction hepcidine/ferroportine (Aschemeyer *et al*, 2018).

D'autre part, l'analyse *in silico*, réalisée par le Dr. Isabelle Callebaut, nous permet d'avancer de premières hypothèses concernant les bases moléculaires de l'ambivalence de la mutation p.Ser47Phe (Figure 25).

Il a en effet été observé que le groupement hydroxyl de la sérine 47, localisée sur l'hélice transmembranaire 1, établissait deux liaisons hydrogènes avec les oxygènes de la chaîne principale de deux acides aminés. La première est établie avec l'histidine 43 avoisinante, dont l'azote de l'imidazole est observé ici comme coordonnant directement le cation divalent, et la deuxième avec la proline 5 de l'hepcidine. L'introduction d'une phénylalanine à cette position engendre la perte de ces liaisons. Cela

pourrait, d'une part, affecter l'environnement local de l'hélice et la coordination du cation divalent par l'histine 43 et l'acide aspartique 39 (position identifiée par Billesbølle et collaborateurs comme interagissant très transitoirement avec le fer (Billesbølle *et al*, 2020)) et, d'autre part, affecter directement la liaison hepcidine/ferroportine. L'encombrement stérique généré par la présence d'une phénylalanine pourrait, de plus, pénaliser le « rapprochement » hepcidine/ferroportine.

Nos explorations *in vitro* ont permis d'observer une diminution de l'ubiquitination du transporteur muté en présence du peptide régulateur, mais pas de différence de fixation entre hepcidine et ferroportine. Il faut toutefois remarquer que les tests ont été effectués avec une hepcidine biotinylée en position C-terminale, à une concentration dépassant les valeurs physiologiques habituellement mesurées chez l'Homme (comprises entre 1 et 30 nM (Galesloot *et al*, 2011)). A nouveau, la capacité de nos tests à pleinement révéler des effets subtils peut être questionnée.

III- Questions posées au cours de la thèse

- a- Caractérisation structurale et fonctionnelle des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn en lien avec les observations de Deshpande et collaborateurs

- i. Contexte

En 2018, Deshpande et collaborateurs ont identifié un site de liaison du fer dans le lobe C-terminal du transporteur (Figure 26) (Deshpande *et al*, 2018). Son existence vient tout juste d'être confortée par les travaux de Billesbølle et collaborateurs qui ont étudié la ferroportine humaine par cryomicroscopie électronique (Billesbølle *et al*, 2020).

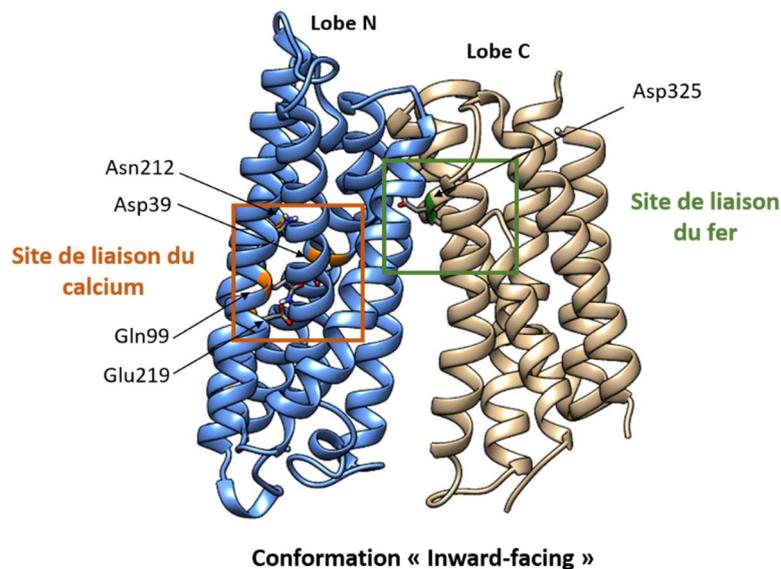


Figure 26 : Localisation des sites de liaison du fer et du calcium proposés par Deshpande et collaborateurs en 2018, sur le modèle 3D de la ferroportine humaine construit par le Dr. Isabelle Callebaut en conformation « inward-facing ».

Le site de liaison du fer qui inclurait notamment l'acide aspartique 325 est présenté en vert, le site de coordination du calcium, qui comprendrait les résidus Asp39, Gln99, Asn212 et Glu219, apparaît en orange (Deshpande *et al*, 2018).

Deshpande et collaborateurs avaient identifié l'acide aspartique en position 325 (TM7) comme étant un résidu critique pour la coordination du fer (Deshpande *et al*, 2018).

En plus des arguments structuraux apportés par les auteurs, on peut rappeler que l'acide aspartique est communément retrouvé dans les sites de liaison du fer de nombreuses protéines non hémiques (Baker *et al*, 2003; Dudev & Nikolova, 2016; Ehrnstorfer *et al*, 2014; Lindley *et al*, 1997).

Cependant, deux points méritent d'être discutés dans les éléments présentés par l'équipe américaine (Deshpande *et al*, 2018) :

- (i) la comparaison Asp325/His261,
- (ii) le choix des variants testés et leur évaluation fonctionnelle

Les auteurs s'étaient initialement intéressés au résidu Asp325 suite à un lien qu'ils avaient établi avec l'histidine 261 de BbFpn. Cet acide aminé avait été identifié comme un des éléments permettant de fixer le cation divalent Ni²⁺ sur une structure cristallographiée de l'homologue bactérien (PDB 6BTX). Bien que ces résidus soient tous deux très représentés dans les sites de liaison du fer de nombreuses protéines non héminiques, ils ne sont pas équivalents (Dudev & Nikolova, 2016; Bonaccorsi di Patti *et al*, 2015). De plus ces acides aminés sont positionnés au niveau de la région « déroulée » qui sépare le TM7a du TM7b, une région dont la séquence et la conformation divergent entre l'Homme et la bactérie (Taniguchi *et al*, 2015; Deshpande *et al*, 2018; Billesbølle *et al*, 2020). La comparaison établie entre Asp325 et His261 pose donc question.

Les auteurs ont ensuite vérifié l'importance de ce résidu *in vitro*. Pour ce faire, ils ont analysé les conséquences de plusieurs substitutions à cette position 325 sur la fonction d'export du fer de la ferroportine humaine. Ces derniers ont choisi de muter l'acide aspartique (acide aminé polaire et chargé négativement) en alanine (acide aminé non polaire), en histidine (acide aminé polaire et pouvant apporter une charge positive) et en asparagine (acide aminé polaire et non chargé).

De manière similaire aux résultats obtenus en 2014 par Bonaccorsi di Patti et collaborateurs à partir de cellules HEK293T, Deshpande et collaborateurs ont observé que le mutant p.Asp325Ala pénalisait fortement la capacité de la ferroportine à exporter le ⁵⁵Fe contenu dans des oocytes de xénopes (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014; Deshpande *et al*, 2018). Il en était de même pour la mutation p.Asp325His. La mutation p.Asp325Asn engendrait, quant à elle, un effet délétère plus modeste (Deshpande *et al*, 2018).

Ces résultats suggèrent un rôle important de l'acide aspartique 325 pour la prise en charge du fer. On peut cependant remarquer que les résultats présentés, de microscopie à fluorescence et de western blot, ne permettent pas de vérifier que les différents mutants testés impactent le transport du fer sans affecter la présence du transporteur à la surface de la cellule. Or, cette distinction est particulièrement importante pour confirmer une liaison directe avec le métal (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014; Deshpande *et al*, 2018).

Ainsi, j'ai souhaité ré-évaluer, sur la base de méthodes mises au point par l'équipe dans laquelle je réalise ma thèse, les effets sur la fonction d'export du fer mais aussi et surtout sur la présence en membrane plasmique de la ferroportine, des substitutions p.Asp325Ala/His/Asn.

ii. Matériel et méthodes

1. Analyse structurale de la ferroportine humaine

Les deux structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine (en absence (PDB 6W4S) ou en présence d'hepcidine et de cobalt (PDB 6WBV)) publiées par Billesbølle et collaborateurs ont été analysées par le Dr. Isabelle Callebaut (Billesbølle *et al*, 2020). Pour ce faire, le logiciel « UCSF Chimera » a été utilisé.

2. Constructions plasmidiques

Le plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 a été construit, avant mon arrivée au laboratoire, par clonage de la séquence codante pleine longueur du gène *SLC40A1* (GenBank NM_014585.5) dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-his-TOPO (Invitrogen). Pour ce faire, une stratégie de type « TA Cloning », reposant sur la complémentarité des adénines et thymidines, situées respectivement aux extrémité 3' de l'insert et du vecteur linéarisé, a été adoptée (coffret « TOPO TA » ; Invitrogen). Ce plasmide, codant la ferroportine de type sauvage en fusion avec un tag V5 en C-terminal, a été utilisé pour générer les différentes constructions codant les différents mutants de la ferroportine étudiés ici. Les mutations ont été introduites dans la séquence codante du gène *SLC40A1* par mutagenèse site-dirigée à l'aide du coffret « QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis » (Agilent technologies) selon les recommandations du fournisseur. Pour ce faire, 20 ng de plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 ont été utilisés pour la réaction de mutagenèse réalisée avec les amorces listées dans le tableau II. Le programme de PCR comportait une phase de dénaturation initiale à 95°C-2 min, 18 cycles d'amplification (95°C-20 sec, 60°C-10 sec, 68°C-4 min) et une phase finale d'extension à 68°C-5 min.

Tableau II : Liste des amorces de mutagenèse utilisées pour générer les différentes constructions plasmidiques ayant servi à étudier le rôle de l'acide aspartique 325

Mutations	Amorce sens	Amorce antisens
p.Val162del	5'-CAAAGGGATTGGATTGTTGTTGCAGGAGAAGACAGAAG-3'	5'-CTTCTGTCTTCTCTGCAACAACAATCCAATCCCTTTG-3'
p.Asp325Ala	5'-CTGTCCTGGGCTTTGCCTGCATCACCACAGG-3'	5'-CCTGTGGTGATGCAGGCAAAGCCCAGGACAG-3'
p.Asp325His	5'-ATATGACTGTCCTGGGCTTTCACTGCATCACCAC-3'	5'-GTGGTGATGCAGTGAAAGCCCAGGACAGTCATAT-3'
p.Asp325Asn	5'-ATATGACTGTCCTGGGCTTTAACTGCATCACCAC-3'	5'-GTGGTGATGCAGTTAAAGCCCAGGACAGTCATAT-3'

Après digestion du plasmide matrice par l'enzyme DpnI à 37 °C pendant 5 min, 50 µL de bactéries compétentes « Stellar™ Competent cells » (Clontech) ont été transformées avec 2 µL de mélange réactionnel. Les plasmides en ont été extraits et purifiés grâce au coffret « Nucleospin Plasmid miniprep » (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. La présence de la mutation souhaitée et la conformité de la séquence codante du gène *SLC40A1* ont été vérifiées par séquençage de type Sanger (amorces présentées dans le tableau III) sur un séquenceur de type « Applied Biosystems®3130XL (16-capillary) Genetic Analyzer », suite à une réaction de séquence effectuée grâce au coffret « BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing » (Thermo Fisher). Une fois validés, les plasmides ont été amplifiés en bactéries, extraits et purifiés en plus grandes quantités à l'aide du coffret « NucleoBond® Xtra Midi EF » (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur, puis revérifiés par séquençage de type Sanger.

Tableau III : Amorces utilisées pour vérifier par séquençage la conformité de la séquence codante du gène *SLC40A1*

Amorces	Séquences
SLC40A1-1F	5'-GTTTCTGGTAGAGCTCTATG-3'
SLC40A1-2R	5'-GGATGATTCCACACAGGATG-3'
SLC40A1-3F	5'-AAGGGATTGGATTGTTGTTG-3'
SLC40A1-4F	5'-TGGGTGTGAAAGACTCTAAC-3'
SLC40A1-5F	5'-CCTGGACTTGTCCGTTTCTC-3'
SLC40A1-6F	5'-TTCATCATGGTCATCCTGGC-3'

3. Culture cellulaire

La lignée cellulaire embryonnaire de rein humaine HEK293T (American Type Culture Collection) a été cultivée comme préconisé par le fournisseur : à 37 °C, en atmosphère humide sous 5 % de CO₂ dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM) (Lonza) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Eurobio) (milieu complet).

4. Etude de la capacité de la ferroportine à exporter le fer

Pour étudier la fonctionnalité des différents mutants de la ferroportine, des expériences de relargage de ⁵⁵Fe ont été menées. Pour cela, une solution d'holotransferrine marquée (⁵⁵Fe) a été préparée selon les étapes suivantes : 1,2 µL de ⁵⁵FeCl₃ (concentration à 1496.91 MBq/mL ; PerkinElmer) ont été incubés sous agitation pendant 24 h à température ambiante dans 10 mL de tampon di(Na)-NTA (100 mM acide nitrilotriacétique, 0,1 N HCl, pH 5). La solution de ⁵⁵Fe-NTA ainsi obtenue a été incubée (ratio 1:1 (volume :volume)) pendant 1 h à 37 °C avec de l'apotransferrine (Sigma) reprise à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de NaCl (100 mM) – NaHCO₃ (20 mM). L'holotransferrine marquée résultante a ensuite été séparée du ⁵⁵Fe libre par exclusion sur colonne de désalage PD-10 (GE Healthcare) en fraction de 1 mL. Le nombre de coups par minute (cpm) de chaque fraction éluée dans du PBS (« Phosphate Buffered Saline ») 1X a été intégré pendant 2 min en présence de liquide de scintillation « Ultima Gold MV » (PerkinElmer) sur un « TRI-CARB 1600 CA scintillation counter » (PerkinElmer). En parallèle, la concentration en holotransferrine de ces différentes fractions a été évaluée par test colorimétrique grâce au coffret « BC Assay » (Interchim). Les fractions avec la plus forte activité spécifique (cpm/ µg d'holotransferrine) ont été sélectionnées.

Pour réaliser les tests d'export de ⁵⁵Fe, les cellules HEK293T ont étéensemencées en plaques 12 puits à une densité de 1,7.10⁵ cellules/puits en milieu complet. 24 h plus tard, les cellules ont été transfectées avec 1 µg de plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 codant les ferroportines de type sauvage ou mutées à l'aide de l'agent de transfection jetPEI® (Polyplus transfection) avec un ratio 2 : 1 ; jetPEI (µL) : ADN plasmidique (µg). 24 h post-transfection, les cellules ont été incubées 16 h en présence d'holotransferrine marquée (⁵⁵Fe) (20 µg/mL). Chaque condition a été réalisée en triplicat pour les temps 0 et 36 h. Après un lavage au PBS, les cellules ont été incubées pendant 36 h en milieu Pro293a-CDM-serum free (Biowhittaker, Lonza). Au terme de cette incubation, le milieu des cellules a été centrifugé à 500 x g pendant 5 min. La radioactivité contenue dans les cellules au temps 0 et dans les surnageants au temps 36 h a été comptée (cpm) par scintillation liquide comme décrit précédemment. Le pourcentage de ⁵⁵Fe exporté par les cellules dans le milieu de culture a été calculé selon la formule suivante : (cpm dans le surnageant à 36 h / cpm intracellulaire à T=0) x 100.

5. Etude de la présence en membrane plasmique de la ferroportine

Pour étudier la présence en membrane plasmique des différents variants de la ferroportine, les cellules HEK293T ont étéensemencées en plaques 6 puits à raison de 3.10⁵ cellules/puits en milieu complet. 24 h plus tard, les cellules ont été co-transfectées par 1 µg de plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 codant les ferroportines étiquetées V5 de type sauvage ou mutées et 100 ng de plasmide pcDNA3.1-HLA-A-V5 codant la protéine membranaire HLA-A étiquetée V5 (plasmide construit avant mon arrivée dans

l'équipe selon le même principe que le plasmide codant la ferroportine) à l'aide de l'agent de transfection jetPEI® (Polyplus transfection) comme décrit précédemment. 48 h post-transfection, les protéines de la membrane plasmique ont été isolées grâce au coffret « Pierce™ Cell Surface Protein Isolation » (Thermo Scientific). Pour cela, le tapis cellulaire a été incubé avec le réactif « Sulfo-NHS-SS-Biotin » pendant 30 min sur glace sous agitation. Les cellules ont ensuite été décollées par aspiration/refoulement avant d'être lavées puis lysées. Les protéines de la membrane plasmique biotinyllées ont par la suite été isolées par affinité sur colonne de billes d'agarose couplées à de la neutravidine, avant d'être éluées dans un tampon SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis »), DTT (« DiThioThréitol ») (50 mM).

La présence en membrane plasmique de la ferroportine a ensuite été évaluée par western blot. Les protéines membranaires éluées ont été déposées (20 µL) en gel de polyacrylamide 10 % (Bio-Rad). Après une étape de migration d'1 h à 150 V constant, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (« Amersham™ protari™ 0.45 µmNC » ; GE Healthcare) par transfert semi-sec à 25 V pendant 30 min (Turbo-Blot ; Bio-Rad). La membrane a ensuite été saturée pendant 1 h dans du TBS (« Tris Buffered Saline ») Tween 0,05 %, lait 5 % avant d'être incubée 1 h avec un anticorps anti-V5 (R960-25 ; dilué au 1/5000^e ; Thermo Fisher Scientific) dans du TBS Tween 0,05 %, lait 5 %. Après plusieurs lavages en TBS Tween 0,05 %, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué HRP (« HorseRadish Peroxidase ») (dilué au 1/1000^{ème} ; Dako) dans du TBS Tween 0,05 %, lait 5 % pendant 1 h. Le signal chemiluminescent a été enregistré grâce au système GeneGnome (Syngene) après que la membrane, de nouveau lavée au TBS Tween 0,05 % ait été incubée avec du substrat « Lumina Forte » (Merck Millipore) pendant 2 min 30. Le niveau d'expression en membrane plasmique de la ferroportine a été évalué par densitométrie à l'aide du logiciel GeneTools software (Syngene), en deux étapes. Tout d'abord, l'expression de la ferroportine a été normalisée sur celle de la protéine HLA-A, issue de la co-transfection, puis l'expression normalisée des différents variants de la ferroportine a été rapportée à celle de la protéine sauvage.

6. Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été comparées en utilisant un test de Student apparié « two tailed » à l'aide du logiciel « GraphPad Prism ».

iii. Résultats

Nous avons tout d'abord évalué les conséquences des trois substitutions sur la capacité de la ferroportine à exporter le fer. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'export de ⁵⁵Fe à partir de cellules HEK293T transfectées transitoirement avec un plasmide pcDNA3.1 « vide » ou un plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 codant une ferroportine de type sauvage ou mutée (Figure 27).

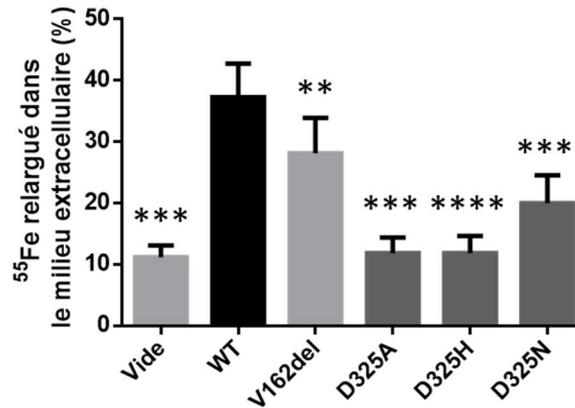


Figure 27 : Evaluation de la capacité de la ferroportine de type sauvage et des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn à exporter le fer.

Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec un plasmide pcDNA3.1 « vide » ou un plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 codant une ferroportine « Wild Type » (WT) ou mutée. 24h post-transfection, les cellules ont été incubées en présence d'holotransferrine radiomarquée (^{55}Fe) pendant 16h. Après avoir été lavées, les cellules ont été incubées dans du milieu dépourvu de sérum. Le relargage de ^{55}Fe dans le surnageant a été mesuré après 36 h d'incubation. Le pourcentage de ^{55}Fe exporté par les cellules dans le milieu de culture indiqué ici a été calculé selon la formule suivante : $(\text{cpm dans le surnageant à 36 h} / \text{cpm intracellulaire à T=0}) \times 100$. Les expériences ont été réalisées 5 fois de manière indépendante en triplicat. Les valeurs p ont été calculées par test de Student ; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ par comparaison avec la ferroportine WT.

Nous pouvons d'abord observer que les cellules HEK293T, exprimant la ferroportine de type sauvage, relarguent plus de ^{55}Fe dans le milieu extracellulaire que les cellules ne sur-exprimant pas le transporteur (de l'ordre de trois fois plus). Nous pouvons ensuite remarquer que les mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn exportent moins de ^{55}Fe que la protéine de type sauvage, avec des écarts comparables à ceux rapportés par les équipes américaine et italienne : de l'ordre de 70 % de réduction pour les mutants p.Asp325Ala et p.Asp325His et de 50 % de réduction pour le mutant p.Asp325Asn (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014; Deshpande *et al*, 2018).

Nous avons ensuite exploré les conséquences des trois substitutions sur la présence en membrane plasmique de la ferroportine en utilisant la méthode adoptée par l'UMR1078 pour la caractérisation de plus d'une trentaine de variants (Le Gac *et al*, 2013; Callebaut *et al*, 2014; Ka *et al*, 2018). Ainsi, les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec un plasmide pcDNA3.1_FPN-V5, codant une ferroportine de type sauvage ou mutée, et un plasmide pcDNA3.1-HLA-A-V5 codant une protéine HLA(A). Cette seconde protéine membranaire, qui n'a aucun rôle connu dans le métabolisme du fer, a été utilisée pour normaliser les résultats issus des différentes transfections. Cette démarche a été facilitée par l'addition d'un épitope V5 à chacune des deux protéines, alors simultanément révélées lors d'expériences de western blot ciblant les protéines de la membrane plasmique.

Le variant p.V162del, qui avait été observé comme présentant un défaut de présence en membrane plasmique par notre équipe et d'autres, a été utilisé comme témoin (Figure 28) (Schimanski *et al*, 2005; Callebaut *et al*, 2014).

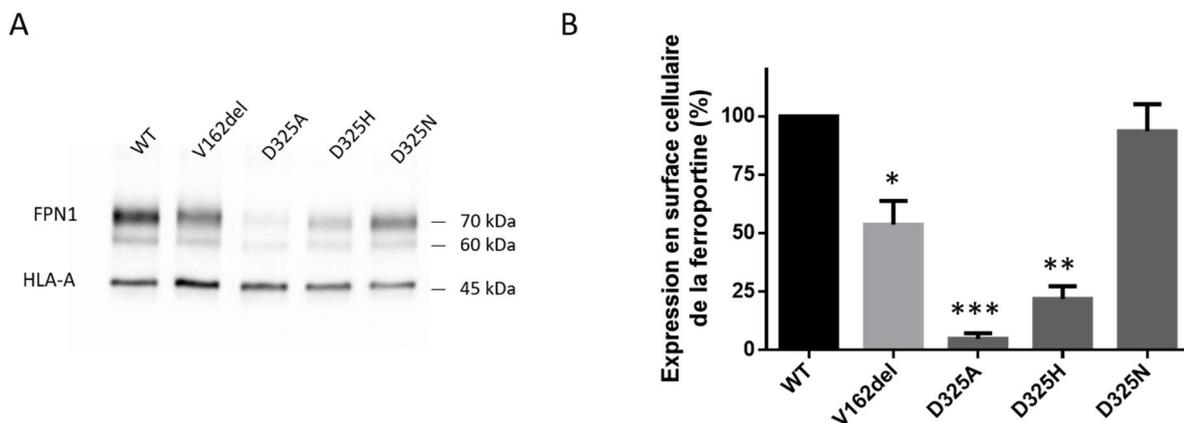


Figure 28 : Evaluation de la présence à la surface des cellules HEK293T de la ferroportine de type sauvage et des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn.

(A) Les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec un plasmide pcDNA3.1_FPN-V5 codant une ferroportine de type sauvage ou mutée et un plasmide contrôle pcDNA3.1-HLA-A-V5 exprimant la protéine membranaire HLA(A). 48h post-transfection, les protéines de la membrane plasmique ont été isolées et analysées par western blot en utilisant un anticorps anti-V5. (B) Densitométrie et normalisation des niveaux d'expression de la ferroportine à la membrane plasmique. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante. La valeur p a été calculée par un test de Student ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par comparaison avec la ferroportine « Wild Type » (WT).

Comme attendu, le variant p.Val162del montre un défaut significatif de présence membranaire avec une expression en surface cellulaire estimée à 54 % de celle de la protéine de type sauvage. De fait, ce variant n'exporte pas le fer de manière comparable à la protéine de type sauvage (Figure 27). D'après nos résultats et contrairement à ce qui avait été annoncé par les équipes italienne et américaine, la substitution de l'acide aspartique 325 en alanine (p.Asp325Ala) affecte sévèrement la présence en membrane plasmique de la ferroportine (-95 % d'expression membranaire). Il en est de même lorsque cet acide aminé est substitué par une histidine (p.Asp325His) (-78 % d'expression membranaire). Seule la substitution p.Asp325Asn ne provoque pas une diminution significative de la présence en membrane plasmique du transporteur.

Pour expliquer les différences observées, le Dr. Isabelle Callebaut a étudié les structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine seule (PDB 6W4S) ou en présence d'hepcidine et de cobalt (PDB 6WBV) qui ont très récemment été publiées par Billesbølle et collaborateurs (Figure 29) (Billesbølle *et al*, 2020).

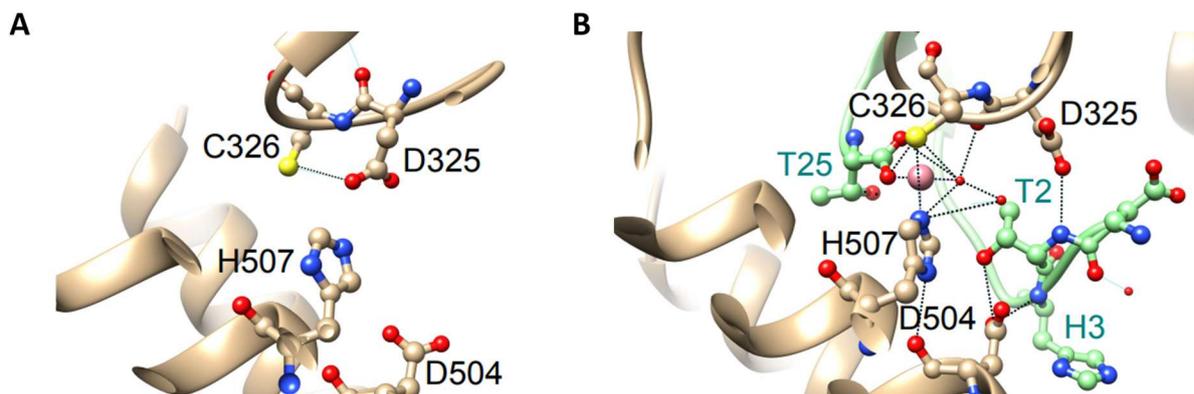


Figure 29 : Analyse *in silico* du rôle de l'acide aspartique 325 à partir des structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine publiées par Billesbølle et collaborateurs.

Le Dr. Isabelle Callebaut a étudié les structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine, publiées par Billesbølle et collaborateurs, qui ont été déterminées en absence (PDB 6W4S ; résolution 3,20 Å) (A) ou en présence (B) d'hepcidine et de cobalt (PDB 6WBV ; résolution 2,50 Å) par cryomicroscopie électronique (Billesbølle *et al*, 2020). Le parcours de la chaîne polypeptidique est représenté sous forme de ruban, permettant de visualiser les structures secondaires régulières (hélices et brins). Les acides aminés clés sont montrés en représentation atomique, accompagnés de leurs numéros. Sur les figures, la ferroportine apparaît en beige, l'hepcidine en vert et le cobalt en rose.

L'analyse *in silico* de la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, obtenue par cryomicroscopie électronique en absence d'hepcidine et de cobalt, révèle que le résidu Asp325 *via* l'un de ces deux oxygènes delta, établit une liaison hydrogène avec le groupement –SH de la cystéine 326 (Figure 29A). La substitution de l'acide aspartique 325 par une asparagine conserve un des deux oxygènes et permet le maintien de cette liaison, ce qui n'est pas le cas avec les substitutions p.Asp325Ala et p.Asp325His. En laissant la cystéine 326 libre, ces deux mutants pourraient modifier la conformation locale et empêcher un repliement correct du transporteur dans la bicouche lipidique ce qui pourrait expliquer le défaut de présence en membrane plasmique observé en Figure 28.

Bien que l'acide aspartique 325 semble critique, il ne suffit pas, seul, à l'image d'autres sites de liaison du fer de protéines non hémiques, à rendre compte de la coordination du fer (Dudev & Nikolova, 2016). Comme les travaux publiés par Billesbølle et collaborateurs l'indiquent clairement, les résidus His507 et Asp504 interviennent également (Billesbølle *et al*, 2020).

Ce que permet de révéler en plus l'analyse réalisée par le Dr. Isabelle Callebaut à partir de la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, obtenue en présence d'hepcidine et de cobalt, c'est que la cystéine 326 est engagée dans un réseau de ponts avec des atomes directement impliqués dans la coordination du métal (His507, Thr25 de l'hepcidine et une molécule d'eau) (Figure 29B). L'acide aspartique 325 intervient dans ce réseau mais uniquement par l'intermédiaire de l'oxygène de sa chaîne principale qui forme une liaison indirecte avec le métal en liant une molécule d'eau. Un des deux oxygènes delta de ce résidu est par ailleurs engagé dans une liaison hydrogène avec l'azote de la chaîne principale de la thréonine 2 de l'hepcidine.

b- Analyse de l'effet de variations faux-sens sur l'épissage du pré-ARN messenger *SLC40A1*

Les variations faux-sens peuvent avoir un effet délétère au niveau protéique et/ou au niveau ARN. L'association entre ce type de variations, des anomalies d'épissage et un phénotype clinique a maintenant été observée dans différentes maladies génétiques (Di Giacomo *et al*, 2013; Kergourlay *et al*, 2014; Donadon *et al*, 2018; Zucker *et al*, 2011; Dagueneat *et al*, 2015; Scotti & Swanson, 2016).

La question de l'existence et de l'importance d'un tel mécanisme physiopathologique dans le contexte de l'hémochromatose de type 4 n'a jamais été traitée. Seules deux équipes se sont intéressées à l'effet délétère que pourraient exercer des variations faux-sens sur l'épissage de l'ARN pré-messenger *SLC40A1* (Lee *et al*, 2007; Callebaut *et al*, 2014). Bien souvent, leur pathogénicité a uniquement été évaluée au niveau protéique, par le biais d'études fonctionnelles reposant sur la surexpression d'un ADN complémentaire (Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019).

J'ai tiré profit de l'expertise développée par l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse pour étudier l'effet sur l'épissage de variants faux-sens du gène *SLC40A1* et poser la question d'un possible lien avec la forte hétérogénéité phénotypique observée dans l'hémochromatose de type 4.

Pour ce faire, nous avons d'abord sélectionné, parmi les 67 variants faux-sens du gène *SLC40A1* rapportés dans la littérature, ceux qui avaient clairement été associés à des phénotypes de surcharges en fer (Mayr *et al*, 2010; Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019). Différents outils *in silico* nous ont ensuite permis de prédire, parmi les 58 variants faux-sens retenus, ceux qui étaient les plus susceptibles d'affecter le processus d'épissage. Ainsi, 15 variants, pointés comme potentiellement délétères, ont été explorés *in vitro* par une approche de type « midi-gène ».

Globalement, cette étude nous a permis d'observer que les variants faux-sens n'ont que très peu d'effet sur l'épissage du pré-ARN messenger *SLC40A1*.

Nous avons confirmé l'effet délétère sur l'épissage de la variation c.1402G>A (p.Gly468Ser) qui avait été décrit en 2007 par Lee et collaborateurs (Lee *et al*, 2007). Nous avons établi que la substitution p.Gly468Ser, directement exprimée à partir d'un ADN complémentaire, n'avait aucun effet délétère sur la fonction d'export du fer de la ferroportine ; cela n'avait pas été documenté auparavant. Nous avons finalement observé un épissage alternatif de l'exon 5, processus qui pourrait être modulé par certaines mutations telles que la mutation c.430A>G (p.Asn144Asp) en contribuant à un mécanisme de gain de fonction.

Ce projet a donné lieu à un article (présenté ci-dessous) que nous venons de soumettre au journal « Blood Cells, Molecules and Diseases ».

Splicing analysis of *SLC40A1* missense variations and contribution to hemochromatosis type 4 phenotypes

Running title: *SLC40A1* missense variants and splicing.

Marlène Le Tertre,^{1,2} Chandran Ka,^{1,2,3} Loann Raud,^{1,4} Isabelle Berlivet,¹ Isabelle Gourlaouen,^{1,3} Gaëlle Richard,¹ Kévin Uguen,^{1,2} Jian-Min Chen,¹ Claude Férec,^{1,2,4} Yann Fichou,^{1,3} Gérald Le Gac^{1,2,3}

¹Univ Brest, Inserm, EFS, UMR1078, GGB, F-29200, France.

²CHRU de Brest, Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction, Laboratoire de Génétique Moléculaire et Histocompatibilité, F-29200, France.

³Laboratory of Excellence GR-Ex, F-75015, France

⁴Association Gaétan Saleün, F-29200, France

Corresponding Author: Gerald Le Gac, Institut Brestois de Recherche en Bio-Santé, UFR Médecine et Sciences de la Santé, UMR1078, 22 rue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France. Tel: (+33) 2 98 01 79 69; E-mail: gerald.legac@univ-brest.fr

Abstract

Hemochromatosis type 4, or ferroportin disease, is considered as the second leading cause of primary iron overload after *HFE*-related hemochromatosis. The disease, which is predominantly associated with missense variations in the *SLC40A1* gene, is characterized by wide clinical heterogeneity. We tested the possibility that some of the reported missense mutations, despite their positions within exons, cause splicing defects. Fifty-eight genetic variants were selected from the literature based on two criteria: a precise description of the nucleotide change and individual evidence of iron overload. The selected variants were investigated by different *in silico* prediction tools and prioritized for midgene splicing assays. Of the 15 variations tested *in vitro*, only two were associated with splicing changes. We confirm that the c.1402G>A transition (p.Gly468Ser) disrupts the exon 7 donor site, leading to the use of an exonic cryptic splicing site and the generation of a truncated reading frame. We observed, for the first time, that the p.Gly468Ser substitution has no effect on the ferroportin iron export function. We demonstrate alternative splicing of exon 5 in different cell lines and show that the c.430A>G (p.Asn144Asp) variant promotes exon 5 inclusion. This could be part of a gain-of-function mechanism. We conclude that splicing mutations rarely contribute to hemochromatosis type 4 phenotypes. An in-depth investigation of exon 5 auxiliary splicing sequences may help to elucidate the mechanism by which splicing regulatory proteins regulate the production of the full length *SLC40A1* transcript and to clarify its physiological importance.

Keywords : hemochromatosis type 4, ferroportin disease, missense variations, pre-mRNA splicing, phenotypic heterogeneity.

Introduction

Hemochromatosis type 4 (OMIM#606069), also known as ferroportin disease, is an inborn error of iron metabolism transmitted through autosomal dominant inheritance. Described in various populations worldwide, it could be the second most common cause of hereditary iron overload after *HFE*-related hemochromatosis [1]. The disease is caused by mutations in the *SLC40A1* gene, which encodes a 62.5KDa multipass membrane protein commonly known as ferroportin 1 (FPN1). FPN1 mediates the export of Fe²⁺ from specialized cells of iron metabolism (macrophages, enterocytes, hepatocytes) to the circulation [2]. It is negatively regulated by the liver-derived peptide hepcidin [3], which regulates plasma iron concentrations according to the body's needs. The hepcidin-FPN1 axis plays a critical role in maintaining iron homeostasis and is responsible for inherited or acquired disorders leading to iron overload or anemia [4,5].

