

Université de Sherbrooke

Spécificité enzymatique et régulation fonctionnelle de la matriptase-2, une protéase à sérine transmembranaire de type II essentielle à l'homéostasie du fer

Par
François Béliveau
Département de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph.D.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2012

Membres du jury d'évaluation :

Dr Richard Leduc
Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Dr Jean-Bernard Denault
Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Dr Simon Labbé
Département de biochimie, Université de Sherbrooke

Dr Manuela M. Santos
Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal

©François Béliveau, 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-93249-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-93249-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Spécificité enzymatique et régulation fonctionnelle de la matriptase-2, une protéase à sérine transmembranaire de type II essentielle à l'homéostasie du fer

par

François Béliveau

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *philosophiæ doctor* (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les protéases à sérine transmembranaires de type II (TTSP) forment une famille d'enzymes protéolytiques nouvellement identifiée dont les rôles physiologiques restent encore peu connus. Ces enzymes seraient, entre autres, impliqués dans la formation des tissus et leur dérégulation est reliée à de nombreux types de cancers. Récemment, une fonction essentielle dans la régulation de l'homéostasie du fer a été attribuée à l'un de ses membres, la matriptase-2 (TMPRSS6). Cet enzyme exerce ce rôle en contrôlant l'expression de l'hepcidine, une hormone importante dans la régulation du fer. Afin de mieux comprendre cette fonction de la matriptase-2, dans ce travail nous avons comparé ses propriétés enzymatiques à celles de trois autres TTSP ainsi qu'analyser son mécanisme de régulation fonctionnel.

Nous démontrons que la matriptase-2 possède des préférences de substrats distinctes. Sa spécificité a été comparée à celles de la matriptase, de l'hepsine et de DESC1 en utilisant des peptides-substrats à fluorescence séquestrée. La séquence des peptides utilisés est basée sur la région P4 à P4' de la séquence d'activation de la matriptase (RQAR↓VVG). Les positions P4, P3, P2 et P1' ont été substituées par des acides aminés de natures différentes (non-polaire, aromatique, acide et basique) alors que la position P1 a été fixée à Arg. Des quatre TTSP étudiées, la matriptase-2 est la plus permissive alors que la matriptase est la plus discriminante. DESC1 possède une préférence similaire à celle de la matriptase, mais avec une tendance pour les petits acides aminés non-polaires (Ala) en P1'. En présence de serpines, seulement AT III démontre une activité d'inhibition robuste. La matriptase-2 ainsi que l'hepsine et DESC1 sont aussi fortement inhibées en présence de PAI-1 et de α_2 -AP. La matriptase-2 est aussi la seule à présenter une inhibition par certains des substrats.

Nous démontrons aussi l'importance de la régulation de la matriptase-2 à la membrane plasmique dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine. Nous rapportons que la matriptase-2 subit une internalisation constitutive dans les cellules HEK293 transfectées ainsi que dans deux lignées cellulaires hépatiques humaines, les HepG2 et les hépatocytes primaires, tous les deux exprimant la matriptase-2 endogènement. La matriptase-2 marquée à la surface cellulaire est internalisée puis détectée dans des vésicules contenant de la clathrine et la protéine AP-2 pour ensuite se retrouver dans les endosomes précoces puis les lysosomes. L'internalisation de la matriptase-2 dépend de résidus spécifiques situés dans la portion amino-terminale de sa queue cytoplasmique, comme le démontre les résultats de la mutagenèse dirigée de ces résidus. Les cellules qui expriment ces mutants produisent des niveaux significativement diminués d'hepcidine comparées à celles exprimant la forme sauvage car les formes mutantes s'accumulent à la surface cellulaire et clivent davantage l'hémojuvéline.

Mots-clés : TTSP, protéase, matriptase-2, TMPRSS6, spécificité enzymatique, internalisation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
1 INTRODUCTION	1
1.1 Les enzymes.	1
1.1.1 La réaction enzymatique	1
1.1.1.1 La cinétique de Michaelis-Menten	1
1.1.2 Modulation de l'activité enzymatique	2
1.1.2.1 Environnement de l'enzyme	3
1.1.2.2 Modulation allostérique.	3
1.1.2.3 Inhibiteurs	4
1.1.3 Classification	5
1.2 Les protéases	5
1.2.1 Nomenclature de Schechter et Berger	6
1.2.2 Les protéases à sérine.	6
1.2.2.1 Mécanisme catalytique	8
1.2.2.2 Spécificité enzymatique	9
1.2.2.3 Les protéases à sérine de la famille S1	11
1.2.2.4 Les protéases à sérine ancrées à la membrane cellulaire.	12
1.3 Les protéases à sérine transmembranaires de type II	12
1.3.1 Classification	12
1.3.2 Propriétés biochimiques	16
1.3.3 Fonctions physiologiques.	17
1.3.4 Implications pathologiques.	19
1.3.4.1 Progression de la tumorigenèse	19
1.3.4.2 Activation des virus de l'influenza	20
1.3.4.3 Surdité	21
1.3.4.4 Anémie	21
1.4 La régulation du fer par la matriptase-2	21
1.4.1 La matriptase-2	21
1.4.2 Le fer chez les organismes vivants	23
1.4.3 Régulation du fer dans l'organisme.	23

1.4.4	Contrôle de la libération du fer	26
1.4.4.1	L'hepcidine.	26
1.4.4.2	Expression de l'hepcidine	26
1.4.4.3	Contrôle de l'expression de l'hepcidine par la matriptase-2	29
1.5	Projet de recherche	30
1.5.1	Problématique	30
1.5.2	Hypothèse de recherche	31
1.5.3	Objectifs de recherche	31
	Objectif 1 : Déterminer la spécificité du domaine catalytique de la matriptase-2	31
	Objectif 2 : Déterminer la fonction de la queue cytoplasmique de la matriptase-2	31
2	ARTICLE I	33
2.1	Abstract	35
2.2	Introduction.	35
2.3	Results.	37
2.4	Discussion.	46
2.5	Experimental procedures.	50
2.6	Acknowledgements	54
2.7	References.	54
3	ARTICLE II	59
3.1	Abstract	62
3.2	Introduction.	62
3.3	Experimental procedures.	64
3.4	Results.	67
3.5	Discussion.	75
3.6	Acknowledgements	78
3.7	References.	78
3.8	Supplemental figures	82
4	DISCUSSION	84
4.1	Spécificité enzymatique de la matriptase-2 par rapport à d'autres TTSP	84
4.1.1	Spécificité envers les substrats	85
4.1.2	Profils d'inhibition	86
4.2	Régulation fonctionnelle de la matriptase-2	88
4.2.1	Internalisation de la matriptase-2 à partir de la surface cellulaire.	88
4.2.2	Caractérisation de la voie d'internalisation de la matriptase-2	89
4.2.3	Déterminants impliqués dans l'internalisation	90

4.2.4	Impact de la perte d'internalisation de la matriptase-2 sur sa fonction	93
4.3	Spécificité enzymatique et internalisation de la matriptase-2 dans la régulation de sa fonction	93
5	CONCLUSION	95
6	REMERCIEMENTS	96
	BIBLIOGRAPHIE	97
	ANNEXE A – RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	109
A.1	Internalisation de la matriptase-2 humaine et murine	109
A.2	Phosphorylation de la matriptase-2	110
	ANNEXE B – LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	111
B.1	Liste des publications.	111
B.2	Liste des communications	111

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Ensemble des différents clans de protéases	7
1.2	Liste des TTSP humaines.	14
2.1	<i>Effects of protease inhibitors on purified recombinant matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 activities</i>	40
2.2	<i>Effects of serpins on purified recombinant matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1.</i>	41
2.3	<i>IQF peptide hydrolysis by matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1</i>	44
2.4	<i>Hydrolysis of IQF peptides with physiological substrate processing sites by matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1</i>	47

LISTE DES FIGURES

1.1	Cinétique de Michaelis-Menten	2
1.2	Effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité enzymatique	3
1.3	Répartition des protéases en fonction de leur type catalytique	6
1.4	Nomenclature de Schechter et Berger	8
1.5	Mécanisme catalytique des protéases à sérine	10
1.6	Représentation schématique des 17 TTSP humaines	13
1.7	Biosynthèse des TTSP	18
1.8	Expression de la matriptase-2 dans différents tissus humains	22
1.9	Représentation schématique de la matriptase-2	22
1.10	Régulation du fer dans l'organisme	25
1.11	Dégradation de la ferroportine par l'hepcidine	27
1.12	Régulation de l'expression de l'hepcidine	28
1.13	Mutations de la matriptase-2 impliquées dans l'anémie de type IRIDA	30
1.14	Motifs identifiés dans la queue cytoplasmique de la matriptase-2	31
2.1	<i>TTSP expression and purification</i>	38
2.2	<i>TTSP pH profile</i>	39
2.3	<i>TTSP substrate preference</i>	42
2.4	<i>IQF peptides do not exhibit Michaelis–Menten kinetics with matriptase-2</i>	43
3.1	<i>TMPRSS6 undergoes internalization</i>	68
3.2	<i>Characterization of TMPRSS6 internalization pathway</i>	70
3.3	<i>TMPRSS6 cytoplasmic tail is involved in internalization</i>	72
3.4	<i>TMPRSS6 internalization depends on specific amino acid within 2–11 region of the cytoplasmic tail</i>	74
3.5	<i>Inhibiting TMPRSS6 internalization affects cell surface cleavage of HJV and hepcidin production</i>	76
3.SF1	<i>Specificity of TMPRSS6 antibody and siRNA pools</i>	82
3.SF2	<i>TMPRSS6 does not colocalize with caveolin-1</i>	83
4.1	Principales voies d'endocytose	90
4.2	Formation des vésicules d'internalisation de la matriptase-2	91
4.3	Différentes étapes du processus d'internalisation de la matriptase-2	92
4.4	Modulation de la matriptase-2 dans le contrôle des niveaux d'hepcidine	94
A.1	La matriptase-2 murine n'est pas internalisée	109

A.2 La matriptase-2 est constitutivement phosphorylée 110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_1 -ACT	α_1 -antichymotrypsine
α_1 -AT	α_1 -antitrypsine
α_2 -AP	α_2 -antiplasmine
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ATIII	Antithrombine III
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMPRI-II	Récepteur de type I et II du BMP
CUB	<i>Cls/Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenetic protein-1</i>
Dcytb	<i>Duodenal cytochrome B</i>
DESC1	<i>Differentially expressed in squamous cell carcinoma-1</i>
DMT1	<i>Divalent metal transporter-1</i>
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hémagglutinine
HAT	<i>Human airway trypsin-like protease</i>
HATL	<i>HAT-like</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HJV	Hémojuvéline
IQF	<i>Internally quenched fluorogenic</i>
IRIDA	<i>Iron-refractory iron deficiency anemia</i>
LAMP2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LDLRA	<i>Low-density lipoprotein receptor class A</i>
MAM	<i>Meprin/A5 antigen/receptor protein phosphatase mu</i>
MesNa	Sodium 2-mercaptoéthanesulfonate
MSPL	<i>Mosaic serine protease large-form</i>
MT1-MMP	<i>Membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR-2	<i>Protease activated receptor 2</i>
PCI	<i>Protein C inhibitor</i>
PKC	Protéine kinase C
PS-SCL	<i>Positional scanning synthetic combinatorial peptide libraries</i>

RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SEA	<i>Sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SMAD	<i>Son of mothers against decapentaplegic</i>
SRCR	<i>Scavenger receptor cysteine-rich</i>
Tf	Transferrine
TfR	Récepteur de la transferrine
TTSP	<i>Type II transmembrane serine protease</i>
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR	<i>Urokinase-type plasminogen activator receptor</i>

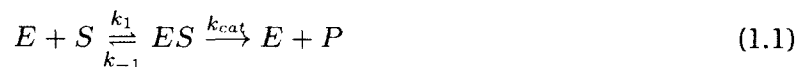
INTRODUCTION

1.1 Les enzymes

Les enzymes sont les entités responsables de l'accélération des réactions chimiques, la catalyse, nécessaire à la survie des cellules. Ceux-ci sont principalement des protéines bien qu'il en existe certains constitués d'ARN, les ribozymes (Talini, Branciamore et Gallori, 2011). Au cours d'une réaction enzymatique, des molécules initiales, appelées substrats, sont converties par l'enzyme en différentes molécules, appelées produits. La fonction et la spécificité de l'enzyme dépendent de sa conformation tridimensionnelle, structure qui est octroyée par la séquence en acides aminés de la protéine (structure primaire) (Anfinsen, 1973). Sa fonction catalytique est assurée seulement que par une petite portion de la protéine (3-4 acides aminés) nommé site actif, qui permet de lier le substrat et d'effectuer la réaction enzymatique (Alberts *et al.*, 1994). Lorsque le substrat entre dans le site actif, celui-ci forme un complexe enzyme-substrat de courte durée (Alberts *et al.*, 1994). Lors de cette combinaison, le site actif peut être modifié lorsque le substrat interagit avec l'enzyme, créant ainsi un ajustement induit. Étant donné que les enzymes sont des structures flexibles, le site actif est continuellement remanié par l'interaction avec le substrat lorsque celui-ci interagit avec l'enzyme (Alberts *et al.*, 1994).

1.1.1 La réaction enzymatique

Au cours de la réaction enzymatique, un enzyme (E) se lie à un substrat (S) pour former un complexe enzyme-substrat (ES), complexe qui permettra de convertir le substrat en produit (P) tout en libérant l'enzyme. Cette réaction peut être représenté par l'équation 1.1.



où k_1 , k_{-1} et k_{cat} sont les constantes de vitesse des réactions et la double flèche entre S et ES représente le fait que le complexe enzyme-substrat est un processus réversible.

1.1.1.1 La cinétique de Michaelis-Menten

La cinétique de Michaelis-Menten (équation 1.2) permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par un enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit (Pelmont, 1995). Dans ce modèle, lorsque la concentration en enzyme est très faible par rapport à la concentration en substrat, la vitesse de formation du produit est la suivante :

$$v_i = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} = k_{cat} [E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (1.2)$$

où v_i est la vitesse initiale (vitesse en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat $[S]$; V_{max} est la vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat; $[S]$ est la concentration en substrat; K_M est la constante de Michaelis. La valeur de V_{max} peut aussi être exprimée par $V_{max} = k_{cat}[E_t]$ où k_{cat} est la constante catalytique qui correspond au nombre maximal de mole de substrat converti en produit par mole d'enzyme par seconde et $[E_t]$ la concentration d'enzyme total. La valeur de K_M est spécifique à l'enzyme et correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale ($v_{max}/2$) (Pelmont, 1995). Elle reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus elle est grande, moins bien le substrat se fixe à l'enzyme, donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible. À l'inverse, plus la constante de Michaelis est petite, le substrat se fixe davantage à l'enzyme, donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée, ce qui signifie que la vitesse de réaction approchera V_{max} plus rapidement. Le rapport k_{cat}/K_M est une mesure de l'efficacité catalytique (Pelmont, 1995). La figure 1.1 représente graphiquement ce modèle enzymatique.

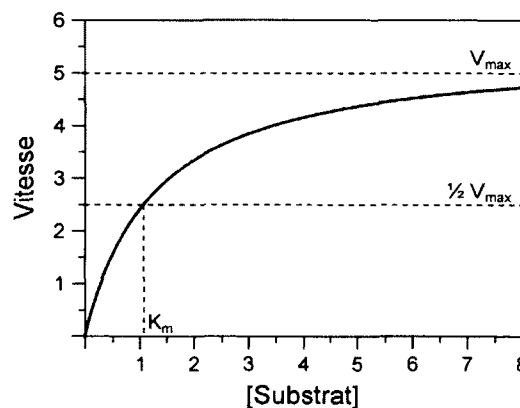


Figure 1.1
Cinétique de Michaelis-Menten

Exemple de la cinétique de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction initiale en fonction de la concentration en substrat pour une quantité fixe d'enzyme. V_{max} correspond à la vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat et K_M correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale (V_{max}).

1.1.2 Modulation de l'activité enzymatique

L'activité catalytique des enzymes peut être modulée à la hausse ou à la baisse afin de réguler leur fonction. À cette fin, différents mécanismes existent, comme par exemple l'influence du milieu, la présence de modulateurs allostériques ainsi que d'inhibiteurs.

1.1.2.1 Environnement de l'enzyme

Le milieu dans lequel se situent les enzymes a une influence importante sur leur activité catalytique. Par exemple, une modification du potentiel hydrogène (pH) de son environnement peut influencer considérablement son efficacité catalytique, comme le démontre la figure 1.2. Cette figure met aussi en évidence que chaque enzyme possède un potentiel hydrogène qui est optimal à sa fonction catalytique (Pelmont, 1995). Une variation du pH a pour conséquence de modifier la charge des résidus basiques et acides des protéines, ce qui causera un changement important de l'état de protonation des résidus nucléophiles impliqués dans la catalyse. De telles modifications de charges peuvent aussi affecter la structure tridimensionnelle de l'enzyme et par conséquent, empêcher le substrat d'accéder correctement au site catalytique (Pelmont, 1995).

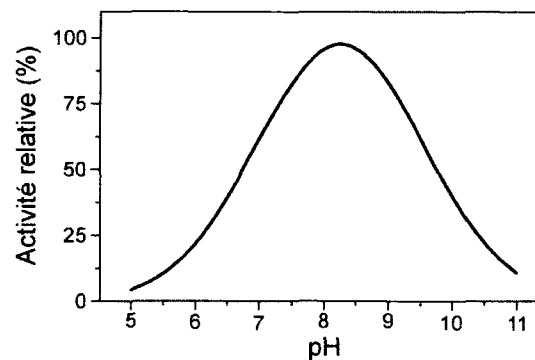


Figure 1.2

Effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité enzymatique

Une modification du potentiel hydrogène (pH) de l'environnement d'une enzyme influence son activité catalytique.

