

# 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 :**

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

**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.