Hemochromatosis type 4 is characterized by wide clinical heterogeneity, which is only partially explained by the existence of mutations with opposing effects. Loss-of-function mutations affect cellular localization of FPN1 and/or its iron export function. This results in cellular iron retention, principally in reticuloendothelial cells, and relative plasma iron deficiency. Laboratory tests show a significant increase in serum ferritin, which contrasts with a normal or slightly increased transferrin saturation. As the disease progresses, iron is deposited in hepatocytes, normally accompanied by a rise in transferrin saturation. This iron overload phenotype has historically been associated with hemochromatosis type 4A, which is now more commonly known as ferroportin disease. Gain-of-function mutations do not change the iron export function but result in partial to complete resistance to hepcidin. This leads to excessive iron export to the bloodstream, increased transferrin saturation and progressive iron accumulation in parenchymal cells. These biologic and histologic features mimic the natural history of *HFE*-related hemochromatosis; hence, gain-of-function mutations are associated with hemochromatosis type 4B [1,6,7].

Certain *SLC40A1* gene mutations have been associated with incomplete penetrance. This appears to be primarily related to age and sex, as the disease is mainly expressed in adult males. Penetrance estimates remain sub-optimal, however, due to limited sample sizes and a focus on a few families [8–15].

In vitro assays are increasingly used to demonstrate the pathogenicity of variants identified in suspected hemochromatosis type 4 patients. This is due to the rarity of the considered variants, the lack of family data and the predominance of missense variations. Several groups have been able to differentiate causal mutations from neutral variations by looking at the protein level and using different approaches and cell models [10,16–32]. Some experimental data are more questionable,

with no obvious relationship with clinical observations [6]. Various *in silico* prediction tools have also been tested but were not found to be very informative [6,33], probably due to the complex structure of FPN1 and the existence of different pathophysiological mechanisms [17,34].

Until now, very few studies have considered a possible effect of *SLC40A1* variants on pre-mRNA splicing [23,35]. Splicing variants, however, are increasingly associated with genetic diseases [36,37]. Missense variants can have a direct effect on protein function, but they can also alter the recognition of splice-donor (5'; GT) or splice-acceptor (3'; AG) sites by the spliceosome, create *de novo* splicing sites (5' or 3'), or modify Exonic Splicing Regulatory Sequences (ESRs) including exonic splicing silencer (ESS) and exonic splicing enhancer (ESE) elements [38–44]. These different effects have been described in several inherited disorders showing substantial clinical heterogeneity [45–48].

In this study, we sought to determine whether splicing anomalies could explain some of the phenotypic heterogeneity observed in hemochromatosis type 4. Through different algorithms, we selected 15 missense variations predicted to alter *SLC40A1* pre-mRNA splicing. The effects of these 15 variations were verified by a midigene approach, which allows each variant to be tested in its natural genetic context (with all its flanking intronic and exonic sequences) as opposed to the classic exon-trapping (minigene) strategy.

Materials and methods

In silico analysis

Four computational algorithms were used to predict the impact of *SLC40A1* missense variations on RNA splicing:

- “Human Splicing Finder” (HSF) and “MaxEntScan” (MES) were used to predict the effects of genetic variants on canonical splicing sequences (3' and 5') and/or to reveal the activation of a cryptic splicing site. Assessments were carried out using the HSF 3.1 web tool (<http://www.umd.be/HSF3>). Aberrant splicing was considered to occur when predictions indicated both a decrease of ≥ 10 % for HSF and ≥ 30 % for MES in the scores between the wild type (WT) and the mutated sequence, or when either a *de novo* splice site or a pre-existing cryptic site was predicted with scores of >65 for HSF and >3 for MES.
- $\Delta tESR_{seq}$ and ΔHZ_{EI} were used to predict the effects of genetic variants on Exonic Splicing Regulatory elements (ESRs) [49,50]. We considered that a variant was susceptible to generate exon skipping when $\Delta tESR_{seq}$ was < -0.5 and ΔHZ_{EI} was < -20 ; these threshold values were previously suggested by Soukarieh *et al.* [40].

Midigene constructions

Each variant was tested by a midigene analysis, ensuring that each exon of interest was cloned with all of its flanking intronic and exonic sequences. We used a modified version of the pSplicePOLR2G vector [23] (version 3; pSplicePOLR2G.3), which enables all the exons of a gene to be studied, regardless of their natural position (first exon, intermediate exon, last exon) [51]. The different constructions are shown diagrammatically in Supplementary Figure 1.

Genomic regions encompassing exons 2–4, 4–6, 5–7, or 6–8 (plus ~150 bp flanking intronic sequences) were amplified by PCR using the Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Sequences of the corresponding primer pairs are provided in Supplementary Table 1. PCR fragments were gel-purified before being inserted into the pSplicePOLR2G.3 vector as previously described [51]. The *SLC40A1* missense variations were introduced into the different constructs by site-directed mutagenesis according to the manufacturer's instructions (QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies). Sanger sequencing was used to verify the integrity of each vector.

Transfection and splicing analysis

The human hepatic HepG2 cell line (American Type Culture Collection), which expresses the *SLC40A1* gene endogenously [52], was used as a cellular model. Two constructions *per* variant (based on two independent clones) were systematically tested in parallel with the wild-type construct.

Midigenes were transiently transfected into HepG2 cells grown in 12-well plates at ~70 % confluence (~1.10⁵ cells) using the TransIT-2020 transfection reagent (Mirus) at a 3:1 ratio of transfection reagent (μL) to plasmid DNA (μg) (0.75 μL/250 ng). Cells were washed in PBS and harvested 48 h after transfection. Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) then treated with DNaseI (Thermo Fisher Scientific). Treated RNA (~1 μg) served as template for cDNA synthesis from an oligo-dT primer with the SuperScript III enzyme (Invitrogen). Reverse transcription products (1/20) were amplified by PCR using HotStarTaq Master Mix (Qiagen). PCR primers were chosen so that only hybrid *SLC40A1/POLR2G* sequences could be amplified (no amplification from endogenous sequences; primer sequences are provided in Supplementary Table 1). The RT-PCR products were separated by electrophoresis on 1 % agarose gel. Transcripts resulting from abnormal splicing were fully characterized by Sanger sequencing.

A different and more sensitive protocol was employed to evaluate the impact of *SLC40A1* exon 5 variants on RNA splicing. Messenger RNAs were isolated from HepG2 cells 48 h after transfection using oligo-dT magnetic beads following the manufacturer's instructions (Dynabeads

mRNA DIRECT, Life Technologies). ~100ng mRNA were reverse transcribed and PCR-amplified using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). A FAM-labeled primer (matching the first 16 5' nucleotides of the POLR2G_F primer) was added to the PCR reaction to generate fluorescent PCR fragments. The RT-PCR products were separated by capillary electrophoresis on an automated sequencer (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) before being analyzed and quantified using GeneMarker software (SoftGenetics).

Analysis of endogenously expressed SLC40A1 pre-mRNA

Human hepatic HepG2 cells and human monocytic THP-1 cells (American Type Culture Collection) were used to analyze the endogenously expressed *SLC40A1* transcripts with respect to exon 5 skipping. THP-1 cells were differentiated and polarized into M2 macrophages according to the protocol established by Ayaub et al. [53], using 20 ng/mL IL4, 20 ng/mL IL13, and 5 ng/mL IL6. RT-PCRs were performed in two steps using SuperScript III (starting from an oligo-dT; Thermo Fisher) and HotStarTaq (Qiagen) polymerases. The RT-PCR products were separated on a 1.5 % agarose gel.

⁵⁵Fe release experiments

⁵⁵Fe release experiments were performed as previously described [10].

Statistical analysis

Quantitative data are presented as means (column bars) + SD. Comparisons used two-tailed paired Student's t-tests.

Results

Bioinformatics analysis of 58 selected missense variants

We identified 67 *SLC40A1* missense variants in the biomedical literature[1,6,33]. Nine of these (p.Ala45Glu, p.Ala69Val, p.Ser71Phe, p.Trp158Leu, p.Asn185Thr, p.Ala232Asp, p.Gly267Asp, p.Arg371Trp and p.Arg371Gln) were subsequently excluded due to a lack of phenotypic data. The remaining 58 variants were annotated according to Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines (Supplementary Table 2) and treated with various tools to predict their effects on splicing based on two distinct situations: i) alteration of a splice donor (5') or acceptor site (3'), activation of a pre-existing cryptic site (5' or 3') or creation of a *de novo* splice site (5' or 3'); and ii) modification of the *SLC40A1* pre-mRNA splicing pattern due to a change in an Exonic Splicing Regulatory (ESR) sequence.

The "Human Splicing Finder" (HSF) and "MaxEntScan" (MES) algorithms [54,55] were used to identify candidate variants from the first category. Only the variants predicted by both tools to have an effect on splicing were selected (Table 1A). The variants c.430A>G (p.Asn144Asp), c.469G>T

(p.Asp157Tyr) and c.1051A>G (p.Ile351Val) were thought to create either a new donor or acceptor site. These new sites may compete with the physiological splice sites and produce transcripts lacking part of exon 5 or 7. The c.1402G>A transition (p.Gly468Ser), which affects the last base of exon 7, was predicted to significantly decrease the strength of the splice donor site of intron 7. This may lead either to the full exclusion of exon 7 (exon skipping) or to the use of a pre-existing cryptic splice donor.

The $\Delta tESR_{seq}$ and ΔHZ_{EI} algorithms [49,50] were used to identify candidate variants from the second category, applying the thresholds previously defined and experimentally validated by Soukarieh et al. [40]. According to the two algorithms, the variants c.214G>T (p.Val72Phe), c.470A>G (p.Asp157Gly), c.470A>C (p.Asp157Ala), c.533G>A (p.Arg178Gln), c.541G>A (p.Asp181Asn), c.542A>T (p.Asp181Val), c.546G>T (p.Gln182His), c.626C>T (p.Ser209Leu), c.809A>T (p.Asp270Val), c.1014T>G (p.Ser338Arg), and c.1510G>A (p.Asp504Asn) impact ESRs in exons 3, 5, 6, 7, and 8 of the *SLC40A1* pre-mRNA. This may lead to exon skipping and the production of truncated and non-functional FPN1 proteins (Table 1B).

In total, four *SLC40A1* missense variants were predicted to modify the use of donor or acceptor splice sites by the spliceosome and 11 were thought to have an impact on ESRs. These 15 *SLC40A1* exonic variants were prioritized for cell culture-based midigene assays.

The c.1402G>A transition alters recognition of the intron 7 splice donor site and favors the use of an exonic cryptic splice site

Figure 1 illustrates the results produced for the two variants of exon 7. The c.1051 A>G variant had a profile comparable to that produced from the wild-type sequence. By contrast, the c.1402 G>A variant led to the observation of two PCR products. Sanger sequencing established that the longer product corresponds to the wild-type transcript, whereas the shorter band resulted from the use of a cryptic splice donor site at the c.990 position (e.g., 413 nucleotides before the end of exon 7). The observed deletion modifies the reading frame; it should cause a premature stop codon to appear at the beginning of exon 8 (HGVS nomenclature: c.990_1402del; p.Tyr331Serfs*5).

It is worth mentioning that the partial effect on splicing of the c.1402 G>A variant as revealed in our midigene system is in accordance with the splicing scores calculated from the mutated *SLC40A1* pre-mRNA with regard to the c.1402+1 and c.990 positions. These scores are well above the threshold values for the detection of donor splice sites using the HSF (>65) and MES (>3) algorithms, and are quite similar (mutated physiological splice site: HSF = 80.36 and MES = 5.52; cryptic splice site: HSF = 83.21 and MES = 6.22). This allows us to predict that the two identified donor splice sites will be recognized by the basal splicing machinery.

Activation of the cryptic splice sites was not confirmed for c.430A>G and c.469G>T of exon 5 (Figure 4A).

Partial skipping of exon 5 and positive regulatory effect of the c.430A>G variant

The 11 variants predicted to alter ESRs were studied in a manner comparable to the four putative canonical splice site variants. No aberrantly spliced transcripts were observed for the nine variants located in exons 3, 6, 7, and 8 (Figure 2).

Somewhat unexpectedly, exon 5 skipping was observed in HepG2 cells transfected with the wild-type midigene that was constructed to analyze the c.430A>G, c.469G>T, c.470A>G and c.470A>C variants (Figure 3A). The analysis of endogenous *SLC40A1* mRNA from the two cell lines HepG2 (human hepatocytes) and THP-1 (human monocytes) allowed us to confirm that exon 5 skipping occurred physiologically (Figure 3B). The inclusion/exclusion ratio did not seem to differ in the M2 macrophages (obtained after differentiation and polarization of the THP-1 cells), where the level of *SLC40A1* gene expression would be expected to be higher [56]. These observations were correlated with a lower conservation of the exon 5 acceptor and donor splice sequences compared with other *SLC40A1* physiological splice sites (Supplementary Table 3).

We developed a fluorescent RT-PCR assay to account for the skipping of exon 5 and provide from a more robust estimate of the inclusion/exclusion ratio. As shown in Figure 4, no differences were observed in the rates of transcripts produced from the WT, c.469G>T, c.470A>G and c.470A>C midigene constructs. By contrast, the c.430A>G (p.Asn144Asp) resulted in increased exon 5 inclusion. This positive regulatory effect could be explained by the disruption of an Exonic Splice Silencer (ESS) and/or by the creation of an Exonic Splice Enhancer (ESE). Mapping all possible 6-bp auxiliary regulatory sequences within wild-type exon 5 as predicted by the QUEPASA method [57], we identified a (U/A)₄ motif (UAAU; c.430 in bold) that can bind the splicing repressor Sam68 and which is broken in the mutated sequence. Conversely, using the ESEfinder tool [56], we found a splicing enhancer motif in the mutated c.430G allele (TGCAGA; c.430 in bold) that is specific to the Splicing Regulatory protein SRp55 and does not exist in the wild-type allele (Supplementary Figure 2).

Effect of the p.Gly468Ser missense mutation on the FPN1 iron export function

Because the effect of the c.1402 G>A variant on splicing was partial in our experimental model, we also aimed to evaluate the impact of the p.Gly468Ser amino acid change on the iron export function of FPN1. We used ⁵⁵Fe export measurements from transiently transfected HEK293T cells, as described previously [10]. The p.Val162del mutant that results in FPN1 mislocalization was used as a

negative control [59]. As shown in Figure 5, the p.Gly468Ser mutant (here encoded from the full-length cDNA; i.e., with no deletion) exports iron in the same way as the wild-type protein.

Discussion

Hemochromatosis type 4 is vastly associated with missense variations [6]. Considering the wide range of phenotypic heterogeneity seen in the disease, we wondered whether some of the reported iron overload phenotypes could result from both protein and splicing changes.

Various algorithms can be used to predict the effect of a genetic variant on splicing. Their use is particularly interesting for processing next-generation sequencing data. The objective is to rank dozens or hundreds of variants from the generation of splicing scores and identify those that could warrant family studies and/or functional explorations. However, there are no agreed thresholds for the interpretation of such scores and no tool can ensure 100% accuracy. The sensitivity and specificity of current algorithms are particularly low for the evaluation of splicing regulatory variants. To limit the number of confirmatory tests, it is highly recommended to combine different tools [60–62]. Here, we chose the Human Splicing Finder and MaxEntScan to study the effects of genetic variants on splice donor and acceptor sites [54,55], and Δ tESRseq and Δ HZ_{EI} to study the effects of genetic variants on ESRs [49,50]. This strategy allowed us to limit the *in vitro* analyses to only 15 *SLC40A1* missense variants.

Our experimental approach has been optimized to limit bias. First, we chose to evaluate each mutant in a fairly broad genetic context, in contrast to the conventional exon-trapping method. Since it was not possible to clone the entire *SLC40A1* gene, as was recently done for the *SPINK1* gene and some other genes [63,64], we split the *SLC40A1* sequence into four large regions (3.9 to 8.7kb; see Supplementary Figure 1). The value of this strategy was previously demonstrated by Sangermano *et al.* based on the evaluation of 47 variants of the *ABCA4* gene; these authors also coined the term "midigene" [65]. Second, to analyze the functional effects of the variants in a physiologically relevant cellular context, transfection experiments were done in human hepatic HepG2 cells that endogenously express the *SLC40A1* gene (<https://www.proteinatlas.org/>) [52]. Lastly, the chosen splicing vector (SplicePOLR2G) was developed by our group and validated by the study of >200 variants located in a dozen different genes [23,51,66–70].

The analysis of the c.1402G>A variant serves as the first example supporting the validity of our experimental approach. Indeed, we observed the same deleterious effect on splicing as that previously seen by Lee *et al.* using mRNAs extracted from the white blood cells of a 59-year-old male patient of Irish-Scottish descent [35]. This previous study revealed the partial use of a pre-existing cryptic splice site inside exon 7, which probably leads to the production of a non-functional product

owing to the deletion of the last 241 amino acids of the wild-type protein (>4/10 of the protein sequence) [35]. Based on bioinformatics predictions and observation of *in vitro* splicing patterns (Figure 1), we estimated that, in the context of the variant allele, the cryptic site is used in a manner quite comparable to the physiological site. The normally spliced c.1402A-containing transcript would encode a protein harboring the p.Gly468Ser missense variant. However, we found that this substitution has no obvious effect on the ability of FPN1 to export iron (Figure 5). It can be therefore concluded that the mild iron overload phenotype described by Lee *et al.* in the 59-year-old man was actually due to the partial splicing defect conferred by a so-called missense variant, a previously unrecognized pathogenic mechanism underlying hemochromatosis type 4. Here, it is worth mentioning that none of the heterozygous variants currently associated with hemochromatosis type 4 (1 splicing mutation, 1 amino acid deletion, 66 missense mutations) appears to result in a total loss of FPN1 function. This is possibly due to the very important and unique function of FPN1, whose haplodeficiency may not be tolerated by the body.

Findings on the existence of alternative splicing of exon 5 served as additional examples supporting the validity of our experimental approach. A survey of the Genotype-Tissue Expression project (<https://www.gtexportal.org>) and the Cancer Genome Atlas (<https://www.cancer.gov>) revealed that exon 5 skipping also occurred in multiple healthy and cancerous tissues. The biological mechanism underlying this phenomenon lies in the relatively weak splice site signals relative to exon 5' recognition. Several studies have shown that alternative splicing of weak exons is particularly sensitive to the presence of genetic variants in ESRs [71–75]. Here, we show that the c.430A>G variation reduces the exclusion of exon 5 (Figure 4B), which should naturally lead to a slight increase in the synthesis of wild-type protein. Further investigation is required to determine whether the c.430A>G variant disrupts an exonic splicing silencer, which could be a Sam68 element, whether it creates an exonic splicing enhancer, which could be a SRp55 binding site, or both.

The c.430A>G (p.Asn144Asp) variant has previously been classified as a gain-of-function mutation causing moderate resistance to hepcidin. The underlying pathophysiological mechanism is still poorly understood [17,21,30]. Based on our findings, two effects should be considered: i) a structural effect, reducing the binding of hepcidin and/or the subsequent conformational changes that mediate the ubiquitination of FPN1 and its intracellular degradation, and, to a lesser extent, ii) a splicing effect, increasing the quantity of the p.Asn144Asp mutant proteins present at the plasma membrane. In short, the c.430A>G variant would qualitatively and quantitatively limit the action of hepcidin on iron export. A combined effect of a variant at both the protein and pre-mRNA levels has only been occasionally reported in the literature. An outstanding example is provided by missense mutations that modulate inclusion of exon 10 within transcripts of the *MAPT* gene, thus influencing

the cellular production of two TAU protein isoforms (3R that excludes exon 10 and 4R that includes exon 10). The longer protein isoforms have abnormal hyperphosphorylation, which could be the basis of the neurodegenerative diseases [46,48].

To conclude, the missense variations observed at the *SLC40A1* locus have very little effect on splicing. Further investigations are needed to understand the effects of *SLC40A1* substitutions on the FPN1 structure and function. This could help to distinguish deleterious mutations from hypomorphic mutations, and better understand some aspects of the phenotypic heterogeneity seen in hemochromatosis type 4. The effect attributed to the c.430A>G transition on the physiological splicing of the *SLC40A1* pre-mRNA is somewhat moderate, but indicates that further investigation of exonic regulatory sequences in exon 5 is warranted. Finally, our data confirm that *in silico* tools are subject to false positive predictions, even when used in combination. Functional analyses remain essential for reliable clinical interpretation of variants outside the GT/GC donor and AG acceptor canonical dinucleotides, especially for variants that may affect auxiliary splicing sequences. The midgene approach is an acceptable approach when direct analysis from patient samples is not possible or when the cloning of an entire gene is too complicated or impossible.

References

- [1] A. Pietrangelo, Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment, *Haematologica*. 102 (2017) 1972–1984. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.170720>.
- [2] A. Donovan, C.A. Lima, J.L. Pinkus, G.S. Pinkus, L.I. Zon, S. Robine, N.C. Andrews, The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis, *Cell Metab.* 1 (2005) 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>.
- [3] E. Nemeth, M.S. Tuttle, J. Powelson, M.B. Vaughn, A. Donovan, D.M. Ward, T. Ganz, J. Kaplan, Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization, *Science*. 306 (2004) 2090–2093. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>.
- [4] C. Camaschella, A. Nai, L. Silvestri, Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era, *Haematologica*. 105 (2020) 260–272. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>.
- [5] T. Ganz, E. Nemeth, The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders, *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2011 (2011) 538–542. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.538>.
- [6] L.T. Vlasveld, R. Janssen, E. Bardou-Jacquet, H. Venselaar, H. Hamdi-Roze, H. Drakesmith, D.W. Swinkels, Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features, *Pharm. Basel Switz.* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ph12030132>.
- [7] A. Piperno, S. Pelucchi, R. Mariani, Inherited iron overload disorders, *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2020) 25. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.11.15>.
- [8] M. Cazzola, L. Cremonesi, M. Papaioannou, N. Soriani, A. Kioumi, A. Charalambidou, R. Paroni, K. Romtsou, S. Levi, M. Ferrari, P. Arosio, J. Christakis, Genetic hyperferritinaemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (*SLC11A3*), *Br. J. Haematol.* 119 (2002) 539–546.
- [9] C. Ka, J. Guellec, X. Perpermans, C. Kannengiesser, C. Ged, W. Wuyts, D. Cassiman, V. de Ledinghen, B. Varet, C. de Kerguenec, C. Oudin, I. Gourlaouen, T. Lefebvre, C. Férec, I. Callebaut, G. Le Gac, French National Network for the Molecular Diagnosis of Inherited Iron

- Overload Disorders, The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism, *Haematologica*. (2018). <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189845>.
- [10] E. Létocart, G. Le Gac, S. Majore, C. Ka, F.C. Radio, I. Gourlaouen, C. De Bernardo, C. Férec, P. Grammatico, A novel missense mutation in SLC40A1 results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases, *Br. J. Haematol.* 147 (2009) 379–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07834.x>.
- [11] G. Montosi, A. Donovan, A. Totaro, C. Garuti, E. Pignatti, S. Cassanelli, C.C. Trenor, P. Gasparini, N.C. Andrews, A. Pietrangelo, Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 619–623. <https://doi.org/10.1172/JCI13468>.
- [12] O.T. Njajou, N. Vaessen, M. Joosse, B. Berghuis, J.W. van Dongen, M.H. Breuning, P.J. Snijders, W.P. Rutten, L.A. Sandkuijl, B.A. Oostra, C.M. van Duijn, P. Heutink, A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis, *Nat. Genet.* 28 (2001) 213–214. <https://doi.org/10.1038/90038>.
- [13] S. Pelucchi, R. Mariani, A. Salvioni, S. Bonfadini, A. Riva, F. Bertola, P. Trombini, A. Piperno, Novel mutations of the ferroportin gene (SLC40A1): analysis of 56 consecutive patients with unexplained iron overload, *Clin. Genet.* 73 (2008) 171–178. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00950.x>.
- [14] A. Pietrangelo, G. Montosi, A. Totaro, C. Garuti, D. Conte, S. Cassanelli, M. Fraquelli, C. Sardini, F. Vasta, P. Gasparini, Hereditary Hemochromatosis in Adults without Pathogenic Mutations in the Hemochromatosis Gene, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 725–732. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411003>.
- [15] C. Le Lan, A. Mosser, M. Ropert, L. Detivaud, V. Loustaud-Ratti, D. Vital-Durand, L. Roget, E. Bardou-Jacquet, B. Turlin, V. David, O. Loréal, Y. Deugnier, P. Brissot, A. Jouanolle, Sex and Acquired Cofactors Determine Phenotypes of Ferroportin Disease, *Gastroenterology*. 140 (2011) 1199–1207.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.049>.
- [16] L.M. Schimanski, H. Drakesmith, A.T. Merryweather-Clarke, V. Viprakasit, J.P. Edwards, E. Sweetland, J.M. Bastin, D. Cowley, Y. Chinthammitr, K.J.H. Robson, A.R.M. Townsend, In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations, *Blood*. 105 (2005) 4096–4102. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4502>.
- [17] S. Aschemeyer, B. Qiao, D. Stefanova, E.V. Valore, A.C. Sek, T.A. Ruwe, K.R. Vieth, G. Jung, C. Casu, S. Rivella, M. Jormakka, B. Mackenzie, T. Ganz, E. Nemeth, Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin, *Blood*. 131 (2018) 899–910. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786590>.
- [18] I. De Domenico, D. McVey Ward, E. Nemeth, T. Ganz, E. Corradini, F. Ferrara, G. Musci, A. Pietrangelo, J. Kaplan, Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin, *Haematologica*. 91 (2006) 1092–1095.
- [19] D.F. Wallace, C.J. McDonald, L. Ostini, D. Iser, A. Tuckfield, V.N. Subramaniam, The dynamics of hepcidin-ferroportin internalization and consequences of a novel ferroportin disease mutation, *Am. J. Hematol.* 92 (2017) 1052–1061. <https://doi.org/10.1002/ajh.24844>.
- [20] L. Détévaud, M.-L. Island, A.-M. Jouanolle, M. Ropert, E. Bardou-Jacquet, C. Le Lan, A. Mosser, P. Leroyer, Y. Deugnier, V. David, P. Brissot, O. Loréal, Ferroportin Diseases: Functional Studies, a Link Between Genetic and Clinical Phenotype, *Hum. Mutat.* (2013). <https://doi.org/10.1002/humu.22396>.
- [21] A. Fernandes, G.C. Preza, Y. Phung, I. De Domenico, J. Kaplan, T. Ganz, E. Nemeth, The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis, *Blood*. 114 (2009) 437–443. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146134>.
- [22] D. Girelli, I. De Domenico, C. Bozzini, N. Campostrini, F. Busti, A. Castagna, N. Soriani, L. Cremonesi, M. Ferrari, R. Colombari, D. McVey Ward, J. Kaplan, R. Corrocher, Clinical, pathological, and molecular correlates in ferroportin disease: a study of two novel mutations, *J. Hepatol.* 49 (2008) 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.05.028>.

- [23] I. Callebaut, R. Joubrel, S. Pissard, C. Kannengiesser, V. Gérolami, C. Ged, E. Cadet, F. Cartault, C. Ka, I. Gourlaouen, L. Gourhant, C. Oudin, M. Goossens, B. Grandchamp, H. De Verneuil, J. Rochette, C. Férec, G. Le Gac, Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 4479–4490. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu160>.
- [24] X.-B. Liu, F. Yang, D.J. Haile, Functional consequences of ferroportin 1 mutations, *Blood Cells. Mol. Dis.* 35 (2005) 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.04.005>.
- [25] R. Mayr, W.J.H. Griffiths, M. Hermann, I. McFarlane, D.J. Halsall, A. Finkenstedt, A. Douds, S.E. Davies, A.R. Janecke, W. Vogel, T.M. Cox, H. Zoller, Identification of mutations in SLC40A1 that affect ferroportin function and phenotype of human ferroportin iron overload, *Gastroenterology.* 140 (2011) 2056–2063, 2063.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.064>.
- [26] M.C. Bonaccorsi di Patti, F. Polticelli, G. Cece, A. Cutone, F. Felici, T. Persichini, G. Musci, A structural model of human ferroportin and of its iron binding site, *FEBS J.* 281 (2014) 2851–2860. <https://doi.org/10.1111/febs.12825>.
- [27] B. Qiao, P. Sugianto, E. Fung, A. Del-Castillo-Rueda, M.-J. Moran-Jimenez, T. Ganz, E. Nemeth, Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination, *Cell Metab.* 15 (2012) 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.018>.
- [28] W.J.H. Griffiths, R. Mayr, I. McFarlane, M. Hermann, D.J. Halsall, H. Zoller, T.M. Cox, Clinical presentation and molecular pathophysiology of autosomal dominant hemochromatosis caused by a novel ferroportin mutation, *Hepatology. Baltim. Md.* 51 (2010) 788–795. <https://doi.org/10.1002/hep.23377>.
- [29] D.F. Wallace, J.L. Dixon, G.A. Ramm, G.J. Anderson, L.W. Powell, V.N. Subramaniam, A novel mutation in ferroportin implicated in iron overload, *J. Hepatology.* 46 (2007) 921–926. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.01.033>.
- [30] H. Drakesmith, L.M. Schimanski, E. Ormerod, A.T. Merryweather-Clarke, V. Viprakasit, J.P. Edwards, E. Sweetland, J.M. Bastin, D. Cowley, Y. Chinthammitr, K.J.H. Robson, A.R.M. Townsend, Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin, *Blood.* 106 (2005) 1092–1097. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0561>.
- [31] C. Ka, J. Guellec, X. Pepermans, C. Kannengiesser, C. Ged, W. Wuyts, D. Cassiman, V. de Ledinghen, B. Varet, C. de Kerguenec, C. Oudin, I. Gourlaouen, T. Lefebvre, C. Férec, I. Callebaut, G. Le Gac, The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism, *Haematologica.* 103 (2018) 1796–1805. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189845>.
- [32] R. Praszberger, M. Schranz, W.J.H. Griffiths, N. Baumgartner, M. Hermann, D.J. Lomas, A. Pietrangelo, T.M. Cox, W. Vogel, H. Zoller, Impact of D181V and A69T on the function of ferroportin as an iron export pump and hepcidin receptor, *Biochim. Biophys. Acta.* 1842 (2014) 1406–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.011>.
- [33] R. Mayr, A.R. Janecke, M. Schranz, W.J.H. Griffiths, W. Vogel, A. Pietrangelo, H. Zoller, Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings, *J. Hepatology.* 53 (2010) 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.016>.
- [34] J. Guellec, A. Elbahnsi, M. Le Tertre, K. Uguen, I. Gourlaouen, C. Férec, C. Ka, I. Callebaut, G. Le Gac, Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33 (2019) 14625–14635. <https://doi.org/10.1096/fj.201901857R>.
- [35] P.L. Lee, T. Gelbart, C. West, J.C. Barton, SLC40A1 c.1402G-->a results in aberrant splicing, ferroportin truncation after glycine 330, and an autosomal dominant hemochromatosis phenotype, *Acta Haematol.* 118 (2007) 237–241. <https://doi.org/10.1159/000112830>.
- [36] D. Baralle, A. Lucassen, E. Buratti, Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice, *EMBO Rep.* 10 (2009) 810–816. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.170>.
- [37] M.M. Scotti, M.S. Swanson, RNA mis-splicing in disease, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.3>.

- [38] D. Di Giacomo, P. Gaildrat, A. Abuli, J. Abdat, T. Frébourg, M. Tosi, A. Martins, Functional analysis of a large set of BRCA2 exon 7 variants highlights the predictive value of hexamer scores in detecting alterations of exonic splicing regulatory elements, *Hum. Mutat.* 34 (2013) 1547–1557. <https://doi.org/10.1002/humu.22428>.
- [39] V. Kergourlay, G. Raï, G. Blandin, D. Salgado, C. Bérout, N. Lévy, M. Krahn, M. Bartoli, Identification of splicing defects caused by mutations in the dysferlin gene, *Hum. Mutat.* 35 (2014) 1532–1541. <https://doi.org/10.1002/humu.22710>.
- [40] O. Soukarieh, P. Gaildrat, M. Hamieh, A. Drouet, S. Baert-Desurmont, T. Frébourg, M. Tosi, A. Martins, Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools, *PLoS Genet.* 12 (2016) e1005756. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005756>.
- [41] K. Ito, P.N. Patel, J.M. Gorham, B. McDonough, S.R. DePalma, E.E. Adler, L. Lam, C.A. MacRae, S.M. Mohiuddin, D. Fatkin, C.E. Seidman, J.G. Seidman, Identification of pathogenic gene mutations in LMNA and MYBPC3 that alter RNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 7689–7694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707741114>.
- [42] M. Dominguez-Valentin, S. Nakken, H. Tubeuf, D. Vodak, P.O. Ekstrøm, A.M. Nissen, M. Morak, E. Holinski-Feder, A. Holth, G. Capella, B. Davidson, D.G. Evans, A. Martins, P. Møller, E. Hovig, Results of multigene panel testing in familial cancer cases without genetic cause demonstrated by single gene testing, *Sci. Rep.* 9 (2019) 18555. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54517-z>.
- [43] M. Zucker, N. Rosenberg, H. Peretz, D. Green, F. Bauduer, A. Zivelin, U. Seligsohn, Point mutations regarded as missense mutations cause splicing defects in the factor XI gene, *J. Thromb. Haemost. JTH.* 9 (2011) 1977–1984. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04426.x>.
- [44] L.B. Ahlborn, M. Dandanell, A.Y. Steffensen, L. Jønson, F.C. Nielsen, T.V.O. Hansen, Splicing analysis of 14 BRCA1 missense variants classifies nine variants as pathogenic, *Breast Cancer Res. Treat.* 150 (2015) 289–298. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3313-7>.
- [45] I. Donadon, J.H. McVey, I. Garagiola, A. Branchini, M. Mortarino, F. Peyvandi, F. Bernardi, M. Pinotti, Clustered F8 missense mutations cause hemophilia A by combined alteration of splicing and protein biosynthesis and activity, *Haematologica.* 103 (2018) 344–350. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178327>.
- [46] M. Iovino, U. Pfisterer, J.L. Holton, T. Lashley, R.J. Swingler, L. Calo, R. Treacy, T. Revesz, M. Parmar, M. Goedert, M.M.K. Muqit, M.G. Spillantini, The novel MAPT mutation K298E: mechanisms of mutant tau toxicity, brain pathology and tau expression in induced fibroblast-derived neurons, *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 127 (2014) 283–295. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1219-1>.
- [47] Y. Jourdy, M. Fretigny, C. Nougier, C. Négrier, D. Bozon, C. Vinciguerra, Splicing analysis of 26 F8 nucleotide variations using a minigene assay, *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 25 (2019) 306–315. <https://doi.org/10.1111/hae.13687>.
- [48] I. D'Souza, G.D. Schellenberg, Regulation of tau isoform expression and dementia, *Biochim. Biophys. Acta.* 1739 (2005) 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.009>.
- [49] S. Ke, S. Shang, S.M. Kalachikov, I. Morozova, L. Yu, J.J. Russo, J. Ju, L.A. Chasin, Quantitative evaluation of all hexamers as exonic splicing elements, *Genome Res.* 21 (2011) 1360–1374. <https://doi.org/10.1101/gr.119628.110>.
- [50] S. Erkelenz, S. Theiss, M. Otte, M. Wüdera, J.O. Peter, H. Schaal, Genomic HEXploring allows landscaping of novel potential splicing regulatory elements, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 10681–10697. <https://doi.org/10.1093/nar/gku736>.
- [51] L. Raud, C. Ka, I. Gourlaouen, I. Callebaut, C. Férec, G. Le Gac, Y. Fichou, Functional analysis of novel RHD variants: splicing disruption is likely to be a common mechanism of variant D phenotype, *Transfusion (Paris)*. 59 (2019) 1367–1375. <https://doi.org/10.1111/trf.15210>.
- [52] M. Sabelli, G. Montosi, C. Garuti, A. Caleffi, S. Oliveto, S. Biffo, A. Pietrangelo, Human macrophage ferroportin biology and the basis for the ferroportin disease, *Hepatol. Baltim. Md.* 65 (2017) 1512–1525. <https://doi.org/10.1002/hep.29007>.