1.1.2.2 Modulation allostérique

L'allostérie est une propriété d'une enzyme qui permet la modulation de son action catalytique. Elle se produit lorsque sa structure tertiaire ou quaternaire est transformée par une molécule qui se fixe à un site différent de son site actif (Häcker, Sisay et Gütschow, 2011). Elle implique au moins deux liaisons à l'enzyme, celle du substrat au niveau du site actif ainsi que celle d'un effecteur à un site dit allostérique ou à un exosite (Drag et Salvesen, 2010). Le site allostérique constitue une région de l'enzyme qui participe indirectement à la reconnaissance et au clivage du substrat alors que l'exosite est responsable d'interactions substrat-enzyme spécifiques. Le site allostérique augmente ou diminue la conversion du substrat en produit par un changement conformationnel de l'enzyme alors que l'exosite influence la vitesse de catalyse et parfois la spécificité de substrat d'une protéase donnée (Drag et Salvesen, 2010). L'effecteur, tant qu'à lui, peut être une petite molécule ou une protéine qui se lie à l'enzyme ou alors une phosphorylation de l'enzyme par une kinase (Laskowski, Gerick et Thornton, 2009).

1.1.2.3 Inhibiteurs

Les inhibiteurs sont des substances qui diminuent l'activité d'un enzyme en se liant à celui-ci. Ils exercent leur fonction principalement en occupant la place du substrat au niveau de la pochette catalytique ou en la déformant en se liant à une région différente de l'enzyme (inhibiteur allostérique) (Marangoni, 2003). La liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme peut se faire d'une façon réversible ou irréversible. Les inhibiteurs réversibles se lient de façon non covalente par des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et des liaisons ioniques alors que les irréversibles se fixent en établissant une liaison covalente avec l'enzyme (Marangoni, 2003).

Il existe différents types d'inhibiteurs réversibles dont les inhibiteurs compétitifs, incompétitifs, non-compétitifs et mixtes. Parmi ceux-ci, les inhibiteurs compétitifs possèdent la capacité d'entrer en compétition avec le substrat au niveau de la pochette catalytique. Ces inhibiteurs possèdent généralement une structure comparable à celle du substrat (Marangoni, 2003). Certains ne sont pas des analogues du substrat et dans ce cas, ils ne se fixent pas au site actif, mais sur un site différent de l'enzyme (inhibiteur allostérique). Dans le cas des inhibiteurs incompétitifs, ceux-ci ne se fixent jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme associée avec le substrat (ES), ce qui empêche la formation de produits (Marangoni, 2003). Cette liaison devient donc possible lorsque le substrat se lie sur l'enzyme, ce qui provoque une modification de sa structure qui permet de révéler un nouveau site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en se liant, modifie la conformation du site actif et empêche ainsi la réaction. Il existe aussi un cas particulier d'inhibition incompétitive, l'inhibition par le substrat. Dans ce cas, deux molécules de substrat peuvent se lier à l'enzyme, mais ne peuvent pas être transformées en produit (Copeland, 2000). Pour ce qui est des inhibiteurs non-compétitifs, ceux-ci peuvent autant se lier à l'enzyme libre qu'au complexe enzyme-substrat, et cela avec une même affinité (Marangoni, 2003). Par contre, dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur et le substrat n'entrent jamais en compétition pour se fixer au même site, le substrat se lie au site actif alors que l'inhibiteur se fixe à un site distinct. La fixation de l'inhibiteur cause une modification de la conformation du site actif et empêche ainsi la transformation du substrat en produit sans toutefois influencer sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Finalement, les inhibiteurs mixtes peuvent se lier à l'enzyme au même moment que le substrat. Dans ce cas, la liaison de l'inhibiteur affecte la liaison du substrat et *vice versa* (Marangoni, 2003). Bien que les inhibiteurs de ce type peuvent se lier au site actif, ils causent généralement un effet allostérique en se liant à un site différent.

Pour ce qui est des inhibiteurs irréversibles, aussi appelés inhibiteurs suicides, ceux-ci forment un complexe stable avec l'enzyme et l'inactive de façon permanente. L'inhibiteur est reconnu par l'enzyme comme un substrat et entame son clivage. Durant cette étape, l'inhibiteur se lie de façon stable à l'enzyme par un lien covalent. Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur peut soit agir sur le site catalytique de l'enzyme ou soit à un endroit distant. De

ces inhibiteurs irréversibles, les serpines constituent la plus grande et la plus distribuée des familles d'inhibiteurs de protéases (Law *et al.*, 2006). Des gènes codant pour des serpines ont été identifiés chez tous les eucaryotes multicellulaires (Law *et al.*, 2006). La majorité des serpines inhibent les protéases à sérine, mais certaines inhibent aussi les caspases ainsi que les protéases à cystéine similaires à la papaïne (Law *et al.*, 2006).

1.1.3 Classification

En fonction du type de réaction qu'ils catalysent, les enzymes sont classés en six principaux groupes : les oxydo-réductases (E.C.1), les transférases (E.C.2), les hydrolases (E.C.3), les lyases (E.C.4), les isomérases (E.C.5) et les ligases ou synthétases (E.C.6) (Webb, 1992).

Parmi ces différents groupes, les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse de molécules en utilisant une molécule d'eau. Elles effectuent des réactions du type $A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H$. On y retrouve, entre autres, les estérases qui hydrolysent les esters ($R-CO-O\downarrow-R'$), les protéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques ($AA1-CO\downarrow NH-AA2$), les glucosidases qui hydrolysent les oligo- ou polysaccharides ($sucre_1-O\downarrow sucre_2$) et les phosphatases qui hydrolysent les produits phosphorés ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + P$). Les hydrolases se retrouvent notamment en abondance dans les lysosomes (Alberts *et al.*, 1994).

Les enzymes protéolytiques (protéases), sont les effecteurs d'un grand nombre d'événements biologiques autant dans la catalyse non-spécifique de la dégradation des protéines que dans celle très sélective responsable du contrôle d'événements physiologiques finement régulés (López-Otín et Bond, 2008).

1.2 Les protéases

À ce jour, 3 923 protéases distinctes ont été identifiées et séparées en différentes classes en fonction de leur mécanisme catalytique (Rawlings, Morton et Barrett, 2006). Le mécanisme catalytique de ces protéases implique la présence au niveau du site actif d'un acide aminé spécifique essentiel à l'hydrolyse du peptide. En fonction de la classe, cet acide aminé peut être une sérine, une cystéine, un acide aspartique, un acide glutamique ou une thréonine (Neurath, 1984). Il existe aussi un cas particulier où la catalyse nécessite la présence au site actif d'un ion métallique, les métalloprotéases (Neurath, 1984). De tous les types catalytiques, les protéases à sérine constituent le type le plus répandu (43 %) suivi des métalloprotéases (24 %), des protéases à cystéine (21 %) et des protéases à aspartate (8 %) (figure 1.3) (Rawlings, Morton et Barrett, 2006). Avec l'arrivée du séquençage complet du génome, ce système de classification s'est étendu par la nécessité d'englober tout le répertoire catalytique retrouvé

dans la nature (Page et Cera, 2008). Une nouvelle classification basée sur les similarités statistiquement significatives dans la séquence et la structure de l'ensemble des enzymes protéolytiques a été établie par Rawlings, Morton et Barrett (2006), une base de données nommée MEROPS. Ce système de classification divise les protéases en clans (tableau 1.1), sur la base de leur mécanisme catalytique, et en familles, sur la base d'ancêtres communs (Rawlings, Morton et Barrett, 2006). Présentement, les protéases sont classées à l'intérieur de 59 clans se divisant en 230 familles différentes (MEROPS 9.6).

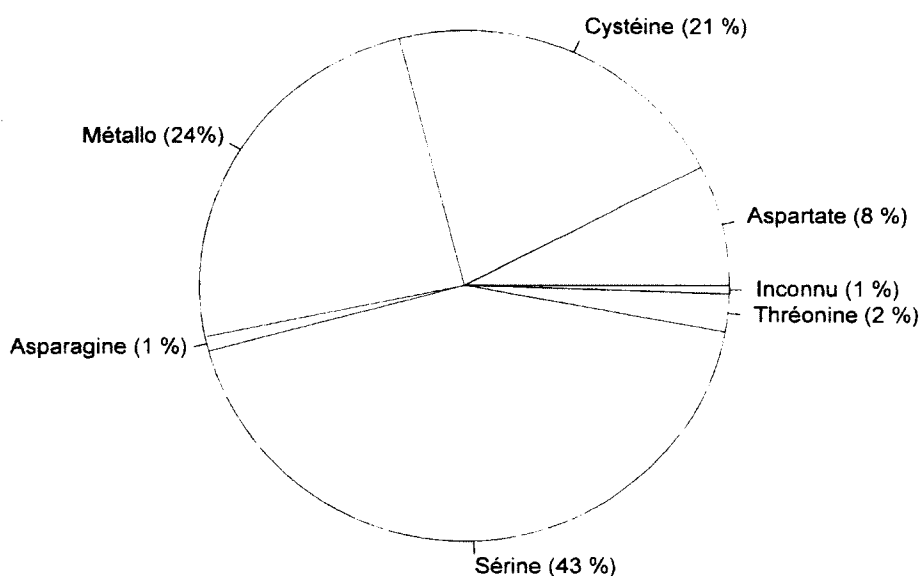


Figure 1.3
Répartition des protéases en fonction de leur type catalytique

Les protéases se répartissent en sept différents types catalytiques en fonction de la présence au niveau du site actif d'un acide aminé spécifique essentiel à leur action hydrolytique (Rawlings, Morton et Barrett, 2006).

1.2.1 Nomenclature de Schechter et Berger

Les protéases possèdent une spécificité variable envers leur substrat en fonction de la capacité de l'enzyme à accommoder les chaînes latérales du substrat au niveau de son site actif. Cette capacité est octroyée par des sous-sites de spécificité qui sont capables d'accueillir la chaîne latérale d'un seul acide aminé du substrat (Schechter et Berger, 1967). Afin de décrire la spécificité des protéases, Schechter et Berger (1967) ont proposé un modèle conceptuel (figure 1.4) dans lequel les résidus du substrat sont numérotés à partir du site de clivage, P1, P2...Pn en direction de la région N-terminale et P1', P2'...Pn' en direction C-terminale. Les sous-sites de la protéase qui les accommodent sont numérotés S1, S2...Sn et S1', S2'...Sn' respectivement.

1.2.2 Les protéases à sérine

Les protéases à sérine constituent le type catalytique le plus répandu avec 43 % de toutes les protéases (Rawlings, Morton et Barrett, 2006) et sont retrouvées de façon ubiquitaire

Tableau 1.1
Ensemble des différents clans de protéases

Clan	Protéase type	Clan	Protéase type
Clans des protéases à aspartate			
AA	Pepsine A (<i>Homo sapiens</i>)	AE	Peptidase gpr (<i>Bacillus megaterium</i>)
AC	Peptidase signalé II (<i>E. coli</i>)	AF	Omptine (<i>E. coli</i>)
AD	Préséniline 1 (<i>Homo sapiens</i>)		
Clans des protéases à cystéine			
CA	Papaïne (<i>Carica papaya</i>)	CL	Sortase A (<i>Staphylococcus aureus</i>)
CD	Caspase-1 (<i>Homo sapiens</i>)	CM	Hépatite C peptidase 2 (<i>B. megaterium</i>)
CE	Adénaïne (Adénovirus humain de type 2)	CN	Peptidase nsP2 du virus sindbis
CF	PGP-I (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	CO	Dpp VI (<i>B. sphaericus</i>)
Clans des protéases à glutamate			
GA	Peptidase scytalidoglutamique (<i>S. lignicolum</i>)	GB	Protéine GP12 (bactériophage phi-29)
Clans des métalloprotéases			
MA	Thermolysine (<i>B. thermoproteolyticus</i>)	MJ	Dipeptidase membranaire (<i>Homo sapiens</i>)
MC	Carboxypeptidase A1 (<i>Homo sapiens</i>)	MK	O-sialoglycoprotéine peptidase (<i>M. haemolytica</i>)
MD	Zn DD-peptidase (<i>S. albus</i>)	MM	S2P peptidase (<i>Homo sapiens</i>)
ME	Pitrilysine (<i>E. coli</i>)	MN	D-aminopeptidase DppA (<i>Bacillus subtilis</i>)
MF	Leucyle aminopeptidase (<i>Bos taurus</i>)	MO	Béta-lytic métallopeptidase (<i>A. lyticus</i>)
MG	Méthionyle aminopeptidase 1 (<i>E. coli</i>)	MP	Poh1 peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
MH	Aminopeptidase Ap1 (<i>Vibrio proteolyticus</i>)	MQ	Aminopeptidase T (<i>Thermus aquaticus</i>)
Clans des lyases à asparagine			
NA	Nodavirus peptidase (Nodavirus)	ND	Précurseur de Tsh (<i>E. coli</i>)
NB	Protéine YscU (<i>Y. pseudotuberculosis</i>)	NE	Picobirnavirus peptidase (Picobirnavirus)
NC	Réovirus peptidase 1 (Orthoréovirus)		
Clans des protéases de type catalytique mixte (cystéine, sérine, thréonine)			
PA	Chymotrypsine A (<i>Bos taurus</i>)	PC	Dipeptidase E (<i>Salmonella enterica</i>)
PB	Amidophosphoribosyltransférase (<i>H. sapiens</i>)	PD	Protéine hedgehog (<i>D. melanogaster</i>)
Clans des protéases à sérine			
SB	Subtilisine Carlsberg (<i>B. licheniformis</i>)	SK	Peptidase Clp (type 1) (<i>E. coli</i>)
SC	Sérine carboxypeptidase D (<i>T. aestivum</i>)	SP	Nucléoporine 145 (<i>Homo sapiens</i>)
SE	DD-carboxypeptidase B (<i>S. lividans</i>)	SQ	DmpA aminopeptidase (<i>O. anthropi</i>)
SF	Protéine UmuD (<i>E. coli</i>)	SR	Lactoferrine (<i>Homo sapiens</i>)
SH	Cytomégalo virus assemblé (Herpesvirus)	SS	Muréine carboxypeptidase (<i>P. aeruginosa</i>)
SJ	Lon-A peptidase (<i>E. coli</i>)	ST	Rhomboïde-1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)

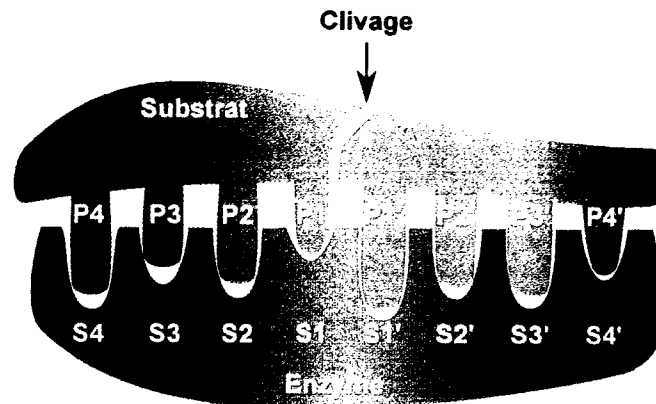


Figure 1.4
Nomenclature de Schechter et Berger

Un substrat est clivé par la rupture d'un lien peptidique par l'enzyme. À partir du site de clivage, les acides aminés du substrat sont identifiés P1, P2...Pn en direction N-terminale et ceux en direction C-terminale, P1', P2',...Pn'. Les sous-sites de la protéase qui accommodent les chaînes latérales des acides aminés du substrat sont numérotés S1, S2...Sn et S1', S2'...Sn' en suivant la même nomenclature.

autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Hedstrom, 2002). Elles sont caractérisées par leur capacité à cliver des liens peptidiques à l'intérieur de protéines en utilisant une sérine comme acide aminé nucléophile au niveau de leur site actif. En fonction de leur structure tridimensionnelle, elles se divisent en deux grandes catégories : celles ressemblant à la chymotrypsine et celles ressemblant à la subtilisine (Madala *et al.*, 2010). Chez l'humain, elles sont responsables de plusieurs fonctions physiologiques tels la digestion, la réponse immunitaire, la coagulation du sang et la reproduction (Hedstrom, 2002).

Dans la classification MEROPS, elles sont groupées en 15 clans se divisant en 49 familles distinctes (Rawlings, Morton et Barrett, 2006). Cependant, il existe des différences significatives dans la distribution de chacun des clans à travers les espèces. Par exemple, les protéases du clan PA sont très abondant chez les eucaryotes, mais rare dans le génome des procaryotes et des plantes. Chez les vertébrés, de nombreuses protéases du clan PA y sont retrouvées et celles-ci sont responsables d'une variété de processus extracellulaires.

1.2.2.1 Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des protéases à sérine est assuré par une triade catalytique. Celle-ci se situe à l'intérieur du site actif de l'enzyme, endroit où la catalyse se produit. À quelques exceptions près, cette triade est conservée chez l'ensemble des protéases à sérine. Elle est constituée d'une histidine (His), d'une sérine (Ser) et d'un acide aspartique (Asp). Bien que ces trois résidus soit éloignés les uns des autres au niveau de la séquence en acides aminés de l'enzyme, le repliement de la protéine fait en sorte qu'ils se retrouvent à proximité au sein du site actif. Chacun de ces résidus se retrouve à jouer un rôle essentiel dans l'action catalytique de l'enzyme (Neitzel, 2010).