- [53] E.A. Ayaub, K. Tandon, M. Padwal, J. Imani, H. Patel, A. Dubey, O. Mekhael, C. Upagupta, A. Ayoub, A. Dvorkin-Gheva, J. Murphy, P.S. Kolb, S. Lhotak, J.G. Dickhout, R.C. Austin, M.R.J. Kolb, C.D. Richards, K. Ask, IL-6 mediates ER expansion during hyperpolarization of alternatively activated macrophages, *Immunol. Cell Biol.* 97 (2019) 203–217. <https://doi.org/10.1111/imcb.12212>.
- [54] F.-O. Desmet, D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Bérout, M. Claustres, C. Bérout, Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>.
- [55] C. Houdayer, V. Caux-Moncoutier, S. Krieger, M. Barrois, F. Bonnet, V. Bourdon, M. Bronner, M. Buisson, F. Coulet, P. Gaildrat, C. Lefol, M. Léone, S. Mazoyer, D. Muller, A. Remenieras, F. Révillion, E. Rouleau, J. Sokolowska, J.-P. Vert, R. Lidereau, F. Soubrier, H. Sobol, N. Sevenet, B. Bressac-de Paillerets, A. Hardouin, M. Tosi, O.M. Sinilnikova, D. Stoppa-Lyonnet, Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants, *Hum. Mutat.* 33 (2012) 1228–1238. <https://doi.org/10.1002/humu.22101>.
- [56] S. Recalcati, M. Locati, A. Marini, P. Santambrogio, F. Zaninotto, M. De Pizzol, L. Zammataro, D. Girelli, G. Cairo, Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 824–835. <https://doi.org/10.1002/eji.200939889>.
- [57] S. Ke, S. Shang, S.M. Kalachikov, I. Morozova, L. Yu, J.J. Russo, J. Ju, L.A. Chasin, Quantitative evaluation of all hexamers as exonic splicing elements, *Genome Res.* 21 (2011) 1360–1374. <https://doi.org/10.1101/gr.119628.110>.
- [58] J. Wang, P.J. Smith, A.R. Krainer, M.Q. Zhang, Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5053–5062. <https://doi.org/10.1093/nar/gki810>.
- [59] G. Le Gac, C. Ka, R. Joubrel, I. Gourlaouen, P. Lehn, J.-P. Mornon, C. Férec, I. Callebaut, Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues, *Hum. Mutat.* 34 (2013) 1371–1380. <https://doi.org/10.1002/humu.22369>.
- [60] X. Jian, E. Boerwinkle, X. Liu, In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 16 (2014) 497–503. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.176>.
- [61] K. Ohno, J.-I. Takeda, A. Masuda, Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1002/wrna.1451>.
- [62] H. Wai, A.G.L. Douglas, D. Baralle, RNA splicing analysis in genomic medicine, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 108 (2019) 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.009>.
- [63] H. Wu, A. Boulling, D.N. Cooper, Z.-S. Li, Z. Liao, C. Férec, J.-M. Chen, Analysis of the Impact of Known SPINK1 Missense Variants on Pre-mRNA Splicing and/or mRNA Stability in a Full-Length Gene Assay, *Genes.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3390/genes8100263>.
- [64] J.-H. Lin, X.-Y. Tang, A. Boulling, W.-B. Zou, E. Masson, Y. Fichou, L. Raud, M. Le Tertre, S.-J. Deng, I. Berlivet, C. Ka, M. Mort, M. Hayden, R. Leman, C. Houdayer, G. Le Gac, D.N. Cooper, Z.-S. Li, C. Férec, Z. Liao, J.-M. Chen, First estimate of the scale of canonical 5' splice site GT>GC variants capable of generating wild-type transcripts, *Hum. Mutat.* 40 (2019) 1856–1873. <https://doi.org/10.1002/humu.23821>.
- [65] R. Sangermano, M. Khan, S.S. Cornelis, V. Richelle, S. Albert, A. Garanto, D. Elmelik, R. Qamar, D. Lugtenberg, L.I. van den Born, R.W.J. Collin, F.P.M. Cremers, ABCA4 midigenes reveal the full splice spectrum of all reported noncanonical splice site variants in Stargardt disease, *Genome Res.* 28 (2018) 100–110. <https://doi.org/10.1101/gr.226621.117>.
- [66] Y. Fichou, P. Gehannin, M. Corre, A. Le Guern, C. Le Maréchal, G. Le Gac, C. Férec, Extensive functional analyses of RHD splice site variants: Insights into the potential role of splicing in the physiology of Rh, *Transfusion (Paris).* 55 (2015) 1432–1443. <https://doi.org/10.1111/trf.13083>.

- [67] R. Leman, P. Gaildrat, G. Le Gac, C. Ka, Y. Fichou, M.-P. Audrezet, V. Caux-Moncoutier, S.M. Caputo, N. Boutry-Kryza, M. Léone, S. Mazoyer, F. Bonnet-Dorion, N. Sevenet, M. Guillaud-Bataille, E. Rouleau, B. Bressac-de Paillerets, B. Wappenschmidt, M. Rossing, D. Muller, V. Bourdon, F. Revillon, M.T. Parsons, A. Rousselin, G. Davy, G. Castelain, L. Castéra, J. Sokolowska, F. Coulet, C. Delnatte, C. Férec, A.B. Spurdle, A. Martins, S. Krieger, C. Houdayer, Novel diagnostic tool for prediction of variant spliceogenicity derived from a set of 395 combined in silico/in vitro studies: an international collaborative effort, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 7913–7923. <https://doi.org/10.1093/nar/gky372>.
- [68] R. Leman, H. Tubeuf, S. Raad, I. Tournier, C. Derambure, R. Lanos, P. Gaildrat, G. Castelain, J. Hauchard, A. Killian, S. Baert-Desurmont, A. Legros, N. Goardon, C. Quesnelle, A. Ricou, L. Castera, D. Vaur, G. Le Gac, C. Ka, Y. Fichou, F. Bonnet-Dorion, N. Sevenet, M. Guillaud-Bataille, N. Boutry-Kryza, I. Schultz, V. Caux-Moncoutier, M. Rossing, L.C. Walker, A.B. Spurdle, C. Houdayer, A. Martins, S. Krieger, Assessment of branch point prediction tools to predict physiological branch points and their alteration by variants, *BMC Genomics.* 21 (2020) 86. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6484-5>.
- [69] Y. Fichou, C. Le Maréchal, D. Jamet, L. Bryckaert, C. Ka, M.-P. Audrezet, G. Le Gac, I. Dupont, J.-M. Chen, C. Férec, Establishment of a medium-throughput approach for the genotyping of RHD variants and report of nine novel rare alleles, *Transfusion (Paris).* 53 (2013) 1821–1828. <https://doi.org/10.1111/trf.12009>.
- [70] G. Martinez, J. Beurois, D. Dacheux, C. Cazin, M. Bidart, Z.-E. Kherraf, D.R. Robinson, V. Satre, G. Le Gac, C. Ka, I. Gourlaouen, Y. Fichou, G. Petre, E. Dulioust, R. Zouari, N. Thierry-Mieg, A. Touré, C. Arnoult, M. Bonhivers, P. Ray, C. Coutton, Biallelic variants in MAATS1 encoding CFAP91, a calmodulin-associated and spoke-associated complex protein, cause severe asthenoteratozoospermia and male infertility, *J. Med. Genet.* (2020). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106775>.
- [71] M. Niksic, M. Romano, E. Buratti, F. Pagani, F.E. Baralle, Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 2339–2349. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.13.2339>.
- [72] I. D'Souza, P. Poorkaj, M. Hong, D. Nochlin, V.M. Lee, T.D. Bird, G.D. Schellenberg, Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5598>.
- [73] L. Suarez-Artiles, A. Perdomo-Ramirez, E. Ramos-Trujillo, F. Claverie-Martin, Splicing Analysis of Exonic OCRL Mutations Causing Lowe Syndrome or Dent-2 Disease, *Genes.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3390/genes9010015>.
- [74] C. Heintz, S.F. Dobrowolski, H.S. Andersen, M. Demirkol, N. Blau, B.S. Andresen, Splicing of phenylalanine hydroxylase (PAH) exon 11 is vulnerable: molecular pathology of mutations in PAH exon 11, *Mol. Genet. Metab.* 106 (2012) 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.05.013>.
- [75] A. Aissat, A. de Becdelièvre, L. Golmard, C. Vasseur, C. Costa, A. Chaoui, N. Martin, B. Costes, M. Goossens, E. Girodon, P. Fanen, A. Hinzpeter, Combined computational-experimental analyses of CFTR exon strength uncover predictability of exon-skipping level, *Hum. Mutat.* 34 (2013) 873–881. <https://doi.org/10.1002/humu.22300>.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author contributions

M. Le Tertre, C. Ka and G. Le Gac designed the study. M. Le Tertre and G. Le Gac conducted statistical analyses. M. Le Tertre, I. Gourlaouen, I. Berlivet and G. Richard performed molecular analyses. J-M. Chen, Y. Fichou and C. Férec provided critical feedback. M. Le Tertre, C. Ka, K. Uguen, L. Raud and G. Le Gac analyzed the data. M. Le Tertre, C. Ka and G. Le Gac wrote the manuscript. G. Le Gac supervised the study. All authors contributed to revision of the final manuscript.

Financial support: This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2009; CHU Brest UF0857).

Figure legends

Table 1. *In silico* analyses of SLC40A1 variants. (A) Predictions for missense variants located in canonical splice donor and splice acceptor sequences or cryptic splice sites. A variation is considered deleterious when predictions indicate both a decrease of $\geq 10\%$ for Human Splicing Finder (HSF) and $\geq 30\%$ for MaxEntScan (MES) in the scores between the physiological and mutated splice sites, or when a *de novo* splice site is predicted with a higher score than the wild-type splice site. The cut-off value that defines a splice site is 65 for HSF, and 3 for MES. (B) Predictions for missense variants located in potential exonic splicing regulatory (ESR) elements. A variation is considered to induce exon skipping when the score obtained from the $\Delta tESRseq$ bioinformatic tool is < -0.5 and the score obtained from ΔHZ_{Ei} is < -20 .

Figure 1. Functional analysis of the c.1051A>G and c.1402G>A exon 7 variations predicted to modify donor or acceptor splicing sites. (A) pSplicePOLR2G-SLC40A1 midigene structure. Positions of the PCR primers designed to amplify exogenous SLC40A1/POLR2G transcripts are indicated by arrows. (B) RT-PCR products resulting from the splicing processes of WT and mutated pSplicePOLR2G constructs transiently transfected in HepG2 cells. The data are representative of two independent experiments. pSP3: cells transiently transfected with a pSplicePOLR2G empty vector; NT: No cDNA template (RNAs from cells transiently transfected with the WT pSplicePOLR2G-SLC40A1 construct). (C) Sequence electrophoregram of the RT-PCR products generated from HepG2 cells transfected with the pSplicePOLR2G-SLC40A1_c.1402G>A mutated midigene.

Figure 2. Functional analysis of SLC40A1 variations predicted to modify splicing regulatory elements within exons 3, 6, 7, and 8. RT-PCR products resulting from the splicing processes of WT and mutated pSplicePOLR2G constructs transiently transfected in HepG2 cells. The data are representative of two independent experiments. NT: No cDNA template (RNAs from cells transiently transfected with the WT pSplicePOLR2G-SLC40A1 construct).

Figure 3. Skipping of SLC40A1 exon 5 in HepG2, THP-1, and macrophage type 2 THP-1-derived cells.

(A) RT-PCR products resulting from the splicing process of the wild type pSlicePOLR2G-SCL40A1 (exons 4 to 6) construct transiently transfected in HepG2 cells. (B) SLC40A1 exon 5 skipping as revealed by RT-PCR from endogenous RNAs extracted from non-transfected human hepatocytes (HepG2) and monocytes (THP-1: differentiated and polarized in M2 macrophages, or not). PCR products generated from the SLC40A1 transcript without exon 5 are indicated by an asterisk.

Figure 4. Functional analysis of SLC40A1 exon 5 variations predicted to create new donor or acceptor splice sites or to promote exon skipping.

(A) Electrophoregrams showing fluorescent RT-PCR products obtained from midigenes constructs transiently transfected in HepG2 cells. (B) Exon 5 exclusion/inclusion ratio as estimated from areas under the two detected fluorescent peaks (inclusion: 416 bp; exclusion: 289 bp) using the formula: $([\text{Area under the exon 5 inclusion peak}] / [\text{Area under the exon 5 exclusion peak}] + [\text{Area under the exon 5 inclusion peak}]) \times 100$. Each bar represents the mean + standard deviation of 5 independent experiments. *P* values were calculated with the Student's *t*-test; **P* < 0.05 compared with the WT condition.

Figure 5. Evaluation of the iron export function of the p.Gly468Ser FPN1 variant.

HEK293T cells were transiently transfected with CMV-regulated plasmids containing no ferroportin 1 (No FPN), WT FPN1 or FPN1 mutants before being grown in 20 µg/mL ⁵⁵Fe-transferrin. After 16 h, cells were washed and then serum-starved for up to 36 h. The ⁵⁵Fe exported into the supernatant was collected at 36 h. Data are presented as the percentage of cellular radioactivity at time zero. Each point represents the average value (from triplicate) of five independent experiments. *P* values were calculated with the Student's *t*-test; **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

Supplementary Table 1. Primers used for PCR amplification of large SLC40A1 genomic regions and RT-PCR analysis of exogenous SLC40A1/POLR2G or endogenous SLC40A1 transcripts. Underlined sequences represent the 5'-ends required to clone inserts into the SplicePOLR2G vector through the In-Fusion® cloning scheme. The universal tail allowing hybridization of a complementary FAM-labeled primer and synthesis of fluorescent RT-PCR products is presented in bold characters.

Supplementary Table 2. List of the 58 SLC40A1 missense variants associated with mild to severe iron overload phenotypes and evaluated for possible splicing defects. HGVS annotations of the NM_014585.5 transcript are shown, as well as the publications included, with their PubMed standard identifiers (PMID).

Supplementary Table 3. Scores of the SLC40A1 acceptor and donor splice sites.

Supplementary Figure 1. pSplicePOLR2G-SLC40A1 midigenes used in this study. (A) The *POLR2G* gene region consisting of exons 1 to 3 (black boxes) was cloned into the pcDNA3.1 vector, downstream of the cytomegalovirus (CMV) promoter and upstream of the bovine growth hormone polyadenylation signal (BGH). An EcoRI restriction site was created (by site-directed mutagenesis) in *POLR2G* intron 2 to facilitate the insertion by homologous recombination of the *SLC40A1* exons 2 to 4, 4 to 6, or 5 to 7 regions and their intronic flanking sequences (~150 bp). (B) A different construct was generated for the study of *SLC40A1* variants within exons 7 and 8. This second construct did not contain the *POLR2G* exon 3. Rather, the *SLC40A1* gene region consisting of exons 6 to 8 was cloned between two XbaI restriction sites, so that the *SLC40A1* intron7/exon8 junction served as the last acceptor splicing site. The 15 missense-variations were introduced by site-directed mutagenesis in each exon of interest (grey boxes).

Supplementary Figure 2. Prediction of exonic splicing silencer (ESS) and exonic splicing enhancer (ESE) within the *SLC40A1* exon 5. (A) Mapping of the splicing regulatory elements in the wild type and c.430A>G mutated alleles based on the so-called QUEPASA (quantifying extensive phenotypic arrays from sequence arrays) method. Exonic Splicing Silencers (ESSs) are shown in red and Exonic Splicing Enhancers (ESEs) in green. On this mapping, the change of adenine 430 to guanine seems to alter overlapping ESSs. The considered region encompasses a U/A repeat sequence that could permit interaction with the Sam68 silencer. (B) Locations of ESEs in *SLC40A1* exon 5 as predicted from the ESEfinder algorithm (integrated in the Alamut application; <http://www.interactive-biosoftware.com>). The c.430A>G transition creates a TGCAGA motif that matches the consensus sequence of an ESE ([T/C/A][G/A][C/T/A][G/A][T/G][C/A/G]), namely the Serine/Arginine-rich Protein 55 (SRp55).

Table 1A. Reference splice site and cryptic splice site - dedicated analyses

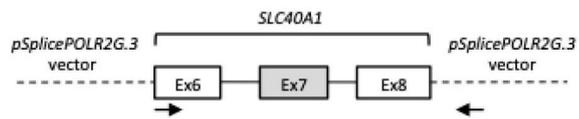
Exon	Nucleotide change c. (NM_014585.5)	Protein change p.	Human Splicing Finder (HSF) scores		MaxEntScan (MES) scores		Predictions HSF and MES
			WT allele	Mutated allele	WT allele	Mutated allele	
5	430A>G	Asn144Asp	51.88	80.83	-2.97	5.77	New acceptor splice site
	469G>T	Asp157Tyr	49.16	75.99	0.11	7.76	New donor splice site
7	1051A>G	Ile351Val	43.77	70.61	-4.92	3.25	New donor splice site
	1402G>A	Gly468Ser	90.93	80.36	10.53	5.52	Physiological donor splice site broken

Table 1B. Exonic splicing regulatory element - dedicated analyses

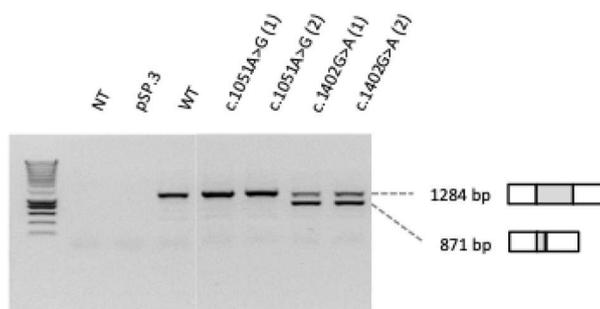
Exon	Nucleotide change c. (NM_014585.5)	Protein change p.	Δ tESRseq scores	Δ Hzei scores	Predictions
			WT allele	WT allele	Δ tESRseq and Δ Hzei
3	214G>T	Val72Phe	-1,334	-64,98	Exon skipping
5	470A>G	Asp157Gly	-2,081	-60,3	Exon skipping
	470A>C	Asp157Ala	-1,074	-21,37	Exon skipping
6	533G>A	Arg178Gln	-0,825	-34,31	Exon skipping
	541G>A	Asp181Asn	-1,964	-34,65	Exon skipping
	542A>T	Asp181Val	-0,942	-26,02	Exon skipping
	546G>T	Gln182His	-0,806	-54,43	Exon skipping
7	626C>T	Ser209Leu	-2,564	-97,2	Exon skipping
	809A>T	Asp270Val	-1,136	-51,04	Exon skipping
8	1014T>G	Ser338Arg	-1,124	-57,9	Exon skipping
	1510G>A	Asp504Asn	-1,169	-57,78	Exon skipping

Figure 1

A



B



C

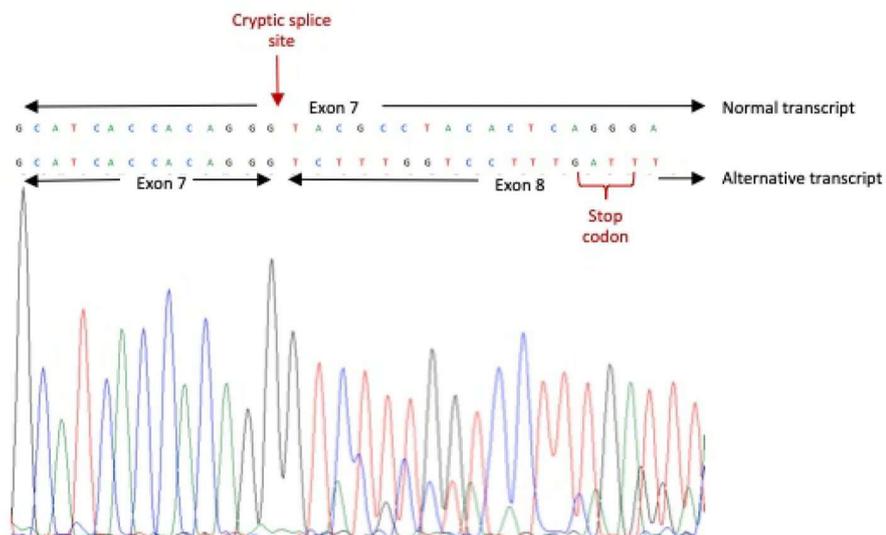


Figure 2

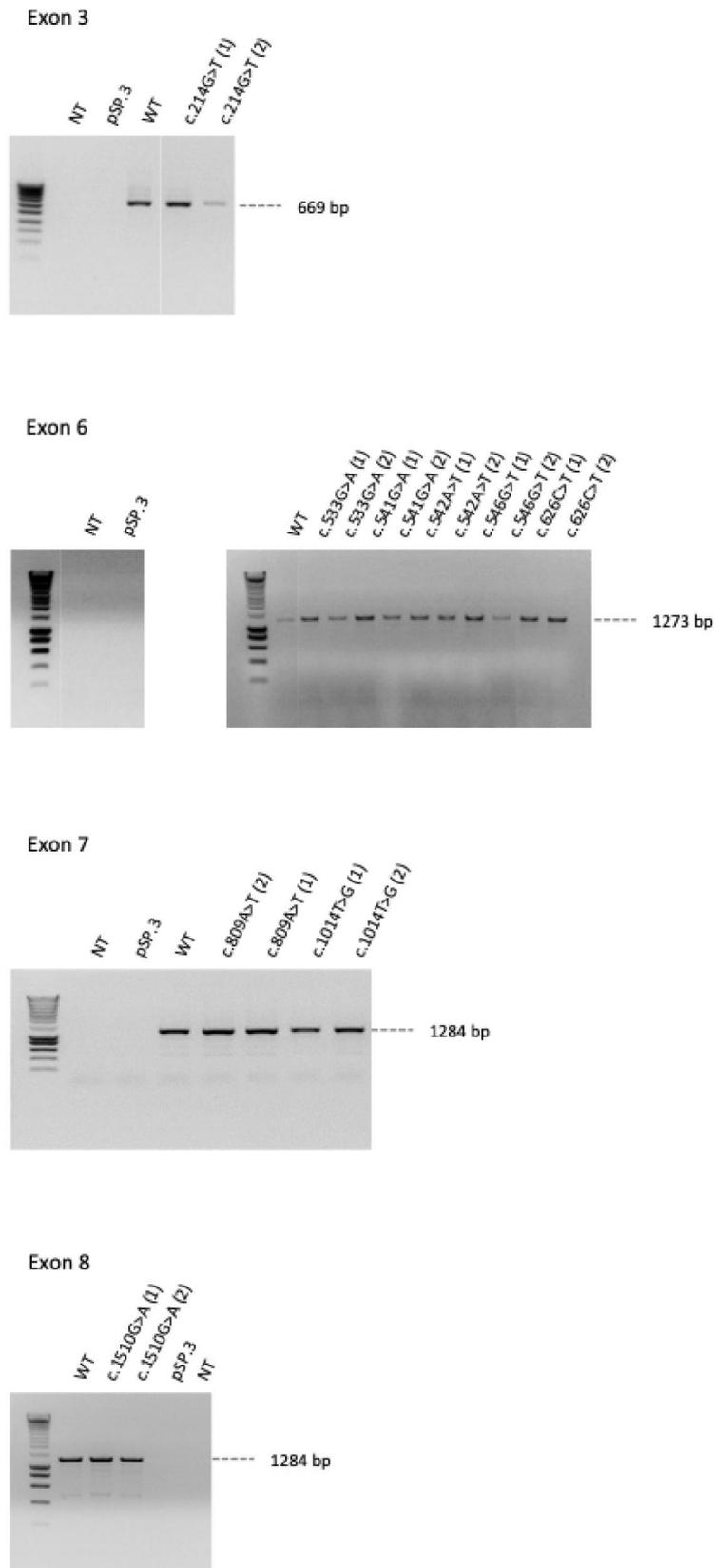
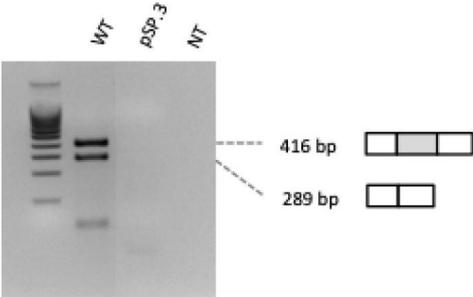


Figure 3

A



B

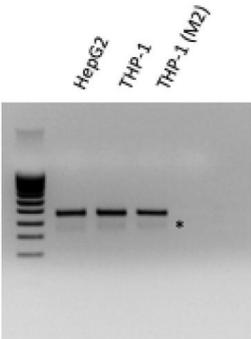
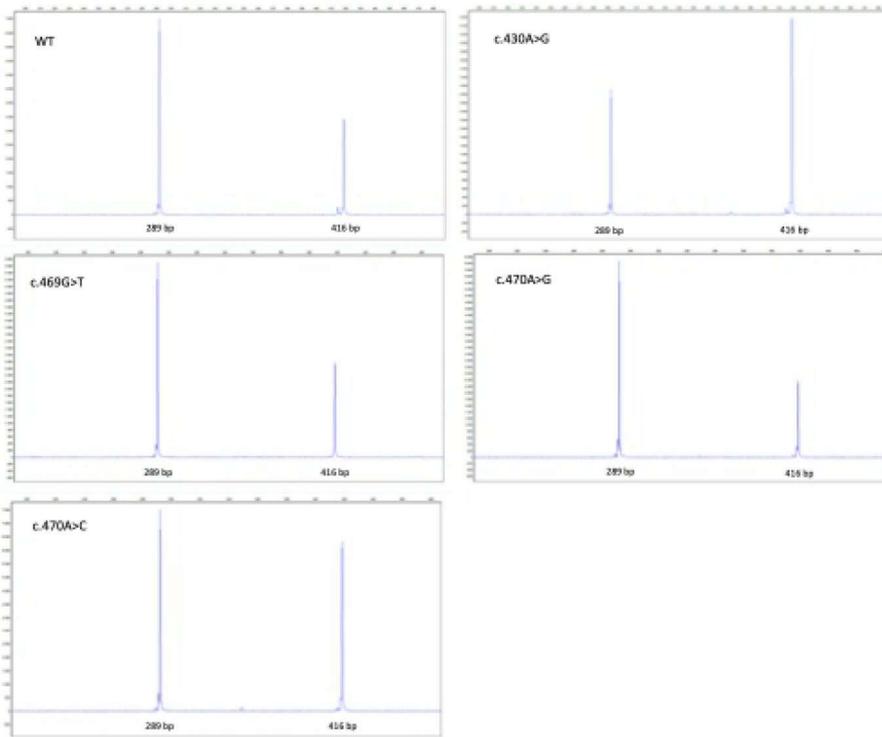


Figure 4

A



B

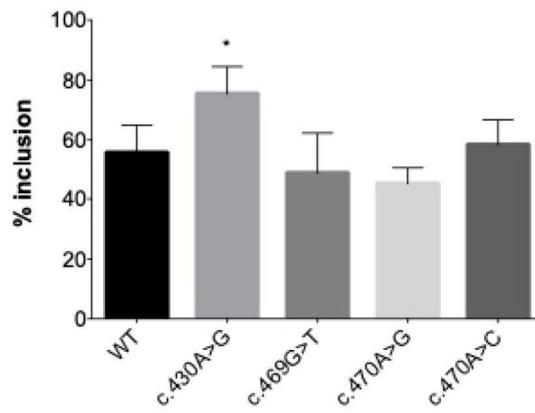
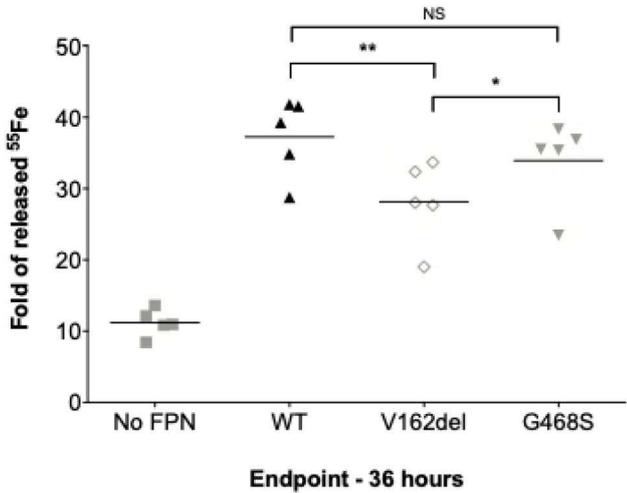
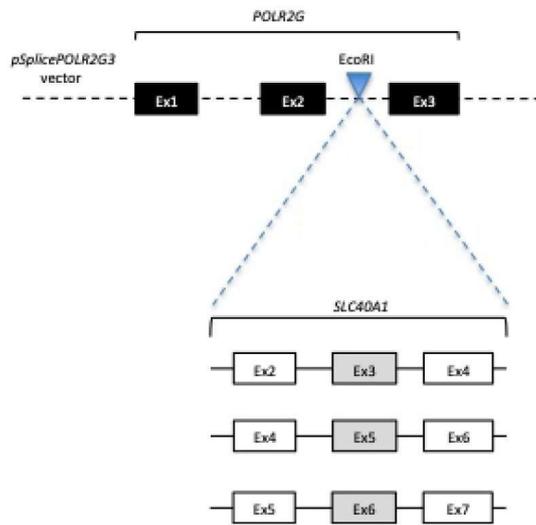


Figure 5

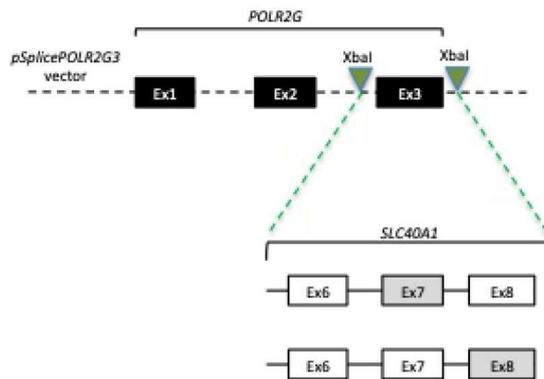


Supplementary Figure 1

A

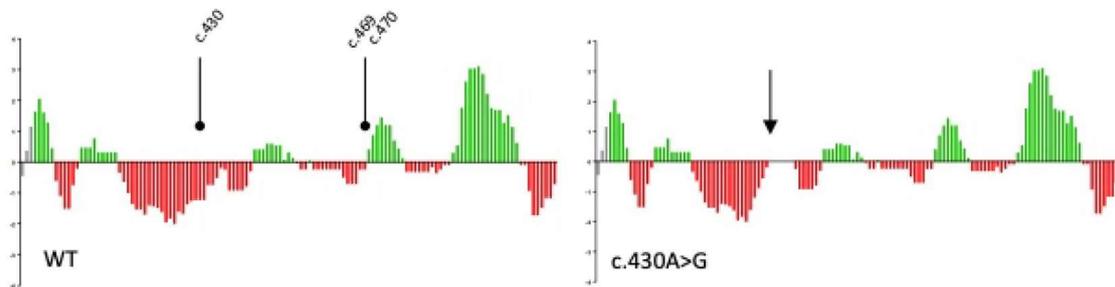


B

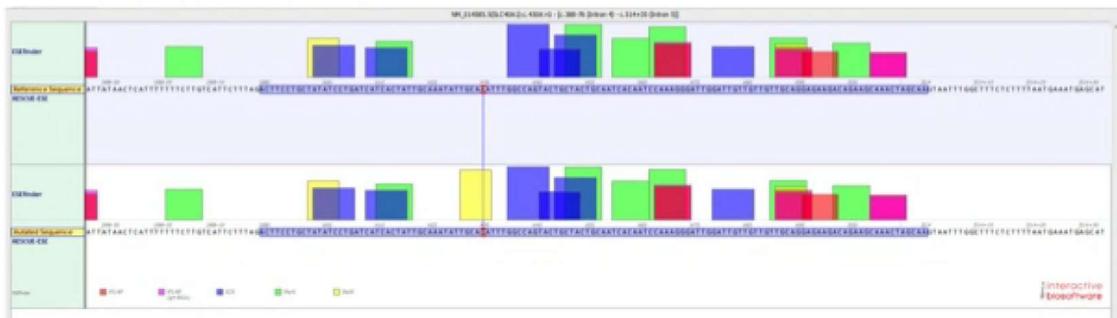


Supplementary Figure 2

A



B



Supplementary Table 1

PCR amplification of SLC40A1 genomic inserts		
Region Of Interest (ROI)	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
Exons 2 to 4	<u>CTGCAGGAACATGCGAATTCACAAACAAACCAACCCA</u>	<u>ATAAGGAGGCTCAGGAATTCGCACAAACAAAGTATAGGTC</u> ACT
Exons 4 to 6	<u>CTGCAGGAACATGCGAATTCAGTGAACAGAGAAAATTGTGGT</u>	<u>ATAAGGAGGCTCAGGAATTCCTCTCACAGAGTCCAAGGG</u>
Exons 5 to 7	<u>CTGCAGGAACATGCGAATTCACAGTTAGGACATTATGCCCA</u>	<u>ATAAGGAGGCTCAGGAATTCAGCCTGAACCATGTTTTAAGT</u>
Exons 6 to 8	<u>TATTCCTACAGAATCTAGAGGACTTGACCCAAACAACAAA</u>	<u>CGAACCGGGGCCCTCTAGAAGCAAAACACCCAGCCATTT</u>

SLC40A1 transcripts analysis		
From midigenes	Forward primer sequence (5' to 3') - SLC40A1	Reverse primer sequence (5' to 3') - POLR2G
Exon 3 (Exons 2 to 4 construct)	SLC40A1_Ex2F: CGACTACCTGACCTCTGCAA	TAGAAGGCACAGTCGAGG
Exon 6 (Exons 5 to 7 construct)	SLC40A1_Ex5F: AAGGGATTGGATTGTTGTTG	TAGAAGGCACAGTCGAGG
Exon 7 or 8 (Exons 6 to 8 construct)	SLC40A1_Ex6F: CGTTCTGCTCTGGAAGTTT	TAGAAGGCACAGTCGAGG
From midigenes	Forward primer sequence (5' to 3') - POLR2G	Reverse primer sequence (5' to 3') - SLC40A1
Exon 5 (Exons 4 to 6 construct)	<u>TAGTCGACGACCGTTACA</u> ACTTGCTCAACACGGTGAAG	SLC40A1_Ex6R: ATGACTGGGAGCCAAATGT
From endogenous transcript	Forward primer sequence (5' to 3') - SLC40A1	Reverse primer sequence (5' to 3') - SLC40A1
Exon 5 skipping	SLC40A1_Ex3F: GTTCTGGTAGAGCTCTATG	SLC40A1_Ex6R: ATGACTGGGAGCCAAATGT

Supplementary Table 2

Exon	Nucleotide change (c.)	Protein change (p.)	PMID
3	190T>A	Tyr64Asn	12857562
	190T>C	Tyr64His	25396007
	205G>A	Ala69Thr	27177411
	214G>T	Val72Phe	18177470
	230C>A	Ala77Asp	10471458
	238G>A	Gly80Ser	16135412
	239G>T	Gly80Val	16351644
	252C>G	Asp84Glu	28681497
	262A>G	Arg88Gly	17951290
	263G>C	Arg88Thr	16257244
4	386T>C	Leu129Pro	24644245
5	430A>C	Asn144His	11431687
	430A>G	Asn144Asp	15030991
	431A>C	Asn144Thr	12865285
	431A>G	Asn144Ser	18403150
	454A>T	Ile152Phe	18713659
	469G>T	Asp157Tyr	24714983
	470A>G	Asp157Gly	12730114
	469G>A	Asp157Asn	18177470
	470A>C	Asp157Ala	20230395
	474G>T	Trp158Cys	28110135
6	521A>T	Asn174Ile	16135412
	533G>A	Arg178Gln	17951290
	539T>C	Ile180Thr	16257244
	542A>T	Asp181Val	16351644
	541G>A	Asp181Asn	29154924
	546G>T	Gln182His	12730114
	553A>G	Asn185Asp	16111902
	610G>C	Gly204Arg	29154924
	610G>A	Gly204Ser	21199650
	626C>T	Ser209Leu	27896572
	689C>A	Thr230Asn	24714983
	698T>C	Leu233Pro	18713659
	697C>G	Leu233Val	32360131
	718A>G	Lys240Glu	21175851
744G>T	Gln248His	14636642	
7	797T>C	Met266Thr	24714983
	809A>T	Asp270Val	15338274
	887G>A	Arg296Gln	29154924
	968G>T	Gly323Val	12730114
	977G>C	Cys326Ser	15727899
	977G>A	Cys326Tyr	19342478
	977G>T	Cys326Phe	26059880
	997T>C	Tyr333His	30500107

8	1014T>G	Ser338Arg	17383046
	1035G>C	Leu345Phe	24714983
	1051A>G	Ile351Val	24714983
	1328C>T	Pro443Leu	24714983
	1402G>A	Gly468Ser	18160816
	1467A>C	Arg489Ser	16258219
	1466G>A	Arg489Lys	19937651
	1468G>A	Gly490Ser	17951290
	1469G>A	Gly490Asp	12873829
	1502A>G	Tyr501Cys	19709084
	1510G>A	Asp504Asn	24714983
	1520A>G	His507Arg	21396368
	1531G>A	Val511Ile	30500107
	1681A>G	Arg561Gly	19066423

Supplementary Table 3

Exon	Acceptor sites		Donor sites	
	HSF	MES	HSF	MES
1			92.33	8.95
2	91.29	12.77	93.16	10.24
3	86.13	9.41	97.89	10.47
4	87.2	8.60	84.24	9.63
5	79.57	9.34	77.1	3.86
6	83.25	9.61	84.71	8.14
7	91.69	8.86	90.93	10.53
8	84.58	6.89		

IV- Développement d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude fonctionnelle de la ferroportine

a- Contexte

La progression des connaissances fondamentales autour de la ferroportine ainsi que l'interprétation des variants rares du gène *SLC40A1* peuvent être pénalisées par les nombreuses limites que présente le mode de réalisation actuel des études fonctionnelles. En effet, ces dernières reposent principalement sur la surexpression d'un ADN complémentaire dans des lignées cellulaires humaines (de rein HEK293T, de colon Caco-2, hépatocytaires HuH-7...) ou dans des cellules primaires d'origine animale (oocytes de Xénopes) (Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019).

Parmi celles-ci, la lignée cellulaire de type épithélial embryonnaire de rein humain HEK293T a été la plus utilisée. C'est en travaillant avec ces cellules que Nemeth et collaborateurs ont, pour la première fois, décrit le rôle négatif exercé par l'hepcidine sur l'export du fer au travers d'une interaction directe avec la ferroportine (Nemeth *et al*, 2004b). Cette lignée reste très utilisée alors que les cellules rénales n'expriment que très peu la ferroportine de manière endogène. Malgré ces nombreuses études et résultats publiés, ce modèle cellulaire, qui ne représente pas un type cellulaire clé du métabolisme du fer, n'apparaît pas être le contexte le plus pertinent pour étudier la ferroportine (Vlasveld *et al*, 2019).

Outre les modèles cellulaires utilisés, les stratégies expérimentales appliquées par les différentes équipes à travers le monde sont extrêmement variables. La capacité de la ferroportine de type sauvage ainsi que des variants à exporter le fer peut, par exemple, être évaluée *via* des mesures de fer radioactif ou de ferritine après avoir chargé les cellules sur des temps différents avec des quantités de fer variables provenant de sources diverses (holotransferrine, citrate d'ammonium ferrique...). La même hétérogénéité est retrouvée pour les protocoles visant à évaluer la présence en membrane plasmique du transporteur de type sauvage ou muté ou encore sa résistance à l'hepcidine (Vlasveld *et al*, 2019).

Dans le but d'améliorer ces explorations fonctionnelles, plusieurs options sont envisageables. La première consisterait à rester sur un modèle de surexpression en privilégiant l'utilisation de lignées cellulaires représentatives du métabolisme du fer (d'origine intestinale, hépatocytaire ou monocytaire/macrophagique) et de protocoles standardisés. La deuxième serait de travailler directement à partir d'un matériel biologique pertinent, sans surexpression (Vlasveld & Swinkels, 2018; Vlasveld *et al*, 2019).

C'est pour cette dernière solution que notre équipe a opté, l'idée étant, à terme, d'explorer fonctionnellement la ferroportine de type sauvage ou mutée en manipulant directement des cellules de donneurs sains et de patients atteints d'hémochromatose de type 4. Notre choix s'est porté sur les macrophages car ce sont les cellules de l'organisme dans lesquelles la ferroportine, *via* le catabolisme des globules rouges sénescents, présente la plus forte activité. Ces cellules ont également l'avantage d'être facilement accessibles. En effet, ce type cellulaire peut être obtenu à partir de monocytes, isolés de simples prélèvements sanguins, qui seront différenciés et polarisés, *in vitro*, en macrophages (Zarif *et al*, 2016). L'obtention d'échantillons sanguins est d'autant plus aisée que la phlébotomie représente le traitement de référence de l'hémochromatose.

Seulement, avant de travailler sur ces cellules « précieuses », il est indispensable de valider l'ensemble des protocoles d'analyses fonctionnelles, visant à évaluer la présence en membrane plasmique, la fonction d'export du fer ainsi que la régulation médiée par l'hepcidine de la ferroportine, sur un

modèle cellulaire auquel l'accès n'est pas restreint. L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a choisi de travailler avec la lignée monocyttaire humaine THP-1 (American Type Culture Collection) qui est, elle aussi, différenciable et polarisable *in vitro* en macrophages (Ayaub *et al*, 2019). Avant mon arrivée en thèse, la caractérisation de cette lignée cellulaire au laboratoire avait permis à l'équipe de valider son utilisation pour étudier la ferroportine. Par CGH-array, il avait été déterminé que ces cellules possédaient 2 copies du gène *SLC40A1*. La conformité de la séquence promotrice proximale (-500 pb) et des exons du gène avait été vérifiée par séquençage. Seul un polymorphisme fréquent, à l'état hétérozygote, (c.663T>C ; rs2304704 ; p.Val221Val) avait été identifié dans l'exon 6. Le séquençage d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer (*FTL*, *HAMP*, *HFE*, *HFE2* et *TFR2*) avait aussi été effectué et n'avait révélé que la présence d'une et deux variations neutres, respectivement, pour les gènes *FTL* (c.163T>C ; p.Leu55Leu) et *HFE* (c.340+4T>C et c.893-44T>C).

Ainsi, les premiers objectifs de ce projet étaient (i) de mettre au point un protocole de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 en macrophages, (ii) de créer des cellules THP-1 « témoins » en modifiant le locus *SLC40A1* par la technologie CRISPR-Cas9 pour permettre (iii) la mise en place et la validation des tests fonctionnels sur ce modèle cellulaire.

b- Matériel et méthodes

i. Mise au point d'un protocole de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 en macrophages de type M2

1. Culture cellulaire

La lignée monocyttaire humaine THP-1 (American Type Culture Collection) a été cultivée, selon les recommandations du fournisseur : à 37 °C, en atmosphère humide, sous 5 % de CO₂ dans du milieu RPMI-1640 (Lonza), supplémenté par 10% de SVF (Sérum de Veau Fétal) décomplémenté (Eurobio) et 0,05 mM de β-mercaptoethanol (Sigma) (milieu complet).

2. Différenciation et polarisation des monocytes THP-1 en macrophages de type M2

Les cellules monocytaires THP-1 ont été différenciées puis polarisées en macrophages de type M2 selon le protocole qui nous avait été transmis par le Dr. Kjetil Ask de l'Université McMaster à Hamilton, au Canada (Ayaub *et al*, 2019). Pour cela, les cellules THP-1 ont étéensemencées en plaque 6 puits à une densité de $2,5 \cdot 10^6$ cellules par puits dans 5 mL de milieu complet supplémenté par 10 ng/mL de PMA (« Phorbol 12-Myristate 13-Acetate ») (Sigma). 48 h après, les cellules différenciées en macrophages de type M0 ont été lavées au PBS avant d'être incubées 72 h dans du milieu complet supplémenté par un cocktail de deux ou trois interleukines (IL) afin d'être polarisées en macrophages de type M2 : IL-4 et 13 à 20 ng/mL chacune ou IL-4 et 13 à 20 ng/mL chacune et IL-6 à 5 ng/mL (R&D Systems).

3. Analyse par RTqPCR de l'expression des différents marqueurs M2 et de la ferroportine dans les cellules THP-1 différenciées et polarisées en macrophages de type M2

Au terme des protocoles de différenciation et de polarisation des cellules THP-1 en macrophages de type M2, l'ARN total a été extrait des cellules grâce au coffret « NucleoSpin RNA Plus » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. 1 µg d'ARN total a ensuite été traité à la DNaseI (Thermo Fisher Scientific) avant que l'ARNm ne soit reverse transcrit à l'aide de la SuperscriptIII (Invitrogen) et d'Oligo(dT), selon les conditions préconisées par le fournisseur. Des PCR quantitatives ont été réalisées sur un Lightcycler 480 (Roche) à partir de l'ADNc généré, avec le coffret « HotStarTaq Master Mix » (Qiagen) et du Syto9 (0,5 µM) (Fisher Scientific). Le programme de qPCR était le suivant : activation initiale à 95 °C, 15 min suivie de 50 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 60 °C - 30 s, 72 °C - 1min). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau IV.

Tableau IV : Amorces de RTqPCR utilisées pour étudier l'expression des marqueurs M2 et de la ferroportine

Cibles	Amorces sens	Amorces antisens
<i>SLC40A1</i>	5'- CTGCTAGAATCGGTCTTTGG - 3'	5' – GATTTGGAGCCAGGATGAC – 3'
<i>18S</i>	5' – ATGGAAAATACAGCCAGGTC – 3'	5' – TCTATGGGCCCGAATCTT – 3'
<i>CCL18</i>	5' – GTCTATACCTCCTGGCAGATT - 3'	5' – TCTCTGGTTAGGAGGATG – 3'
<i>CD163</i>	5'-CTCAAGAGGAGAGAACTTAGT-3'	5'-CTGACTCATGGGAATTTCTG-3'
<i>CD206</i>	5' - TCAGAAATGTTGAAGGGACG – 3'	5' - AATCATTCCGTTACCAGAG -3'

ii. Création de cellules THP-1 éditées au locus *SLC40A1* par la technologie CRISPR-Cas9

Nous avons choisi de créer différents clones THP-1 « témoins » en introduisant deux types de mutations/modifications au locus *SLC40A1* par la technologie CRISPR-Cas9. Ainsi, pour invalider un des deux allèles du gène, en engendrant un décalage du cadre de lecture, ou pour introduire la mutation faux-sens p.Asn174Ile à l'état hétérozygote, deux protocoles ont été utilisés. Les différences entre ces derniers sont spécifiées à chacune des étapes décrites ci-dessous.

1. Sélection, synthèse et purification des ARN guides

Les séquences variables des ARN guides, ciblant spécifiquement le gène *SLC40A1*, utilisés pour la création des clones THP-1 « témoins », ont été définies à l'aide du logiciel de conception en ligne « DESKGEN™ CRISPR Libraries » (www.deskgen.com) (Hough *et al*, 2016). Ces dernières ont été sélectionnées parmi différentes propositions afin que les ARN guides ciblent les régions d'intérêt avec une forte activité et une haute spécificité (Doench *et al*, 2016; Hsu *et al*, 2013).

Pour le protocole « invalidation d'un allèle » : la séquence de « guidage » de 20 nucléotides correspondant au gène *SLC40A1* était la suivante : 5'-GTCGCCTAGTGTCATGACCA-3' (séquence PAM « Protospacer Adjacent Motif » : GGG). L'ARN guide s'hybridait ainsi à proximité du codon d'initiation de la traduction (dans l'exon 1) avec une activité et une spécificité théoriques estimées respectivement à 67 sur 100 et 93 sur 100.

Pour le protocole « p.Asn174Ile » : la séquence de « guidage » de 20 nucléotides correspondant au gène *SLC40A1* était la suivante 5'-ATATGAATGCCACAATACGA-3' (séquence PAM : AGG). L'ARN guide s'hybridait ainsi à proximité du codon 174 (dans l'exon 6) avec une activité et une spécificité théoriques estimées respectivement à 67 sur 100 et 97 sur 100.

Les ARN guides ont été transcrits *in vitro* grâce au coffret « EnGen® sgRNA Synthesis, *S. pyogenes* » (NEB) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN guides produits ont ensuite été purifiés sur colonne grâce au coffret « RNA Clean & Concentrator-25 » (Zymo Research).

2. Construction des ADN donneurs

- ADN donneur utilisé pour invalider un allèle du gène *SLC40A1*

Pour invalider un allèle du gène *SLC40A1* par insertion d'un gène de résistance à la zéocine selon la stratégie élaborée par Zhou et collaborateurs en 2016, nous avons construit un ADN donneur linéaire en trois étapes successives (Zhou *et al*, 2016).

La première étape consistait à cloner le gène de résistance à la zéocine dans le site multiple de clonage du plasmide pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) situé en aval du promoteur CMV et en amont de la séquence BGH pA (Figure 30).

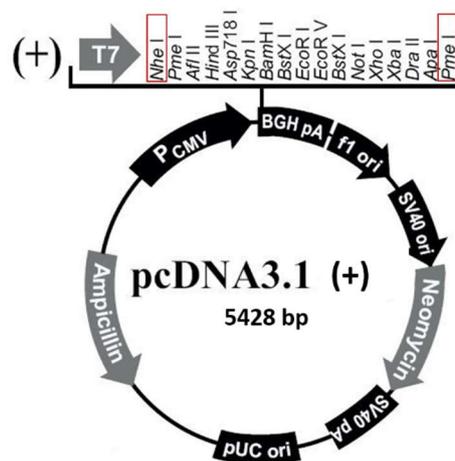


Figure 30 : Carte du plasmide pcDNA3.1 (+) utilisé pour la construction de l'ADN donneur linéaire.

Le gène de résistance à la zéocine a été inséré par clonage « *in fusion* » (Clontech) dans le site multiple de clonage du plasmide pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) digéré, au préalable, par les enzymes de restriction NheI et PmeI (NEB).

Pour ce faire, le plasmide pcDNA3.1 (+) (1 µg) a été doublement digéré à 37 °C sur la nuit par 20 unités de deux enzymes de restriction, NheI et PmeI (NEB). En parallèle, le gène de résistance à la zéocine a été amplifié par PCR avec le coffret « HotstarTaq Master Mix » (Qiagen), à partir du plasmide pcDNA4/TO (Invitrogen) et des amorces sens 5'-ACCCAAGCTGGCTAGCATGGCCAAGTTGACCAGTGC-3' et antisens 5'-ATCAGCGGGTTTAAACTCAGTCTGCTCTCGGC-3'. Les amorces utilisées portaient des

queues (soulignées), homologues aux extrémités du plasmide pcDNA3.1 (+) linéarisé par les enzymes de restriction NheI et PmeI. Ces queues étaient nécessaires au clonage « *in fusion* ». La PCR s'est déroulée comme suit : une première étape d'activation à 95 °C- 15 min suivie de 35 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 59 °C - 30 s, 72 °C - 1min) et d'une étape d'élongation finale à 72 °C – 10 min. Le plasmide digéré ainsi que l'amplicon de 407 pb ont été extraits sur gel d'agarose puis purifiés en utilisant le coffret « PCR clean-up/Gel extraction NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Le gène de résistance à la zéocine a ensuite été inséré dans le plasmide pcDNA3.1 (+) linéarisé à l'aide du coffret « In-Fusion HD Cloning » (Clontech) comme indiqué par le fournisseur. Après transformation, les plasmides ont été extraits et purifiés. La présence et la conformité de la séquence introduite ont été vérifiées par séquençage de type Sanger.

La seconde étape consistait à introduire dans la construction nouvellement obtenue, pcDNA3.1 (+)_Zeo, la séquence *SLC40A1* cible de l'ARN guide en amont du promoteur CMV, en utilisant la même stratégie de clonage que précédemment (Figure 31). Pour ce faire, le plasmide pcDNA3.1 (+)_Zeo (1 µg) a été linéarisé sur la nuit à 37 °C par 20 unités d'enzyme de restriction MluI (NEB). L'insert *SLC40A1* a, quant à lui, été amplifié par PCR à partir d'un ADN génomique témoin et des amorces sens 5'-GGCCAGATATACGCGTGTGCCTAGTGTGTCATGACCA-3' et antisens 5'-ATCAATGTCAACGCGTCTGGCGGTTGTGATCTCC-3' portant des queues homologues (soulignées) aux extrémités du plasmide linéarisé par l'enzyme de restriction MluI.

Afin de produire en quantité suffisante l'ADN donneur linéaire porté par le plasmide pcDNA3.1 (+)_Zeo_ *SLC40A1* nouvellement construit, la dernière étape reposait sur une amplification PCR (Figure 31). Les amorces sens 5'-TCCACTGCGACGTCGCGAGTGTCGCCTAGTGTGTCATGACCA-3' et antisens 5'-GGCTTAGGATTGTTACGCCCCATAGAGCCCACCGCAT-3', ont été conçues pour s'hybrider respectivement sur les extrémités de la séquence cible de l'ARN guide et de la séquence BGH pA. Ces amorces portaient des queues (soulignées) correspondant à des séquences « protectrices » ayant pour but de protéger les futures extrémités de l'ADN donneur linéaire des exonucléases. La PCR, réalisée à l'aide du coffret « HotstarTaq Master Mix » (Qiagen) s'est déroulée comme suit : une première étape d'activation à 95 °C- 15 min suivie de 40 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 56 °C - 30 s, 72 °C – 1min30) et d'une étape d'élongation finale à 72 °C – 10 min. L'ADN donneur linéaire de 1381 pb obtenu a été purifié sur colonne à l'aide du coffret « DNA Clean & Concentrator-25 » (Zymo Research).

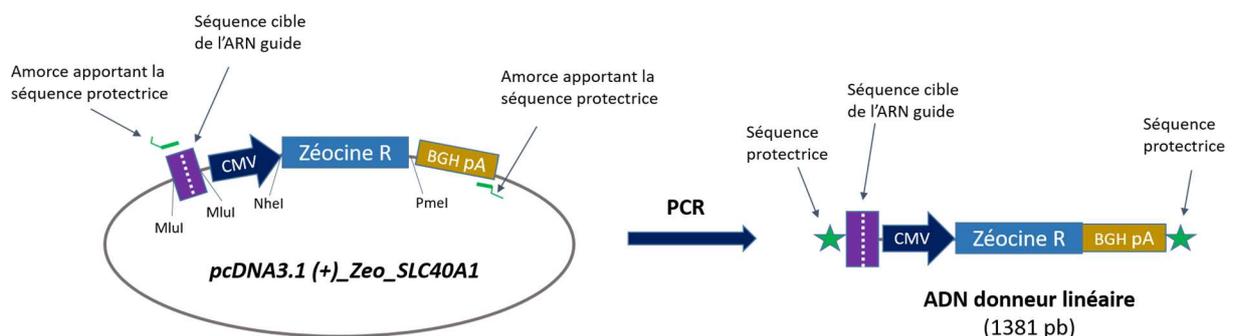


Figure 31 : Schéma récapitulatif de la stratégie adoptée pour construire l'ADN donneur linéaire.

Le gène de résistance à la zéocine a tout d'abord été introduit dans le site multiple de clonage du plasmide pcDNA3.1 (+), doublement digéré par les enzymes de restriction NheI et PmeI, par clonage « *in fusion* ». Puis, la séquence *SLC40A1* cible de l'ARN guide sélectionné a été insérée en amont du promoteur CMV également par clonage « *in fusion* » au niveau du site de restriction de l'endonucléase MluI. Enfin une PCR, réalisée avec des amorces apportant des séquences protectrices contre les exonucléases, a permis de linéariser l'ADN donneur.

- ADN donneur utilisé pour introduire la mutation faux-sens p.Asn174Ile à l'état hétérozygote au locus *SLC40A1*

Pour générer des clones porteurs de la mutation faux-sens p.Asn174Ile par la technologie CRISPR-Cas9, nous avons fait produire un ADN donneur simple brin par la société Eurogentec en tenant compte des recommandations formulées en 2017 par Liang et collaborateurs (Liang *et al*, 2017). Celui-ci comprenait des bras d'homologies asymétriques de part et d'autre du changement nucléotidique à introduire (50 bases d'homologie en 5', 30 en 3'). Les extrémités de cet oligonucléotide étaient protégées des attaques nucléasiques par des modifications phosphorothioates. La séquence de l'ADN donneur était la suivante : 5'-T*G*ATGGGTTTGCACACTTACCTGCCTCTTTCACCTGCCTCTCTAGATATGAtcGCCACAATACGAAGGATTGACCAGTTAA*C*C-3' (Le changement nucléotidique apparaît en minuscule, les astérisques représentent les modifications phosphorothioates).

3. Electroporation des cellules THP-1

Les complexes Cas9/ARN guide ont été formés par incubation pendant 15 min à température ambiante de 120 pmol de Cas9 « Cas9 ribonucleoprotein EnGen® Cas9 NLS, *S. pyogenes* » (NEB) en présence de 120 pmol d'ARN guide. Puis, 1 µg d'ADN donneur linéaire (portant le gène de résistance à la zéocine pour le protocole « invalidation d'un allèle ») ou 100 pmol d'ADN donneur simple brin (synthétisé pour le protocole « p.Asn174Ile ») ont été ajoutés aux complexes avant que ce mélange soit de nouveau incubé 5 minutes à température ambiante. 1.10⁶ cellules THP-1 en suspension dans 100 µL de solution « Cell Line Nucleofector® Solution V » (Lonza), ont ensuite été ajoutées à cette solution avant d'être électroporées à l'aide du Nucleofector II (Amaxa Biosystems) en utilisant le programme V-001. A l'issue de ce protocole d'électroporation, les cellules ont directement été remises en culture en plaques 12 puits dans 2 mL de milieu complet.

4. Détermination de la concentration de zéocine à utiliser pour la sélection clonale du protocole « invalidation d'un allèle »

Pour déterminer la concentration en zéocine (Invitrogen) à utiliser pour sélectionner efficacement les cellules THP-1 ayant intégré le gène de résistance à la zéocine, les cellules ont étéensemencées en plaques 6 puits à une densité de 3.10⁵ cellules/puits en milieu complet supplémenté ou non en zéocine (Thermo Fisher). Au terme de 4 jours d'incubation en présence de concentrations croissantes de drogue (0, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL), les cellules vivantes ont été comptabilisées en utilisant le compteur de cellules « ADAM-MC™ Automatic Cell Counter » (AlphaMetrix Biotech) selon les recommandations du fournisseur. La concentration minimale efficace de 100 µg/mL a été choisie pour éliminer les clones négatifs, n'ayant pas intégré le transgène.

5. Sélection des cellules « corrigées »

Pour le protocole « invalidation d'un allèle » : le milieu des cellules a été supplémenté en zéocine (100 µg/mL) (ThermoFisher) 3 jours post-électroporation. 10 jours plus tard, les cellules ont été

ensemencées dans un milieu semi-solide (« MethoCult H4435 Enriched », Stemcell) supplémenté en Zéocine (100 µg/mL) à raison de 400 cellules dans un puits de plaque 6 puits. Une dizaine de jours plus tard, les clones ayant proliféré ont été repiqués individuellement et remis en culture dans du milieu complet contenant 100 µg/mL de Zéocine.

Pour le protocole « p.Asn174Ile » : 4 jours post-électroporation, les cellules ont été ensemencées dans un milieu semi-solide (« MethoCult H4435 Enriched », Stemcell) à raison de 400 cellules dans un puits de plaque 6 puits. Une dizaine de jours plus tard, les clones ayant proliféré ont été repiqués individuellement et remis en culture dans du milieu complet.

6. Vérification des clones

- Validation au niveau de l'ADN génomique

L'ADN génomique des clones repiqués a été extrait selon les recommandations du fournisseur grâce au coffret « QIAamp DNA Investigator » (Qiagen).

Pour le protocole « invalidation d'un allèle »: une PCR a été réalisée à partir de l'ADN génomique extrait avec des amorces s'hybridant sur la séquence *SLC40A1*, de part et d'autre du site de coupure présumé dans l'exon 1 (amorce sens : 5'-CCAACTTCAGCTACAGTGTTAGCT-3', amorce antisens : 5'-TTCACAGCAGAGCCACATTCC-3'). Les différentes étapes de PCR (coffret « HotstarTaq Master Mix » ; Qiagen) étaient les suivantes : une première étape d'activation à 95 °C- 15 min suivie de 40 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 58 °C - 30 s, 72 °C – 2 min) et d'une étape d'élongation finale à 72 °C – 10 min. Les différents produits de PCR ont été extraits et purifiés sur gel avant d'être directement analysés par séquençage de type Sanger.

Pour le protocole « p.Asn174Ile » : Une PCR a été réalisée à partir de l'ADN génomique extrait et des amorces sens : 5'-TGTGTTAAATGGGACAGTCTCTCT-3' et antisens : 5'- CCAGAGCAGAACGTACTCCA-3' s'hybridant sur la séquence *SLC40A1*, de part et d'autre du site de coupure présumé dans l'exon 6. Les différentes étapes de PCR (coffret « HotstarTaq Master Mix » ; Qiagen) étaient les suivantes : une première étape d'activation à 95 °C- 15 min suivie de 40 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 58 °C - 30 s, 72 °C – 1 min) et d'une étape d'élongation finale à 72 °C – 10 min. Les produits de PCR ont été purifiés de façon enzymatique en utilisant de « l'ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent » (Thermo Fisher Scientific) avant d'être analysés par séquençage de type Sanger. Les différents produits de PCR obtenus pour deux des clones (clones 28 et 39) ont été sous-clonés à l'aide du coffret « TOPO TA for sequencing » (Thermo Fisher) comme indiqué par le fournisseur avant d'être étudiés par séquençage de type Sanger.

- Validation au niveau des transcrits

Pour les deux protocoles : L'ARN total des différents clones obtenus a été extrait grâce au coffret "NucleoSpin RNA Plus" (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. 1 µg d'ARN total a ensuite été traité à la DNase I (ThermoFisher Scientific) avant que l'ARNm ne soit reverse transcrit à l'aide de la SuperscriptIII (Invitrogen) et d'Oligo(dT) selon les conditions préconisées par le fournisseur. A l'issue de la reverse transcription, une PCR a été effectuée à partir de l'ADNc généré, avec les amorces sens 5'- AAGGGATTGGATTGTTGTTG -3' et antisens 5'-AGCAAAACACCCAGCCATTT-3' s'hybridant sur la séquence *SLC40A1*, de part et d'autre de l'exon 6 portant le polymorphisme c.663T>C ; rs2304704 ; p.Val221Val. Les conditions de PCR (coffret « HotstarTaq Master Mix » ;

Qiagen) étaient les suivantes: une première étape d'activation à 95 °C-15 min suivie de 40 cycles d'amplification (94 °C - 30 s, 60 °C - 30 s, 72 °C – 2 min) et d'une étape d'élongation finale à 72 °C – 10 min. Les produits de PCR ont été purifiés de façon enzymatique en utilisant de « l'ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent » (Thermofisher scientific) avant d'être analysés par séquençage de type Sanger.

iii. Mise en place et validation de tests fonctionnels : analyse de la présence en membrane plasmique de la ferroportine endogène dans les cellules THP-1

1. Anticorps anti-ferroportine humaine

Au cours de l'année 2019, le Dr. François Canonne-Hergaux nous a mis à disposition deux anticorps anti-ferroportine humaine:

- l'anticorps HuFPN1, dont l'épitope reconnu comprend les acides aminés intracellulaires 224 à 303 de la ferroportine humaine
- l'anticorps HuFPN2, dont l'épitope reconnu comprend les acides aminés extracellulaires 395 à 450 du transporteur humain.

2. Echantillons protéiques

Pour tester ces anticorps en western blot, différents échantillons protéiques ont été déposés en gel :

- Des protéines totales issues de cellules HEK293, exprimant de façon stable et inducible la ferroportine de type sauvage (étiquetée V5 en C-terminal) en présence de tétracycline, ont notamment été utilisées comme contrôle positif. Ce modèle cellulaire avait été construit avant mon arrivée au laboratoire grâce au système « Flp-In T-Rex » (Thermo Fisher Scientific). Pour obtenir ces échantillons protéiques, 1.10^7 cellules ont étéensemencées en pétri de 10 cm de diamètre dans du milieu DMEM (Lonza) supplémenté par 10 % de SVF décomplémenté (Eurobio). 24 h plus tard, l'expression de la ferroportine a été induite ou non en ajoutant au milieu de culture, 1 µg/mL de tétracycline. Après 24 h d'incubation, les protéines totales ont été extraites à l'aide d'un tampon de lyse RIPA (Sigma) complémenté par un cocktail d'anti-protéases (Roche) avant d'être dosées, selon les recommandations du fournisseur, grâce au coffret «BC Assay» (Interchim).
- Des protéines totales ont été extraites de cellules THP-1 différenciées et/ou polarisées en macrophages de type M2, puis dosées comme décrit précédemment.
- Les protéines de membrane plasmique de cellules THP-1 différenciées et polarisées en macrophages de type M2 puis incubées 16 h en présence de 400 µM de Fer-NTA ont, quant à elles, été isolées grâce au coffret « Pierce™ Cell Surface Protein Isolation » (Thermo Scientific) comme présenté précédemment.

3. Western blot

Sur les recommandations du Dr. François Canonne-Hergaux, nous avons modifié quelques paramètres par rapport au protocole de western blot décrit précédemment (partie résultats III.a) pour réaliser ces premiers essais. Les protéines totales (20 µg) ou de membrane plasmique (20 µL) ont été déposées en gel de polyacrylamide 10 % (Bio-Rad) après avoir été incubées pendant 30 minutes à température ambiante dans un tampon SDS-PAGE, DTT (50 mM). Après une étape de migration d'1 h à 150 V constant, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose « Amersham™ protari™ 0.45 µmNC » (GE Healthcare) par transfert semi-sec à 25 V pendant 30 min. La membrane a ensuite été colorée au rouge Ponceau, photographiée puis décolorée dans du TBS Tween 0,15 % avant d'être saturée pendant 3 h dans du TBS Tween 0,15 %, lait 7 %. La membrane a ensuite été incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps HuFPN1 (dilué au 1/2500^e ou au 1/1000^e), HuFPN2 (dilué au 1/500^e) et/ou anti-V5 (R960-25 ; dilué au 1/5000^e ; Thermo Fisher Scientific) dans du TBS Tween 0,15 %, lait 7 %. Après plusieurs lavages en TBS Tween 0,15 %, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin (dilué au 1/2000^e ; Dako, pour les membranes incubées avec HuFPN1 et HuFPN2) ou anti-souris conjugué HRP (dilué au 1/1000^e ; Dako, pour la membrane incubée avec l'anticorps anti-V5) dans du TBS Tween 0,15 %, lait 7 % pendant 1 h. Le signal chemiluminescent a par la suite été enregistré grâce au système GeneGnome (Syngene) après que les membranes, de nouveau lavées au TBS Tween 0,15 % aient été incubées avec du substrat « Lumina Forte » (Merck Millipore) pendant 2 min 30.

L'intensité des bandes révélées a été évaluée par densitométrie à l'aide du logiciel « GeneTools software » (Syngene). La membrane colorée au rouge Ponceau a été photographiée puis la densitométrie a été réalisée sur les profils de migration de chaque piste grâce au logiciel « ImageJ » (Wayne Rasband, NIH).

c- Résultats

i. Mise au point d'un protocole de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 en macrophages de type M2

Les macrophages sont capables d'une grande plasticité phénotypique. En fonction des stimuli environnementaux reçus, ces cellules spécialisées vont se différencier et se polariser afin d'adapter leur réponse. Parmi les différents états phénotypiques que peuvent adopter ces cellules, deux états de polarisation, M1 et M2, ont été particulièrement décrits. Les macrophages de type M1 sont plutôt impliqués dans l'inflammation et la défense contre les agents pathogènes. Les macrophages de type M2 présentent, quant à eux, des propriétés d'immunorégulation et de réparation tissulaire (Genin *et al*, 2015).

Il a été observé que la ferroportine était plus exprimée dans des macrophages de type M2 que dans des macrophages de type M1 (murins et humains) (Corna *et al*, 2010; Recalcati *et al*, 2010). Cela serait également le cas de l'hème oxygénase-1 et des récepteurs CD163 et TfR1, permettant respectivement l'assimilation de l'hémoglobine et du fer lié à la transferrine. En revanche, la ferritine (ferritine H en particulier) apparaît plus fortement exprimée dans les macrophages de type M1 (Corna *et al*, 2010; Recalcati *et al*, 2010). Ainsi, ces derniers présentent un profil d'expression génique favorisant plutôt la rétention intracellulaire de fer. Les macrophages de type M2, quant à eux, montrent plutôt une aptitude à incorporer et à relarguer d'importantes quantités de fer (Corna *et al*, 2010; Recalcati *et al*,

2010). Il est important de souligner ici que cette aptitude est retrouvée *in vivo* chez les macrophages responsables du catabolisme des globules rouges sénescents (Corna *et al*, 2010).

Au vu de ces observations, nous avons souhaité différencier et polariser nos cellules monocytaires THP-1 en macrophages de type M2. Dans cette première phase de mise au point et de validation d'un protocole de différenciation et de polarisation, nous avons choisi, sur la base d'une revue de la littérature, de suivre l'expression de plusieurs marqueurs décrits comme étant particulièrement exprimés dans les macrophages de type M2 : la chimiokine CCL18, le récepteur du complexe hémoglobine/haptoglobine CD163 et le récepteur du mannose CD206 (Genin *et al*, 2015; Zarif *et al*, 2016; Ayaub *et al*, 2019).

Suite à un échange avec l'équipe du Dr. Kjetil Ask de l'Université McMaster à Hamilton, au Canada, nous avons testé deux protocoles qui diffèrent dans le nombre de cytokines utilisé au moment de la polarisation (Ayaub *et al*, 2019). Après une étape de différenciation des cellules monocytaires THP-1 non adhérentes en macrophages naïfs non polarisés de type M0, par incubation en présence de PMA (« Phorbol 12-Myristate 13-Acetate »), les cellules devenues adhérentes ont été polarisées en macrophages de type M2 en présence de deux (IL4/13) ou trois (IL4/13/6) interleukines. L'expression des différents marqueurs de macrophages de type M2 (CCL18, CD163 et CD206) ainsi que celle de la ferroportine ont ensuite été évaluées par RTqPCR en prenant les macrophages de type M0 comme témoin (Figure 32).