Lors de la protéolyse, une série de mécanismes ordonnés se produit et provoque la génération de plusieurs intermédiaires. D'abord, le substrat polypeptidique se lie au niveau du site actif de la protéase de façon à ce que le carbone du groupement carbonyle du lien scissile soit positionné à proximité de la sérine nucléophile (figure 1.5-1). L'azote de l'histidine accepte l'hydrogène provenant du groupe $-OH$ de la sérine, ce qui permet la création d'un lien entre l'oxygène de la chaîne latérale de la sérine et le carbone du groupement carbonyle. Cette nouvelle liaison provoque le déplacement de la paire d'électrons provenant du double lien entre le carbone et l'oxygène du groupement carbonyle vers l'oxygène du groupement, ce qui forme l'intermédiaire tétraédrique (figure 1.5-2). Ensuite, afin de rétablir la charge neutre de l'histidine, il y a transfert d'un proton de l'histidine à l'azote de la liaison peptidique (figure 1.5-3). Les électrons qui s'étaient déplacés vers l'oxygène du groupement carbonyle se redéplient pour recréer la double liaison (figure 1.5-4), ce qui permet le clivage du lien peptidique et la libération du produit en position amino-terminale (figure 1.5-5). À ce point, une molécule d'eau attaque le carbone du groupement carbonyle, ce qui cause un déplacement des électrons du double lien vers l'oxygène, ce qui lui procure une charge négative (figure 1.5-6). L'ensemble de cette réaction est coordonné par l'azote de l'histidine, qui accepte un proton provenant de la molécule d'eau et permet la formation d'un second intermédiaire tétraédrique. Dans la réaction finale, le lien créé lors de la première étape entre la sérine de la triade catalytique et le carbone du groupement carbonyle se déplace pour attaquer l'hydrogène que l'histidine vient tout juste d'acquérir (figure 1.5-7). Le carbone du groupement carbonyle, maintenant déficient en électron, reforme un lien double avec l'oxygène, ce qui a pour conséquence d'expulser la partie carboxy-terminale du peptide (figure 1.5-8) (Neitzel, 2010). Au cours de cette réaction, l'acide aspartique de la triade catalytique permet d'orienter adéquatement l'histidine relativement à la sérine (Polgár, 2005).

1.2.2.2 Spécificité enzymatique

Les protéases à sérine qui possèdent une structure semblable à la chymotrypsine sont caractérisées par une conformation tridimensionnelle distinctive consistant en deux domaines barils- β qui convergent au niveau du site actif. Ces enzymes peuvent ensuite être classés par leur spécificité envers leurs substrats en trois types distincts : ceux ressemblant à la trypsine, à la chymotrypsine ou à l'élastase (Ovaere *et al.*, 2009). Les protéases semblables à la trypsine clivent des liaisons peptidiques après un acide aminé chargé positivement (Lys ou Arg) (Evnin, Vásquez et Craik, 1990). Le résidu situé à la base de la pochette S1 de l'enzyme, généralement un acide aspartique ou glutamique chargé négativement, est responsable de cette spécificité (Evnin, Vásquez et Craik, 1990). Pour les protéases semblables à la chymotrypsine, leur spécificité est davantage pour des résidus hydrophobiques de grandeur moyenne ou large comme la tyrosine, la phénylalanine et la leucine car leur pochette S1 est davantage hydrophobique que celle des protéases semblables à la trypsine (Hung et

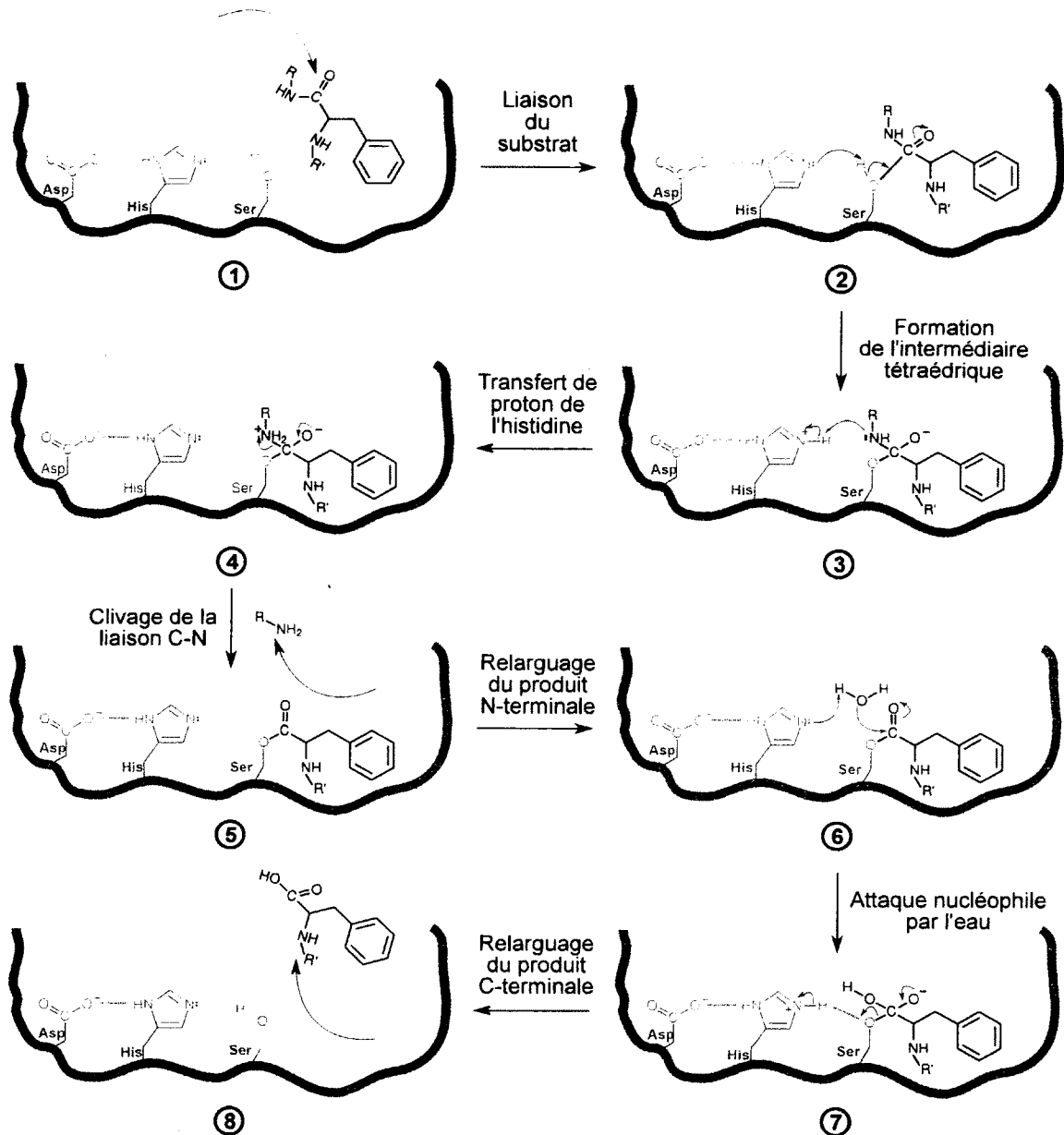


Figure 1.5
Mécanisme catalytique des protéases à sérine

(1) Un substrat entre dans le site actif à proximité de la sérine de la triade catalytique. (2) L'azote de l'histidine accepte l'hydrogène du groupe $-OH$ de la sérine et favorise la création d'un lien entre l'oxygène de la sérine et le carbone du groupement carbonyle. Cette action conduit au déplacement vers l'oxygène de la paire d'électrons provenant du double lien du groupement carbonyle. (3) Un proton est ensuite transféré de l'histidine à l'azote de la liaison peptidique afin de rétablir la charge neutre de l'histidine. (4) Les électrons de l'oxygène du groupement carbonyle se redéplient pour recréer la double liaison, ce qui permet le clivage du lien peptidique et la libération du produit en position amino-terminale (5). (6) Une molécule d'eau attaque le carbone du groupement carbonyle et provoque le déplacement des électrons du double lien vers l'oxygène, réaction coordonnée par l'azote de l'histidine qui accepte un proton provenant de la molécule d'eau. (7) Le lien entre la sérine de la triade catalytique et le carbone du groupement carbonyle se déplace pour attaquer l'hydrogène que l'histidine vient tout juste d'acquérir. Le carbone du groupement carbonyle, maintenant déficient en électron, reforme un lien double avec l'oxygène, ce qui a pour conséquence d'expulser la partie carboxy-terminale du peptide (8).

Hedstrom, 1998). Finalement, les protéases semblables à l'élastase possèdent une pochette S1 plus petite que les protéases ressemblant à la trypsine ou à la chymotrypsine, ce qui favorise une préférence pour des acides aminés de petite dimension comme l'alanine, la glycine et la valine (Hung et Hedstrom, 1998).

Les protéases à sérine qui possèdent une structure semblable à la subtilisine sont retrouvées uniquement chez les procaryotes (Bryant *et al.*, 2009). Elles sont structurellement non reliées à celles semblables à la chymotrypsine, mais elles utilisent le même type de triade catalytique au niveau de leur site catalytique. Cependant, ces protéases ne possèdent aucune spécificité enzymatique, elles sont davantage des enzymes spécialisées dans la dégradation des protéines (Bryant *et al.*, 2009).

1.2.2.3 Les protéases à sérine de la famille S1

Les protéases à sérine appartenant au clan PA font parties de l'un des groupes d'enzymes les mieux décrits (Page et Cera, 2008). Ce clan contient des protéases à sérine et à cystéine possédant uniquement une activité endopeptidase. La majorité des protéases de ce clan sont cependant des protéases à sérine et font parties de la famille S1. Cette famille, qui regroupe des protéases ressemblant à la chymotrypsine, est la plus large de toutes les familles de protéases, autant par le nombre de protéines ayant été séquencées que par la diversité de leur activité catalytique (Rawlings et Barrett, 1993). Les enzymes de cette famille possèdent la triade catalytique His, Asp et Ser. Trois principaux types d'activité existent dans cette famille : celle ressemblant à la trypsine, à la chymotrypsine et à l'élastase.

La famille S1 se divise en six sous-familles de protéases à sérine (S1A–S1F) qui sont phylogénétiquement distinctes, mais qui partagent une structure commune. Chacune de ces sous-familles possède une protéase modèle : la chymotrypsine A pour S1A, la glutamyle peptidase pour S1B, la DegP peptidase pour S1C, la lysyle peptidase pour S1D, la streptogrisine A pour S1E et la protéase à sérine de l'astrovirus pour S1F. De toutes ces sous-familles, S1A est celle la plus représentée, elle inclut plus de 67 % des protéases de la famille S1. Les protéases de S1A sont impliquées dans une variété de processus extracellulaires et présentent une distribution qui est restreinte dans les plantes, les procaryotes et les archées (Page et Cera, 2008). Ces protéases contrôlent une variété de processus cellulaires en clivant sélectivement différents substrats afin d'influencer le comportement de la cellule (Ramsay *et al.*, 2009). Par exemple, elles sont impliquées dans les processus de coagulation du sang (thrombine), de la digestion (trypsine) et de la cicatrisation (plasmine) (Ramsay *et al.*, 2009). Elles ont été principalement identifiées en tant qu'enzymes sécrétés, mais l'identification et la caractérisation de l'un de ses membres qui possède un domaine transmembranaire, l'hepsine (Leytus *et al.*, 1988), a provoqué l'émergence d'un groupe de protéases structurellement distinctes, les protéases à sérine ancrées à la membrane cellulaire (Ramsay *et al.*, 2009).

1.2.2.4 Les protéases à sérine ancrées à la membrane cellulaire

Les protéases à sérine ancrées à la surface cellulaire diffèrent des enzymes sécrétés au niveau de leurs fonctions biologiques. En effet, au lieu d'exercer leur rôle catalytique dans une région distante dans le milieu extracellulaire, ces enzymes catalysent des réactions directement à la membrane plasmique (Netzel-Arnett *et al.*, 2003). La présence de protéases à cet endroit a été identifiée comme jouant un rôle essentiel dans l'interaction des cellules avec leur environnement (Ramsay *et al.*, 2009) en régulant différents processus dont la transduction des stimuli extracellulaires à travers la membrane, la relâche de facteurs de croissance ainsi que l'interaction avec les cellules avoisinantes et les protéines de la matrice extracellulaire (Netzel-Arnett *et al.*, 2003). Ces enzymes ont la propriété d'être ancrés à la surface cellulaire à l'aide d'une extension hydrophobe située dans leur région carboxy- (transmembranaire de type I) ou amino-terminale (transmembranaire de type II) qui permet une orientation extracellulaire du domaine catalytique (Ramsay *et al.*, 2009). Un autre type d'ancrage à la surface cellulaire, qui ne nécessite aucune région transmembranaire, se fait par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI). De ces différents types de protéases transmembranaires, celles de type II sont les plus répandues avec 17 membres identifiées chez l'humain (Szabo et Bugge, 2011).

1.3 Les protéases à sérine transmembranaires de type II

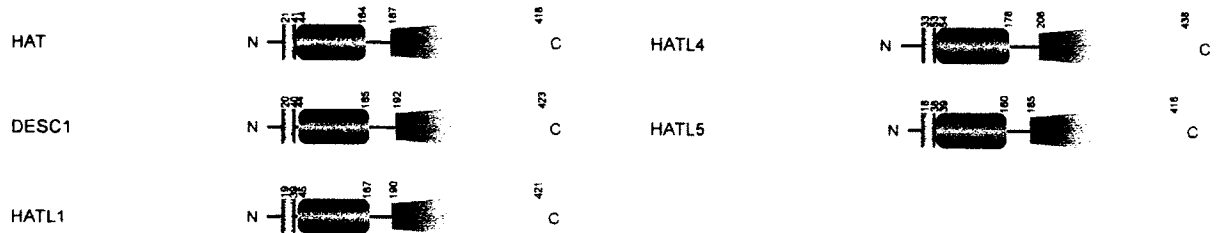
L'analyse au début du nouveau millénaire des bases de données du génome et des séquences exprimées a permis d'identifier une nouvelle famille de protéases à sérine transmembranaires de type II (TTSP, *type II transmembrane serine proteases*) (Hooper *et al.*, 2001). Les principales caractéristiques de ces enzymes sont la présence d'une courte région cytoplasmique et d'un domaine transmembranaire dans leur région amino-terminale et d'un ectodomaine complexe qui peut contenir un assortiment de un à dix domaines de neuf types différents dont un domaine protéase à sérine de type chymotrypsine (S1A) en position carboxy-terminale (figure 1.6) (Szabo *et al.*, 2003).

1.3.1 Classification

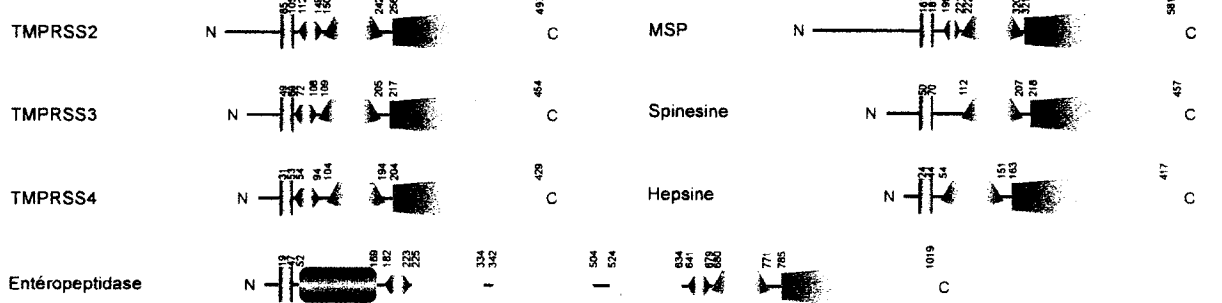
Chez l'humain, les 17 TTSP identifiées se divisent en quatre sous-familles en fonction de l'analyse phylogénétique de leur domaine protéase à sérine, de la composition de leur ectodomaine et de la localisation chromosomique de leur gène (figure 1.6 et tableau 1.2) (Szabo *et al.*, 2003). Ces sous-familles sont celles des HAT/DESC, hepsine/TMPRSS, des matriptases et de la corine.

Outre d'un domaine catalytique protéase à sérine, leur ectodomaine est composé d'un agencement de six domaines différents : SEA (*sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin*), SRCR (*scavenger receptor cysteine-rich*), LDLRA (*low-density lipoprotein receptor class A*), CUB (*Cls/Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenetic protein-1*), MAM (*meprin/A5*

Sous-famille HAT/DESC



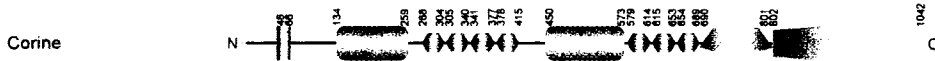
Sous-famille Hepsine/TMPRSS



Sous-famille Matriptase



Sous-famille Corine



Liste des domaines

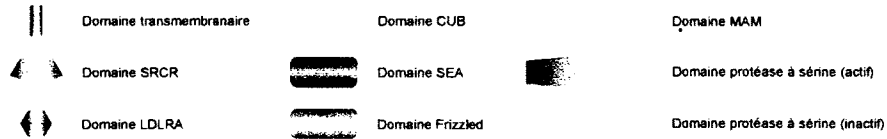


Figure 1.6
Représentation schématique des 17 TTSP humaines

Représentation schématique des domaines des 17 TTSP humaines. Les protéases sont divisées en sous-familles en se basant sur l'analyse phylogénétique de leur domaine protéase à sérine, de la composition de leur ectodomaine et de la localisation chromosomique de leur gène. L'identification des domaines est basée sur les prédictions de la base de données UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>) ainsi que sur la littérature publiée. Les nombres représentent les limites des différents domaines.