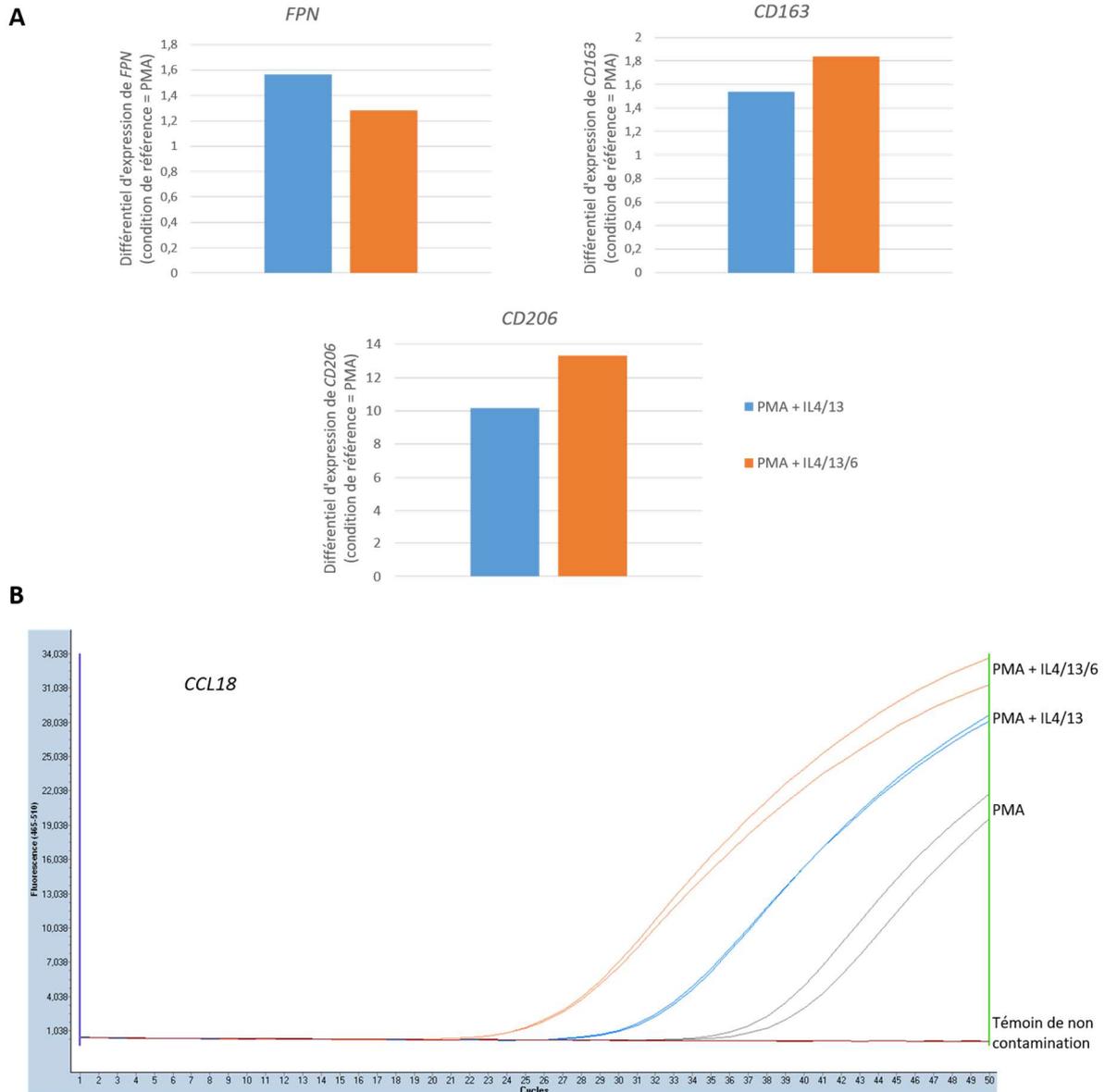


Figure 32 : Analyse par RTqPCR de l'expression des différents marqueurs M2 (*CCL18*, *CD163* et *CD206*) et de la ferroportine (*FPN*) à l'issue des différents protocoles de polarisation des cellules THP-1 en macrophages de type M2.

(A) L'expression des différents marqueurs M2 (*CD163* et *CD206*) et de la ferroportine mesurée dans les cellules THP-1 différenciées et polarisées en macrophages de type M2 avec 2 (PMA + IL4/13) ou 3 interleukines (PMA + IL4/13/6) a été normalisée sur l'expression du transcrite *18S* et comparée à celle mesurée dans les cellules THP-1 uniquement différenciées en macrophages de type M0 (PMA) selon la formule suivante : $E_{cible}^{\Delta Ct_{cible}(\text{contrôle-échantillon})} / E_{18S}^{\Delta Ct_{18S}(\text{contrôle-échantillon})}$ (Pfaffl, 2001); l'efficacité de chaque PCR (*E*) étant estimée à 2, soit un doublement du nombre d'amplicons à chaque cycle. (B) L'expression de *CCL18* dans les cellules uniquement différenciées en macrophages de type M0 (PMA) étant très faible et de ce fait mal détectée (*Ct* > 35 cycles), l'expression différentielle de *CCL18* par rapport à cette condition de référence n'a pas été calculée comme celle des autres marqueurs M2 et de la ferroportine. Seules les courbes d'amplifications de qPCR sont présentées pour ce marqueur.

Nous pouvons remarquer que les cellules THP-1, polarisées en présence des interleukines 4 et 13 ou 4, 13 et 6, expriment plus fortement les différents marqueurs M2 que les cellules THP-1 uniquement différenciées en macrophages de type M0. Cette élévation est particulièrement prononcée pour les marqueurs *CD206* (avec un différentiel d'expression > 10) et *CCL18* (avec *Ct* qui passent de > 35 cycles

à <30 cycles). De manière intéressante, les 3 marqueurs semblent plus exprimés lorsque les 3 interleukines 4, 13 et 6 ont été utilisées.

La polarisation en macrophages de type M2 augmente également l'expression de la ferroportine (avec un différentiel d'expression supérieur à 1,2). Contrairement aux marqueurs de type M2, la tendance serait en faveur d'une polarisation en présence de 2 interleukines. Ces résultats nécessiteraient d'être confirmés.

En nous basant sur la plus forte augmentation de l'expression des marqueurs du phénotype M2 dans le cas d'une polarisation à trois interleukines 4, 13 et 6, nous avons fait le choix de ce protocole pour la suite de nos expériences.

ii. Création de cellules THP-1 éditées au locus *SLC40A1*

Afin de mettre en place des tests fonctionnels sur le modèle cellulaire THP-1, nous avons entrepris de créer des clones THP-1 modifiés au locus *SLC40A1* à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9.

1. Invalidation d'un des deux allèles du gène *SLC40A1*

Pour engendrer un effet fonctionnel fort et sans ambiguïté, un premier type de modification a été envisagé : la création d'un décalage du cadre de lecture inactivant totalement un des deux allèles du gène.

Classiquement, la seule introduction du complexe Cas9/ARN guide dans la cellule suffit à obtenir ce type d'édition génique. En effet, pour réparer la cassure double brin de l'ADN générée par la nucléase, la cellule va principalement mobiliser un mécanisme de réparation par recombinaison non homologue ou « NHEJ » (« Non-Homologous-End-Joining ») qui, en entraînant des insertions/délétions aléatoires, se révèle particulièrement utile pour inactiver un gène (Tsai & Joung, 2016).

Pour faciliter la sélection clonale, nous avons décidé, en nous appuyant sur la stratégie publiée en 2016 par Zhou et collaborateurs, de générer un décalage du cadre de lecture en introduisant un gène de résistance à un antibiotique dans un des deux allèles du gène *SLC40A1* (Zhou *et al*, 2016). Après avoir évalué la sensibilité des cellules THP-1 à la zéocine, nous avons choisi de travailler avec un gène de résistance à cette drogue.

Pour introduire la cassette d'expression de la zéocine au locus *SLC40A1*, nous avons électroporé les cellules THP-1 avec le complexe Cas9/ARN guide et un ADN donneur linéaire double brins. Nous avons fait le choix d'apporter la Cas9 et l'ARN guide sous forme de ribonucléoprotéine plutôt que par plasmides. En effet, cette méthode permet de réduire le risque de coupures aspécifiques en limitant le temps de présence et le niveau d'expression de la Cas9 dans les cellules (Tsai & Joung, 2016). L'ADN donneur, quant à lui, comportait le gène de sélection mais aussi la séquence *SLC40A1* ciblée par l'ARN guide. Ainsi, selon la stratégie élaborée par Zhou et collaborateurs, la Cas9, en coupant à la fois l'ADN génomique et l'ADN donneur, favoriserait, selon un mécanisme de réparation indépendant de la recombinaison homologue, l'insertion de l'ADN donneur au niveau de la coupure double brin du gène *SLC40A1* (Figure 33) (Zhou *et al*, 2016). Nous avons décidé de rompre le cadre de lecture dès l'exon 1, un codon après l'ATG du gène *SLC40A1*.

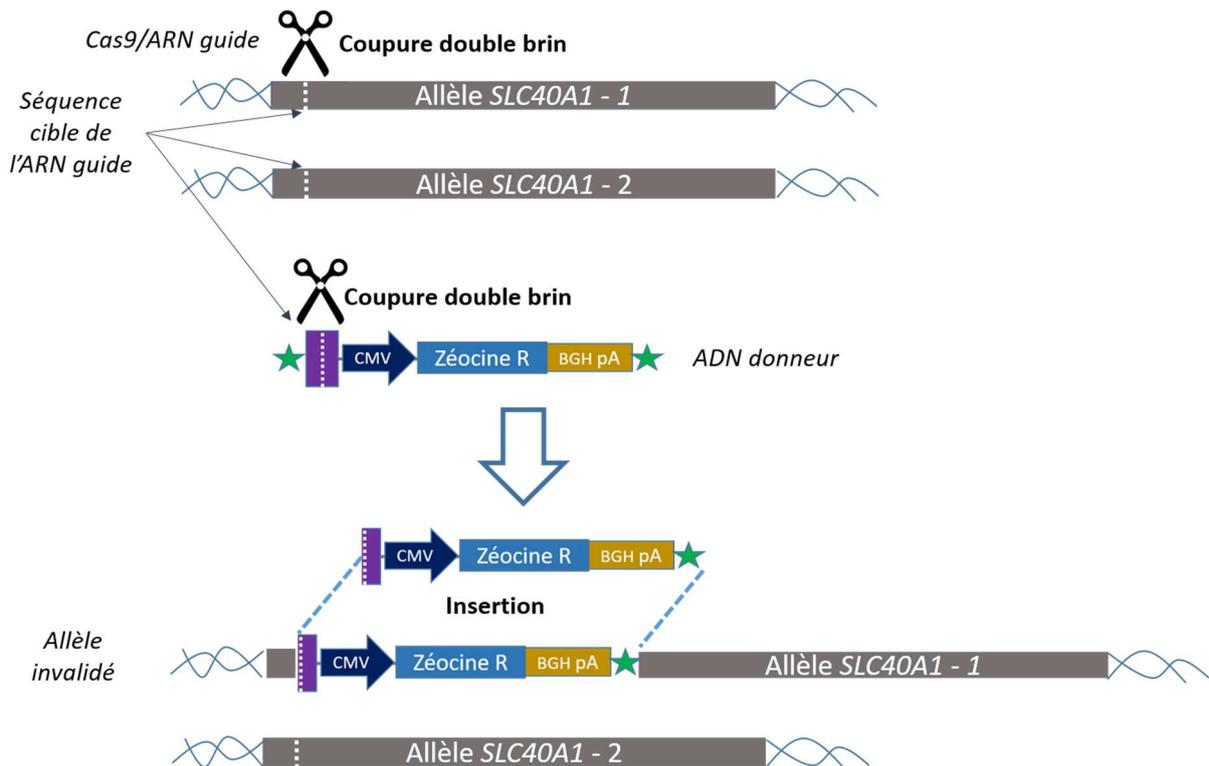


Figure 33 : Stratégie CRISPR-Cas9 utilisée pour construire un clone THP-1 avec un des deux allèles du gène *SLC40A1* invalidé.

L'ARN guide (ARNg) complexé à la Cas9 vient s'hybrider sur la séquence cible du gène *SLC40A1*, portée également par l'ADN donneur. La Cas9 génère alors une coupure double brin du gène *SLC40A1* mais aussi de l'ADN donneur, porteur d'un gène de résistance à la zéocine. Cette coupure favorise l'insertion de l'ADN donneur au niveau du site de coupure du gène *SLC40A1*. Cette insertion provoquera la transcription d'un ARNm aberrant et l'apparition d'un codon stop prématuré, l'allèle sera alors « invalidé ».

- Sélection et validation des clones au niveau de l'ADN génomique

Sur les conseils des Dr. Eric Lippert, de l'UMR 1078 (à Brest), et Valérie Prouzet-Mauléon, de l'unité Inserm U1218 à Bordeaux, un milieu semi-solide (Méthylcellulose) supplémenté en zéocine, contraignant les cellules non adhérentes à croître en amas, a été utilisé pour faciliter l'isolement et la sélection des cellules électroporées. Le séquençage Sanger du gène *SLC40A1* des 9 clones résistants obtenus, a confirmé l'édition génique « attendue » pour un des clones, le clone 3. Une insertion de 816 pb, correspondant à l'ADN donneur, a été identifiée dans l'un des deux allèles du gène *SLC40A1*, à proximité du codon d'initiation de la traduction ATG. Le deuxième allèle, quant à lui, ne présentait aucune modification (Figure 34).

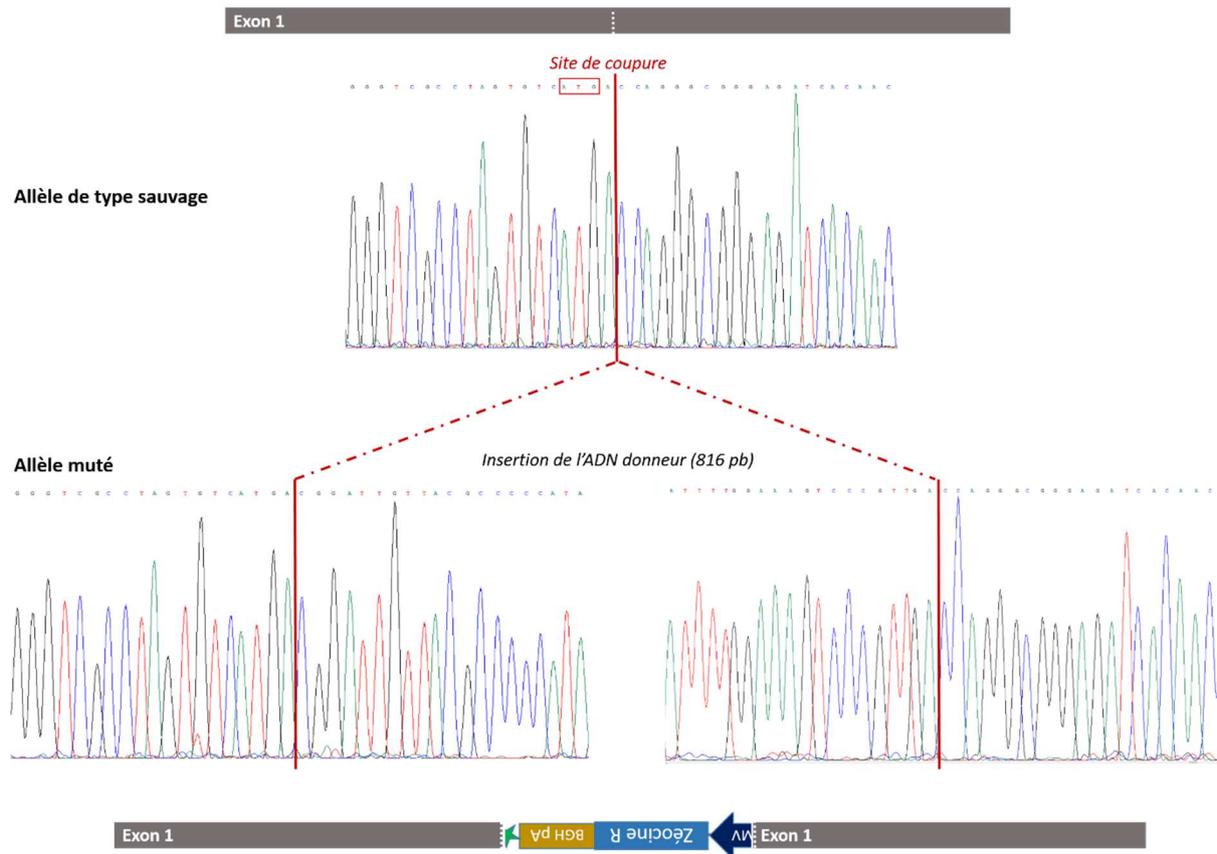


Figure 34 : Caractérisation par séquençage de type Sanger du clone 3.

Le clone 3 possède un allèle de type sauvage et un allèle modifié par l'insertion de l'ADN donneur, au locus *SLC40A1*. L'insertion a eu lieu au niveau du site de coupure de la Cas9, localisé dans le codon après l'ATG (encadré en rouge).

- Validation au niveau des transcrits

Le polymorphisme c.663T>C (rs2304704 ; p.Val221Val), à l'état hétérozygote au locus *SLC40A1* des cellules THP-1 natives, nous a permis d'évaluer l'expression des deux allèles du gène *SLC40A1* dans le clone 3, par séquençage de l'ARNm reverse transcrit. Contrairement aux cellules natives, l'hétérozygotie c.663T>C n'a pas été retrouvée par séquençage pour le clone 3. En révélant l'absence d'expression de l'allèle c.663T, ces résultats confirment l'inactivation d'un des deux allèles du gène *SLC40A1* dans ce clone (Figure 35).

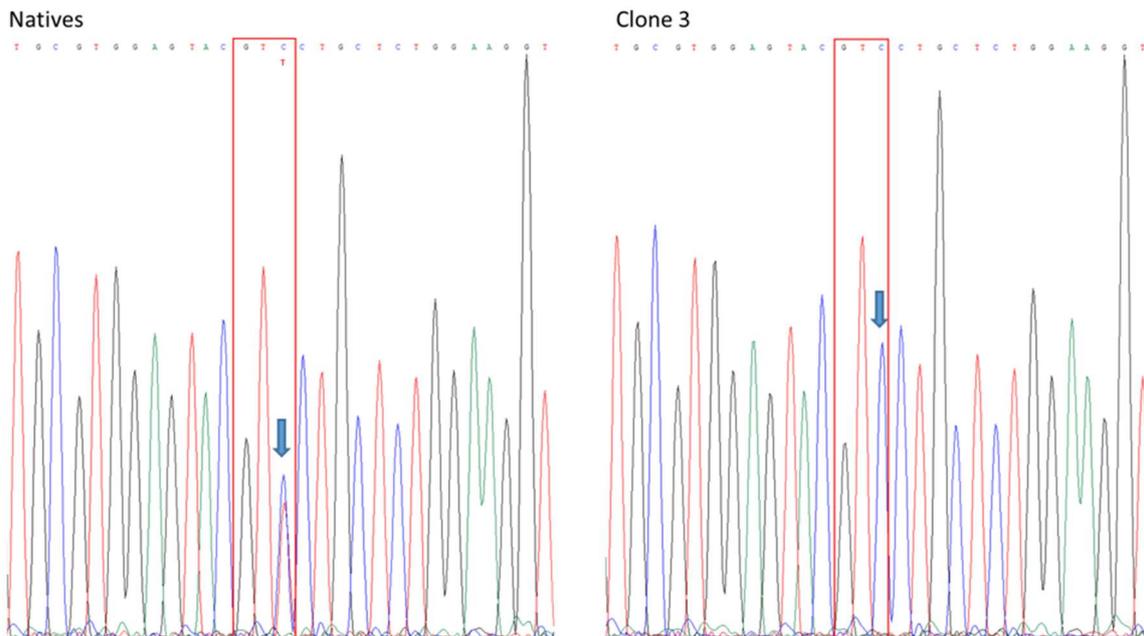


Figure 35 : Séquençage Sanger des ARNm *SLC40A1* reverse transcrits des cellules THP-1 natives et du clone 3. Les ARN totaux ont été extraits des cellules THP-1 natives et de notre clone 3 sélectionné par Zéocine. L'ADNc obtenu à partir des ARNm reverse transcrits a été amplifié par PCR. L'expression des deux allèles du gène *SLC40A1* a ensuite été déterminée par séquençage de type Sanger grâce à la présence du polymorphisme c.663T>C à l'état hétérozygote dans les cellules THP-1 natives.

2. Introduction de mutations faux-sens à l'état hétérozygote au locus *SLC40A1*

Pour nous placer dans le contexte de l'hémochromatose de type 4A (ou maladie de la ferroportine) et travailler sur des effets fonctionnels plus « partiels », nous avons par la suite envisagé d'introduire, à l'état hétérozygote au locus *SLC40A1*, deux mutations faux-sens clairement associées à l'hémochromatose de type 4:

- la mutation c.238G>A (p.Gly80Ser) qui affecte la présence en membrane plasmique de la ferroportine (Callebaut *et al*, 2014)

- la mutation c.521A>T (p.Asn174Ile) qui engendre un défaut d'export de fer du transporteur sans pénaliser son expression en surface cellulaire (Le Gac *et al*, 2013).

Il s'agit là d'un évènement d'édition génique plus difficile à obtenir. L'introduction de mutations précises par la technologie CRISPR-Cas9 dépend, en effet, d'un mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, ou « HDR » (« Homology-Directed-Repair »), qui est plus rarement mobilisé par la cellule que la voie « NHEJ » (Tsai & Joung, 2016; Liang *et al*, 2017).

Pour y parvenir, un ADN donneur, porteur de la substitution à insérer, doit être introduit dans les cellules avec le complexe Cas9/ARN guide. Afin d'optimiser nos chances d'obtenir des clones positifs, nous avons tenu compte des recommandations formulées par Liang et collaborateurs en 2017, à savoir (Liang *et al*, 2017) :

- Produire un ADN donneur simple brin possédant deux bras d'homologie asymétriques de part et d'autre du changement nucléotidique à introduire (30 bases d'homologie en 3', >40 bases en 5')

-Protéger les extrémités de l'ADN donneur des dégradations nucléiques par des modifications phosphorothioates.

L'établissement des clones « p.Gly80Ser » a été confié au Dr. Carine Lefevre de l'unité Inserm U1016 à Paris. De mon côté, je me suis attelée à la construction des clones « p.Asn174Ile ».

Le séquençage du gène *SLC40A1* de 50 clones isolés par méthylcellulose, a révélé qu'aucun d'entre eux ne portaient la substitution p.Asn174Ile attendue. En revanche, nous avons pu observer que deux de ces clones, les clones 28 et 39, présentaient des événements de délétions de 63 et 37 pb, respectivement, sur un des deux allèles du gène *SLC40A1* ; délétions qui éliminent le site accepteur d'épissage en 3' de l'intron 5 (Tableau V).

La caractérisation par séquençage des transcrits *SLC40A1*, a révélé que des sites cryptiques, localisés 31 et 47 nucléotides après le début de l'exon 6, respectivement pour les clones 28 et 39, étaient utilisés lors de la maturation des ARN pré-messagers. Ces événements d'épissage alternatif pourraient conduire à la traduction de ferroportines mutées présentant un codon stop prématuré (clone 28) ou une délétion de 15 acides aminés (clone 39) (Tableau V).

Tableau V : Mutations observées dans les clones 28 et 39 à l'état hétérozygote au locus *SLC40A1*.

Clones	Mutations nucléotidiques c. (NM_014585.5)	Mutations protéiques p.
28	c.515-34_543del	p.Asn172Ilefs*58
39	c.515-6_545del	p.Asn172_Ala188delinsThr

Comme nous pouvions nous y attendre, ces deux délétions résultent d'une réparation par recombinaison non homologue « NHEJ » de la cassure double brin générée par le complexe Cas9/ARN guide. Par manque de temps, la poursuite de l'isolement clonal des cellules électroporées restantes, pour obtenir des clones p.Asn174Ile, a été suspendue.

De son côté, le Dr. Carine Lefevre a utilisé une stratégie qui présentait quelques différences avec celle que nous avons employée pour établir des clones « p.Gly80Ser »:

- la Cas9 et l'ARN guide n'ont pas été apportés sous forme de ribonucléoprotéine mais par un plasmide
- la Cas9, en fusion avec la protéine GFP, a permis d'isoler les cellules transfectées des non transfectées
- l'ADN donneur simple brin utilisé possédait des bras d'homologie symétriques.

Plusieurs ampoules de cellules GFP+ nous ont été adressées. Une PCR digitale, réalisée avec une sonde fluorescente spécifique de la mutation c.238G>A (p.Gly80Ser), a été mise au point au laboratoire de génétique du CHU de Brest. Elle a permis d'analyser les pools de cellules dans leur ensemble et a révélé la présence de la variation nucléotidique. Les clones positifs n'ont pas encore été isolés.

L'obtention relativement aisée des clones 28 et 39, présentant d'importantes délétions au locus *SLC40A1*, nous a amené à nous remettre en question sur la stratégie que nous avons adoptée précédemment pour invalider un allèle de ce gène d'intérêt. L'avantage conféré par l'introduction d'un gène de résistance à la zéocine, face au simple apport du complexe Cas9/ARN guide dans les cellules, nous est finalement paru assez négligeable au vu du temps conséquent que nous avons consacré à la mise en œuvre de ce protocole. A l'issue de ces travaux, mon point de vue est qu'il est plus simple et plus rapide d'invalider un allèle en apportant seulement le complexe Cas9/ARN guide dans les cellules.

iii. Mise en place et validation de tests fonctionnels

Sur le modèle cellulaire THP-1 et grâce à l'obtention de clones « témoins », nous voulions mettre en place différents tests fonctionnels dans le but d'évaluer la présence en membrane plasmique, la capacité d'export de fer et la sensibilité à l'hepcidine de la ferroportine endogène. Cette première étape devait faciliter l'application de ces méthodes sur des macrophages de donneurs sains et de patients atteints d'hémochromatose de type 4. Par manque de temps, seuls des résultats préliminaires concernant la présence en membrane plasmique du transporteur ont pu être obtenus.

La principale limite pour étudier la présence en surface cellulaire de la ferroportine endogène était le manque d'anticorps dans le commerce permettant une détection fiable et efficace du transporteur. Dans le courant de l'année 2019, nous avons débuté une collaboration avec le Dr. François Canonne-Hergaux qui nous a mis à disposition deux anticorps anti-ferroportine humaine qu'il avait développés et produits (HuFPN1 et HuFPN2 - Fiche migratech Inserm transfert MT0579). Ces anticorps avaient précédemment été validés à partir d'extraits membranaires issus de cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) surexprimant le transporteur humain.

Pour tester ces anticorps, un premier western blot a été réalisé à partir de protéines totales, issues de cellules HEK293 exprimant de façon stable et inducible la ferroportine humaine : Flp-in T-Rex FPN WT (Figure 36).

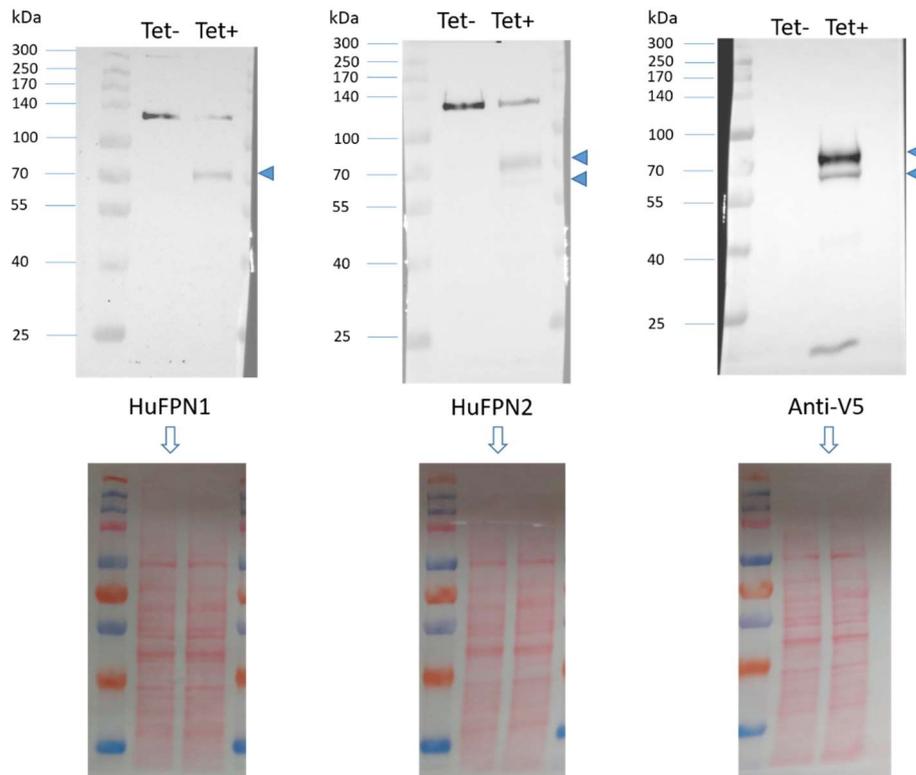


Figure 36 : Premier test en western blot des anticorps anti-ferroportine humaine, mis à disposition par le Dr. François Canonne-Hergaux (HuFPN1 et HuFPN2).

Western blot réalisé à partir de protéines totales (20 µg) extraites de cellules HEK293 exprimant de façon stable et inducible la ferroportine (taguée V5 en C-terminal), en présence de tétracycline (Tet+). Chaque échantillon protéique a été déposé en triplicat. Les membranes obtenues ont été incubées avec l'anticorps HuFPN1 (dilué au 1/2500^e), ou HuFPN2 (dilué au 1/500^e) ou anti-V5 (dilué au 1/5000^e) (Thermo Fisher Scientific). Les colorations au rouge Ponceau sont présentées en-dessous des membranes révélées correspondantes.

Dans ce modèle cellulaire, la ferroportine humaine, dont la masse moléculaire est estimée à environ 62,5 kDa (sans considération de modifications post-traductionnelles), est taguée V5 en C-terminal. L'anticorps anti-V5 permet de révéler une bande attendue, légèrement supérieure à 70 kDa, par western blot ; celle-ci est visible uniquement lorsque l'expression du transporteur a été induite par la tétracycline (système TET-ON). L'anticorps anti-V5 révèle également une bande moins intense à 60 kDa qui doit correspondre à la forme non mature du transporteur, la ferroportine étant probablement N-glycosylée (Canonne-Hergaux *et al*, 2006).

Sur les membranes incubées avec les anticorps HuFPN1 et HuFPN2, nous pouvons observer une bande à environ 130 kDa. Cette dernière apparaît que l'expression de la ferroportine ait été induite ou non en présence de tétracycline, il s'agit donc d'une bande aspécifique. De manière intéressante, ces deux anticorps révèlent également une bande légèrement supérieure à 70 kDa et ce, seulement lorsque les protéines ont été extraites de cellules traitées à la tétracycline. Pour cette même condition, seul l'anticorps HuFPN2 révèle la bande à environ 60 kDa. Bien que les signaux détectés soient plus faibles que ceux observés avec l'anticorps anti-V5, à ce stade de l'analyse, ces anticorps anti-ferroportine semblent être en mesure de détecter par western blot la protéine dans un modèle de surexpression. Il sera possible et nécessaire d'optimiser le ratio anticorps/protéines.

Suite à ces premiers résultats encourageants, nous avons voulu tester la capacité de ces anticorps à révéler la ferroportine exprimée de manière endogène par les cellules THP-1. Pour cela, nous avons utilisé différents types d'échantillons protéiques (Figure 37).

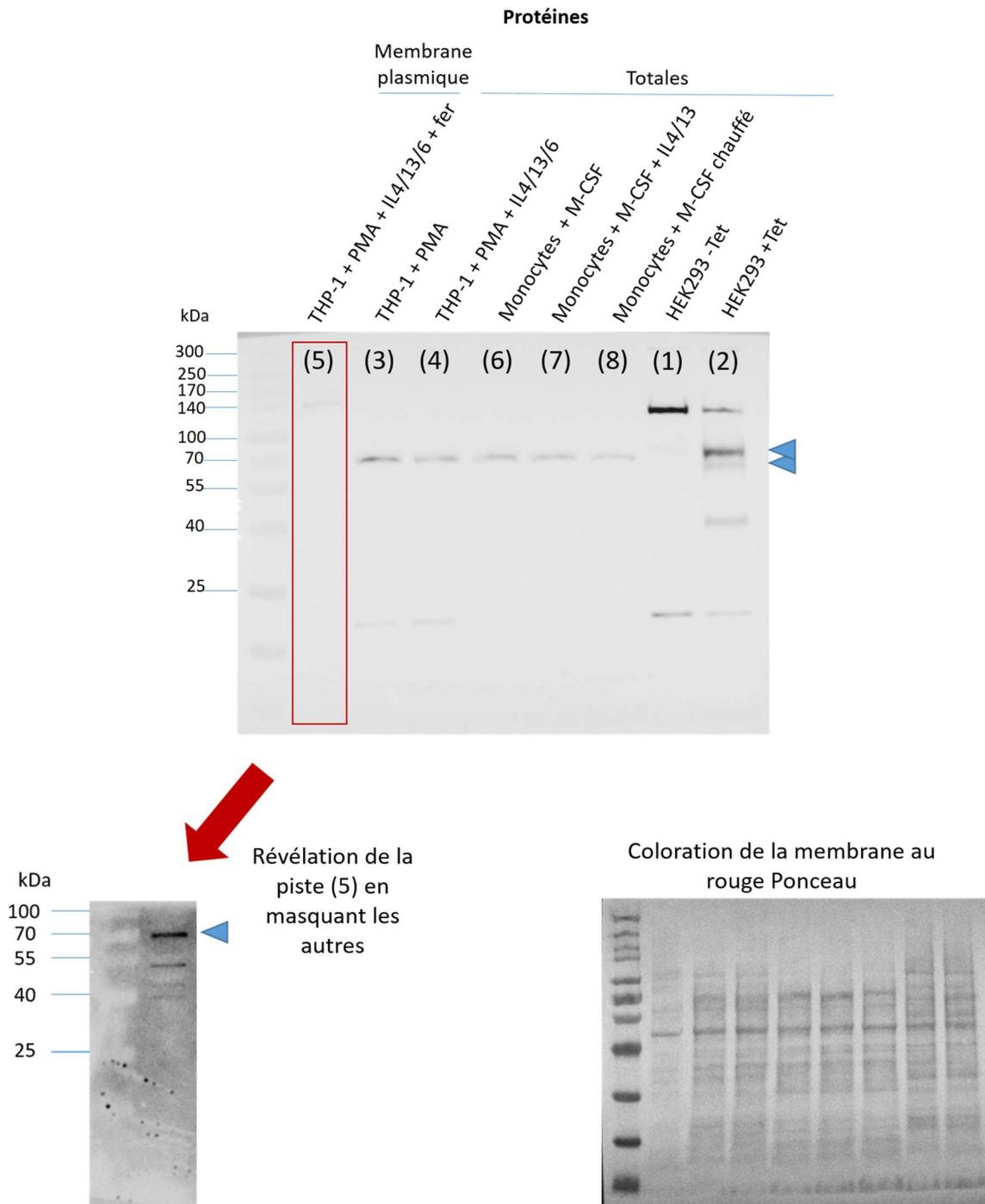


Figure 37 : Evaluation de la capacité de l'anticorps HuFPN1 à révéler la ferroportine endogène exprimée par les cellules THP-1.

Western blot réalisé à partir de protéines de la membrane plasmique (20 µL) ou de protéines totales (20 µg) extraites de cellules THP-1 ou de monocytes primaires différenciés en macrophages de type M0 (PMA ou M-CSF) et/ou polarisés (IL) en macrophages de type M2. Les pistes témoins (échantillon chauffé ou HEK293 incubées ou non en présence de tétracycline) se trouvent à droite de la membrane. Le signal de la piste (5) étant plus faible, nous l'avons de nouveau révélé en masquant les autres pistes de la membrane (membrane du dessous). La membrane a été incubée avec l'anticorps HuFPN1 (dilué au 1/1000^e). La coloration de la membrane révélée, au rouge Ponceau, est également présentée en bas à droite.

NB : Seule la membrane incubée avec l'anticorps HuFPN1 est présentée, des résultats similaires ont été obtenus avec l'anticorps HuFPN2.