Tableau 1.2
Liste des TTSP humaines

TTSP	Noms alternatifs ^a	Nom gène	Distribution cellulaire ^b
Sous-famille HAT/DESC			
HAT	TMPRSS11D	<i>TMPRSS11D</i>	cer, bro , oes , pro, pe, ig, me, es, tes, la , tr , ves
DESC1	TMPRSS11E	<i>TMPRSS11E</i>	epd, pro, pe , gs, tes , la
HATL1	TMPRSS11A, HESP, ECRG1	<i>TMPRSS11A</i>	n.d.
HATL4	TMPRSS11F	<i>TMPRSS11F</i>	n.d.
HATL5	TMPRSS11B	<i>TMPRSS11B</i>	n.d.
Sous-famille Hepsin/TMPRSS			
TMPRSS2	PRSS10	<i>TMPRSS2</i>	co, rn, fo, pou, pa, pro , tr
TMPRSS3	TADG-12	<i>TMPRSS3</i>	co, coc, coe, rn, fo, pou, ova, pa, pl, pro, ig, rat, tes, thm
TMPRSS4	MT-SP2, CAPH2	<i>TMPRSS4</i>	ves, co, oes, rn, ig, es
Entéropeptidase	TMPRSS15, entérokinase, PRSS7	<i>TMPRSS15</i>	duo
MSPL	TMPRSS13	<i>TMPRSS13</i>	pou, pa, pl , pro
Spinesine	TMPRSS5	<i>TMPRSS5</i>	cer, me
Hepsine	TMPRSS1	<i>TMPRSS1</i>	rn, fo , pou, pa, hyp, pro, thm, thr
Sous-famille Matriptase			
Matriptase	MT-SP1, prostamine, PRSS14, ST14 TADG-15		bro, co, epd, oes, veb, ori, fp , rn , gmm, mon, cn, tpf, pl, pro, gs, ig, pe, es, vs, de, la, tr, thm, ves, ur, ut
Matriptase-2	TMPRSS6	<i>TMPRSS6</i>	rn, fo , cn, ut
Matriptase-3	TMPRSS7	<i>TMPRSS7</i>	cer, epd, yeu, ova, pro, gs, pe, tes , ut
Polysérase-1	TMPRSS9	<i>TMPRSS9</i>	cer, coe, rn, fo, pl, msq
Sous-famille Corine			
Corine	TMPRSS10, <i>Heart-specific serine proteinase ATC2, Pro-ANP-converting enzyme</i>	<i>TMPRSS10</i>	os, coe

^a Selon UniProt (Consortium, 2012). ^b Niveaux d'ARNm confirmés expérimentalement dans différents tissus. Les expressions les plus fortes sont marquées en gras. bro, bronchioles; cer, cerveau; cn, cavité nasale; co, côlon; coc, cochlée; coe, cœur; de, dents; duo, duodénum; epd, épидидyme; es, estomac; fo, foie; fp, follicules pileux; gmm, glandes mammaires; gs, glandes salivaires; hyp, hypophyse; ig, intestin grêle; la, langue; me, moelle épinière; mon, monocytes; msq, muscles squelettiques; oes, œsophage; ori, oreille interne; os, os; ova, ovaires; pa, pancréas; pe, peau; pl, placenta; pou, poumon; pro, prostate; rat, rate; rn, reins; tes, testicules; thm, thymus; thr, thyroïde; tpf, trompes de Fallope; tr, trachée; ur, urètre; ut, utérus; veb, vésicule biliaire; ves, vessie; vs, vésicules séminales; yeu, yeux; n.d., non disponible. Adapté de Szabo et Bugge (2008).

antigen/receptor protein phosphatase mu) et *frizzled* (figure 1.6). Bien que le rôle du domaine SEA présent chez les TTSP ne soit pas connu, ce domaine est généralement associé à des protéines hautement glycosylées qui contiennent des glucides liés par des liaisons O-glycosidiques tel le sulfate d'héparane (Bork et Patthy, 1995). Ceux-ci pourraient réguler ou assister à la liaison avec les groupes fonctionnels de glucides présents sur des protéines de leur voisinage (Bork et Patthy, 1995). Ces domaines sont aussi retrouvés clivés chez de nombreuses protéines transmembranaires (Abe, Fukuzawa et Hirose, 2002) pouvant générer une alliance ligand-récepteur lorsque les sous-unités clivées se réassocient pour conduire à une cascade signalétique (Wreschner *et al.*, 2002). Dans le cas du domaine SRCR, sa fonction biologique précise reste à être déterminée, mais des évidences suggèrent qu'il pourrait permettre des interactions protéine-protéine, homo- ou hétérotypiques, ainsi que la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) dans la défense immunitaire (Martínez *et al.*, 2011). Pour ce qui est des domaines LDLRA, ce sont des domaines riches en cystéines d'environ 40 acides aminés et qui possèdent un motif conservé D/NXSDE dans lequel les résidus acide aspartique et acide glutamique sont impliqués dans la liaison du calcium. Ces domaines sembleraient jouer des rôles dans la liaison, l'internalisation et la maturation des protéines qui possèdent ces domaines (Horn *et al.*, 1998; Cam et Bu, 2006; Parkyn *et al.*, 2008). Les domaines CUB sont presque exclusivement retrouvés chez des protéines extracellulaires ou associées à la membrane cellulaire (Bork et Beckmann, 1993). Ces domaines sont impliqués dans l'adhésion intermoléculaire (Bork et Beckmann, 1993). Par exemple, il a été démontré que la cubuline, qui contient 27 domaines CUB, peut se lier à la transferrine, à l'hémoglobine, au facteur intrinsèque de la vitamine B₁₂, à l'apolipoprotéine A₁ et à l'HDL (*high-density lipoprotein*) (Amsellem *et al.*, 2010). Les domaines MAM sont retrouvés dans la région extracellulaire de diverses protéines (Beckmann et Bork, 1993) et sembleraient posséder une fonction adhésive en permettant la formation de complexes homomériques (Ishmael *et al.*, 2001). Les domaines *frizzled*, eux, sont retrouvés chez des protéines qui fonctionnent comme récepteur de surface cellulaire pour les Wnt, des protéines qui activent diverses voies de signalisation impliquées dans le développement embryogénique, la différenciation et la polarité cellulaire (Logan et Nusse, 2004). Ce domaine riche en cystéines est présent dans la région extracellulaire de ces protéines et est impliqué dans la liaison avec Wnt (Bhanot *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997).

La plus grande sous-famille de TTSP est celle des HAT/DESC. Celle-ci comprend HAT (*human airway trypsin-like protease*), DESC1 (*differentially expressed in squamous cell carcinoma-1*), HATL (*HAT-like*) -1, -4 et -5. De toutes les TTSP, les membres de cette sous-famille présentent le plus simple ectodomaine en possédant seulement un domaine SEA unique. Tous les gènes qui codent pour les membres de cette sous-famille sont situés dans un même regroupement de gènes, autant chez la souris que chez l'humain, ce qui suggère qu'ils originent de la duplication d'un gène ancestral commun (Hobson *et al.*, 2004).

La sous-famille hepsine/TMPRSS se compose de sept membres comprenant l'hepsine, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, la spinesine, MSPL et l'entéropeptidase. Tous possèdent dans leur ectodomaine un domaine SRCR seul (spinesine et hepsine) ou précédé par un domaine LDLRA pour TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 et MSPL. L'entéropeptidase fait exception, elle possède un ensemble de domaine SEA, LDLRA, CUB et MAM.

La sous-famille des matriptases possède quatre membres très similaires, la matriptase, la matriptase-2, la matriptase-3 ainsi qu'une protéine ayant une configuration de l'ectodomaine différente, la polysérase-1. Les matriptases possèdent un domaine SEA, deux CUB et deux (matriptase-3), trois (matriptase-2) ou quatre (matriptase) domaines LDLRA dans leur ectodomaine. La polysérase-1 est constituée d'un domaine LDLRA, deux domaines catalytiques actifs et un inactif.

La sous-famille de la corine est la seule à posséder qu'un seul membre. La corine diffère des autres TTSP par son ectodomaine composé de deux domaines *frizzled*, sept domaines LDLRA et un domaine SRCR ainsi que par son domaine catalytique, qui est davantage relié à des protéases à sérine sécrétées (Netzel-Arnett *et al.*, 2003), ce qui laisse croire que les TTSP peuvent avoir évolué à partir d'au moins deux gènes ancestraux différents par évolution convergente (Szabo et Bugge, 2008).

1.3.2 Propriétés biochimiques

Les TTSP sont synthétisés d'abord sous la forme d'une chaîne simple catalytiquement inactive (zymogène). Cette forme nécessite une activation par un clivage suivant un résidu basique (Arg ou Lys) présent dans un motif d'activation précédant immédiatement le domaine catalytique (figure 1.7). Le domaine catalytique reste associé à la membrane suite à l'activation à l'aide d'un pont disulfure qui relie le prodomaine et le domaine catalytique (Hooper *et al.*, 2001). Plusieurs TTSP, dont la matriptase (Takeuchi *et al.*, 2000), la matriptase-2 (Velasco *et al.*, 2002), l'hepsine (Qiu *et al.*, 2007), TMPRSS2 (Afar *et al.*, 2001), TMPRSS3 (Guipponi *et al.*, 2002), TMPRSS4 (Andreasen *et al.*, 2006) et la neurobine (souris) (Stallmach et Gloor, 2008) possèdent la caractéristique de s'autoactiver *in vitro*. Cela suggère que plusieurs TTSP peuvent fonctionner comme initiateur de cascades protéolytiques. Ce mécanisme d'autoactivation n'est pas identifié, mais impliquerait potentiellement l'oligomérisation (Lee *et al.*, 2007; Bugge, Antalis et Wu, 2009).

Les différents domaines des TTSPs peuvent aussi être impliqués dans leur biosynthèse. En effet, la présence de la queue cytoplasmique pourrait contribuer au routage des TTSP à la membrane plasmique. En effet, certaines TTSP contiennent des sites consensus de phosphorylation dans leur région cytoplasmique qui pourraient avoir un impact sur leur régulation. Pour ce qui est des domaines extracellulaires, ceux-ci semblent être critiques pour la localisation cellulaire, l'activation, l'inhibition et la spécificité de substrat (Szabo et Bugge,

2008). Par exemple, la capacité de la corine à convertir le pro-ANP en ANP est dépendante du domaine *frizzled* et des domaines LDLRA 1 à 4 (Knappe *et al.*, 2003). La matriptase ainsi que l'entéropeptidase subissent aussi un clivage protéolytique au niveau de leur domaine SEA. Ce clivage se produirait par une hydrolyse spontanée causée par un stress conformationnel, ce qui suggère la présence de ce processus chez tous les TTSP possédant ce domaine (Szabo et Bugge, 2008). De plus, le relargage de l'ectodomaine des TTSP de la surface cellulaire est fréquent, ce qui constitue un mécanisme par lequel les TTSP peuvent exercer leur activité protéolytique dans l'espace péricellulaire (Szabo et Bugge, 2008).

L'activité catalytique des TTSP est régulée par des inhibiteurs de protéases endogènes, plus spécifiquement les inhibiteurs contenant un domaine Kunitz et les serpins. Par exemple, HAI-1, un inhibiteur transmembranaire de type Kunitz, est impliqué dans l'inhibition de la matriptase (Lin *et al.*, 1999) et de l'hepsine (Kirchhofer *et al.*, 2005) et la matriptase est aussi retrouvée dans le lait humain en complexe avec des serpins sécrétées dont l'antithrombine III, l' α_1 -antitrypsine et l' α_2 -antiplasmine (Tseng *et al.*, 2008).

1.3.3 Fonctions physiologiques

Bien que très peu de fonctions aient été identifiées pour les TTSP, certaines évidences suggèrent qu'elles joueraient des rôles importants dans une variété de fonctions biologiques.

La toute première fonction identifiée pour une TTSP a été attribuée à l'entéropeptidase. Cet enzyme est un élément essentiel au processus de digestion (Kunitz, 1939). Elle est exprimée dans la membrane de la bordure en brosse du duodénum, endroit où elle convertit le trypsinogène pancréatique en trypsine. Cette fonction est essentielle à l'initiation des réactions protéolytiques des enzymes digestives dans l'intestin grêle (Bugge, Antalis et Wu, 2009).

Les tissus épithéliaux expriment une grande variété de TTSP dont la HAT, TMPRSS2 et la matriptase. La présence de ces enzymes semble assurer l'homéostasie de ces tissus. HAT est exprimée dans l'épithélium de la voie respiratoire et permettrait d'accomplir plusieurs fonctions dont la fibrinolyse, la réponse inflammatoire via l'activation du récepteur couplé aux protéines G (RCPG) PAR-2 (*protease activated receptor 2*) et l'adhérence et motilité cellulaire par le clivage du récepteur de l'urokinase (uPAR, *urokinase-type plasminogen activator receptor*) (Chokki *et al.*, 2005; Szabo *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2012). TMPRSS2 a été identifié comme régulateur du courant sodique épithélial au niveau du poumon en clivant le canal sodique épithélial (Kim *et al.*, 2006) et au niveau de la réponse inflammatoire de la prostate via le clivage de PAR-2 (Donaldson *et al.*, 2002). Finalement, la matriptase jouerait un rôle important dans la différenciation épidermale terminale, la formation de la barrière épidermale et le développement des follicules pileux (Bugge, Antalis et Wu, 2009; Désilets *et al.*, 2008).

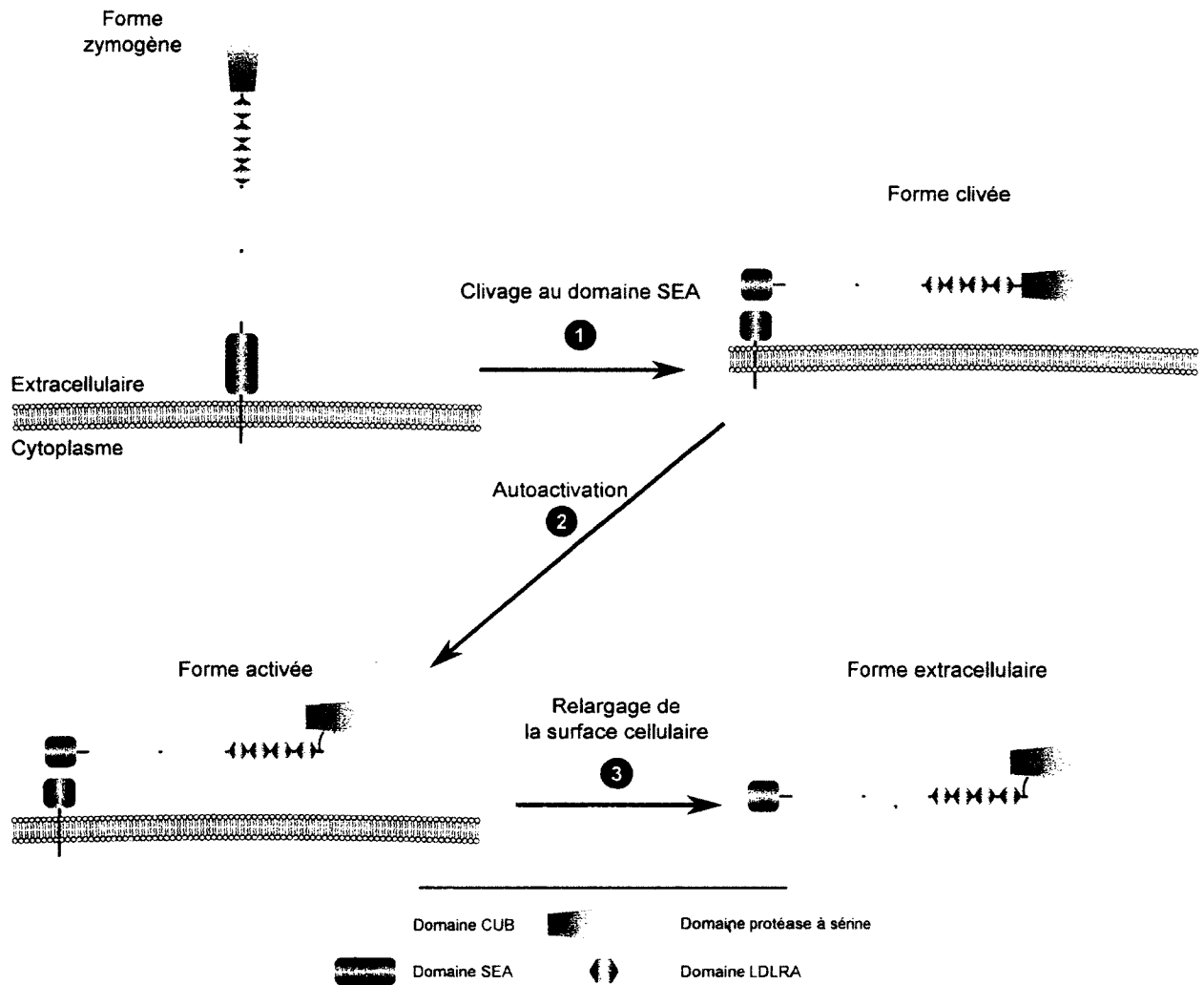


Figure 1.7
Biosynthèse des TTSP

Représentation schématique de la biosynthèse de la matriptase. La matriptase est synthétisée sous une forme zymogène inactive. Un clivage au niveau du domaine SEA (Gly¹⁴⁹) se produit dans la voie de sécrétion (1). L'enzyme est par la suite activée par un clivage autocatalytique (Arg⁶¹⁴) (2). La matriptase est finalement relarguée de la surface cellulaire (4).

La corine est aussi un élément important dans la régulation du volume et de la pression sanguine (Jiang *et al.*, 2011). En effet, la corine est responsable de la conversion du proANP en sa forme active, l'ANP (*Atrial natriuretic peptide*) (Yan *et al.*, 2000). Cette hormone, sécrétée par les cardiomyocytes atriaux, favorise la production d'urine, l'excrétion du sodium ainsi que la dilatation des vaisseaux sanguins (Yan *et al.*, 2000).

La matriptase-2, quant à elle, a tout récemment été associée à un rôle important dans la régulation du fer. La section 1.4 traitera de ce rôle.

1.3.4 Implications pathologiques

Certaines TTSP jouent des rôles importants dans le développement de certaines pathologies. Ces dernières incluent, entre autres, la progression de la tumorigénèse, l'activation des virus de l'influenza, la surdité et l'anémie.