Des protéines totales issues de cellules Flp-in T-Rex FPN WT incubées (HEK293 +Tet) ou non (HEK293 - Tet) en présence de tétracycline ont été déposées dans les pistes (1) et (2) comme témoins positif et négatif. De manière similaire à ce qui a été précédemment observé, l'anticorps HuFPN1, utilisé ici au 1/1000^{ème}, révèle une bande aux alentours de 70 kDa et ce, uniquement lorsque les protéines ont été extraites de cellules traitées à la tétracycline (piste (2)). Une seconde bande à environ 60 kDa, qui n'avait pas été révélée précédemment par cet anticorps utilisé à une dilution plus faible (1/2500^{ème}), est également observée pour cette même condition.

Des protéines totales, issues de cellules THP-1 différenciées en macrophages de type M0 (THP-1 + PMA) ou différenciées et polarisées en macrophages de type M2 (THP-1 + PMA + IL4/13/6), ont été déposées dans les pistes (3) et (4). Une bande fine et d'une intensité faible, à 70 kDa environ, est observée pour ces deux échantillons. Aucune bande à 60 kDa n'est ici détectée. De manière surprenante, la bande à 70 kDa présente une intensité plus forte (+40 %) dans la piste (3) que dans la piste (4) (estimation du rapport entre le signal « ECL » et la densité du profil de migration de la piste totale de la membrane colorée au rouge Ponceau). Sur la seule foi de ce premier western blot, la ferroportine serait plus exprimée dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages naïfs de type M0. Cette observation est en contradiction avec nos résultats de RTqPCR présentés figure 32 et les travaux menés par Recalcati et collaborateurs, qui avaient montré que la ferroportine était plus exprimée dans des macrophages de type M2 que dans des macrophages de type M0 (Recalcati *et al*, 2010). Il sera impératif de répéter cette expérience pour confirmer ou infirmer ce résultat.

Des protéines de la membrane plasmique, isolées de cellules THP-1 différenciées et polarisées en macrophages de type M2, ont été déposées dans la piste (5). Il faut noter que ces cellules ont été incubées pendant 16 h en présence de 400 µM de Fer-NTA (THP-1 + PMA + IL4/13/6 + fer) afin de favoriser la présence de la ferroportine en surface cellulaire (Delaby *et al*, 2005a). De manière intéressante, une fine bande, similaire à celle observée précédemment dans les échantillons de protéines totales issues de cellules THP-1, est détectée à 70 kDa environ.

L'opportunité de tester d'autres types d'échantillons s'est présentée avec le travail de Kévin Uguen, également doctorant dans l'équipe. Une partie de son projet de thèse consistait à mettre en place un protocole afin de pouvoir travailler sur un modèle de cellules primaires : isolation des PBMC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») à partir de résidus d'aphérèse, purification des monocytes et différenciation et polarisation de ces cellules en macrophages de type M2. Des extraits de protéines totales, issues de monocytes circulants de donneurs sains différenciés en macrophages de type M0 (monocytes + M-CSF) et polarisés (monocytes + M-CSF + IL4/13) en macrophages de type M2, ont été déposés dans les pistes (6) et (7). Ici, une bande unique est révélée à 70 kDa dans les deux pistes dont l'intensité apparaît légèrement plus forte dans la piste (6) (+27 %) que dans la piste (7). Contrairement à ce que nous attendions, la ferroportine, semble de nouveau, plus exprimée dans les macrophages de type M0 que dans les macrophages de type M2. Cette expérience devra être répétée.

Pour aller plus loin dans la validation de ces anticorps, et notamment s'assurer de leur spécificité, il est possible d'utiliser de l'hepcidine, des siRNA anti-ferroportine ou faire bouillir les échantillons protéiques ; la chaleur pouvant provoquer l'aggrégation des protéines membranaires (Mahler *et al*, 2009). Pour cela, un échantillon de protéines totales, chauffées à 95 °C pendant 5 minutes (monocytes + M-CSF chauffé), a été déposé en piste (8).

La non disparition du signal observée ici pose la question de la spécificité de la bande systématiquement révélée à 70 kDa. Il ne faut cependant pas exclure le fait qu'il s'agisse de la

ferroportine. En effet, Tsuji et collaborateurs ont très récemment observé, dans leur étude, que le signal « ferroportine » disparaissait uniquement lorsque les protéines chauffées provenaient de cellules transfectées et non de cellules natives avec une expression endogène de la ferroportine (Tsuji, 2020).

A ce stade de notre analyse, nous avons réussi à révéler par western blot une bande à 70 kDa dans différents modèles cellulaires. Néanmoins, nous avons détecté des variations du niveau d'expression que nous n'attendions pas (bande plus intense dans les macrophages de type M0 que dans les macrophages de type M2). Pour vérifier la spécificité de ces anticorps, il serait nécessaire d'utiliser de l'hepcidine et/ou des siRNA anti-ferroportine. Si nous validons ces anticorps anti-ferroportine humaine, nous pourrions évaluer le niveau d'expression du transporteur dans nos cellules THP-1 modifiées par la technologie CRISPR-Cas9. Ces clones « témoins » nous serviraient notamment à optimiser les conditions expérimentales visant à évaluer la présence en membrane plasmique de la ferroportine. Le signal faible obtenu avec ces deux anticorps pourrait être amélioré, d'une part, en titrant les anticorps. D'autre part, les échantillons protéiques pourraient être concentrés en développant un nouveau protocole d'extraction de protéines de membrane plasmique par ultracentrifugation (protocole mis à disposition par le Dr. François Canonne-Hergaux), que nous transposerions, une fois validé, aux macrophages de donneurs sains et de patients.

Discussion

I- Etude structure/fonction du mécanisme d'export du fer et de la résistance partielle à l'hepcidine de la ferroportine

a- Mécanisme d'export du fer de la ferroportine

La publication des structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine (Billesbølle *et al*, 2020) nous a permis de valider les modèles 3D du transporteur humain qui avaient été construits par le Dr. Isabelle Callebaut à partir des structures expérimentales de BbFpn (Taniguchi *et al*, 2015). La structure des lobes N et C-terminaux des modèles est en effet hautement similaire aux nouvelles structures expérimentales, avec une superposition parfaite des acides aminés équivalents. En particulier, les acides aminés impliqués dans les réseaux de liaisons sont également bien observés dans les structures expérimentales. Cela conforte les observations que nous avons faites, durant mon travail de thèse, sur l'organisation et la dynamique de la « gate » intracellulaire de la ferroportine humaine. Associé à des tests fonctionnels et des simulations de dynamique moléculaire (sur 100 ns), le modèle de la ferroportine humaine, en conformation « outward-facing », nous a d'abord permis de dépasser les propositions formulées par Taniguchi et collaborateurs, sur la base de la structure expérimentale de l'homologue bactérien (Taniguchi *et al*, 2015), en identifiant des résidus critiques, spécifiques de la protéine humaine (Guellec *et al.*, 2019). Des simulations de dynamique moléculaire plus longues (1 μ s) nous ont ensuite permis de révéler des changements d'interactions avec une diminution des liaisons inter-lobes au profit de liaisons intra-lobes. Ces changements, qui conduisent progressivement à un déverrouillage de la « gate » intracellulaire, pourraient être à la base du basculement vers la conformation « inward-facing » (Le Tertre *et al.*, 2020 en cours de rédaction).

Ces différentes observations ont permis un retour vers la clinique puisque nous avons pu établir que 8 des « gating-residues » ainsi identifiés, étaient associés à 14 mutations décrites chez des patients atteints d'hémochromatose de type 4A (ou maladie de la ferroportine). Le travail réalisé sur les « gating-residues » et la distinction entre variants « perte de fonction », du fait d'une diminution de la ferroportine en membrane plasmique ou d'un défaut spécifique d'export du fer, est à la base de la description, par nos équipes, d'un nouveau mécanisme physiopathologique.

Nous nous sommes également intéressés au rôle de l'acide aspartique 325, qui avait été rapporté dans la littérature comme étant impliqué dans la coordination du fer au niveau du lobe C-terminal de la ferroportine (Deshpande *et al*, 2018; Billesbølle *et al*, 2020). Notre évaluation *in vitro* des mutants p.Asp325Ala, p.Asp325His et p.Asp325Asn, nous a conduit à observer des résultats différents de ceux présentés et commentés par les équipes italienne et américaine (Bonaccorsi di Patti *et al*, 2014; Deshpande *et al*, 2018). Associés à l'étude des structures 3D expérimentales de la ferroportine humaine, publiées par Billesbølle et collaborateurs (Billesbølle *et al*, 2020), ces résultats nous ont permis d'avancer de nouvelles hypothèses quant à l'importance structurale et fonctionnelle de ce résidu. En absence de métal, cet acide aminé serait critique pour la stabilité de la région déroulée, séparant le TM7a du TM7b, en établissant une liaison hydrogène avec le groupement -SH de la cystéine 326. En présence de fer, l'acide aspartique ne formerait plus de liaison hydrogène avec la cystéine 326 mais avec une molécule d'eau qui elle-même interagit avec le substrat. Son interaction avec le fer serait donc indirecte.

Il est important de souligner que ces observations reposent sur l'exploitation de la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, déterminée par Billesbølle et collaborateurs en présence d'hepcidine et de cobalt (Billesbølle *et al*, 2020). Nous pouvons y voir deux limites principales :

- La première est que cette structure n'a pas été déterminée en présence de fer mais de cobalt, un des autres substrats décrits dans la littérature avec le zinc, le manganèse et le nickel, comme étant également transporté par la ferroportine mais dans une moindre mesure que le fer (Madejczyk & Ballatori, 2012; Mitchell *et al*, 2014; Li *et al*, 2020). Or, bien que tous soient des cations divalents, ces différents métaux sont probablement coordonnés de manière différente par le transporteur.
- La seconde est que la coordination de l'ion métallique apparaît, sur cette structure expérimentale, comme étant principalement assurée par l'hepcidine *via* son carboxylate en C-terminal. Nous pouvons donc nous demander comment ce site est préservé en l'absence du peptide régulateur.

Pour avoir de premières réponses à ces interrogations et ainsi mieux comprendre le défaut d'export du fer révélé *in vitro* pour le mutant p.Asp325Asn, des simulations de dynamique moléculaire vont être réalisées en présence de Fe²⁺, à partir de la structure 3D expérimentale de la ferroportine humaine, déterminée en absence d'hepcidine et de cobalt par Billesbølle et collaborateurs (Billesbølle *et al*, 2020).

Au-delà de la coordination du fer par le transporteur qui mérite d'être plus amplement explorée tout comme la « gate » extracellulaire stabilisant la ferroportine en conformation « inward-facing », qui a été très peu étudiée, un point central reste encore irrésolu. Il s'agit des mécanismes moléculaires qui régissent les basculements conformationnels de la ferroportine lors de son cycle de transport du fer.

Ces derniers mois, plusieurs articles, rapportant différentes hypothèses autour du mécanisme d'export du fer par la ferroportine, ont été publiés. Ces derniers sont venus nourrir la réflexion autour de cette question primordiale.

Un fait important est que Tortosa et collaborateurs, suite à des simulations de dynamique moléculaire menées à partir des structures expérimentales de BbFpn, ont confirmé, en septembre 2020, que la conformation de base du transporteur était la conformation « outward-facing » (Tortosa *et al*, 2020). Cette observation pose alors la question du mécanisme qui permettrait à la ferroportine de basculer de cette conformation de base à la conformation « inward-facing », lui permettant de lier le fer intracellulaire (Figure 38). Deshpande et collaborateurs, qui avaient rapporté pour la première fois l'importance du calcium extracellulaire pour la fonction d'export du fer de la ferroportine, avaient proposé que celui-ci, en se fixant dans le site de liaison du lobe N-terminal, induisait ce changement conformationnel (Deshpande *et al*, 2018). De manière intéressante, Billesbølle et collaborateurs, en août 2020, puis Li et collaborateurs, en octobre 2020, ont conforté cette hypothèse en observant également que le calcium extracellulaire augmentait la capacité d'export du fer de la ferroportine (Billesbølle *et al*, 2020; Li *et al*, 2020). Ainsi, ces différents travaux rendent plausible l'hypothèse d'un changement conformationnel « outward- » vers « inward-facing » induit par la fixation du calcium. Il est toutefois important de noter que, pour l'instant, seuls Deshpande et collaborateurs ont observé une coordination du calcium dans le lobe N-terminal, par cristallisation de l'homologue bactérien en présence de CaCl₂ (Deshpande *et al*, 2018).

Une analyse de la littérature permet de dégager deux éléments qui pourraient jouer un rôle dans le basculement « outward- » vers « inward-facing » : le motif A et la bicouche lipidique. Le motif A est un élément très fort de l'identité des protéines MFS puisqu'il est observé chez une majorité des membres de cette grande famille avec comme motif consensus : [G-(X3)-(D/E)-(R/K)-X-G-[X]-(R/K)-(R/K)]. Ces acides aminés se répartissent entre les hélices transmembranaires 2 et 3 du lobe N-terminal (Griffith *et al*, 1992; Jessen-Marshall *et al*, 1995). Le rôle du motif A dans la stabilisation de la conformation « outward-facing » a été démontré chez plusieurs protéines MFS où il est impliqué dans différentes interactions intra- et inter-lobes (Jiang *et al*, 2013; Martens *et al*, 2018). En étudiant le transporteur MFS bactérien YajR, Jiang et collaborateurs ont suggéré que les résidus composant le motif A étaient également impliqués dans un relais de charges faisant suite à la fixation d'un proton. En se fixant sur un site indépendant de celui du substrat, le proton agirait comme un co-facteur qui provoquerait le déplacement d'électrons le long de ce motif et apporterait de cette façon, une partie de l'énergie nécessaire à un changement de conformation (Jiang *et al*, 2013). Une autre hypothèse a été formulée par Martens et collaborateurs qui ont étudié le transporteur MFS bactérien Xyle et observé que certains des résidus du motif A, mais pas seulement, pouvaient interagir directement avec la bicouche lipidique. Ces interactions auraient pour conséquence de rompre les liaisons non covalentes de la « gate » intracellulaire, facilitant alors le passage d'une conformation « outward-facing » à une conformation « inward-facing » (Martens *et al*, 2018). De manière intéressante, nous pouvons remarquer que le motif A de la ferroportine humaine, qui est composé notamment des résidus Asp81, Asp84, Lys85 et Arg88 intervenant dans la « gate » intracellulaire, est associé à 5 mutations qui ont été identifiées chez des patients atteints d'hémochromatose de type 4A (p.Gly80Ser, p.Gly80Val p.Asp84Glu, p.Arg88Thr et p.Arg88Gly) (Cremonesi *et al*, 2005; Callebaut *et al*, 2014; Guellec *et al*, 2019). L'importance fonctionnelle de ce motif chez la ferroportine, en dehors de sa participation à des liaisons non covalentes qui stabilisent la « gate » intracellulaire, reste encore à déterminer.

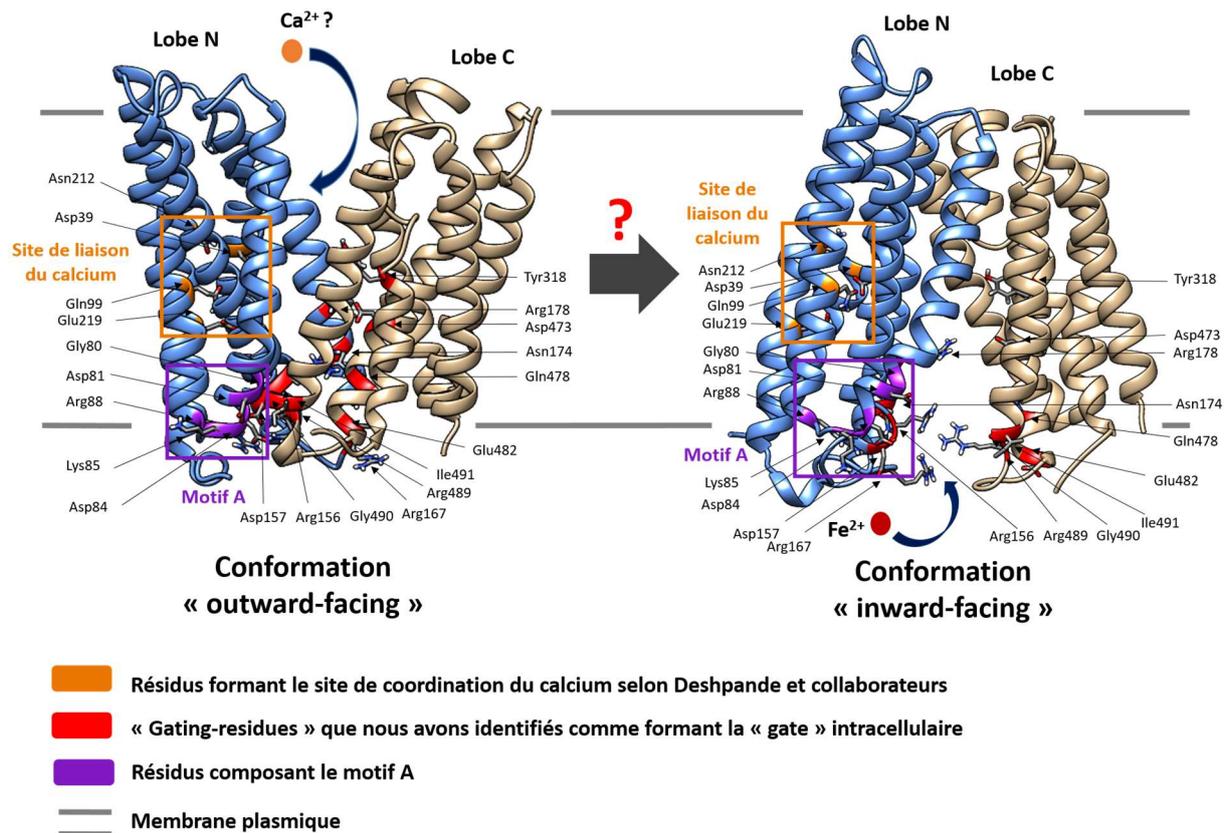


Figure 38 : Schéma repositionnant les différents éléments qui pourraient intervenir dans le basculement conformationnel « outward- » vers « inward-facing » de la ferroportine sur les modèles 3D du transporteur humain construits par le Dr. Isabelle Callebaut.

La fixation du calcium extracellulaire dans le lobe N-terminal du transporteur, le motif A, ainsi que la bicouche lipidique pourraient jouer un rôle dans cette transition conformationnelle.

NB : Les résidus Asp81, Asp84, Lys85 et Arg88 qui composent le motif A sont aussi des acides aminés que nous avons identifiés comme étant des « gating-residues » critiques pour la formation de la « gate » intracellulaire du transporteur humain.

A ce jour, 3 hypothèses différentes se dessinent pour expliquer le basculement conformationnel « inward- » vers « outward-facing » du transporteur (Figure 39).

- La première s'appuie sur les travaux de Tortosa et collaborateurs qui ont montré que la conformation « outward-facing » était plus favorable énergétiquement/plus stable que la conformation « inward-facing » en membrane (Tortosa *et al*, 2020). Nous pouvons ainsi imaginer que le fer « profiterait » seulement du basculement furtif de la ferroportine en conformation « inward-facing » pour se loger dans son site de liaison sans avoir de rôle « mécanistique » dans le rebasculement du transporteur en conformation « outward-facing ».
- La deuxième hypothèse est que le fer jouerait un rôle dans cette transition « inward- » vers « outward-facing ». En révélant la présence du cobalt dans les sites de liaison des lobes N et C-terminaux de la ferroportine humaine par cryomicroscopie électronique, Billesbølle et collaborateurs ont suggéré que les deux lobes du transporteur prenaient part à la prise en charge du métal (Billesbølle *et al*, 2020). Or, Tortosa et collaborateurs ont ensuite observé, par des expériences de simulations de dynamique moléculaire, que le fer venait se loger spontanément au niveau du lobe N-terminal de BbFpn en conformation « inward-facing ». Ces auteurs ont alors proposé que la fixation du fer dans le lobe N-terminal induisait le passage

d'une conformation « inward-facing » à une conformation de type « occluded », ce qui favoriserait l'entrée du fer dans le deuxième site de coordination du métal, localisé dans le lobe C-terminal du transporteur (Tortosa *et al*, 2020).

- La troisième hypothèse est que le fer, aidé d'un co-facteur, induirait la transition « inward- » vers « outward-facing ». Cette hypothèse repose sur les travaux de Li et collaborateurs qui viennent tout juste de rapporter, en travaillant à partir de protéoliposomes contenant la ferroportine humaine, que le transport du métal était couplé au transport de protons, suggérant ainsi que la ferroportine est un symporteur $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$ (Li *et al*, 2020). Sur la base du modèle de transport emprunté par le symporteur MFS LacY (sucre/ H^+), les auteurs ont proposé que la protonation de la ferroportine augmentait l'affinité du fer pour son site de liaison. La fixation du métal induirait alors un basculement conformationnel « inward- » vers « outward-facing » ce qui engendrerait la libération du substrat dans le compartiment sanguin ainsi que la déprotonation du transporteur.

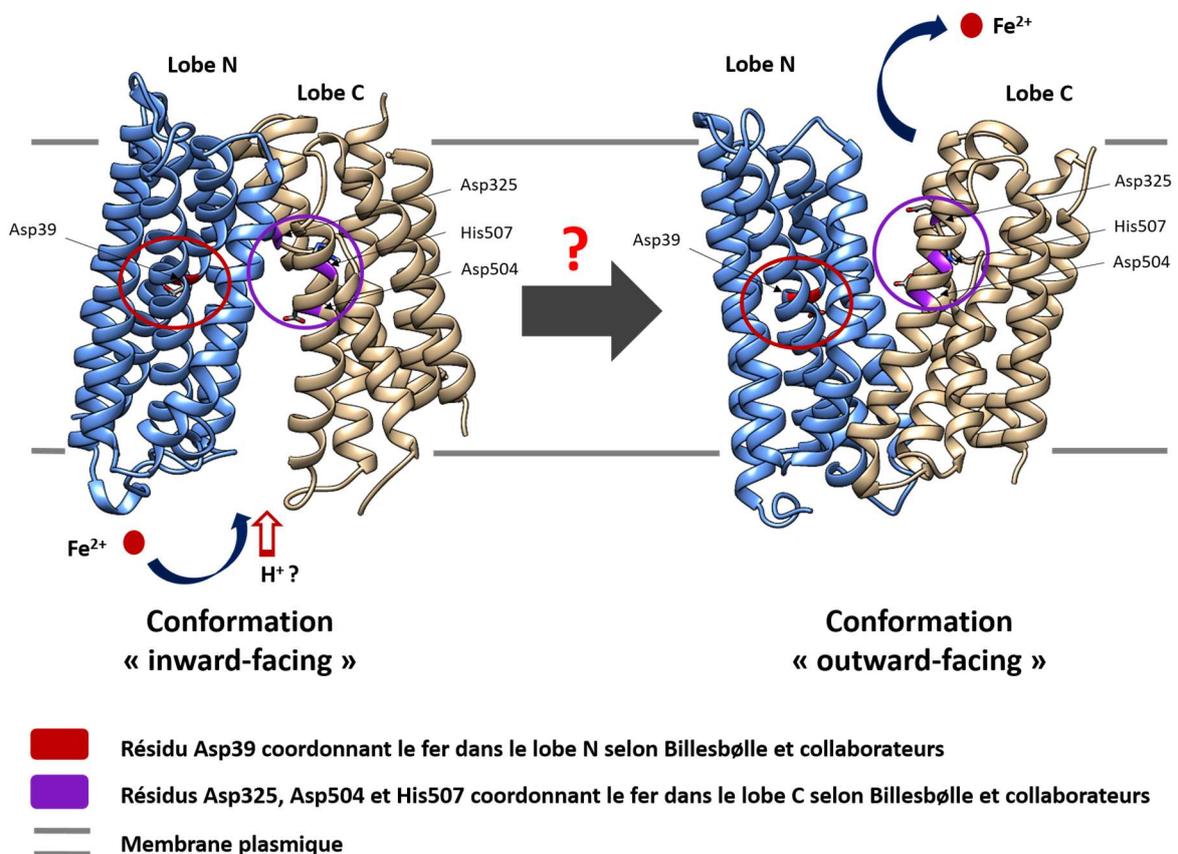


Figure 39 : Schéma repositionnant les différents éléments qui pourraient intervenir dans le basculement conformationnel « inward- » vers « outward-facing » de la ferroportine sur les modèles 3D du transporteur humain construits par le Dr. Isabelle Callebaut.

La fixation du fer dans les sites de coordination du métal décrits dans les deux lobes de la ferroportine ainsi que le co-transport d'un proton intracellulaire pourraient être impliqués dans cette transition conformationnelle.

Ensemble, ces travaux montrent bien que le mécanisme d'export du fer de la ferroportine n'est pas encore totalement élucidé. De futures explorations seront ainsi nécessaires pour identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les basculements conformationnels du transporteur ; un processus pouvant se révéler extrêmement dynamique. Pour exemple, il a été estimé que le

transporteur LacY opèrait une transition conformationnelle 16 à 21 fois par seconde soit une fois toutes les 50 000 μ s environ (Viitanen *et al*, 1984; Stelzl *et al*, 2014).

b- Mécanisme de résistance partielle de la ferroportine à l'hepcidine

La caractérisation structurale et fonctionnelle des mutations p.Gly204Ser et p.Ser47Phe a fait évoluer la vision dichotomique que nous avons de l'implication de chacun des lobes de la ferroportine dans le processus de régulation post-traductionnel médié par l'hepcidine (Le Tertre *et al*, 2017). Nos travaux suggèrent, en accord avec ce qui avait été rapporté par Aschemeyer et collaborateurs puis Billesbølle et collaborateurs, que le lobe N-terminal du transporteur intervient à la fois dans la liaison hepcidine/ferroportine mais également dans les changements conformationnels du transporteur qui lui font suite (Aschemeyer *et al*, 2018; Billesbølle *et al*, 2020).

Notre étude a permis de révéler que la résistance partielle, voire très partielle à l'hepcidine, de variants localisés dans le lobe N-terminal, était associée à des mécanismes différents. Nous pensons que la mutation p.Gly204Ser, par un défaut de « packing » affectant l'organisation structurale du lobe N-terminal, pénalise indirectement l'interaction hepcidine/ferroportine et/ou les remaniements structuraux du transporteur qui s'ensuivent. La mutation p.Ser47Phe empêcherait, quant à elle, l'établissement d'une liaison hydrogène entre la sérine 47 de la ferroportine et la proline 5 de l'hepcidine. La phénylalanine à cette position pénaliserait de plus, le rapprochement hepcidine/lobe N-terminal de la ferroportine par encombrement stérique.

Nos travaux ont souligné l'originalité de la mutation p.Ser47Phe qui provoque également une « perte de fonction » du transporteur. Les analyses *in silico* suggèrent que la substitution de la sérine 47 par une phénylalanine (acide aminé comportant une chaîne latérale « imposante » avec un cycle aromatique), pénalise la fonction d'export du fer du transporteur en déstabilisant l'environnement local de l'hélice transmembranaire 1 qui intervient dans la formation du site de coordination du cation divalent au niveau du lobe N-terminal (Deshpande *et al*, 2018; Billesbølle *et al*, 2020). Ces observations conduisent à proposer que la mutation p.Ser47Phe est une mutation « ambivalente » ; à la fois « perte » et « gain de fonction ».

On peut toutefois se demander si l'effet « gain de fonction » n'est pas une conséquence indirecte de l'effet « perte de fonction ». Ce questionnement est lié aux travaux de Billesbølle et collaborateurs qui ont rapporté que l'affinité de l'hepcidine pour le transporteur augmentait de près de 80 fois lorsque celui-ci était chargé en fer. Cette observation, cohérente avec la fonction hyposidéremiante de l'hepcidine, pourrait s'expliquer par le fait que le fer favorise la liaison du peptide régulateur dans le lobe C-terminal en stabilisant le TM7b, qui, sans fer, présente une importante flexibilité. Cette meilleure affinité pourrait également résulter d'un établissement de contacts directs entre le métal et l'hepcidine (Billesbølle *et al*, 2020). Ces résultats très récents permettent de mettre en perspective les observations faites par Deshpande et collaborateurs qui suggèrent que la liaison du calcium dans le lobe N-terminal du transporteur est nécessaire au basculement de la ferroportine en conformation « inward-facing » et donc à la prise en charge du fer intracellulaire (Deshpande *et al*, 2018). Sur ces bases, nous pouvons imaginer que la mutation p.Ser47Phe pénalise la coordination du calcium dans le lobe N-terminal et de fait, limite les changements de conformations et la prise en charge du fer intracellulaire. La conséquence indirecte serait alors une moins bonne fixation de l'hepcidine à des ferroportines membranaires globalement moins chargées en fer.

Pour explorer cette hypothèse, il serait intéressant de commencer par confirmer les résultats de Billesbølle et collaborateurs en vérifiant, par cytométrie en flux et/ou isolement des protéines de la membrane plasmique et western blot, que la ferroportine de type sauvage est plus fortement régulée par l'hepcidine en présence qu'en absence de fer. Pour limiter les biais expérimentaux, une hepcidine correctement repliée et à des concentrations physiologiques devra être utilisée. Il faudrait également vérifier que le calcium stimule la fonction d'export du fer de la ferroportine de type sauvage en faisant varier les concentrations de Ca^{2+} dans le milieu. Si tel est le cas, des expériences pourront être réalisées pour déterminer si l'effet « gain de fonction » de la mutation p.Ser47Phe dépend ou non de son effet « perte de fonction ». En prenant la protéine de type sauvage comme témoin, l'équipe pourra, par cytométrie en flux, observer si le variant p.Ser47Phe résiste plus « fortement » à l'hepcidine en augmentant la quantité de calcium présente dans le milieu contenant du fer. Cela représenterait alors un premier argument en faveur d'un effet « gain de fonction » indirectement lié à la mauvaise prise en charge du fer par le transporteur.

//- Analyse de l'effet de variations faux-sens sur l'épissage du pré-ARN messager *SLC40A1*

Dans notre étude, seules deux mutations faux-sens (c.1402G>A ; p.Gly468Ser et c.430A>G ; p.Asn144Asp) sur les 15 testées *in vitro*, ont été observées comme modifiant l'épissage du pré-ARN messager *SLC40A1*. L'hypothèse d'une hétérogénéité phénotypique associée à des défauts d'épissage n'est donc que très partiellement vérifiée.

Cette étude a attiré notre attention sur un évènement particulier : l'épissage alternatif de l'exon 5 que nous avons observé à la fois dans notre système « midi-gène » mais également dans deux lignées cellulaires (HepG2 et THP-1) qui expriment la ferroportine de manière endogène. Comme nous l'avons mis en évidence, le taux d'exclusion de cet exon, qui a la particularité d'être plus faiblement défini que les autres exons du gène *SLC40A1*, est modulé par la mutation c.430A>G (p.Asn144Asp). En augmentant l'inclusion de cet exon et par conséquent la traduction d'une protéine « pleine longueur », cette mutation pourrait avoir un double effet gain de fonction : au niveau protéique, comme cela avait été décrit précédemment (Drakesmith *et al*, 2005; Fernandes *et al*, 2009; Aschemeyer *et al*, 2018), mais aussi au niveau ARN.

En pré-sélectionnant les variations à analyser *in vitro* par différents outils *in silico*, nous en avons peut-être exclu à tort. La question se pose particulièrement pour les variations qui affectent les séquences auxiliaires d'épissage qui sont reconnues comme étant difficiles à prédire (Soukariéh *et al*, 2016). Au vu des résultats obtenus pour la mutation c.430A>G (p.Asn144Asp), il serait intéressant d'explorer les conséquences, sur cet épissage alternatif, des 7 autres variations décrites dans l'exon 5 qui n'ont pas été testées ici : (c.430A>C (p.Asn144His), c.431A>C (p.Asn144Thr), c.431A>G (p.Asn144Ser), c.454A>T (p.Ile152Phe), c.469G>A (p.Asp157Asn), c.474G>T (p.Trp158Cys) et c.484_486del (p.Val162del) (Mayr *et al*, 2010; Pietrangelo, 2017; Vlasveld *et al*, 2019). Cela permettrait peut-être de révéler d'autres effets « cachés » qui pourraient consolider l'effet attribué à la mutation c.430A>G.

L'exclusion de cet exon, qui pourrait conduire à la traduction d'une protéine tronquée, a déjà été rapportée dans les bases de données TCGA (« The Cancer Genome Atlas ») et GTEx (« Genotype-Tissue Expression ») (Base de données ExonSkipDB) (Kim *et al*, 2020). D'après la base de données TCGA, ce saut d'exon a notamment été observé dans des tissus cancéreux de sein et de prostate. Or, il a été rapporté que l'expression de la ferroportine était diminuée dans différents tissus ou lignées cellulaires issus de ce type de cancers (Pinnix *et al*, 2010; XUE *et al*, 2015). Ainsi, il serait intéressant, en comparant des tissus sains et cancéreux, de vérifier s'il existe une corrélation entre le taux d'exclusion de l'exon 5 et la diminution de l'expression du transporteur. Cet épissage alternatif pourrait, en effet, représenter un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de la ferroportine qui, dans le cas de cellules cancéreuses, pourrait favoriser leur prolifération en augmentant la rétention de fer intracellulaire (Pinnix *et al*, 2010).

Plus globalement, l'analyse des séquences auxiliaires d'épissage de l'exon 5 pourrait permettre d'identifier les acteurs protéiques régulant, en trans, l'épissage alternatif de ce dernier. L'étude du profil d'expression de ces facteurs dans divers tissus (sains comme cancéreux) pourrait ensuite permettre de mieux apprécier le rôle et l'importance physiologique de cet évènement d'épissage.

III- Développement d'un nouveau modèle cellulaire pour l'étude fonctionnelle de la ferroportine

En étudiant la ferroportine par surexpression d'un ADN complémentaire dans un modèle cellulaire éloigné du métabolisme du fer, nous faisons abstraction totale ou partielle du contexte génétique, des mécanismes de régulation de l'expression du transporteur mais aussi de l'importance de ses partenaires protéiques.

En effet, plusieurs études ont montré que la ferroportine ne fonctionnait pas de manière isolée (Yang *et al*, 2020). La protéine Mon1a, par exemple, a été observée comme étant particulièrement critique pour le trafic intracellulaire de la ferroportine vers la membrane plasmique de macrophages murins (Wang *et al*, 2007). La protéine chaperonne PCBP2 (« Poly(rC)-Binding Protein 2 »), quant à elle, approvisionnerait le transporteur en fer intracellulaire en interagissant directement avec son extrémité C-terminale intracytoplasmique (Yanatori *et al*, 2014, 2016). Enfin, il est important de rappeler qu'*in vivo*, l'héphaestine et la céruloplasmine représentent deux ferroxidases qui conditionnent la libération du fer par la ferroportine dans le compartiment sanguin (Harris *et al*, 1999; Vulpe *et al*, 1999; Fuqua *et al*, 2018).

Afin de dépasser ces limites, l'équipe souhaite travailler directement à partir de macrophages de donneurs sains et de patients atteints d'hémochromatose de type 4 exprimant de manière endogène une ferroportine de type sauvage ou mutée. Avant de travailler directement sur ces précieuses cellules, la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 a été choisie pour mettre au point les différents protocoles visant à évaluer la présence en membrane plasmique, la capacité d'export du fer ainsi que la sensibilité à l'hepcidine de la ferroportine.