1.3.4.1 Progression de la tumorigénèse

La croissance tumorale puis la formation de métastases sont initiées et maintenues par différentes voies de signalisation qui contrôlent la dynamique du cytosquelette dans les cellules tumorales ainsi que par la dégradation des jonctions intercellulaires et de la matrice extracellulaire (Friedl et Alexander, 2011). La capacité dégradative de ces cellules est favorisée par l'exploitation de l'activité de protéases dérégulées. Plusieurs TTSP dont la matriptase, la matriptase-2, l'hepsine, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 et DESC1 sont dérégulées dans de nombreuses cellules tumorales (Choi *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2011).

La matriptase est retrouvée en surexpression dans différents types de tumeurs épithéliales, comme ceux du sein, du côlon, du foie, du poumon, du mésothélium, des ovaires et de la patate et est considérée comme un biomarqueur potentiel pour le diagnostique et le pronostique (Umland, 2006; Szabo et Bugge, 2008; List, 2009; Jin *et al.*, 2006a; Tanimoto *et al.*, 2005; Köbel *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2008). La matriptase serait capable de promouvoir le développement et la progression du cancer en activant le précurseur de l'uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) et de l'HGF (*hepatocyte growth factor*), tous les deux impliqués dans la promotion de la croissance tumorale invasive (Takeuchi *et al.*, 2000; Lee, Dickson et Lin, 2000; Umland, 2006). De plus, la matriptase pourrait favoriser l'invasion tissulaire en modulant l'adhésion cellulaire par la dégradation de composantes de la matrice extracellulaire (Jin *et al.*, 2006b) et en activant PAR-2, un régulateur de l'inflammation et de l'adhésion cellulaire (Bocheva *et al.*, 2009).

Une altération de l'expression de la matriptase-2 dans le cancer a été reportée dans plusieurs études. Certaines ont démontré que les niveaux d'expression de la matriptase-2 étaient augmentés chez des cellules tumorales (Odet, Verot et Magueresse-Battistoni, 2006)

et dans le carcinome des cellules canalaire du sein (Overall *et al.*, 2004). Par contre, d'autres études ont démontré qu'une augmentation de l'expression de la matriptase-2 réduit le pouvoir invasif ainsi que la motilité des cellules tumorales (Sanders *et al.*, 2008) et est associée à un pronostic favorable chez les patients (Parr *et al.*, 2007). Il y a peu d'informations sur les voies de signalisation par lesquelles la matriptase-2 exerce ses fonctions dans la progression de la tumorigénèse, mais il est suggéré que l'interaction entre la matriptase-2, l'hémojuvéline et la signalisation par BMP peut constituer un mécanisme potentiel par lequel la matriptase-2 pourrait exercer ses effets sur les cellules cancéreuses (Sanders *et al.*, 2010).

L'hepsine est retrouvée en surexpression dans les cancers de la prostate, de l'ovaire, de l'endomètre et du rein (Webb *et al.*, 2011). Elle est aussi considérée comme un biomarqueur potentiel pour la détection du cancer de la prostate et est associée à un pronostic défavorable pour les patients (Webb *et al.*, 2011). Dans la progression du cancer, elle jouerait un rôle dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Holt *et al.*, 2010) en causant une désorganisation de la membrane basale par l'activation des précurseurs du HGF (Herter *et al.*, 2005) et de l'uPA (Moran *et al.*, 2006) ainsi que par le clivage de la laminine-332 (Tripathi *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont aussi soulignées l'implication potentielles de TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 et DESC1 dans la progression tumorale. TMPRSS2 a été identifié en surexpression au niveau de la prostate et posséderait la capacité de cliver PAR-2 et ainsi contribuer à la progression tumorale (Wilson *et al.*, 2005). TMPRSS3 est retrouvé en surexpression dans les stades cliniques avancés du cancer de l'ovaire et pourrait servir comme cible potentiel pour la thérapie ou en tant que marqueur pour le diagnostique (Sawasaki *et al.*, 2004). TMPRSS4 est impliqué au niveau des cellules cancéreuses du pancréas dans la formation de métastases et dans l'invasion tumorale. Son niveau d'expression corrèle avec son potentiel métastatique (Wallrapp *et al.*, 2000). Finalement, une diminution de l'expression de DESC1 est observée dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou (Lang et Schuller, 2001; Sedghizadeh *et al.*, 2006).

1.3.4.2 Activation des virus de l'influenza

La capacité de l'hémagglutinine (HA) des virus de l'influenza à médier la fusion entre la membrane virale et cellulaire lors de l'entrée du virus dans la cellule dépend du clivage de HA (HA0) en deux sous-unités HA1 et HA2 qui restent reliées par un pont disulfure (Böttcher *et al.*, 2006). Ce clivage se produit, chez les mammifères, par une protéase de l'hôte présente dans les voies respiratoires, mais chez l'humain, cette protéase n'a pas encore été identifiée à ce jour (Böttcher *et al.*, 2006).

Chez l'humain, plusieurs TTSP sont exprimées au niveau des voies respiratoires (HAT, TMPRSS2, TMPRSS4 et MSPL) et il a été démontré que ces différentes protéases étaient en

mesure de cliver l'hémagglutinine (Choi *et al.*, 2009; Bertram *et al.*, 2010). Ces TTSP pourraient donc jouer un rôle important dans l'infection par les virus de l'influenza.

1.3.4.3 Surdité

Deux TTSP ont été reliées à la surdité, TMPRSS3 et l'hepsine. Des mutations au niveau du gène de TMPRSS3 causent une surdité congénitale autosomale récessive (Scott *et al.*, 2001) qui provoque la dégénérescence des cellules ciliées de la cochlée (Fasquelle *et al.*, 2011). Dans le cas de l'hepsine, la surdité provoquée par son absence semble liée à un développement aberrant de la membrane tectoriale de la cochlée et à une diminution de la my lination du nerf auditif (Szabo et Bugge, 2011).

1.3.4.4 Anémie

Des mutations au niveau du gène TMPRSS6 codant pour la matriptase-2 sont responsables d'une forme d'anémie d ficiante en fer et réfractaire à la thérapie de prise de fer par voie orale (IRIDA, *iron-refractory iron deficiency anemia*) (Finberg *et al.*, 2008). Le lien entre ce type d'anémie et la matriptase-2 a permis d'identifier son rôle important dans la régulation du fer dont il sera question à la section suivante.

1.4 La régulation du fer par la matriptase-2

1.4.1 La matriptase-2

La matriptase-2 a été identifiée chez l'humain et la souris en utilisant une approche *in silico* qui permettait de rechercher dans des bases de données du génome des régions avec des similarités avec les TTSP déjà connues (Velasco *et al.*, 2002). Dans les tissus humain, la matriptase-2 possède une expression très limitée et est seulement détectée à des quantités significatives qu'au niveau du foie (figure 1.8) (Velasco *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2004).

Chez l'humain, la matriptase-2 est composée de 811 acides aminés et comprend dans sa région amino-terminale une queue cytoplasmique suivie d'un domaine transmembranaire, d'un domaine SEA, de deux domaines CUB, de trois domaines LDLRA et d'un domaine catalytique protéase à sérine en carboxy-terminal (figure 1.9). Aucun rôle précis n'a été identifié pour ces différents domaines, sauf pour le domaine catalytique, qui permet de cliver l'hémojuvéline (voir 1.4.4.3).

  la surface cellulaire, la matriptase-2 est principalement retrouvée sous sa forme zymogène inactive (chaîne unique) (Stirnberg *et al.*, 2010).   cet endroit, elle subit un clivage en aval du résidu Arg⁵⁷⁶ qui permet son activation (figure 1.9). Cet  v nement est médié par un mécanisme d'activation en *trans* de l'enzyme qui nécessite la présence d'une

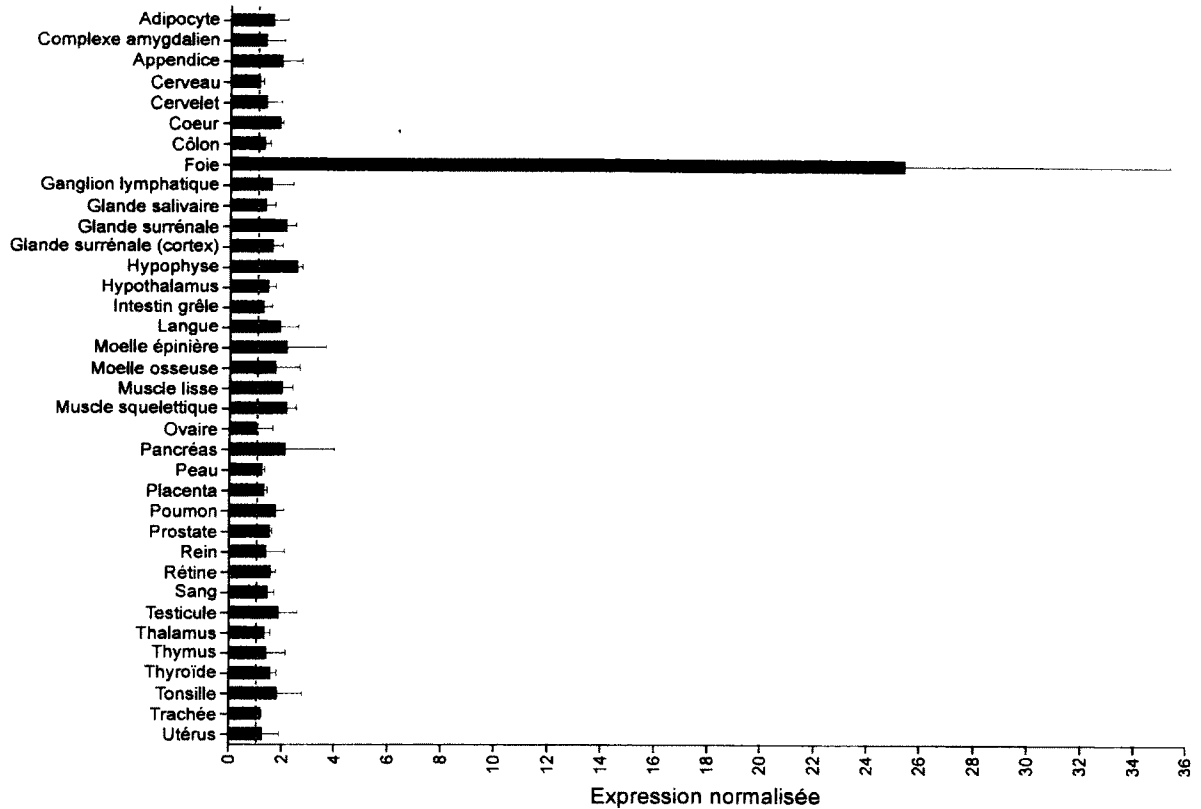


Figure 1.8

Expression de la matriptase-2 dans différents tissus humains

Niveau d'expression normalisé d'ARNm de la matriptase-2 dans différents tissus humains. Une puce contenant des oligonucléotides couvrant 44 775 séquences cibles humaines distinctes a été criblée par un ensemble d'ARNm provenant de 79 tissus humains différents (Su *et al.*, 2004).

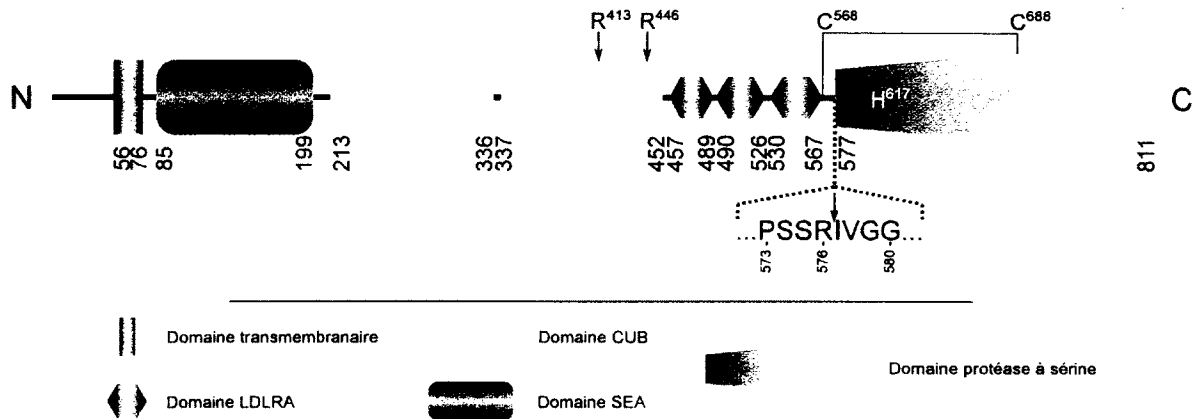


Figure 1.9

Représentation schématique de la matriptase-2

La matriptase-2 est synthétisée sous une forme zymogène qui est activée par un clivage autocatalytique suivant le résidu Arg⁵⁷⁶. Le domaine catalytique clivé reste associé à l'ectodomaine par un pont disulfure (Cys⁵⁶⁸-Cys⁶⁸⁸). L'ectodomaine est relâché de la surface cellulaire suite à des clivages autocatalytiques à la position Arg⁴¹³ ou Arg⁴⁴⁶. Les nombres représentent les limites des différents domaines.

autre matriptase-2 active (Stirnberg *et al.*, 2010). La partie catalytique clivée reste reliée à l'ectodomaine par un pont disulfure (Cys⁵⁶⁸-Cys⁶⁸⁸) pour former une forme double chaînes (Stirnberg *et al.*, 2010). Suite à son activation, la matriptase-2 est relâchée de la surface cellulaire par un autre clivage autocatalytique se produisant en aval du résidu Arg⁴¹³ ou Arg⁴⁴⁶ pour ainsi se retrouver sous sa forme active dans le milieu extracellulaire (figure 1.9) (Stirnberg *et al.*, 2010).

Cependant, avant de se retrouver relarguée de la surface cellulaire, la forme active de la matriptase-2 a la capacité de cliver l'hémoujuvéline, une protéine membranaire importante à l'homéostasie du fer.

1.4.2 Le fer chez les organismes vivants

Le fer est un élément indispensable à la survie de la plupart des organismes vivants, des formes les plus primitives de procaryotes jusqu'à l'humain. Présent à l'état de trace dans ces organismes, le fer est un élément essentiel par son rôle capital dans les processus d'oxydation et de transport d'électrons (Crichton et Charlotheaux-Wauters, 1987).

Le fer entre dans la composition de différents composés bio-organiques dont les plus connus sont les protéines à hème comme l'hémoglobine, la myoglobine et le cytochrome P450. Ces composés sont utilisés pour le transport de gaz ou d'électrons. Le fer qu'ils contiennent est un cofacteur essentiel à de nombreuses réactions métaboliques, entre autres pour le fonctionnement du transporteur d'oxygène, l'hémoglobine, et pour des protéines de la chaîne de transport d'électrons (Du *et al.*, 2008). Certaines métalloprotéines, qui nécessitent un ion métallique en tant que cofacteur, requièrent le fer comme la ferritine et la rubrédoxyne (Andrews, 2010). Il y a aussi plusieurs enzymes vitaux qui contiennent du fer comme la catalase et les lipoxygénases (Bergmann *et al.*, 2010; Funk *et al.*, 1990).

Chez les mammifères, la distribution du fer dans l'organisme est finement contrôlée, principalement à cause du haut potentiel de toxicité des ions métalliques (Nanami *et al.*, 2005). Pour cette raison, les organismes vivants ont développé d'importants mécanismes assurant sa régulation.

1.4.3 Régulation du fer dans l'organisme

De part sa capacité à générer des radicaux hydroxyles bioréactifs, principalement à partir d'anions superoxydes, les niveaux corporels de fer nécessitent une régulation importante afin d'éviter la toxicité (Domenico, Ward et Kaplan, 2008). Ainsi, les niveaux plasmatique et cellulaire du fer sont finement régulés par des mécanismes qui contrôlent son absorption, son transport, son emmagasinage et son recyclage (Andrews et Schmidt, 2007).

Afin d'être absorbé, le fer insoluble provenant des végétaux, sous forme ferrique (Fe^{3+}), doit être réduit en sa forme ferreuse (Fe^{2+}), soluble (figure 1.10). Cette réduction est effectuée par la réductase Dcytb (*Duodenal cytochrome B*), présente au niveau de la membrane en brosse du duodénum et du jéjunum supérieur (Mackenzie et Garrick, 2005). Le fer ferreux est ensuite transporté à travers la membrane cellulaire apicale des entérocytes par le transporteur DMT1 (*Divalent Metal Transporter-1*), qui se spécialise dans le transport des métaux divalents (Mackenzie et Garrick, 2005). Dans le cas du fer provenant d'une source animale, celui-ci possède une meilleure biodisponibilité que la forme inorganique contenue dans les végétaux et son absorption semble médiée par un mécanisme moléculaire différent (Cui, Wu et Zhou, 2009).

Les entérocytes peuvent ensuite accumuler le fer dans la cellule ou l'exporter vers la circulation. L'emmagasinement à l'intérieur de la cellule se fait par l'intermédiaire de la ferritine, un complexe protéique composé de 24 sous-unités formant une large cavité pouvant accueillir jusqu'à 4 500 atomes de fer déposé sous la forme de minéraux (Friedman *et al.*, 2011). Ce complexe possède une activité ferroxidase qui permet d'oxyder le fer ferreux soluble (Fe^{2+}) présent dans le cytosol, qui possède une activité réductrice importante, en sa forme ferrique insoluble (Fe^{3+}), incapable d'activité réductrice (Friedman *et al.*, 2011). La perte d'activité réductrice permet de protéger les cellules contre la formation médiée par le fer de radicaux hydroxyles toxiques pour la cellule (Friedman *et al.*, 2011). L'export vers la circulation de l'organisme se fait en utilisant un transporteur spécifique présent à la membrane basolatérale, la ferroportine (Wang et Pantopoulos, 2011). Une fois à l'extérieur de la cellule, le fer est ensuite immédiatement oxydé de sa forme ferreuse (Fe^{2+}) à sa forme ferrique (Fe^{3+}) par l'héphaestine, une ferroxidase liée à la membrane, afin d'être transporté dans la circulation par la transferrine (Tf) (Petрак et Vyoral, 2005).