Afin de mimer *in vitro*, le contexte dans lequel la ferroportine est la plus active *in vivo*, nous avons travaillé à différencier et polariser les monocytes THP-1 en macrophages de type M2. Pour cela, nous avons comparé deux protocoles de polarisation, reposant sur l'utilisation de deux (IL-4 et 13) ou trois (IL-4, 13 et 6) interleukines. Sur la base d'une expression plus prononcée des marqueurs M2, nous avons choisi de travailler avec un cocktail de trois interleukines. Cependant, plusieurs éléments méritent d'être soulevés par rapport aux travaux et aux choix qui ont été réalisés :

- La polarisation des cellules en macrophages de type M2 a seulement été vérifiée en prenant comme référence les cellules THP-1 différenciées en macrophages naïfs de type M0, non polarisés. Pour valider « l'efficacité » de ce protocole de polarisation, il serait intéressant de différencier et polariser des monocytes THP-1 en macrophages de type M1, à l'aide d'un protocole adapté que l'équipe mettrait en place, afin de comparer l'expression de différents marqueurs M1 et M2 dans les deux populations macrophagiques obtenues.
- D'autre part, le choix que nous avons fait de polariser nos cellules en présence d'interleukine 6 est discutable/contestable. Nous avons remarqué, comme cela avait été observé dans d'autres études, que l'ajout de cette interleukine au cocktail de polarisation IL4/IL13, augmentait l'expression des marqueurs M2 (Zarif *et al*, 2016; Ayaub *et al*, 2019). Cependant, il a été rapporté que cette « hyperpolarisation » induite par l'IL6, était associée à une augmentation du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse engagée par la cellule pour y faire face : l'UPR (« Unfolded Protein Response ») (Ayaub *et al*, 2019). Dans ces

conditions, le profil d'expression génique et la fonction de la cellule peuvent être modifiés ce qui pourrait biaiser la mise en place de protocoles visant à étudier la ferroportine.

- Enfin, il est important de souligner que la catégorisation des états de polarisation M1/M2 est assez « caricaturale » et « réductrice » puisqu'*in vivo*, les macrophages présentent un continuum d'états phénotypiques qui vont dépendre du microenvironnement cellulaire (Sica & Mantovani, 2012). Des sous-populations de macrophages de type M2 ou des états de polarisation autres que M1/M2 ont d'ailleurs été décrits (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2015; Yao *et al*, 2019). Ces observations rappellent ainsi que le choix de différencier et de polariser les monocytes THP-1 en macrophages de type M2 pour mimer *in vitro*, le phénotype des macrophages responsables du catabolisme des globules rouges *in vivo*, présente certaines limites.

Parallèlement à mon projet de thèse, les travaux sur les cellules primaires ont bien progressé. L'accès à des résidus d'aphérèse de donneurs sains a été organisé. Les protocoles permettant d'isoler les monocytes de ces échantillons puis de les différencier et de les polariser en macrophages de type M2 ont été mis en place dans l'équipe. Cette évolution, associée à l'obtention relativement aisée de cellules de donneurs sains, questionne maintenant, l'intérêt de poursuivre le développement des tests fonctionnels sur les cellules THP-1 plutôt que sur ces cellules primaires. Il s'agit là d'un changement de stratégie qui sera finalement adopté par l'équipe.

Concernant les tests fonctionnels, nous avons choisi de travailler avec des protocoles qui nous permettent de nous rapprocher au plus près des conditions physiologiques. Ainsi, des globules rouges sénescents seront utilisés comme source de fer pour étudier la présence en surface cellulaire du transporteur, afin de favoriser sa localisation en membrane plasmique (Delaby *et al*, 2005c, 2005a), mais également pour évaluer sa capacité à exporter le fer. Comme en témoigne la figure 40, nous avons mis en place, au laboratoire, en nous appuyant sur les conseils du Dr. François Canonne-Hergaux, un protocole d'érythrophagocytose sur des monocytes primaires différenciés et polarisés en macrophages de type M2.

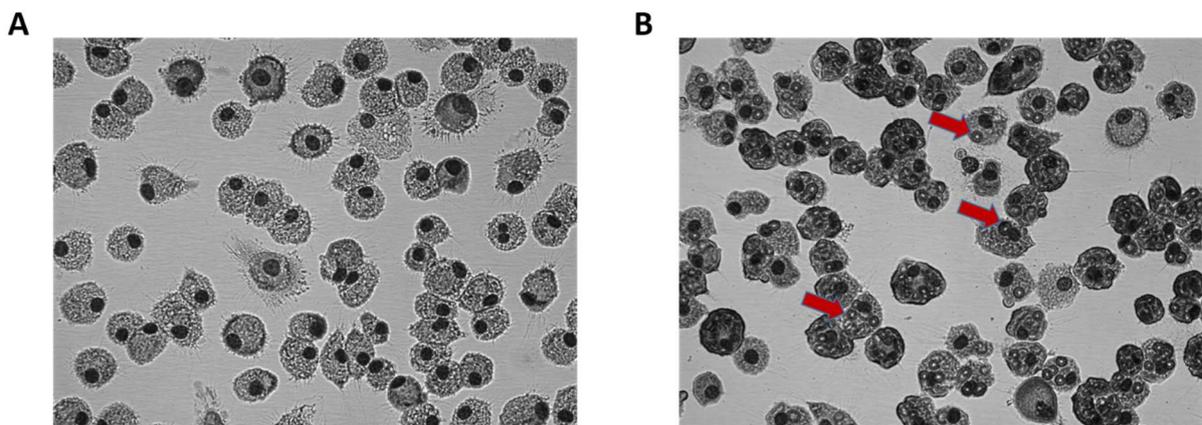


Figure 40 : Observation par microscopie (x400) de la capacité de monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 à endocyter des érythrocytes sénescents.

(A) Monocytes primaires humains différenciés et polarisés en macrophages de type M2 (par incubation avec M-CSF et interleukines 4 et 13) en absence ou (B) en présence de globules rouges humains rendus sénescents de manière artificielle (par incubation pendant 16 h à 30 °C en présence de calcium et d'un ionophore (Delaby *et al*, 2005c)). Les flèches rouges pointent des globules rouges endocytés par les macrophages.

La ferroportine étant majoritairement retrouvée dans les rafts lipidiques au niveau macrophagique, un protocole d'ultracentrifugation, mis à disposition par le Dr. François Canonne-Hergaux, sera mis en place pour les isoler (Auriac *et al*, 2010). L'expression en membrane plasmique de la ferroportine sera évaluée dans ces échantillons par western blot, à l'aide d'anticorps anti-ferroportine, dont la spécificité aura été vérifiée. La capacité de la ferroportine à exporter le fer intracellulaire sera, quant à elle, évaluée par dosage de la ferritine intracellulaire. Enfin, ces deux protocoles pourront être utilisés pour apprécier la sensibilité de la ferroportine à l'hepcidine, en observant la diminution de sa présence en membrane plasmique et le défaut d'export de fer induits par la présence du peptide régulateur, qui sera apporté sous sa conformation et à des concentrations physiologiques.

La mise en place de ces protocoles permettra d'étudier la ferroportine de type sauvage mais également différents variants du transporteur en transposant ensuite ces protocoles sur des macrophages issus de patients atteints d'hémochromatose de type 4. Bien que cette façon plus « physiologique » de procéder paraisse plus « fiable » pour étudier la causalité de ces derniers, celle-ci présente des limites pouvant conduire à la mauvaise interprétation de certains variants. Le manque de sensibilité des techniques mises en œuvre ainsi que la difficulté à répéter des expériences pour dégager des différences significatives, peuvent, par exemple, entraîner à tort la classification de variants hypomorphes, qui ne présentent qu'un effet délétère « faible », en variants neutres. Pour cette raison notamment, il semble important de poursuivre, en parallèle, les études fonctionnelles par surexpression.

Du fait de leurs différentes corrections géniques, qui pour certaines n'ont pas été retrouvées chez l'Homme (invalidation d'un allèle *SLC40A1*, codon stop prématuré et délétion de 15 acides aminés), les clones THP-1 obtenus ou en passe de l'être (clones porteurs des mutations faux-sens p.Asn174Ile et p.Gly80Ser à l'état hétérozygote) pourraient se révéler utiles pour explorer certaines questions qui restent posées autour de l'hémochromatose de type 4.

C'est notamment le cas du mécanisme général de perte de fonction associé à l'hémochromatose de type 4A, ou maladie de la ferroportine, qui n'est pas encore totalement défini (Pietrangelo, 2017). Au vu de différentes études publiées dans la littérature, cette maladie autosomique dominante pourrait être engendrée par un mécanisme de dominance négative.

Zohn et collaborateurs ont ainsi observé que les souris « flatiron », hétérozygotes pour la mutation «perte de fonction» p.H32R, (qui entraîne un défaut de présence en membrane plasmique et d'activité de la ferroportine *in vitro*) présentaient un phénotype comparable à celui des patients atteints de la maladie (saturation de la transferrine basse, ferritine sérique élevée et importante rétention de fer dans les cellules de Kupffer) (Zohn *et al*, 2007). Cela n'avait, en revanche, pas été observé chez des souris porteuses d'une délétion hétérozygote du gène *SLC40A1*, qui ne présentaient pas de surcharge en fer évidente (Donovan *et al*, 2005).

Le fait que, chez l'Homme, l'hémochromatose de type 4A soit presque exclusivement associée à des mutations faux-sens et non à des mutations non-sens ou entraînant une modification du cadre de lecture, a été avancé en faveur d'un effet dominant négatif (Pietrangelo, 2017).

Pour vérifier l'existence d'un tel mécanisme, plusieurs équipes se sont attachées à mettre en évidence une oligomérisation de la ferroportine, principalement par le biais d'expériences de surexpression en lignées cellulaires. Certaines ont observé une dimérisation de la ferroportine alors que d'autres non (Gonçalves *et al*, 2006; Schimanski *et al*, 2005, 2008; Rice *et al*, 2009; Sabelli *et al*, 2017; Rishi *et al*, 2020).

Très récemment, Rishi et collaborateurs ont observé une dimérisation intracellulaire des ferroportines de type sauvage et mutées, exogènes et taguées, par le biais d'expériences de PLA (« Proximity Ligation Assay ») réalisées dans la lignée cellulaire hépatocytaire humaine HuH-7 (Rishi *et al*, 2020). L'équipe australienne a alors proposé que les protéines mutées, qui présentent un défaut d'adressage membranaire, pénalisent par dimérisation, le trafic intracellulaire des protéines de type sauvage vers la surface des cellules et par conséquent, leur capacité à exporter le fer.

Bien que ces différentes observations rendent l'hypothèse de dominance négative plausible, elles ne permettent pas d'exclure le fait qu'une haploinsuffisance puisse être à l'origine de la pathologie. Si le fait que la maladie soit principalement associée à des mutations « faux-sens » laisse penser à un processus de dominance négative, l'absence de mutations non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture traduit peut-être aussi que la ferroportine ne puisse être mutée autrement que par des changements d'acides aminés ponctuels. Comme en témoigne la létalité *in utero* induite par l'inactivation totale du gène *Slc40a1* chez la souris, la ferroportine, de par sa fonction unique d'export du fer dans l'organisme, a une importance cruciale (Donovan *et al*, 2005). Nous pouvons tout à fait imaginer que sa fonction soit pénalisée par un effet « seuil » qui serait particulièrement critique dans les macrophages qui gèrent la plus grande quantité de fer dans l'organisme.

De manière intéressante, Sabelli et collaborateurs ont rapporté, en 2017, l'existence d'un mécanisme « intermédiaire » en travaillant à partir de macrophages de donneurs sains et de patients atteints d'hémochromatose de type 4 (Sabelli *et al*, 2017). Par chromatographie d'exclusion stérique et western blot, les auteurs n'avaient pas observé d'oligomérisation de la ferroportine. Des expériences d'immunofluorescence les ont conduit à observer qu'en présence d'un faible taux de fer, la ferroportine était retrouvée de manière comparable dans les endosomes précoces et à la membrane plasmique des macrophages pathologiques et sains mais que celle-ci s'accumulait davantage dans les lysosomes de macrophages de patients. En présence de grandes quantités de fer hémique, la ferroportine a été observée comme étant moins présente à la membrane plasmique des macrophages de patients. Ainsi, Sabelli et collaborateurs ont formulé l'hypothèse qu'une forte exposition au fer entraînait une sorte « d'embouteillage » dans les voies d'endocytose et de dégradation ce qui empêcherait l'apport suffisant de ferroportines sauvages comme mutées en membrane plasmique. Cette hypothèse expliquerait notamment pourquoi la capacité d'export du fer des macrophages, qui gèrent 20 à 25 mg de fer par jour *via* le catabolisme des globules rouges, est particulièrement affectée dans la maladie alors que celle des entérocytes qui ne transportent qu'1 à 2 mg de fer par jour semble préservée.

Ensemble, ces différentes observations nous invitent notamment à étudier les conséquences des différentes corrections géniques de nos clones sur la localisation intracellulaire et en membrane plasmique de la ferroportine, qui présente ici, le grand avantage d'être exprimée de manière endogène. Pour ce faire, des expériences d'immunofluorescence pourront être mises en place avec des anticorps anti-ferroportine dont la spécificité aura été vérifiée.

Conclusion

En plus d'avoir contribué à une amélioration des connaissances fondamentales sur la structure et la fonction de la ferroportine et sa régulation par l'hepcidine, ces travaux de thèse nous ont permis d'apporter quelques éléments de réponse à la forte hétérogénéité phénotypique observée dans le cadre de l'hémochromatose de type 4 en mettant en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques. La mise en place de tests fonctionnels sur des macrophages dérivés de monocytes prélevés chez des donneurs sains et des patients atteints d'hémochromatose de type 4 devrait permettre à l'équipe UMR1078 d'étudier le comportement de la ferroportine à la membrane plasmique dans un environnement plus physiologique. Cela pourrait aussi contribuer à une meilleure description de l'effet de certaines variations faux-sens.

Références bibliographiques

- Abboud, S. & Haile, D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 19906–19912.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. & Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 610–615.
- Abreu, R., Quinn, F. & Giri, P.K. (2018) Role of the hepcidin-ferroportin axis in pathogen-mediated intracellular iron sequestration in human phagocytic cells. *Blood Advances*, **2**, 1089–1100.
- Adams, P.C. & Barton, J.C. (2010) How I treat hemochromatosis. *Blood*, **116**, 317–325.
- Addo, L., Ikuta, K., Tanaka, H., Toki, Y., Hatayama, M., Yamamoto, M., Ito, S., Shindo, M., Sasaki, Y., Shimonaka, Y., Fujiya, M. & Kohgo, Y. (2016) The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *International Journal of Hematology*, **103**, 34–43.
- Andersen, R.V., Tybjaerg-Hansen, A., Appleyard, M., Birgens, H. & Nordestgaard, B.G. (2004) Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood*, **103**, 2914–2919.
- Anderson, C.P., Shen, M., Eisenstein, R.S. & Leibold, E.A. (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1823**, 1468–1483.
- Anderson, E.R., Taylor, M., Xue, X., Ramakrishnan, S.K., Martin, A., Xie, L., Bredell, B.X., Gardenghi, S., Rivella, S. & Shah, Y.M. (2013) Intestinal HIF2 α promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, E4922–E4930.
- Andriopoulos, B., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S.A., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson, M.D., Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H.Y. & Babitt, J.L. (2009) BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*, **41**, 482–487.
- Arezes, J., Foy, N., McHugh, K., Sawant, A., Quinkert, D., Terraube, V., Brinth, A., Tam, M., LaVallie, E.R., Taylor, S., Armitage, A.E., Pasricha, S.-R., Cunningham, O., Lambert, M., Draper, S.J., Jasuja, R. & Drakesmith, H. (2018) Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood*, **132**, 1473–1477.
- Aschemeyer, S., Qiao, B., Stefanova, D., Valore, E.V., Sek, A.C., Ruwe, T.A., Vieth, K.R., Jung, G., Casu, C., Rivella, S., Jormakka, M., Mackenzie, B., Ganz, T. & Nemeth, E. (2018) Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood*, **131**, 899–910.
- Auriac, A., Willemetz, A. & Canonne-Hergaux, F. (2010) Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica*, **95**, 1269–1277.
- Ayoub, E.A., Tandon, K., Padwal, M., Imani, J., Patel, H., Dubey, A., Mekhael, O., Upagupta, C., Ayoub, A., Dvorkin-Gheva, A., Murphy, J., Kolb, P.S., Lhotak, S., Dickhout, J.G., Austin, R.C., Kolb, M.R.J., Richards, C.D. & Ask, K. (2019) IL-6 mediates ER expansion during hyperpolarization of alternatively activated macrophages. *Immunology and Cell Biology*, **97**, 203–217.

- Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., Andrews, N.C. & Lin, H.Y. (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature Genetics*, **38**, 531–539.
- Babu, K.R. & Muckenthaler, M.U. (2016) miR-20a regulates expression of the iron exporter ferroportin in lung cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **94**, 347–359.
- Baker, H.M., Anderson, B.F. & Baker, E.N. (2003) Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 3579–3583.
- Baumann, B.H., Shu, W., Song, Y., Simpson, E.M., Lakhali-Littleton, S. & Dunaief, J.L. (2019) Ferroportin-mediated iron export from vascular endothelial cells in retina and brain. *Experimental Eye Research*, **187**, 107728.
- Beaton, M., Guyader, D., Deugnier, Y., Moirand, R., Chakrabarti, S. & Adams, P. (2002) Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **36**, 673–678.
- Beaumont, C. & Canonne-Hergaux, F. (2005) [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, **12**, 123–130.
- Besson-Fournier, C., Latour, C., Kautz, L., Bertrand, J., Ganz, T., Roth, M.-P. & Coppin, H. (2012) Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood*, **120**, 431–439.
- Billesbølle, C.B., Azumaya, C.M., Kretsch, R.C., Powers, A.S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R.O., Cheng, Y. & Manglik, A. (2020) Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*.
- Bonaccorsi di Patti, M.C., Polticelli, F., Cece, G., Cutone, A., Felici, F., Persichini, T. & Musci, G. (2014) A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *The FEBS journal*, **281**, 2851–2860.
- Bonaccorsi di Patti, M.C., Polticelli, F., Tortosa, V., Furbetta, P.A. & Musci, G. (2015) A bacterial homologue of the human iron exporter ferroportin. *FEBS Letters*, **589**, 3829–3835.
- Brissot, P., Pietrangelo, A., Adams, P.C., de Graaff, B., McLaren, C.E. & Loréal, O. (2018) Haemochromatosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, **4**, 18016.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C. & Loréal, O. (2012) Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1820**, 403–410.
- Brissot, P., Troadec, M.-B., Bardou-Jacquet, E., Lan, C.L., Jouanolle, A.-M., Deugnier, Y. & Loréal, O. (2008) Current approach to hemochromatosis. *Blood Reviews*, **22**, 195–210.
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T.K. & van Bruggen, R. (2012) CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, **119**, 5512–5521.
- Callebaut, I., Joubrel, R., Pissard, S., Kannengiesser, C., Gérolami, V., Ged, C., Cadet, E., Cartault, F., Ka, C., Gourlaouen, I., Gourhant, L., Oudin, C., Goossens, M., Grandchamp, B., De Verneuil, H.,

- Rochette, J., Férec, C. & Le Gac, G. (2014) Comprehensive functional annotation of 18 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Human Molecular Genetics*, **23**, 4479–4490.
- Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B. & Mornon, J.P. (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **53**, 621–645.
- Camaschella, C., Nai, A. & Silvestri, L. (2020) Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*, **105**, 260–272.
- Camaschella, C., Roetto, A., Calì, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A. & Gasparini, P. (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genetics*, **25**, 14–15.
- Canali, S., Wang, C.-Y., Zumbrennen-Bullough, K.B., Bayer, A. & Babitt, J.L. (2017a) Bmp2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *American journal of hematology*, **92**, 1204.
- Canali, S., Zumbrennen-Bullough, K.B., Core, A.B., Wang, C.-Y., Nairz, M., Bouley, R., Swirski, F.K. & Babitt, J.L. (2017b) Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood*, **129**, 405–414.
- Canonne-Hergaux, F., Donovan, A., Delaby, C., Wang, H. & Gros, P. (2006) Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **290**, G156-163.
- Casanovas, G., Mleczko-Sanecka, K., Altamura, S., Hentze, M.W. & Muckenthaler, M.U. (2009) Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **87**, 471–480.
- Casu, C., Nemeth, E. & Rivella, S. (2018) Hepcidin agonists as therapeutic tools. *Blood*, **131**, 1790–1794.
- Chen, W., Dailey, H.A. & Paw, B.H. (2010) Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*, **116**, 628–630.
- Chen, W., Paradkar, P.N., Li, L., Pierce, E.L., Langer, N.B., Takahashi-Makise, N., Hyde, B.B., Shirihai, O.S., Ward, D.M., Kaplan, J. & Paw, B.H. (2009) Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 16263–16268.
- Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., Fiorito, V., Fagoonee, S., Camporeale, A., Turco, E., Merlo, G.R., Silengo, L., Altruda, F., Pinton, P. & Tolosano, E. (2012) The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**, 4569–4579.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S. & Staels, B. (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, **12**, 10–17.
- Cianetti, L., Segnalini, P., Calzolari, A., Morsilli, O., Felicetti, F., Ramoni, C., Gabbianelli, M., Testa, U. & Sposi, N.M. (2005) Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica*, **90**, 1595–1606.

- Clark, R., Tan, C., Preza, G., Nemeth, E., Ganz, T. & Craik, D. (2011) Understanding the Structure/Activity Relationships of the Iron Regulatory Peptide Hepcidin. *Chemistry & Biology*, **18**, 336–343.
- Conrad, M.E., Benjamin, B.I., Williams, H.L. & Foy, A.L. (1967) Human absorption of hemoglobin-iron. *Gastroenterology*, **53**, 5–10.
- Coppin, H., Bensaid, M., Fruchon, S., Borot, N., Blanché, H. & Roth, M.P. (2003) Longevity and carrying the C282Y mutation for haemochromatosis on the HFE gene: case control study of 492 French centenarians. *BMJ*, **327**, 132–133.
- Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., Campanella, A., Brunelli, S., Manfredi, A.A., Apostoli, P., Silvestri, L., Camaschella, C. & Rovere-Querini, P. (2010) Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*, **95**, 1814–1822.
- Corradini, E., Meynard, D., Wu, Q., Chen, S., Ventura, P., Pietrangelo, A. & Babitt, J.L. (2011) Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **54**, 273–284.
- Cremonesi, L., Cemonesi, L., Forni, G.L., Soriani, N., Lamagna, M., Fermo, I., Daraio, F., Galli, A., Pietra, D., Malcovati, L., Ferrari, M., Camaschella, C. & Cazzola, M. (2005) Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *British Journal of Haematology*, **131**, 663–670.
- Daguenet, E., Dujardin, G. & Valcárcel, J. (2015) The pathogenicity of splicing defects: mechanistic insights into pre-mRNA processing inform novel therapeutic approaches. *EMBO reports*, **16**, 1640–1655.
- Daher, R., Lefebvre, T., Puy, H. & Karim, Z. (2019) Extrahepatic hepcidin production: The intriguing outcomes of recent years. *World Journal of Clinical Cases*, **7**, 1926–1936.
- D'Alessio, F., Hentze, M.W. & Muckenthaler, M.U. (2012) The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *Journal of Hepatology*, **57**, 1052–1060.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H.F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 2258–2262.
- De Domenico, I., Ward, D.M., Langelier, C., Vaughn, M.B., Nemeth, E., Sundquist, W.I., Ganz, T., Musci, G. & Kaplan, J. (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Molecular Biology of the Cell*, **18**, 2569–2578.
- Delaby, C., Pilard, N., Gonçalves, A.S., Beaumont, C. & Canonne-Hergaux, F. (2005a) Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*, **106**, 3979–3984.
- Delaby, C., Pilard, N., Hetet, G., Driss, F., Grandchamp, B., Beaumont, C. & Canonne-Hergaux, F. (2005b) A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Experimental Cell Research*, **310**, 43–53.
- Delaby, C., Pilard, N., Hetet, G., Driss, F., Grandchamp, B., Beaumont, C. & Canonne-Hergaux, F. (2005c) A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Experimental Cell Research*, **310**, 43–53.

- Delaby, C., Pilard, N., Puy, H. & Canonne-Hergaux, F. (2008) Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *The Biochemical Journal*, **411**, 123–131.
- Delaby, C., Rondeau, C., Pouzet, C., Willemetz, A., Pilard, N., Desjardins, M. & Canonne-Hergaux, F. (2012) Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PLoS One*, **7**, e42199.
- Deshpande, C.N., Ruwe, T.A., Shawki, A., Xin, V., Vieth, K.R., Valore, E.V., Qiao, B., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B. & Jormakka, M. (2018) Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nature Communications*, **9**, 3075.
- Détivaud, L., Island, M.-L., Jouanolle, A.-M., Ropert, M., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., Mosser, A., Leroyer, P., Deugnier, Y., David, V., Brissot, P. & Loréal, O. (2013) Ferroportin Diseases: Functional Studies, a Link Between Genetic and Clinical Phenotype. *Human Mutation*, **34**, 1529–1536.
- Di Giacomo, D., Gaildrat, P., Abuli, A., Abdat, J., Frébourg, T., Tosi, M. & Martins, A. (2013) Functional analysis of a large set of BRCA2 exon 7 variants highlights the predictive value of hexamer scores in detecting alterations of exonic splicing regulatory elements. *Human Mutation*, **34**, 1547–1557.
- Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J. & Root, D.E. (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, **34**, 184–191.
- Domenico, I.D., Lo, E., Ward, D.M. & Kaplan, J. (2009) Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 3800–3805.
- Donadon, I., McVey, J.H., Garagiola, I., Branchini, A., Mortarino, M., Peyvandi, F., Bernardi, F. & Pinotti, M. (2018) Clustered F8 missense mutations cause hemophilia A by combined alteration of splicing and protein biosynthesis and activity. *Haematologica*, **103**, 344–350.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C. & Zon, L.I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776–781.
- Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S. & Andrews, N.C. (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*, **1**, 191–200.
- Dowdle, W.E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R.A., Liu, S., Triantafellow, E., Menon, S., Wang, Z., Honda, A., Pardee, G., Cantwell, J., Luu, C., Cornella-Taracido, I., Harrington, E., Fekkes, P., Lei, H., Fang, Q., Digan, M.E., Burdick, D., Powers, A.F., et al (2014) Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nature Cell Biology*, **16**, 1069–1079.
- Drakesmith, H., Nemeth, E. & Ganz, T. (2015) Ironing out Ferroportin. *Cell Metabolism*, **22**, 777–787.
- Drakesmith, H., Schimanski, L.M., Ormerod, E., Merryweather-Clarke, A.T., Viprakasit, V., Edwards, J.P., Sweetland, E., Bastin, J.M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K.J.H. & Townsend, A.R.M.

- (2005) Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*, **106**, 1092–1097.
- Dudev, T. & Nikolova, V. (2016) Determinants of Fe(2+) over M(2+) (M = Mg, Mn, Zn) Selectivity in Non-Heme Iron Proteins. *Inorganic Chemistry*, **55**, 12644–12650.
- Ehrnstorfer, I.A., Geertsma, E.R., Pardon, E., Steyaert, J. & Dutzler, R. (2014) Crystal structure of a SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for transition-metal ion transport. *Nature Structural & Molecular Biology*, **21**, 990–996.
- Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., et al (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, **13**, 399–408.
- Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., Sly, W.S. & Schatzman, R.C. (1997) The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 14025–14028.
- Fernandes, A., Preza, G.C., Phung, Y., De Domenico, I., Kaplan, J., Ganz, T. & Nemeth, E. (2009) The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*, **114**, 437–443.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D. & Andrews, N.C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1148–1153.
- Fowler, P.W., Orwick-Rydmark, M., Radestock, S., Solcan, N., Dijkman, P.M., Lyons, J.A., Kwok, J., Caffrey, M., Watts, A., Forrest, L.R. & Newstead, S. (2015) Gating topology of the proton-coupled oligopeptide symporters. *Structure (London, England: 1993)*, **23**, 290–301.
- Franco, R.S. (2012) Measurement of Red Cell Lifespan and Aging. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **39**, 302–307.
- Fuqua, B.K., Lu, Y., Frazer, D.M., Darshan, D., Wilkins, S.J., Dunn, L., Loguinov, A.V., Kogan, S.C., Matak, P., Chen, H., Dunaief, J.L., Vulpe, C.D. & Anderson, G.J. (2018) Severe Iron Metabolism Defects in Mice With Double Knockout of the Multicopper Ferroxidases Hephaestin and Ceruloplasmin. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **6**, 405–427.
- Fuqua, B.K., Vulpe, C.D. & Anderson, G.J. (2012) Intestinal iron absorption. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, **26**, 115–119.
- Galesloot, T.E., Vermeulen, S.H., Geurts-Moespot, A.J., Klaver, S.M., Kroot, J.J., van Tienoven, D., Wetzels, J.F.M., Kiemeneij, L.A.L.M., Sweep, F.C., den Heijer, M. & Swinkels, D.W. (2011) Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*, **117**, e218–e225.
- Ganz, T. (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*, **93**, 1721–1741.
- Ganz, T., Olbina, G., Girelli, D., Nemeth, E. & Westerman, M. (2008) Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*, **112**, 4292–4297.

- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.-S. & Enns, C.A. (2009) Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metabolism*, **9**, 217–227.
- Geissler, C. & Singh, M. (2011) Iron, Meat and Health. *Nutrients*, **3**, 283–316.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. & Michiels, C. (2015) M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer*, **15**, 577.
- Gonçalves, A.S., Muzeau, F., Blaybel, R., Hetet, G., Driss, F., Delaby, C., Canonne-Hergaux, F. & Beaumont, C. (2006) Wild-type and mutant ferroportins do not form oligomers in transfected cells. *The Biochemical Journal*, **396**, 265–275.
- Green, R., Charlton, R., Seftel, H., Bothwell, T., Mayet, F., Adams, B., Finch, C. & Layrisse, M. (1968) Body iron excretion in man: a collaborative study. *The American Journal of Medicine*, **45**, 336–353.
- Griffith, J.K., Baker, M.E., Rouch, D.A., Page, M.G.P., Skurray, R.A., Paulsen, I.T., Chater, K.F., Baldwin, S.A. & Henderson, P.J.F. (1992) Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Current Opinion in Cell Biology*, **4**, 684–695.
- Guellec, J., Elbahnsi, A., Le Tertre, M., Uguen, K., Gourlaouen, I., Férec, C., Ka, C., Callebaut, I. & Le Gac, G. (2019) Molecular model of the ferroportin intracellular gate and implications for the human iron transport cycle and hemochromatosis type 4A. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **33**, 14625–14635.
- Guida, C., Altamura, S., Klein, F.A., Galy, B., Boutros, M., Ulmer, A.J., Hentze, M.W. & Muckenthaler, M.U. (2015) A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood*, **125**, 2265–2275.
- Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A.O., Drenzo, C., Robine, S. & Andrews, N.C. (2005) Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *The Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1258–1266.
- Guo, S., Casu, C., Gardenghi, S., Booten, S., Aghajan, M., Peralta, R., Watt, A., Freier, S., Monia, B.P. & Rivella, S. (2013) Reducing Tmprss6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **123**, 1531–1541.
- Gurrin, L.C., Osborne, N.J., Constantine, C.C., McLaren, C.E., English, D.R., Gertig, D.M., Delatycki, M.B., Southey, M.C., Hopper, J.L., Giles, G.G., Anderson, G.J., Olynyk, J.K., Powell, L.W., Allen, K.J., & HealthIron Study Investigators (2008) The natural history of serum iron indices for HFE C282Y homozygosity associated with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*, **135**, 1945–1952.
- Guyader, D., Jacquelinet, C., Moirand, R., Turlin, B., Mendler, M.H., Chaperon, J., David, V., Brissot, P., Adams, P. & Deugnier, Y. (1998) Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology*, **115**, 929–936.
- Hanson, E.H., Imperatore, G. & Burke, W. (2001) HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, **154**, 193–206.

- Harada, N., Kanayama, M., Maruyama, A., Yoshida, A., Tazumi, K., Hosoya, T., Mimura, J., Toki, T., Maher, J.M., Yamamoto, M. & Itoh, K. (2011) Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **508**, 101–109.
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K. & Gitlin, J.D. (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10812–10817.
- Harrison, P.M. & Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1275**, 161–203.
- Hough, S.H., Ajetunmobi, A., Brody, L., Humphries-Kirilov, N. & Perello, E. (2016) Desktop Genetics. *Personalized Medicine*, **13**, 517–521.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G. & Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, **31**, 827–832.
- Huang, D.-L., Bai, J.-S., Wu, M., Wang, X., Riedl, B., Pook, E., Alt, C., Erny, M., Li, Y.-M., Bierer, D., Shi, J. & Fang, G.-M. (2019) Non-reducible disulfide bond replacement implies that disulfide exchange is not required for hepcidin-ferroportin interaction. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, **55**, 2821–2824.
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. & Wang, D.-N. (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 616–620.
- Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H.J. & Moestrup, S.K. (2005) Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, **106**, 2572–2579.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. & Kaelin, W.G. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, N.Y.)*, **292**, 464–468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science (New York, N.Y.)*, **292**, 468–472.
- Jacolot, S., Le Gac, G., Scotet, V., Quere, I., Mura, C. & Ferec, C. (2004) HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood*, **103**, 2835–2840.
- Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, **211**, 969–970.
- Jeffrey, P.D., Bewley, M.C., MacGillivray, R.T., Mason, A.B., Woodworth, R.C. & Baker, E.N. (1998) Ligand-induced conformational change in transferrins: crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin. *Biochemistry*, **37**, 13978–13986.

- Jenkitkasemwong, S., Wang, C.-Y., Coffey, R., Zhang, W., Chan, A., Biel, T., Kim, J.-S., Hojyo, S., Fukada, T. & Knutson, M.D. (2015) SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metabolism*, **22**, 138–150.
- Jessen-Marshall, A.E., Paul, N.J. & Brooker, R.J. (1995) The Conserved Motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/K)(R/K), in Hydrophilic Loop 2/3 of the Lactose Permease. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 16251–16257.
- Jiang, D., Zhao, Y., Wang, X., Fan, J., Heng, J., Liu, X., Feng, W., Kang, X., Huang, B., Liu, J. & Zhang, X.C. (2013) Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 14664–14669.
- Jiang, S., Fang, X., Liu, M., Ni, Y., Ma, W. & Zhao, R. (2019) MiR-20b Down-Regulates Intestinal Ferroportin Expression In Vitro and In Vivo. *Cells*, **8**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829237/> [Accessed January 26, 2020].
- Jordan, J.B., Poppe, L., Haniu, M., Arvedson, T., Syed, R., Li, V., Kohno, H., Kim, H., Schnier, P.D., Harvey, T.S., Miranda, L.P., Cheetham, J. & Sasu, B.J. (2009) Hecpidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 24155–24167.
- Ka, C., Guellec, J., Perpermans, X., Kannengiesser, C., Ged, C., Wuyts, W., Cassiman, D., de Ledinghen, V., Varet, B., de Kerguenec, C., Oudin, C., Gourlaouen, I., Lefebvre, T., Férec, C., Callebaut, I., Le Gac, G., & French National Network for the Molecular Diagnosis of Inherited Iron Overload Disorders (2018) The SLC40A1 R178Q mutation is a recurrent cause of hemochromatosis and is associated with a novel pathogenic mechanism. *Haematologica*.
- Ka, C., Le Gac, G., Dupradeau, F.-Y., Rochette, J. & Férec, C. (2005) The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for the mutated 282Y HFE protein. *Human Genetics*, **117**, 467–475.
- Kappas, A., Drummond, G.S. & Galbraith, R.A. (1993) Prolonged clinical use of a heme oxygenase inhibitor: hematological evidence for an inducible but reversible iron-deficiency state. *Pediatrics*, **91**, 537–539.
- Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E. & Ganz, T. (2014) Identification of erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, **46**, 678–684.
- Kautz, L., Meynard, D., Monnier, A., Darnaud, V., Bouvet, R., Wang, R.-H., Deng, C., Vaulont, S., Mosser, J., Coppin, H. & Roth, M.-P. (2008) Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, **112**, 1503–1509.
- Kergourlay, V., Raï, G., Blandin, G., Salgado, D., Bérout, C., Lévy, N., Krahn, M. & Bartoli, M. (2014) Identification of Splicing Defects Caused by Mutations in the Dysferlin Gene. *Human Mutation*, **35**, 1532–1541.
- Kim, P., Yang, M., Yiya, K., Zhao, W. & Zhou, X. (2020) ExonSkipDB: functional annotation of exon skipping event in human. *Nucleic Acids Research*, **48**, D896–D907.
- Klei, T.R.L., Meinderts, S.M., van den Berg, T.K. & van Bruggen, R. (2017) From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Frontiers in Immunology*, **8**, 73.