La transferrine est une bêta globuline synthétisée par le foie qui est constituée d'une chaîne polypeptidique unique possédant deux sites de captation du Fe^{3+} . Elle permet le transport du fer de l'intestin vers les réserves hépatiques ainsi que vers les cellules précurseurs des érythrocytes, les réticulocytes, situées au niveau de la moelle osseuse (Wang et Pantopoulos, 2011). L'entrée de la transferrine dans la cellule s'effectue par les récepteurs 1 de la transferrine (TfR1). Lorsque la transferrine se fixe à son récepteur, le complexe ligand-récepteur nouvellement formé est endocyté à partir de la surface cellulaire (Andrews et Schmidt, 2007). La transferrine se retrouve ensuite à l'intérieur d'endosomes acides et le fer qu'elle contient est ensuite relâché puis réduit en Fe^{2+} par la réductase STEAP3, ce qui permet la sortie du fer vers le cytosol via le transporteur DMT1 (Ohgami *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2007). Au niveau des hépatocytes, le fer sera emmagasiné à l'intérieur de ferritines (Cui, Wu et Zhou, 2009) alors qu'au niveau des réticulocytes, le fer sera utilisé pour la synthèse de l'hème qui entrera dans la formation de l'hémoglobine (Ohgami *et al.*, 2005).

Lorsque le niveau plasmatique en fer est faible, son relargage des réserves est augmenté afin de rétablir l'équilibre. Ce relargage se fait à partir des ferritines et sa sortie dans la

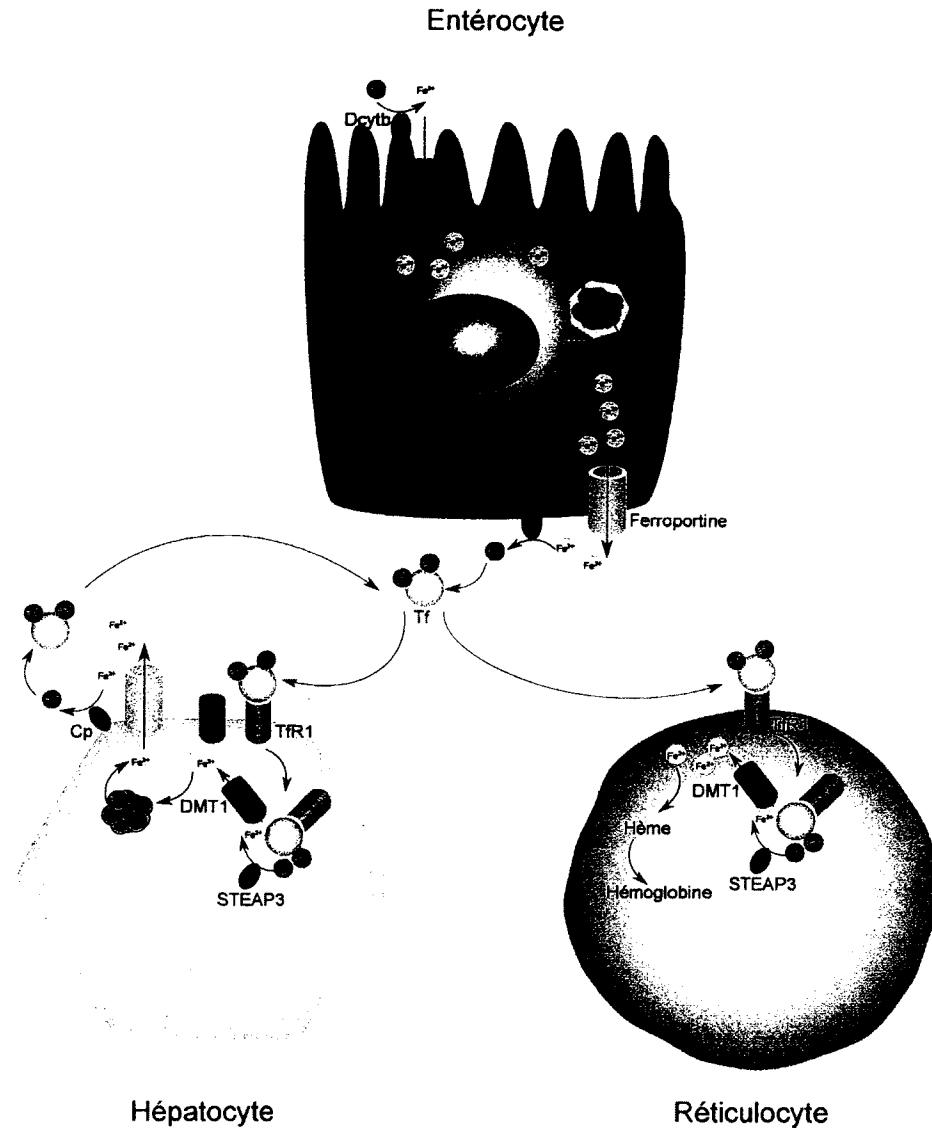


Figure 1.10
Régulation du fer dans l'organisme

Le fer ferrique (Fe^{3+}) provenant de l'alimentation est réduit en sa forme ferreuse (Fe^{2+}) par la réductase Dcytb au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Une fois réduit, le Fe^{2+} entre dans la cellule par le transporteur DMT1. Le fer peut ensuite être emmagasiné à l'intérieur de ferritines sous forme Fe^{3+} ou être exporté vers la circulation par la ferroportine, présente à la membrane basolatérale. À l'extérieur de la cellule, le Fe^{2+} est immédiatement oxydé en Fe^{3+} par l'héphaestine, ce qui permet la liaison du fer à la transferrine (Tf). Tf permet le transport du fer vers les réserves hépatiques (hépatocytes) et vers les cellules précurseurs des érythrocytes, les réticulocytes. L'entrée du fer dans ces cellules se fait par la liaison de Tf au récepteur TfR1, suite à quoi le complexe est endocyté et se retrouve à l'intérieur d'endosomes acides, ce qui permet la dissociation du Fe^{3+} de Tf. Le Fe^{3+} est ensuite réduit en Fe^{2+} par la réductase STEAP3, ce qui permet la sortie du fer vers le cytosol via le transporteur DMT1. Au niveau des hépatocytes, le fer sera accumulé à l'intérieur de ferritines et libéré de la cellule lors de carence en fer en empruntant la ferroportine. À l'extérieur de la cellule, le Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} par la céruloplasmine (Cp), ce qui permet la liaison du fer à Tf. Dans le cas des réticulocytes, le Fe^{2+} sera utilisé pour la synthèse de l'hème qui entrera dans la formation de l'hémoglobine.

circulation est médié par la ferroportine par un mécanisme comparable à celui présent au niveau basolatéral des entérocytes. Le fer ferrique contenu dans la ferritine (Fe^{3+}) est libéré et réduit en sa forme ferreuse (Fe^{2+}) par un mécanisme pas encore complètement élucidé mais nécessitant la dégradation du complexe protéique de la ferritine (Wang et Pantopoulos, 2011). Le fer ferreux (Fe^{2+}) libéré est ensuite transporté à l'extérieur de la cellule par la ferroportine puis oxydé de nouveau en sa forme ferrique (Fe^{3+}) par les ferroxidases héphaestine, principalement exprimée au niveau des entérocytes, ou céruloplasmine, aux autres sites de réserve, afin de permettre son transport par la transferrine (Chepelev et Willmore, 2011; Wang et Pantopoulos, 2011). Étant donné que le corps ne possède aucune voie d'excrétion du fer au niveau du rein, la régulation de sa libération des sites d'emmagasinage devient donc un mécanisme majeur du contrôle du fer plasmatique (Cui, Wu et Zhou, 2009).

1.4.4 Contrôle de la libération du fer

1.4.4.1 L'hepcidine

La régulation des niveaux de fer corporel se fait principalement en contrôlant sa libération vers le sang depuis ses sites d'emmagasinages. Étant donné que la ferroportine est le principal transporteur de fer, la quantité présente à la surface cellulaire permet de contrôler la quantité de fer pouvant être relâchée. Sa localisation à la surface cellulaire est contrôlée par une hormone, l'hepcidine (figure 1.11) (Camaschella et Silvestri, 2008; Muckenthaler, 2008; Ganz, 2006). Cette hormone peptidique est synthétisée au niveau du foie par les hépatocytes sous une forme précurseur de 84 acides aminés qui sera ensuite clivée en une forme mature de 25 acides aminés par la prohormone convertase furine avant d'être sécrétée dans la circulation sanguine (Ganz et Nemeth, 2011). Une fois sécrétée, l'hepcidine se liera éventuellement aux ferroportines des cellules emmagasinatrices de fer (hépatocytes, macrophages et entérocytes) et provoquera leur phosphorylation, internalisation puis leur dégradation (Nemeth *et al.*, 2004). Une atténuation de la présence de la ferroportine à la membrane plasmique conduit à une diminution de la capacité à relâcher le fer emmagasiné dans les hépatocytes au niveau du foie, prévient le recyclage provenant de la dégradation des érythrocytes au niveau des macrophages et réduit l'absorption du fer au niveau des entérocytes de l'intestin.

1.4.4.2 Expression de l'hepcidine

L'expression de l'hepcidine représente un point de contrôle important dans l'homéostasie du fer. Une dérégulation de son expression peut avoir d'importantes conséquences sur les niveaux en fer dans l'organisme. Il a été observé que des souris déficientes en hepcidine (Nicolas *et al.*, 2001) et des humains possédant des mutations au sein du gène HAMP (Roetto *et al.*, 2003) développent de sévères désordres de surcharge en fer. De façon opposée, des souris possédant une augmentation au niveau hépatique de l'expression de l'hepcidine manifestent unem sévère anémie due à une déficience en fer (Nicolas *et al.*,

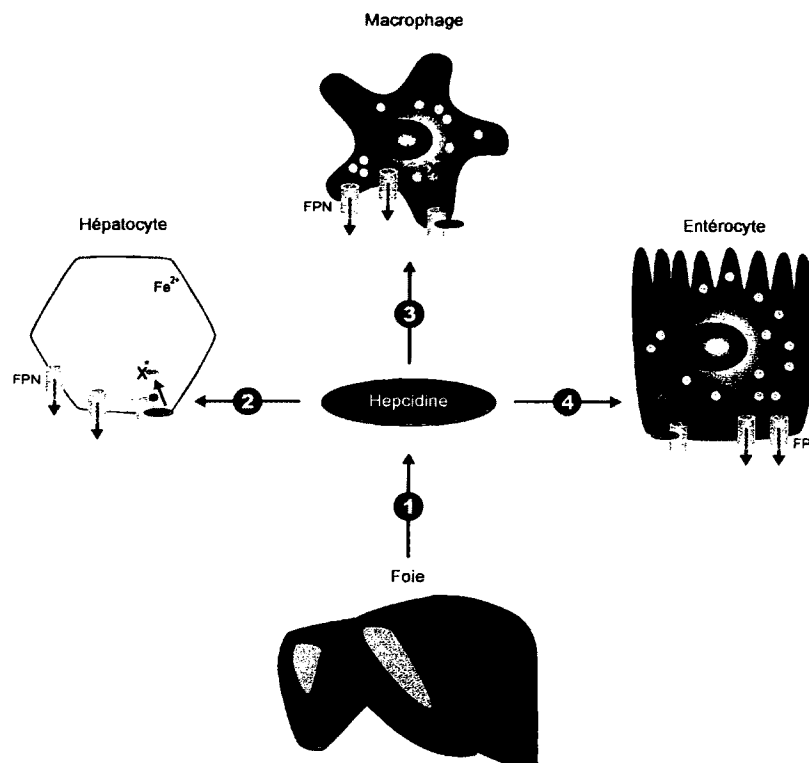


Figure 1.11

Dégradation de la ferroportine par l'hepcidine

Les hépatocytes, au niveau du foie, sécrètent dans la circulation sanguine de l'hepcidine (1) qui se lie éventuellement aux ferroportines (FPN) des cellules possédant ce transporteur du fer à leur surface cellulaire (hépatocytes, macrophages et entérocytes). Cette liaison conduit à la phosphorylation de la ferroportine, son internalisation puis finalement à sa dégradation. Une atténuation de la présence de la ferroportine à la membrane plasmique conduit à une diminution de la relâche de fer emmagasiné dans les hépatocytes du foie (2), prévient le recyclage provenant de la dégradation des érythrocytes au niveau des macrophages (3) et réduit l'absorption du fer au niveau des entérocytes de l'intestin (4).

2002a). L'ensemble de ces exemples démontre bien l'importance de l'hepcidine dans la régulation du fer et l'importance de maintenir des niveaux adéquats de cette hormone.

L'expression de l'hepcidine par les hépatocytes est régulée en fonction des concentrations en fer dans l'organisme (Camaschella et Silvestri, 2011). Cette régulation est assurée par une signalisation passant par la voie BMP (*Bone morphogenetic protein*) – SMAD (*Son of mothers against decapentaplegic*) (figure 1.12). Dans cette voie, il y a formation d'un complexe multiprotéique à la surface cellulaire des hépatocytes entre le ligand, le BMP (BMP-2, -4 ou -6), un co-récepteur membranaire du BMP, l'hémojuvéline (HJV), ainsi que les récepteurs de type I et II du BMP (BMPRI et -II) (Babitt *et al.*, 2006). Le BMP6, qui est produit principalement par les cellules endothéliales sinusoides et non-parenchymateuses du foie (Zhang *et al.*, 2011), a été démontré comme étant le BMP dont l'expression est sensible au fer (Andriopoulos *et al.*, 2009). La formation du complexe multiprotéique provoque la phosphorylation de SMAD-1, -5 et -8 et la formation subséquente d'un complexe

hétéromérique avec SMAD-4. Suite à la translocation au noyau, le complexe hétéromérique SMAD stimule la transcription du gène HAMP codant pour l'hepcidine.

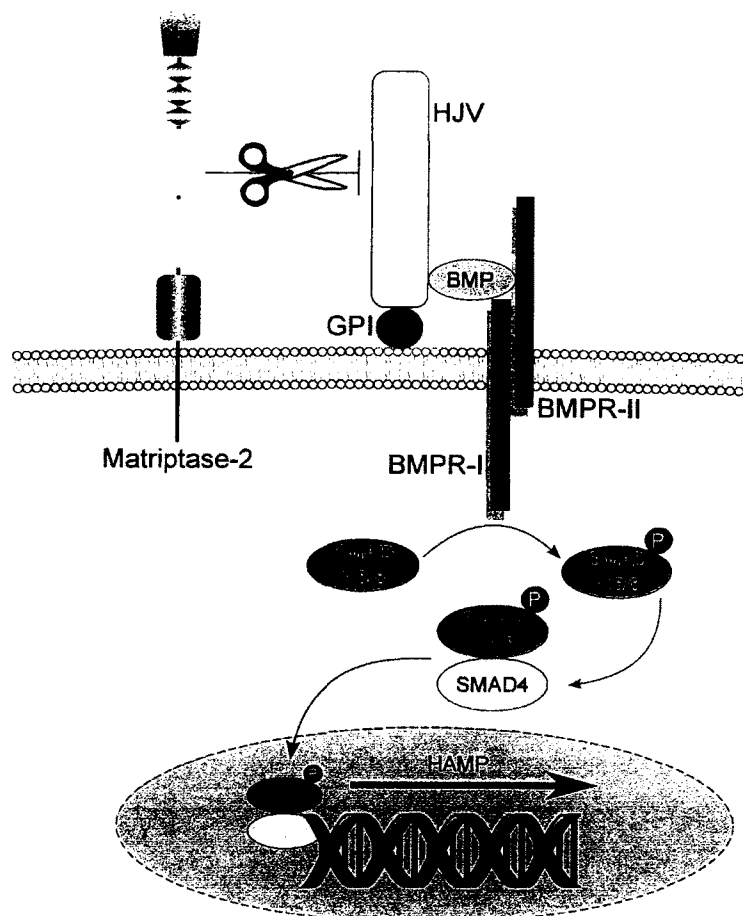


Figure 1.12

Régulation de l'expression de l'hepcidine

BMP2, -4 ou -6 se lie aux récepteurs BMPR-I et -II ainsi qu'à son co-récepteur membranaire, l'hémojuvéline (HJV). HJV est relié à la membrane cellulaire par un ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cette liaison au récepteur produit la phosphorylation de SMAD-1, -5 et -8 et la formation subséquente d'un complexe hétéromérique avec SMAD-4. Suite à la translocation au niveau du noyau, le complexe hétéromérique SMAD stimule la transcription du gène HAMP. Une régulation négative de la voie BMP-HJV-HAMP est médiée par le clivage protéolytique de l'hémojuvéline par la matriptase-2.

L'expression de l'hepcidine est aussi favorisée par les cytokines inflammatoires, particulièrement IL-6, qui en se liant à son récepteur, active la signalisation de JAK2 et la phosphorylation de STAT3 (Falzacappa *et al.*, 2007). Cette voie requiert aussi l'intégrité de la voie BMP-SMAD pour pleinement activer l'expression de l'hepcidine (Wang *et al.*, 2005).

La voie BMP–SMAD et la transcription de l'hepcidine sont toutes les deux réprimées dans les situations d'hypoxie, de manque en fer et lors de l'expansion érythropoïétique, mais les mécanismes moléculaires qui y sont associés sont peu connus (Hentze *et al.*, 2010). Alors que les BMP jouent un rôle crucial dans la régulation à la hausse de l'expression de l'hepcidine, la matriptase-2 est essentielle au mécanisme d'inhibition de son expression (Folgueras *et al.*, 2008) (figure 1.12).