- Kleven, M.D., Jue, S. & Enns, C.A. (2018) The Transferrin Receptors, TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry*, **57**, 1552–1559.
- Knutson, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J. & Wessling-Resnick, M. (2003) Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*, **102**, 4191–4197.
- Koch, P.-S., Olsavszky, V., Ulbrich, F., Sticht, C., Demory, A., Leibing, T., Henzler, T., Meyer, M., Zierow, J., Schneider, S., Breitkopf-Heinlein, K., Gaitantzi, H., Spencer-Dene, B., Arnold, B., Klapproth, K., Schledzewski, K., Goerdts, S. & Géraud, C. (2017) Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood*, **129**, 415–419.
- Kovtunovych, G., Eckhaus, M.A., Ghosh, M.C., Ollivierre-Wilson, H. & Rouault, T.A. (2010) Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*, **116**, 6054–6062.
- Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P. & Adermann, K. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters*, **480**, 147–150.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K. & Moestrup, S.K. (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, **409**, 198–201.
- Kumar, H., Kasho, V., Smirnova, I., Finer-Moore, J.S., Kaback, H.R. & Stroud, R.M. (2014) Structure of sugar-bound LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 1784–1788.
- Laarakkers, C.M.M., Wiegerinck, E.T., Klaver, S., Kolodziejczyk, M., Gille, H., Hohlbaum, A.M., Tjalsma, H. & Swinkels, D.W. (2013) Improved Mass Spectrometry Assay For Plasma Hepcidin: Detection and Characterization of a Novel Hepcidin Isoform. *PLoS ONE*, **8**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790851/> [Accessed August 20, 2019].
- Lakhal-Littleton, S., Wolna, M., Carr, C.A., Miller, J.J.J., Christian, H.C., Ball, V., Santos, A., Diaz, R., Biggs, D., Stillion, R., Holdship, P., Larner, F., Tyler, D.J., Clarke, K., Davies, B. & Robbins, P.A. (2015) Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 3164–3169.
- Latour, C., Kautz, L., Besson-Fournier, C., Island, M.-L., Canonne-Hergaux, F., Loréal, O., Ganz, T., Coppin, H. & Roth, M.-P. (2014) Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of epidermal growth factor receptor signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatology*, **59**, 683–694.
- Layrisse, M., Cook, J.D., Martinez, C., Roche, M., Kuhn, I.N., Walker, R.B. & Finch, C.A. (1969) Food iron absorption: a comparison of vegetable and animal foods. *Blood*, **33**, 430–443.
- Le Gac, G., Dupradeau, F.-Y., Mura, C., Jacolot, S., Scotet, V., Esnault, G., Mercier, A.-Y., Rochette, J. & Férec, C. (2003) Phenotypic expression of the C282Y/Q283P compound heterozygosity in HFE and molecular modeling of the Q283P mutation effect. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **30**, 231–237.
- Le Gac, G. & Férec, C. (2005) The molecular genetics of haemochromatosis. *European Journal of Human Genetics*, **13**, 1172–1185.

- Le Gac, G., Ka, C., Joubrel, R., Gourlaouen, I., Lehn, P., Mornon, J.-P., Férec, C. & Callebaut, I. (2013) Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Human Mutation*, **34**, 1371–1380.
- Le Gac, G., Mons, F., Jacolot, S., Scotet, V., Férec, C. & Frébourg, T. (2004a) Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent. *British Journal of Haematology*, **125**, 674–678.
- Le Gac, G., Scotet, V., Ka, C., Gourlaouen, I., Bryckaert, L., Jacolot, S., Mura, C. & Férec, C. (2004b) The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Human Molecular Genetics*, **13**, 1913–1918.
- Le Lan, C., Mosser, A., Ropert, M., Detivaud, L., Loustaud–Ratti, V., Vital–Durand, D., Roget, L., Bardou–Jacquet, E., Turlin, B., David, V., Loréal, O., Deugnier, Y., Brissot, P. & Jouanolle, A. (2011) Sex and Acquired Cofactors Determine Phenotypes of Ferroportin Disease. *Gastroenterology*, **140**, 1199-1207.e2.
- Le Tertre, M., Ka, C., Guellec, J., Gourlaouen, I., Férec, C., Callebaut, I. & Le Gac, G. (2017) Deciphering the molecular basis of ferroportin resistance to hepcidin: Structure/function analysis of rare SLC40A1 missense mutations found in suspected hemochromatosis type 4 patients. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*.
- Lee, P.L., Gelbart, T., West, C. & Barton, J.C. (2007) SLC40A1 c.1402G-->a results in aberrant splicing, ferroportin truncation after glycine 330, and an autosomal dominant hemochromatosis phenotype. *Acta Haematologica*, **118**, 237–241.
- Leidgens, S., Bullough, K.Z., Shi, H., Li, F., Shakoury-Elizeh, M., Yabe, T., Subramanian, P., Hsu, E., Natarajan, N., Nandal, A., Stemmler, T.L. & Philpott, C.C. (2013) Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 17791–17802.
- Létocart, E., Le Gac, G., Majore, S., Ka, C., Radio, F.C., Gourlaouen, I., De Bernardo, C., Férec, C. & Grammatico, P. (2009) A novel missense mutation in *SLC40A1* results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases. *British Journal of Haematology*, **147**, 379–385.
- Li, S., Yang, Y. & Li, W. (2020) Human ferroportin mediates proton-coupled active transport of iron. *Blood Advances*, **4**, 4758–4768.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N. & Chesnut, J.D. (2017) Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of Biotechnology*, **241**, 136–146.
- Lim, P.J., Duarte, T.L., Arezes, J., Garcia-Santos, D., Hamdi, A., Pasricha, S.-R., Armitage, A.E., Mehta, H., Wideman, S., Santos, A.G., Santos-Gonçalves, A., Morovat, A., Hughes, J.R., Soilleux, E., Wang, C.-Y., Bayer, A.L., Klenerman, P., Willberg, C.B., Hartley, R.C., Murphy, M.P., et al (2019) Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nature metabolism*, **1**, 519–531.
- Lindley, P.F., Card, G., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Reinhammar, B., Selin-Lindgren, E. & Yoshida, K. (1997) An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2**, 454–463.

- Liu, X.-B., Yang, F. & Haile, D.J. (2005) Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **35**, 33–46.
- Liuzzi, J.P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M.D. & Cousins, R.J. (2006) Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13612–13617.
- van de Loo, J.W., Creemers, J.W., Bright, N.A., Young, B.D., Roebroek, A.J. & Van de Ven, W.J. (1997) Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 27116–27123.
- Lu, L.-N., Qian, Z.-M., Wu, K.-C., Yung, W.-H. & Ke, Y. (2017) Expression of Iron Transporters and Pathological Hallmarks of Parkinson's and Alzheimer's Diseases in the Brain of Young, Adult, and Aged Rats. *Molecular Neurobiology*, **54**, 5213–5224.
- Lutz, H.U., Bussolino, F., Flepp, R., Fasler, S., Stammler, P., Kazatchkine, M.D. & Arese, P. (1987) Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7368–7372.
- Lymboussaki, A., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Haile, D.J. & Pietrangelo, A. (2003) The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *Journal of Hepatology*, **39**, 710–715.
- Madejczyk, M.S. & Ballatori, N. (2012) The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1818**, 651–657.
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U. & Kiese, S. (2009) Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98**, 2909–2934.
- Majumdar, D.S., Smirnova, I., Kasho, V., Nir, E., Kong, X., Weiss, S. & Kaback, H.R. (2007) Single-molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12640–12645.
- Mancias, J.D., Pontano Vaites, L., Nissim, S., Biancur, D.E., Kim, A.J., Wang, X., Liu, Y., Goessling, W., Kimmelman, A.C. & Harper, J.W. (2015) Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis. *eLife*, **4**.
- Mancias, J.D., Wang, X., Gygi, S.P., Harper, J.W. & Kimmelman, A.C. (2014) Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, **509**, 105–109.
- Marro, S., Chiabrando, D., Messina, E., Stolte, J., Turco, E., Tolosano, E. & Muckenthaler, M.U. (2010) Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*, **95**, 1261–1268.
- Martens, C., Shekhar, M., Borysik, A.J., Lau, A.M., Reading, E., Tajkhorshid, E., Booth, P.J. & Politis, A. (2018) Direct protein-lipid interactions shape the conformational landscape of secondary transporters. *Nature Communications*, **9**, 4151.
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M.C., Vaulont, S. & Peyssonnaud, C. (2009) HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **119**, 1159–1166.

- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. & Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271–275.
- Mayr, R., Griffiths, W.J.H., Hermann, M., McFarlane, I., Halsall, D.J., Finkenstedt, A., Douds, A., Davies, S.E., Janecke, A.R., Vogel, W., Cox, T.M. & Zoller, H. (2011) Identification of Mutations in SLC40A1 That Affect Ferroportin Function and Phenotype of Human Ferroportin Iron Overload. *Gastroenterology*, **140**, 2056-2063.e1.
- Mayr, R., Janecke, A.R., Schranz, M., Griffiths, W.J.H., Vogel, W., Pietrangelo, A. & Zoller, H. (2010) Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *Journal of Hepatology*, **53**, 941–949.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F. & Simpson, R.J. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (New York, N.Y.)*, **291**, 1755–1759.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W. & Simpson, R.J. (2000) A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell*, **5**, 299–309.
- Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H. & Roth, M.-P. (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature Genetics*, **41**, 478–481.
- Mitchell, C.J., Shawki, A., Ganz, T., Nemeth, E. & Mackenzie, B. (2014) Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **306**, C450–C459.
- Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C.C., Gasparini, P., Andrews, N.C. & Pietrangelo, A. (2001) Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *The Journal of Clinical Investigation*, **108**, 619–623.
- Moreno-Carralero, M.-I., Muñoz-Muñoz, J.-A., Cuadrado-Grande, N., López-Rodríguez, R., José Hernández-Alfaro, M., del-Castillo-Rueda, A., Enríquez-de-Salamanca, R., Méndez, M. & Morán-Jiménez, M.-J. (2014) A novel mutation in the SLC40A1 gene associated with reduced iron export in vitro. *American Journal of Hematology*, **89**, 689–694.
- Morrison, E.D., Brandhagen, D.J., Phatak, P.D., Barton, J.C., Krawitt, E.L., El-Serag, H.B., Gordon, S.C., Galan, M.V., Tung, B.Y., Ioannou, G.N. & Kowdley, K.V. (2003) Serum Ferritin Level Predicts Advanced Hepatic Fibrosis among U.S. Patients with Phenotypic Hemochromatosis. *Annals of Internal Medicine*, **138**, 627–633.
- Muckenthaler, M.U., Rivella, S., Hentze, M.W. & Galy, B. (2017) A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, **168**, 344–361.
- Nemeth, E., Preza, G.C., Jung, C.-L., Kaplan, J., Waring, A.J. & Ganz, T. (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*, **107**, 328–333.

- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K. & Ganz, T. (2004a) IL-6 mediates hypoferraemia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation*, **113**, 1271–1276.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T. & Kaplan, J. (2004b) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 2090–2093.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. & Vaulont, S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8780–8785.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A. & Vaulont, S. (2002a) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4596–4601.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A. & Vaulont, S. (2002b) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**, 1037–1044.
- Njajou, O.T., Vaessen, N., Joesse, M., Berghuis, B., van Dongen, J.W., Breuning, M.H., Snijders, P.J., Rutten, W.P., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., van Duijn, C.M. & Heutink, P. (2001) A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nature Genetics*, **28**, 213–214.
- Nomura, N., Verdon, G., Kang, H.J., Shimamura, T., Nomura, Y., Sonoda, Y., Hussien, S.A., Qureshi, A.A., Coincon, M., Sato, Y., Abe, H., Nakada-Nakura, Y., Hino, T., Arakawa, T., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Murata, T., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Kasahara, M., et al (2015) Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. *Nature*, **526**, 397–401.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E. & Fleming, M.D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics*, **37**, 1264–1269.
- Olynyk, J.K., Hagan, S.E., Cullen, D.J., Beilby, J. & Whittall, D.E. (2004) Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busseton population: a 17-year study. *Mayo Clinic Proceedings*, **79**, 309–313.
- Ong, S.Y., Nicoll, A.J. & Delatycki, M.B. (2016) How should hyperferritinaemia be investigated and managed? *European Journal of Internal Medicine*, **33**, 21–27.
- Pankow, J.S., Boerwinkle, E., Adams, P.C., Guallar, E., Leiendecker-Foster, C., Rogowski, J. & Eckfeldt, J.H. (2008) HFE C282Y homozygotes have reduced low-density lipoprotein cholesterol: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **152**, 3–10.
- Pantopoulos, K., Porwal, S.K., Tartakoff, A. & Devireddy, L. (2012) Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, **51**, 5705–5724.
- Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. (2017) Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB life*, **69**, 399–413.

- Papanikolaou, G., Samuels, M.E., Ludwig, E.H., MacDonald, M.L.E., Franchini, P.L., Dubé, M.-P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J.K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radomski, C.C., Pape, T.D., Davidas, O., Christakis, J., Brissot, P., et al (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nature Genetics*, **36**, 77–82.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J. & Ganz, T. (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7806–7810.
- Paterson, S., Armstrong, N.J., Iacopetta, B.J., McArdle, H.J. & Morgan, E.H. (1984) Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells. *Journal of Cellular Physiology*, **120**, 225–232.
- Pelucchi, S., Mariani, R., Salvioni, A., Bonfadini, S., Riva, A., Bertola, F., Trombini, P. & Piperno, A. (2008) Novel mutations of the ferroportin gene (SLC40A1): analysis of 56 consecutive patients with unexplained iron overload. *Clinical Genetics*, **73**, 171–178.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45.
- Pietrangelo, A. (2007) Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **46**, 1291–1301.
- Pietrangelo, A. (2017) Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica*, **102**, 1972–1984.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. & Loréal, O. (2001) A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7811–7819.
- Pinnix, Z.K., Miller, L.D., Wang, W., D’Agostino, R., Kute, T., Willingham, M.C., Hatcher, H., Tesfay, L., Sui, G., Di, X., Torti, S.V. & Torti, F.M. (2010) Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis. *Science translational medicine*, **2**, 43ra56.
- Piperno, A., Pelucchi, S. & Mariani, R. (2020) Inherited iron overload disorders. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, **5**, 25.
- Porter, J., Kowdley, K., Taher, A., Vacirca, J., Shen, Z., Chen, S., Chawla, L. & Tidmarsh, G. (2018) Effect of Ljpc-401 (synthetic human hepcidin) on Iron Parameters in Healthy Adults. *Blood*, **132**, 2336–2336.
- Poss, K.D. & Tonegawa, S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10919–10924.
- Praschberger, R., Schranz, M., Griffiths, W.J.H., Baumgartner, N., Hermann, M., Lomas, D.J., Pietrangelo, A., Cox, T.M., Vogel, W. & Zoller, H. (2014) Impact of D181V and A69T on the function of ferroportin as an iron export pump and hepcidin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1842**, 1406–1412.
- Preza, G.C., Ruchala, P., Pinon, R., Ramos, E., Qiao, B., Peralta, M.A., Sharma, S., Waring, A., Ganz, T. & Nemeth, E. (2011) Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 4880–4888.

- Qiao, B., Sugianto, P., Fung, E., del-Castillo-Rueda, A., Moran-Jimenez, M.-J., Ganz, T. & Nemeth, E. (2012) Heparin-Induced Endocytosis of Ferroportin Is Dependent on Ferroportin Ubiquitination. *Cell Metabolism*, **15**, 918–924.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H. & Goldman, I.D. (2006) Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell*, **127**, 917–928.
- Quistgaard, E.M., Löw, C., Guettou, F. & Nordlund, P. (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **17**, 123–132.
- Raha, A.A., Vaishnav, R.A., Friedland, R.P., Bomford, A. & Raha-Chowdhury, R. (2013) The systemic iron-regulatory proteins hepcidin and ferroportin are reduced in the brain in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, **1**, 55.
- Ramos, E., Ruchala, P., Goodnough, J.B., Kautz, L., Preza, G.C., Nemeth, E. & Ganz, T. (2012) Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood*, **120**, 3829–3836.
- Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., Zammataro, L., Girelli, D. & Cairo, G. (2010) Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *European Journal of Immunology*, **40**, 824–835.
- van Renswoude, J., Bridges, K.R., Harford, J.B. & Klausner, R.D. (1982) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 6186–6190.
- Rice, A.E., Mendez, M.J., Hokanson, C.A., Rees, D.C. & Björkman, P.J. (2009) Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *Journal of Molecular Biology*, **386**, 717–732.
- Richard, F., Lier, J.J. van, Roubert, B., Haboubi, T., Göhring, U.-M. & Dürrenberger, F. (2020) Oral ferroportin inhibitor VIT-2763: First-in-human, phase 1 study in healthy volunteers. *American Journal of Hematology*, **95**, 68–77.
- Rishi, G., Secondes, E.S., Wallace, D.F. & Subramaniam, V.N. (2020) Evidence for dimerization of ferroportin in a human hepatic cell line using proximity ligation assays. *Bioscience Reports*, **40**.
- Rochette, J., Le Gac, G., Lassoued, K., Férec, C. & Robson, K.J.H. (2010) Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Human Genetics*, **128**, 233–248.
- Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D. & Camaschella, C. (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature Genetics*, **33**, 21–22.
- Rombout-Sestrienkova, E., van Kraaij, M.G.J. & Koek, G.H. (2016) How we manage patients with hereditary haemochromatosis. *British Journal of Haematology*, **175**, 759–770.
- Ross, S., Tran, L., Winters, A., Lee, K.-J., Plewa, C., Foltz, I., King, C., Miranda, L., Allen, J., Beckman, H., Cooke, K., Moody, G., Sasu, B., Nemeth, E., Ganz, T., Molineux, G. & Arvedson, T. (2012)

- Molecular Mechanism of Heparin-Mediated Ferroportin Internalization Requires Ferroportin Lysines, Not Tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metabolism*, **15**, 905–917.
- Sabelli, M., Montosi, G., Garuti, C., Caleffi, A., Oliveto, S., Biffo, S. & Pietrangelo, A. (2017) Human macrophage ferroportin biology and the basis for the ferroportin disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **65**, 1512–1525.
- Sangokoya, C., Doss, J.F. & Chi, J.-T. (2013) Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. *PLoS genetics*, **9**, e1003408.
- Santos, P.C.J.L., Cançado, R.D., Pereira, A.C., Schettert, I.T., Soares, R.A.G., Pagliusi, R.A., Hirata, R.D.C., Hirata, M.H., Teixeira, A.C., Figueiredo, M.S., Chiattonne, C.S., Krieger, J.E. & Guerra-Shinohara, E.M. (2011) Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **46**, 302–307.
- Schimanski, L.M., Drakesmith, H., Merryweather-Clarke, A.T., Viprakasit, V., Edwards, J.P., Sweetland, E., Bastin, J.M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K.J.H. & Townsend, A.R.M. (2005) In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood*, **105**, 4096–4102.
- Schimanski, L.M., Drakesmith, H., Talbott, C., Horne, K., James, J.R., Davis, S.J., Sweetland, E., Bastin, J., Cowley, D. & Townsend, A.R.M. (2008) Ferroportin: lack of evidence for multimers. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **40**, 360–369.
- Schmidt, P.J., Toudjarska, I., Sendamarai, A.K., Racie, T., Milstein, S., Bettencourt, B.R., Hettinger, J., Bumcrot, D. & Fleming, M.D. (2013) An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe^{-/-} mice and ameliorates anemia and iron overload in murine β -thalassemia intermedia. *Blood*, **121**, 1200–1208.
- Schroit, A.J., Madsen, J.W. & Tanaka, Y. (1985) In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 5131–5138.
- Scotet, V., Mérour, M.-C., Mercier, A.-Y., Chanu, B., Le Faou, T., Raguénes, O., Le Gac, G., Mura, C., Nouisbaum, J.-B. & Férec, C. (2003) Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *American Journal of Epidemiology*, **158**, 129–134.
- Scotti, M.M. & Swanson, M.S. (2016) RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews. Genetics*, **17**, 19–32.
- Semenza, G.L., Neufeld, M.K., Chi, S.M. & Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 5680–5684.
- Shanmugam, N.K.N., Chen, K. & Cherayil, B.J. (2015) Commensal Bacteria-induced Interleukin 1 β (IL-1 β) Secreted by Macrophages Up-regulates Heparin Expression in Hepatocytes by Activating the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 30637–30647.
- Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E., Gwynn, B., Lambert, A.J., Wingert, R.A., Traver, D., Trede, N.S., Barut, B.A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M.J., Peters, L.L., Kaplan, J., et al (2006) Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, **440**, 96–100.

- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. & McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, **122**, 789–801.
- Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L. & Philpott, C.C. (2008) A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, N.Y.)*, **320**, 1207–1210.
- Sica, A. & Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**, 787–795.
- Silvestri, L., Nai, A., Dulja, A. & Pagani, A. (2019) Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitamins and Hormones*, **110**, 71–99.
- Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J. & Camaschella, C. (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, **8**, 502–511.
- Smirnova, I., Kasho, V., Choe, J.-Y., Altenbach, C., Hubbell, W.L. & Kaback, H.R. (2007) Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 16504–16509.
- Solcan, N., Kwok, J., Fowler, P.W., Cameron, A.D., Drew, D., Iwata, S. & Newstead, S. (2012) Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *The EMBO Journal*, **31**, 3411–3421.
- Soukarieh, O., Gaildrat, P., Hamieh, M., Drouet, A., Baert-Desurmont, S., Frébourg, T., Tosi, M. & Martins, A. (2016) Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLoS genetics*, **12**, e1005756.
- Stefanova, D., Raychev, A., Deville, J., Humphries, R., Campeau, S., Ruchala, P., Nemeth, E., Ganz, T. & Bulut, Y. (2018) Hepcidin Protects against Lethal Escherichia coli Sepsis in Mice Inoculated with Isolates from Septic Patients. *Infection and Immunity*, **86**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6013672/> [Accessed November 18, 2019].
- Steinbicker, A.U., Bartnikas, T.B., Lohmeyer, L.K., Leyton, P., Mayeur, C., Kao, S.M., Pappas, A.E., Peterson, R.T., Bloch, D.B., Yu, P.B., Fleming, M.D. & Bloch, K.D. (2011) Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood*, **118**, 4224–4230.
- Stelzl, L.S., Fowler, P.W., Sansom, M.S.P. & Beckstein, O. (2014) Flexible gates generate occluded intermediates in the transport cycle of LacY. *Journal of Molecular Biology*, **426**, 735–751.
- Su, M.A., Trenor, C.C., Fleming, J.C., Fleming, M.D. & Andrews, N.C. (1998) The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, **92**, 2157–2163.
- Takami, A., Tatsumi, Y., Sakai, K., Toki, Y., Ikuta, K., Oohigashi, Y., Takagi, J., Kato, K. & Takami, K. (2020) Juvenile Hemochromatosis: A Case Report and Review of the Literature. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **13**,
- Taniguchi, R., Kato, H.E., Font, J., Deshpande, C.N., Wada, M., Ito, K., Ishitani, R., Jormakka, M. & Nureki, O. (2015) Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nature Communications*, **6**, 8545.

- Taylor, M., Qu, A., Anderson, E.R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F.J. & Shah, Y.M. (2011) Hypoxia-Inducible Factor-2 α Mediates the Adaptive Increase of Intestinal Ferroportin During Iron Deficiency in Mice. *Gastroenterology*, **140**, 2044–2055.
- Tjelle, T.E., Løvdal, T. & Berg, T. (2000) Phagosome dynamics and function. *BioEssays*, **22**, 255–263.
- Tortosa, V., Bonaccorsi di Patti, M.C., Iacovelli, F., Pasquadibisceglie, A., Falconi, M., Musci, G. & Politicelli, F. (2020) Dynamical Behavior of the Human Ferroportin Homologue from *Bdellovibrio bacteriovorus*: Insight into the Ligand Recognition Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**,.
- Traeger, L., Enns, C.A., Krijt, J. & Steinbicker, A.U. (2018) The hemochromatosis protein HFE signals predominantly via the BMP type I receptor ALK3 in vivo. *Communications Biology*, **1**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6123693/> [Accessed January 18, 2020].
- Tsai, S.Q. & Joung, J.K. (2016) Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nature Reviews. Genetics*, **17**, 300–312.
- Tsuji, Y. (2020) Transmembrane protein western blotting: Impact of sample preparation on detection of SLC11A2 (DMT1) and SLC40A1 (ferroportin). *PLoS One*, **15**, e0235563.
- Unkles, S.E., Karabika, E., Symington, V.F., Cecile, J.L., Rouch, D.A., Akhtar, N., Cromer, B.A. & Kinghorn, J.R. (2012) Alanine scanning mutagenesis of a high-affinity nitrate transporter highlights the requirement for glycine and asparagine residues in the two nitrate signature motifs. *The Biochemical Journal*, **447**, 35–42.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K. & Musílek, K. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, **90**, 1–37.
- Viitanen, P., Garcia, M.L. & Kaback, H.R. (1984) Purified reconstituted lac carrier protein from *Escherichia coli* is fully functional. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 1629–1633.
- Vishwakarma, P., Banerjee, A., Pasrija, R., Prasad, R. & Lynn, A.M. (2018) Phylogenetic and conservation analyses of MFS transporters. *3 Biotech*, **8**, 462.
- Vlasveld, L.T., Janssen, R., Bardou-Jacquet, E., Venselaar, H., Hamdi-Roze, H., Drakesmith, H. & Swinkels, D.W. (2019) Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **12**,.
- Vlasveld, L.T. & Swinkels, D.W. (2018) Loss-of-function ferroportin disease: novel mechanistic insights and unanswered questions. *Haematologica*, **103**, 1753–1755.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J. & Anderson, G.J. (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genetics*, **21**, 195–199.
- Wallace, D.F., Harris, J.M. & Subramaniam, V.N. (2010) Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **298**, C75-84.

- Wallace, D.F. & Subramaniam, V.N. (2016) The global prevalence of *HFE* and non-*HFE* hemochromatosis estimated from analysis of next-generation sequencing data. *Genetics in Medicine*, **18**, 618–626.
- Wang, C.-Y. & Babitt, J.L. (2019) Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*, **133**, 18–29.
- Wang, C.-Y., Core, A.B., Canali, S., Zumbrennen-Bullough, K.B., Ozer, S., Umans, L., Zwijsen, A. & Babitt, J.L. (2017) Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood*, **130**, 73–83.
- Wang, C.-Y., Xu, Y., Traeger, L., Dogan, D.Y., Xiao, X., Steinbicker, A.U. & Babitt, J.L. (2019) Erythroferrone lowers hepcidin by sequestering BMP2/6 heterodimer from binding to the BMP type I receptor ALK3. *Blood*.
- Wang, F., Paradkar, P.N., Custodio, A.O., McVey Ward, D., Fleming, M.D., Campagna, D., Roberts, K.A., Boyartchuk, V., Dietrich, W.F., Kaplan, J. & Andrews, N.C. (2007) Genetic variation in Mon1a affects protein trafficking and modifies macrophage iron loading in mice. *Nature Genetics*, **39**, 1025–1032.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. & Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 5510–5514.
- Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L. & Deng, C.-X. (2005) A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, **2**, 399–409.
- White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapierre, A., Ward, D.M., Liu, P., Fleming, M.D. & Hamza, I. (2013) HRG1 Is Essential for Heme Transport from the Phagolysosome of Macrophages during Erythrophagocytosis. *Cell Metabolism*, **17**, 261–270.
- Willemetz, A., Beatty, S., Richer, E., Rubio, A., Auriac, A., Milkereit, R.J., Thibaudeau, O., Vaulont, S., Malo, D. & Canonne-Hergaux, F. (2017) Iron- and Hepcidin-Independent Downregulation of the Iron Exporter Ferroportin in Macrophages during Salmonella Infection. *Frontiers in Immunology*, **8**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410627/> [Accessed April 27, 2020].
- Wrighting, D.M. & Andrews, N.C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, **108**, 3204–3209.
- Wu, J., Zhang, L., Wu, S., Yi, X. & Liu, Z. (2020) miR-194-5p inhibits SLC40A1 expression to induce cisplatin resistance in ovarian cancer. *Pathology - Research and Practice*, **216**, 152979.
- Wu, Q., Sun, C.C., Lin, H.Y. & Babitt, J.L. (2012) Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One*, **7**, e46307.
- Wu, X.-G., Wang, Y., Wu, Q., Cheng, W.-H., Liu, W., Zhao, Y., Mayeur, C., Schmidt, P.J., Yu, P.B., Wang, F. & Xia, Y. (2014) HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*, **124**, 1335–1343.

- Xia, Y., Babitt, J.L., Sidis, Y., Chung, R.T. & Lin, H.Y. (2008) Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood*, **111**, 5195–5204.
- XUE, D., ZHOU, C.-X., SHI, Y.-B., LU, H. & HE, X.-Z. (2015) Decreased expression of ferroportin in prostate cancer. *Oncology Letters*, **10**, 913–916.
- Yan, N. (2013) Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, **38**, 151–159.
- Yan, N. (2015) Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, **44**, 257–283.
- Yanatori, I., Richardson, D.R., Imada, K. & Kishi, F. (2016) Iron Export through the Transporter Ferroportin 1 Is Modulated by the Iron Chaperone PCBP2. *The Journal of Biological Chemistry*, **291**, 17303–17318.
- Yanatori, I., Yasui, Y., Tabuchi, M. & Kishi, F. (2014) Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochemical Journal*, **462**, 25–37.
- Yang, Q., Liu, W., Zhang, S. & Liu, S. (2020) The cardinal roles of ferroportin and its partners in controlling cellular iron in and out. *Life Sciences*, **258**, 118135.
- Yao, Y., Xu, X.-H. & Jin, L. (2019) Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, **10**, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6476302/> [Accessed September 30, 2020].
- Zarif, J.C., Hernandez, J.R., Verdone, J.E., Campbell, S.P., Drake, C.G. & Pienta, K.J. (2016) A phased strategy to differentiate human CD14+ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells. *BioTechniques*, **61**, 33–41.
- Zhang, A.-S., Anderson, S.A., Wang, J., Yang, F., DeMaster, K., Ahmed, R., Nizzi, C.P., Eisenstein, R.S., Tsukamoto, H. & Enns, C.A. (2011) Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood*, **117**, 1687–1699.
- Zhang, D.-L., Ghosh, M.C., Ollivierre, H., Li, Y. & Rouault, T.A. (2018a) Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood*, **132**, 2078–2087.
- Zhang, D.-L., Hughes, R.M., Ollivierre-Wilson, H., Ghosh, M.C. & Rouault, T.A. (2009) A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron-Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metabolism*, **9**, 461–473.
- Zhang, D.-L., Wu, J., Shah, B.N., Greutelaers, K.C., Ghosh, M.C., Ollivierre, H., Su, X.-Z., Thuma, P.E., Bedu-Addo, G., Mockenhaupt, F.P., Gordeuk, V.R. & Rouault, T.A. (2018b) Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science (New York, N.Y.)*, **359**, 1520–1523.
- Zhao, N., Nizzi, C.P., Anderson, S.A., Wang, J., Ueno, A., Tsukamoto, H., Eisenstein, R.S., Enns, C.A. & Zhang, A.-S. (2015) Low intracellular iron increases the stability of matriptase-2. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 4432–4446.

- Zhou, Y., Guan, L., Freitas, J.A. & Kaback, H.R. (2008) Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 3774–3778.
- Zhou, Y., Zhang, H. & Wei, W. (2016) Simultaneous generation of multi-gene knockouts in human cells. *FEBS letters*, **590**, 4343–4353.
- Zohn, I.E., De Domenico, I., Pollock, A., Ward, D.M., Goodman, J.F., Liang, X., Sanchez, A.J., Niswander, L. & Kaplan, J. (2007) The flatiron mutation in mouse ferroportin acts as a dominant negative to cause ferroportin disease. *Blood*, **109**, 4174–4180.
- Zucker, M., Rosenberg, N., Peretz, H., Green, D., Bauduer, F., Zivelin, A. & Seligsohn, U. (2011) Point mutations regarded as missense mutations cause splicing defects in the factor XI gene. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **9**, 1977–1984.
- Zumerle, S., Mathieu, J.R.R., Delga, S., Heinis, M., Viatte, L., Vaulont, S. & Peyssonnaud, C. (2014) Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype. *Blood*, **123**, 3646–3650.

Titre : Analyses structurales et fonctionnelles de la ferroportine humaine et mécanismes moléculaires associés à l'hémochromatose de type 4

Mots clés : Métabolisme du fer, hémochromatose de type 4, hétérogénéité phénotypique, ferroportine, hepcidine, protéines MFS

Résumé : L'hémochromatose de type 4 (HC4) est considérée comme l'une des formes les plus communes de surcharge en fer héréditaire après l'hémochromatose de type 1. Elle est associée à des mutations hétérozygotes du gène *SLC40A1* qui code la seule protéine exportatrice de fer : la ferroportine (FPN), un transporteur MFS (« Major Facilitator Superfamily ») régulé de manière systémique par l'hepcidine. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'hétérogénéité phénotypique observée dans l'HC4 en faisant l'hypothèse de mécanismes moléculaires originaux et en cherchant à établir des liens avec l'étude des mécanismes d'export du fer et de régulation par l'hepcidine de FPN. Au travers d'études structure/fonction, j'ai participé à l'identification de liaisons non covalentes intra- et inter-lobes qui stabilisent FPN dans une conformation « outward-facing » (ouverte vers le milieu

extérieur) et participent à la dynamique de la « gate » intracellulaire. Plusieurs acides aminés impliqués dans ces interactions sont mutés chez des patients atteints d'HC4. Ces études ont également permis d'explorer le rôle particulier de l'acide aspartique 325 dans la coordination du fer mais aussi de confirmer l'existence de mécanismes différents de résistance à l'hepcidine et de suggérer l'hypothèse de variants ambivalents (perte et gain de fonction). Enfin, j'ai identifié deux mutations faux-sens qui modifient l'épissage du pré-ARN messager *SLC40A1*. Une partie de ma thèse a été consacrée à la mise en place d'un modèle cellulaire macrophagique basé sur une édition génique de cellules THP-1 par CRISPR-Cas9. Bien que difficile à faire progresser, cette partie s'est révélée particulièrement formatrice.

Title : Structural and functional analyses of human ferroportin and molecular mechanisms associated with hemochromatosis type 4

Keywords : Iron metabolism, hemochromatosis type 4, phenotypic heterogeneity, ferroportin, hepcidin, MFS proteins

Abstract : Hemochromatosis type 4 (HC4) is considered as one of the most common forms of inherited iron overload after hemochromatosis type 1. It is associated with heterozygous mutations in the *SLC40A1* gene which encodes the sole iron exporter in mammals: ferroportin (FPN), an MFS (Major Facilitator Superfamily) transporter regulated at the systemic level by hepcidin. During my thesis, I was interested in HC4 phenotypic heterogeneity, by hypothesizing novel molecular mechanisms and by seeking to establish links with FPN iron export mechanism and its regulation by hepcidin. Using structure-function studies, I have contributed to identify intra- and inter-domains noncovalent bonds which stabilize FPN "outward-facing" conformation (open to external compartment)

and participate in the intracellular gate dynamics. Several amino acids involved in these interactions are mutated in HC4 patients. Moreover, these studies have allowed us to explore the particular role of aspartic acid 325 in iron coordination. We have confirmed the existence of different hepcidin resistance mechanisms and have suggested an ambivalent type of variants (loss and gain of function). Finally, I have identified two missense mutations with *SLC40A1* pre-mRNA splicing consequences. Last but not least, my thesis was dedicated to the generation of a macrophage cell model, based on THP-1 cells and gene editing by CRISPR-Cas9. While this last section proved to be challenging, it was a good learning and practicing opportunity.