1.4.4.3 Contrôle de l'expression de l'hepcidine par la matriptase-2

L'identification du rôle de la matriptase-2 dans l'inhibition de l'hepcidine a été obtenue récemment par l'établissement d'un lien entre une incapacité d'origine génétique à réprimer l'hepcidine et une mutation du gène *TMPRSS6*, codant pour la matriptase-2 (Du *et al.*, 2008; Finberg *et al.*, 2008). Cette association a été établie à partir du modèle murin *Mask* qui présente un phénotype récessif caractérisé par une perte progressive du pelage (sauf la tête) et une anémie microcytaire. Cette forme d'anémie provoque un faible niveau de fer dans le plasma et un épuisement des réserves de fer (Du *et al.*, 2008). Chez ces souris, un haut taux d'hepcidine a été identifié et cette augmentation aberrante se produit malgré l'anémie, qui normalement diminue son niveau d'expression (Nicolas *et al.*, 2002b). Cette augmentation mène à une absorption réduite du fer provenant de l'alimentation. La mutation responsable du phénotype *Mask* a par la suite été identifiée et localisée au niveau du gène *TMPRSS6*.

La mutation identifiée a pour conséquence de produire une forme de la matriptase-2 présentant une absence de domaine catalytique (Du *et al.*, 2008). Il a ainsi été démontré que l'activité catalytique de la matriptase-2 était responsable de la régulation à la baisse de l'expression de l'hepcidine. Chez l'humain, plusieurs mutations ont été identifiées (figure 1.13). Ces mutations touchent différents domaines de l'enzyme et causent des mutations faux-sens, qui modifient un acide aminé spécifique par un autre, non-sens, qui insèrent un codon de terminaison, ou décalent, qui provoquent un changement du cadre de lecture du code génétique. Ces modifications provoquent soit une perte de la synthèse du domaine catalytique ; la synthèse d'un domaine catalytique inactif ou incapable de s'activer ; ou une rétention de l'enzyme à l'intérieur de la cellule (Silvestri *et al.*, 2009; Ramsay *et al.*, 2009). L'absence d'une forme active de matriptase-2 à la surface cellulaire empêche le clivage de l'hémojuvéline, ce qui résulte en une anémie microcytaire résistante au traitement par le fer oral, l'IRIDA. Les patients atteints d'IRIDA possèdent un niveau d'hepcidine très élevé en dépit d'une déficience en fer. Différentes mutations retrouvées chez l'humain (non-sens et modification du cadre de lecture) conduisent à des formes tronquées qui rappellent la matriptase-2^{*Mask*}. Ces résultats chez la souris et l'humain indiquent que la matriptase-2 peut être impliquée dans des cas de déficience en fer chez les mammifères (Du *et al.*, 2008).

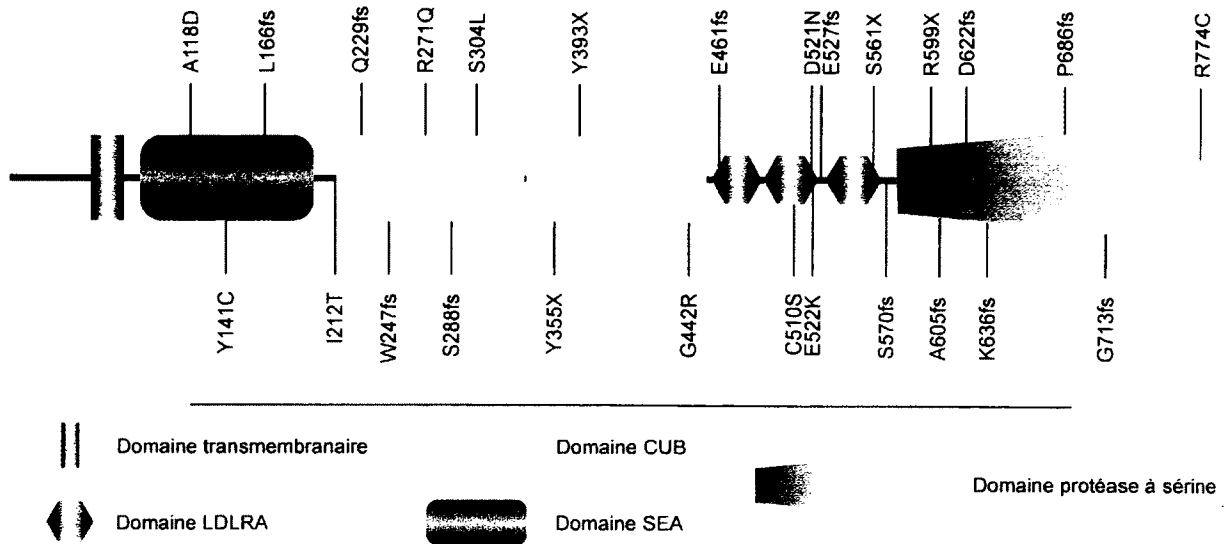


Figure 1.13

Mutations de la matriptase-2 impliquées dans l'anémie de type IRIDA

Localisation des différentes mutations de la matriptase-2 impliquées dans l'anémie de type IRIDA. Les mutations de l'ADN de la matriptase-2 provoquent des mutations faux-sens qui modifient un acide aminé spécifique par un autre, non-sens (X) qui insèrent un codon de terminaison ou décalent (fs) qui provoquent un changement du cadre de lecture du code génétique.

1.5 Projet de recherche

1.5.1 Problématique

L'importance de la matriptase-2 dans la régulation du fer a récemment été révélée par l'identification de mutations au niveau de son gène. Ces mutations sont impliquées dans un type d'anémie microcytaire résistant au traitement par le fer oral (IRIDA) (Finberg *et al.*, 2008). Les différentes études publiées (Du *et al.*, 2008; Finberg *et al.*, 2008; Folgueras *et al.*, 2008; Silvestri *et al.*, 2008) sur la matriptase-2 ont démontré que son activité catalytique apparaît essentielle à sa fonction de régulation du fer (Silvestri *et al.*, 2009). Des mutations identifiées dans les domaines autres que catalytique (SEA, CUB et LDLRA) se sont aussi avérées à abolir sa fonction de régulation sur l'hepcidine (Finberg *et al.*, 2008). Ces mutations semblent supprimer l'activité du domaine protéase. Les différents domaines mosaïques de l'ectodomaine semblent donc essentiels à la fonction de l'enzyme. L'importance des domaines de l'ectodomaine se retrouve aussi chez d'autres TTSP. En effet, TMPRSS3 possède également des mutations identifiées dans les différents domaines autres que catalytiques et ces mutations engendrent une surdité récessive autosomale (Guipponi, Antonarakis et Scott, 2008). La région cytoplasmique est aussi une candidate ayant un grand potentiel pour la régulation de l'enzyme. En effet, la queue cytoplasmique de la matriptase-2 comporte une variété de motifs potentiels tels des motifs de phosphorylation et d'autres ayant un rôle dans le routage des protéines (figure 1.14). En effet, les sérines en position 7 et 43 du domaine cytoplasmique de la matriptase-2 font partis de potentiels motifs de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) et la région 7-12 constitue une région à laquelle des protéines

ayant un domaine SH2 (*Src homology 2*) peuvent se lier (Hwang *et al.*, 2002). La matriptase-2 possède aussi à proximité de sa région transmembranaire deux motifs d'exportation du réticulum endoplasmique de protéine transmembranaire de type II pouvant se lier à Sar1 (Giraud et Maccioni, 2003). Aucun rôle n'a à ce jour été assigné à ces différents motifs pour la matriptase-2. De plus, peu de substrats ont été identifiés jusqu'à maintenant, l'hémojuvéline étant le premier.



Figure 1.14

Motifs identifiés dans la queue cytoplasmique de la matriptase-2

Motifs identifiés dans le domaine cytoplasmique de la matriptase par l'analyse de Minimotif Miner (Mi *et al.*, 2012). PKC : motif de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) ; SH2 : motif de liaison à SH2 ; Sar1 : motif d'exportation du réticulum endoplasmique de protéine transmembranaire de type II se liant à Sar1.

En tant que suppresseur de l'expression de l'hepcidine, la matriptase-2 est une candidate possible pour une intervention thérapeutique afin de traiter les désordres du métabolisme du fer. Une connaissance approfondie de sa régulation, de ses propriétés catalytiques et de sa biosynthèse est donc souhaitable. Il s'agit de l'objet de cette thèse de doctorat.

1.5.2 Hypothèse de recherche

La matriptase-2 est un enzyme possédant une multitude de domaines, cependant aucun rôle n'a encore été associé à ceux-ci. Notre hypothèse de recherche stipule que les différents domaines de la matriptase-2 jouent des rôles essentiels dans la régulation et l'activité de l'enzyme.

1.5.3 Objectifs de recherche

Objectif 1 : Déterminer la spécificité du domaine catalytique de la matriptase-2

Le domaine catalytique de la matriptase-2 est sans aucun doute son domaine ayant la plus grande importance. L'action de l'enzyme est directement associée à la présence de l'activité de ce domaine. Le présent objectif vise à identifier la spécificité de la matriptase-2 ainsi que son profil d'inhibition. L'étude se fera en comparant la matriptase-2 à trois autres TTSP (matriptase, DESC1, hepsine) pour ainsi couvrir trois sous-familles de TTSP différentes.

Objectif 2 : Déterminer la fonction de la queue cytoplasmique de la matriptase-2

La matriptase-2 est constituée de pas moins de neuf domaines de six types différents. Jusqu'à maintenant, très peu d'information est disponible sur le rôle de ces différents domaines. Par la présence de nombreux motifs susceptibles de jouer un rôle essentiel dans sa biosynthèse et sa régulation, le domaine cytoplasmique de la matriptase-2 est d'un intérêt important. L'importance de ce domaine sur la fonction de clivage de l'hémojuvéline et de la régulation de l'expression de l'hepcidine sera analysée.

ARTICLE I

Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides

Auteurs de l'article : François Béliveau, Antoine Désilets et Richard Leduc.

Statut de l'article : Publié dans *FEBS Journal* (2009), vol. 276, no 8, p. 2213–2226.

Avant-propos :

L'article « *Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides* » paru dans *FEBS Journal* présente les différences au niveau des propriétés enzymatiques de la matriptase-2 envers trois autres TTSP, la matriptase, l'hepsine et DESC1. J'ai contribué à l'élaboration et à l'exécution du travail expérimental présenté dans cet article ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

Les sérines protéases transmembranaires de type II (TTSP) sont une classe émergente d'enzymes protéolytiques impliquées dans l'homéostasie des tissus et dans un grand nombre de désordres physiologiques tel le cancer. Pour mieux définir les fonctions biochimiques d'un sous-ensemble de ces protéases, nous avons comparé les propriétés enzymatiques de la matriptase, la matriptase-2, l'hepsine et DESC1 en utilisant une série de substrats peptidiques à fluorescence confinée intramoléculairement qui possèdent un groupement amino-terminal *o*-aminobenzoyle (fluorophore) et un groupement carboxy-terminal 3-nitrotyrosine (confiner). Nous avons établi la séquence des peptides (P4 à P4') sur la base de la séquence d'activation de la matriptase (RQAR-VVGG). Les positions P4, P3, P2 et P1' ont été substituées par des acides aminés non-polaires (Ala, Leu), aromatique (Tyr), acide (Glu) et basique (Arg) et où P1 a été fixé à Arg. Des quatre TTSP étudiées, la matriptase-2 est la plus permissive et la matriptase la plus discriminante, avec une spécificité distincte pour les résidues Arg en P4, P3 et P2. DESC1 possède une préférence similaire à celle de la matriptase, mais avec une propension pour les petits acides aminés non-polaires (Ala) en P1'. L'hepsine partage des similarités avec la matriptase et DESC1, mais est nettement plus permissive en P2. La matriptase-2 manifeste une spécificité plus large ainsi qu'une inhibition par le substrat pour certains des substrats utilisés. Finalement, nous avons découvert que l'antithrombine III possède des propriétés d'inhibition robustes envers la matriptase, la matriptase-2, l'hepsine et DESC1 alors que PAI-I (*plasminogen activator inhibitor-1*) et l' α_2 -antiplasmine inhibent la matriptase-2, l'hepsine et DESC1 ainsi que la matriptase à un moindre niveau. En résumé, notre étude a révélé que ces enzymes possèdent des préférences distinctes pour leurs substrats.

**PROBING THE SUBSTRATE SPECIFICITIES OF MATRIPTASE, MATRIPTASE-2, HEPSIN,
AND DESC1 WITH INTERNALLY QUENCHED FLUORESCENT PEPTIDES**

François Béliveau, Antoine Désilets, and Richard Leduc*

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, CANADA, J1H 5N4

Running title: Distinct substrate specificities of TTSPs

***Corresponding author:** Richard Leduc, Ph.D.; e-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

2.1 Abstract

Type II transmembrane serine proteases are an emerging class of proteolytic enzymes involved in tissue homeostasis and a number of human disorders such as cancer. To better define the biochemical functions of a subset of these proteases, we compared the enzymatic properties of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 using a series of internally quenched fluorogenic peptide substrates containing *o*-aminobenzoyl and 3-nitro-tyrosine. We based the sequence of the peptides on the P4 to P4' activation sequence of matriptase (RQAR-VVGG). Positions P4, P3, P2 and P1' were substituted with nonpolar (Ala, Leu), aromatic (Tyr), acid (Glu) and basic (Arg) amino acids, whereas P1 was fixed to Arg. Of the four type II transmembrane serine proteases studied, matriptase-2 was the most promiscuous, and matriptase was the most discriminating, with a distinct specificity for Arg residues at P4, P3 and P2. DESC1 had a preference similar to that of matriptase, but with a propensity for small nonpolar amino acids (Ala) at P1'. Hepsin shared similarities with matriptase and DESC1, but was markedly more permissive at P2. Matriptase-2 manifested broader specificities, as well as substrate inhibition, for selective internally quenched fluorescent substrates. Lastly, we found that antithrombin III has robust inhibitory properties toward matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1, whereas plasminogen activator inhibitor-1 and α_2 -antiplasmin inhibited matriptase-2, hepsin and DESC1, and to a much lesser extent, matriptase. In summary, our studies revealed that these enzymes have distinct substrate preferences.

2.2 Introduction

Type II transmembrane serine proteases (TTSPs) are a newly recognized family of S1 class proteolytic enzymes, with 20 distinct members known in mice and humans. TTSPs are divided into four subfamilies based on their modular structure (Szabo and Bugge,

2008). The HAT/DESC subfamily is the largest and is comprised of HAT, DESC1–4 and HAT-like HATL3–5. It exhibits the simplest modular structure of the stem region, which consists of a single sea urchin sperm protein, an enteropeptidase and an agrin domain (SEA). The matriptase subfamily contains three highly homologous proteases: matriptase, matriptase-2 and matriptase-3. All matriptases have similar stem regions, with one SEA, two C1r/C1s, urchin embryonic growth factor, bone morphogenic protein-1 (CUB), and three (matriptase-2 and matriptase-3) or four (matriptase) low-density lipoprotein receptor class A domains (LDLRA). Members of the hepsin/TMPRSS/enteropeptidase subfamily (hepsin, MSPL, TMPRSS2–5) possess a short stem region containing a single scavenger Cys-rich domain (SR) (hepsin, TMPRSS5), preceded by a single LDLRA domain (MSPL, TMPRSS2–4).

Over the past few years, accumulating evidence has revealed the distinct and important roles these enzymes play in homeostasis and pathological conditions (Szabo and Bugge, 2008). The most extensively studied TTSP, matriptase, is involved in epithelial development by its ability to cleave cell-surface and extracellular matrix proteins, thereby regulating cellular adhesion and growth. Numerous potential matriptase substrates have been identified, including protease-activated receptor-2 (Takeuchi *et al.*, 2000), pro-urokinase plasminogen activator (Takeuchi *et al.*, 2000; Lee, Dickson and Lin, 2000), pro-hepatocyte growth factor (Lee, Dickson and Lin, 2000), pro-prostasin (Netzel-Arnett *et al.*, 2006), pro-filaggrin (List *et al.*, 2003), transmembrane and associated with src kinases (Trask/CD318/SIMA135/CDGP-1) (Bhatt *et al.*, 2005) and macrophage-stimulating protein 1 precursor (proMSP-1) (Bhatt *et al.*, 2007). Elevated levels of matriptase have been found in epithelial tumors (Benaud *et al.*, 2002), and overexpression of the enzyme in transgenic mice induces squamous cell carcinomas (List *et al.*, 2005). A direct link between matriptase and a skin disease (autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis) has been established (Avrahami *et al.*, 2008; Basel-Vanagaite *et al.*, 2007) and is the result of a genetic mutation which leads to loss of proteolytic activity (Désilets *et al.*, 2008; List *et al.*, 2007).

The roles of other TTSPs have not been investigated in as much detail as matriptase. The expression of matriptase-2 (Ramsay *et al.*, 2008), which cleaves type I collagen, fibronectin and fibrinogen *in vitro* (Velasco *et al.*, 2002), correlates with suppression of the invasiveness and migration of prostate and breast cancer cells (Parr *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2008). In addition, a recent report demonstrated that mutations in the gene encoding matriptase-2 are associated with iron-refractory, iron-deficiency anemia (Finberg *et al.*, 2008). Hepsin,

which activates factor VII (Kazama *et al.*, 1995), pro-hepatocyte growth factor (Kirchhofer *et al.*, 2005) and pro-urokinase-type plasminogen activator (Moran *et al.*, 2006) may play an important role in hearing (Guipponi *et al.*, 2008). This TTSP is also actively involved in prostate cancer progression and metastasis (Klezovitch *et al.*, 2004; Srikantan *et al.*, 2002), and is used as a marker for the detection of early prostate cancer (Kelly *et al.*, 2008). DESC1 confers tumorigenic properties on MDCK cells and is upregulated in tumors of different origin (Viloria *et al.*, 2007). The deregulation of TTSPs is thus linked to multiple pathological states.

To better understand the role of these enzymes, we purified and enzymatically characterized four TTSPs from three different subfamilies: matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1. We determined their pH optimum, their k_{cat} , K_m and k_{cat}/K_m values toward a number of internally quenched fluorescent (IQF) peptides and their sensitivity to various chemical and physiological inhibitors. In a side-by-side comparison, we find that these TTSPs exhibit specific and distinct biochemical and enzymatic properties.

2.3 Results

Expression, purification and characterization of human matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1

To study TTSP specificity, we first expressed and purified soluble recombinant forms of the enzymes. The matriptase construct (amino acids 596–855, 29 kDa theoretical molecular mass) was expressed in *Escherichia coli* and purified as previously described (Désilets *et al.*, 2006). The matriptase-2, hepsin and DESC1 constructs (84, 45 and 45 kDa, respectively) (Fig. 2.1A) expressed in *Drosophila* S2 cells as C-terminally V5-His tagged fusion proteins had their N-terminal cytoplasmic and transmembrane domains removed. The secreted soluble enzymes were purified from the media supernatants by immobilized metal-chelate affinity chromatography. Typically, 50–100 μg of purified recombinant enzyme is obtained from 1 l of cell media. As shown in Fig. 2.1B, two forms of hepsin were detected that migrated as 45 kDa (zymogen form consisting of amino acids 45–417) and 30 kDa (autocatalytically processed form consisting of amino acids 163–417). The absence of higher molecular mass forms of DESC1 and matriptase-2 suggests that, under these conditions, the zymogen forms were more efficiently converted to their 32 kDa (amino acids 192–423) and 28 kDa (amino acids 577–811) forms, respectively. Each enzyme preparation was enzymatically pure. No activity using

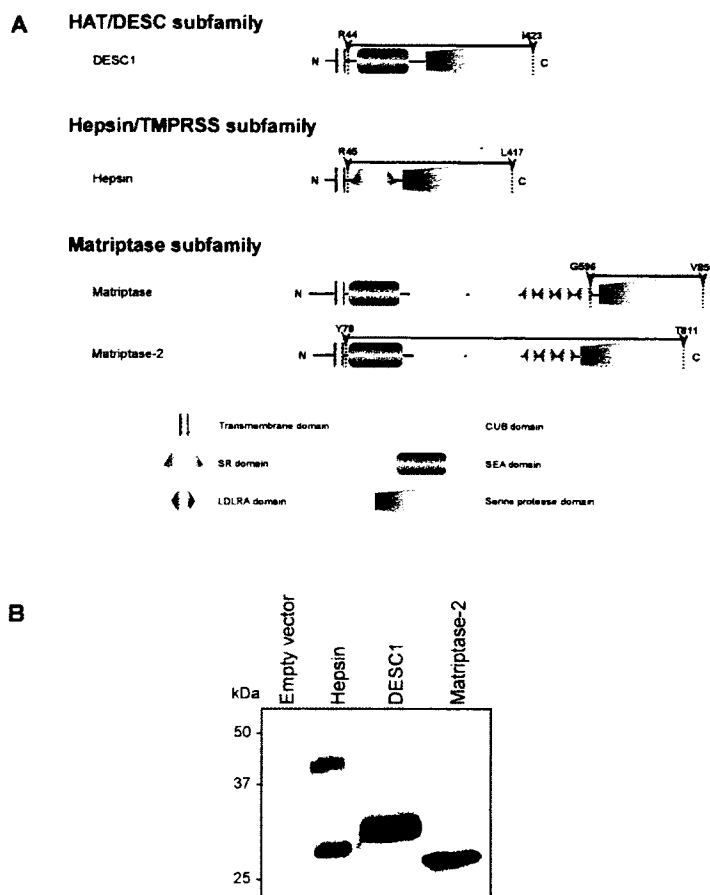


Figure 2.1
TTSP expression and purification

(A) Schematic representations of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1. Arrows and numbers indicate the first and last amino acids of the constructs. Recombinant matriptase has a His₆ epitope at the N-terminus, whereas matriptase-2, hepsin and DESC1 have a V5-His epitope at the C-terminus. (B) Purification of TTSPs from S2 cell medium. TTSP expression was induced in S2 cell medium by adding copper sulfate. The His₆-tagged TTSPs were then purified from the medium by FPLC using a nickel-charged resin. Purified enzymes were loaded on 12 % SDS/PAGE gels under reducing conditions and analyzed by western blotting using an antibody directed against the V5 tag located on the C-terminus.

Gln-Ala-Arg tripeptide conjugated to the fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) as a substrate was detected in supernatants from untransfected S2 cells that underwent the same purification procedure as the supernatant from stably transfected cells. The enzyme preparations were titrated using the irreversible inhibitor 4-methylumbelliferyl *p*-guanidinobenzoate to determine the precise active site concentration of each preparation which was adjusted to a final concentration of 100 nM.

To examine the influence of various physiological environments on enzyme activity, we analyzed the pH profile of each purified TTSP. We assayed for proteolytic activity using Boc-

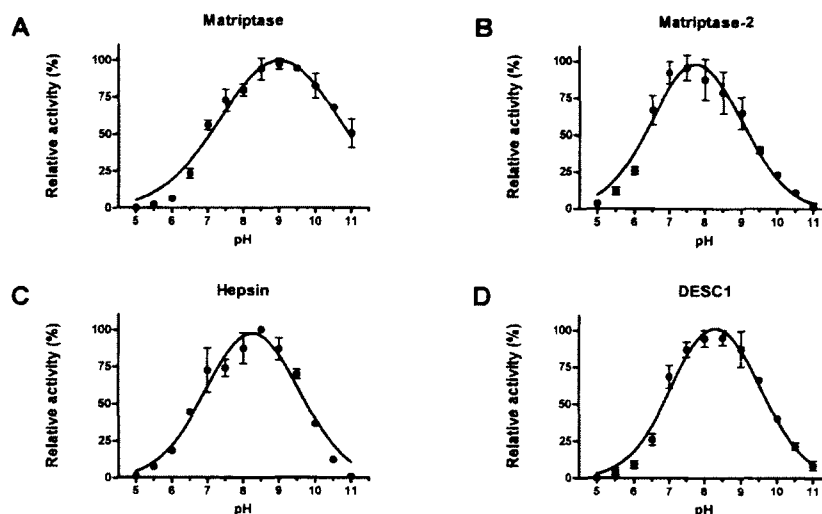


Figure 2.2
TTSP pH profile

(A) Matriptase, (B) matriptase-2, (C) hepsin and (D) DESC1 were incubated with MES (pH 5–7), Tris (pH 7–9) and CAPS (pH 9–11) at various pH values. Enzymatic activities were determined by monitoring the fluorescence signal of 50 μ M Boc-Gln-Ala-Arg-AMC and are presented as the relative activities at each pH. Measurements were performed in duplicate and represent the means \pm SD of at least three independent experiments. The results were plotted with least squares regression analysis.

Gln-Ala-Arg-AMC as a substrate in MES (pH 5–7), Tris (pH 7–9) and CAPS (pH 9–11) buffers (Fig. 2.2). Matriptase activity (Fig. 2.2A) was optimal in more basic conditions. Matriptase-2 activity (Fig. 2.2B) was optimal near physiological pH (pH 7.5), whereas hepsin and DESC1 activities (Fig. 2.2C,D) were optimal at pH 8.5. In the ensuing experiments, TTSP activities were measured at pH 8.5. Of note, all enzymes were stable under the conditions used up to 40 min.

To further analyze the enzymatic properties of the enzymes, we determined the inhibitory profiles of the purified TTSPs. The effects of various protease inhibitors on matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 activities are shown in Table 2.1. The serine protease inhibitors 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF; irreversible) and aprotinin (reversible) significantly inhibited proteolytic activity. AEBSF (4 mM) completely abolished the activity of all four TTSPs. Aprotinin (0.3 μ M) had a potent inhibitory effect on matriptase, matriptase-2 and hepsin, but less so on DESC1 (29% residual activity). The serine/cysteine protease inhibitor leupeptin (1 μ M) had a variable inhibitory effect. It significantly inhibited matriptase (29% residual activity), but was less potent against matriptase-2 (63% residual activity) and DESC1 (55% residual activity). Cysteine, aspartic and metalloproteinase inhibitors had no effect on the activities of the TTSPs tested.

Table 2.1

Effects of protease inhibitors on purified recombinant matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 activities. Inhibitors and 2 nM TTSP were mixed, and the proteolytic activity toward 50 μ M Boc-Gln-Ala-Arg-AMC was monitored for up to 20 min. Proteolytic activity is expressed as a percentage of the activity of an inhibitor-free control (residual activity). Inhibitions measurements were performed in duplicate and represent the means \pm SD of at least three independent experiments. AEBSF, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride.

Target protease	Inhibitor	Concentration	Residual activity (%)			
			Matriptase	Matriptase-2	Hepsin	DESC1
Ser	Aprotinin	0.3 μ M	0	2 \pm 2	1 \pm 1	29 \pm 8
	Leupeptin	1 μ M	29 \pm 11	63 \pm 15	4 \pm 0.2	55 \pm 7
	AEBSF	4 mM	0	1 \pm 1	0	1 \pm 1
	Trypsin inhibitor	5 μ M	58 \pm 32	5 \pm 7	0	8 \pm 8
Cys	E-64	28 μ M	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1
Asp	Pepstatin	1 μ M	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1
Metallo	EDTA	1 mM	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1
	Bestatin	74 μ M	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1
	O-phenanthroline	1 mM	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1

Physiological serine protease inhibitor serpins [α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), α_1 -antichymotrypsin (α_1 -ACT), antithrombin III (AT III), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and α_2 -antiplasmin (α_2 -AP)] were also used to complete the inhibitory profile (Table 2.2). Inhibition assays with serpins were performed at pH 7.4 because these inhibitors present a higher dissociation rate with an increase in pH (Calugaru, Swanson and Olson, 2001). α_1 -AT (Serpina1) had no inhibitory effect on matriptase, matriptase-2 or DESC1, but slightly inhibited hepsin (67 % residual activity). α_1 -ACT (Serpina3) had no significant inhibitory effects on any of the TTSPs. AT III (Serpinc1) with heparin exhibited the strongest inhibitory effects on TTSPs, totally inhibiting matriptase, matriptase-2 and hepsin, and leaving DESC1 with 8 % residual activity. Interestingly, AT III was the only serpin that completely inhibited matriptase. PAI-1 (Serpine1) had a strong inhibitory effect on matriptase-2 (5 % residual activity), hepsin (0 % residual activity) and DESC1 (8 % residual activity), but was less potent against matriptase (58 % residual activity). α_2 -AP (Serpine2) had a strong inhibitory effect on matriptase-2 (11 % residual activity), hepsin (1 % residual activity) and DESC1 (2 % residual activity), but was less potent against matriptase (78 % residual activity). Moreover, we did not detect cleavage of any of the serpins used when incubated with matriptase.

Table 2.2

Effects of serpins on purified recombinant matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1. Serpins were mixed with 2.5 nM matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1. The mixtures were incubated for 10 min and proteolysis of 50 μ M Boc-Gln-Arg-Arg-AMC was monitored for 30 min. Proteolytic activity is expressed as a percentage of the activity of an inhibitor-free control (residual activity). Inhibitions measurements were performed in duplicate and represent the means \pm SD of at least three independent experiments. RCL, reactive-center loop; α_1 -AT, α_1 -antitrypsin; α_1 -ACT, α_1 -antichymotrypsin; AT III, antithrombin III; PAI-1, plasminogen activator inhibitor I; α_2 -AP, α_2 -antiplasmin.

Inhibitor	RCL P4-P4'	Concentration	Residual activity (%)			
			Matriptase	Matriptase-2	Hepsin	DESC1
α_1 -AT	AIPM-SIPP	250 nM	96 \pm 9	96 \pm 5	67 \pm 23	91 \pm 8
α_1 -ACT	ITLL-SALV	250 nM	88 \pm 18	93 \pm 11	88 \pm 19	89 \pm 5
AT III	IAGR-SLNP	250 nM	0	0	0	8 \pm 1
PAI-1	VSAR-MAPE	250 nM	58 \pm 32	5 \pm 7	0	8 \pm 8
α_2 -AP	AMSR-MSLS	250 nM	78 \pm 23	11 \pm 4	1 \pm 1	2 \pm 1

Enzymatic specificity using IQF peptides based on the autoactivation sequence of matriptase

To study the substrate specificity of TTSPs, we initially used IQF substrates whose sequences were based on the autoactivation sequence of matriptase (RQAR↓VVGK; Table 2.3, substrate 1). Utilization of IQF substrates allowed us to probe the prime position of the substrate that is critical to many enzyme families. The peptides used to assay TTSP activities were designed by individually replacing each position (P4, P3, P2 and P1') with residues with different physico-chemical properties such as small aliphatic (Ala), larger aliphatic (Leu), polar aromatic (Tyr), basic (Arg) or acidic (Glu) amino acids. Position P1 was always occupied by Arg because TTSPs have an exclusive preference for substrates that contain this amino acid (or Lys) (Takeuchi *et al.*, 2000). Amino acids at P4, to which the Abz group is linked, have no effect on the quantum yield of IQF peptides (Ito *et al.*, 1998).

To gain an overall picture of the relative activities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 towards the fluorogenic peptides, 18 IQF peptides were incubated at a fixed concentration (50 μ M) with the various enzymes (Fig. 2.3A–D). We also used trypsin as a positive control of the 'cleavability' of the substrates and as an example of a protease with poor discrimination for positions other than P1 (Fig. 2.3E). Figure 2.3 shows that TTSPs had clear preferences for distinct IQF peptides when compared with trypsin, which cleaved all IQF peptides without significant discrimination. Furthermore, TTSPs cleaved 11 of the 18 substrates with different efficiency (Table 2.3), indicating that they had no exquisite substrate specificity, but rather had preferred motifs.

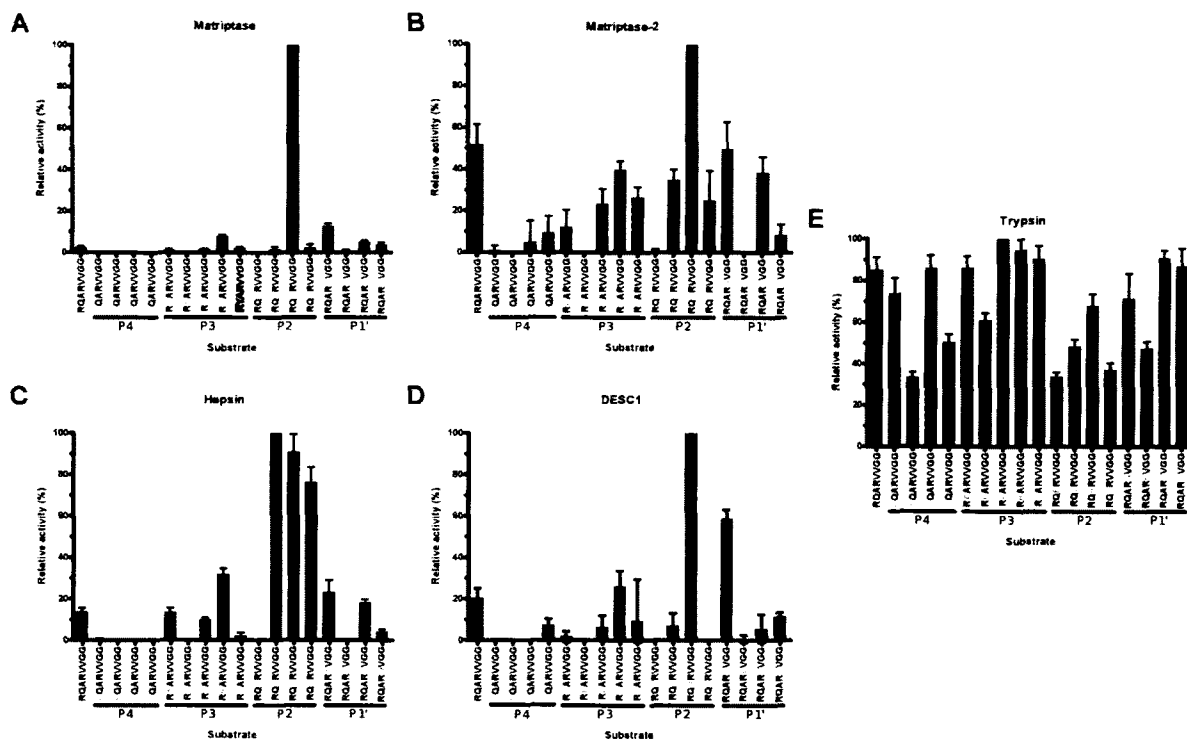


Figure 2.3
TTSP substrate preference

Substrate preferences for positions P4, P3, P2 and P1' of (A) matriptase, (B) matriptase-2, (C) hepsin, (D) DESC1 and (E) trypsin were analyzed using IQF peptides. Relative activities were measured using 50 μ M substrate. Release of fluorescence from the substrates by the enzymes is given as the maximum velocity observed (relative activity). All cleaved IQF peptides had their cleavage sites confirmed by MS analysis. Measurements were performed in duplicate and represent the mean \pm SD of at least three independent experiments.

To confirm that cleavage occurs at the predicted position (between suggested P1 and P1' positions), we analyzed the cleavage products of the reaction with matriptase by MS of the 11 IQF cleaved peptides (results not shown). All expected cleavage products were identified for the 11 peptides analyzed. Surprisingly, the peptide containing Arg in the P1 and P2 positions [Abz-RQRRVGG-Y(3-NO₂); substrate 13] produced fragments corresponding to the cleavage between positions P1 and P1', as expected, but also fragments corresponding to cleavage between positions P1 and P2 (see Discussion).

To better evaluate TTSP specificity, we determined kinetic parameters for matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 by using standard Michaelis–Menten kinetics (Fig. 2.4A). Interestingly, we found that matriptase-2 did not manifest standard Michaelis–Menten kinetics for 4 of 18 IQF peptides. Use of these peptides significantly inhibited matriptase-2 activity and therefore, fit the substrate inhibition equation (Fig. 2.4B). Only Abz-RQAR↓VVG-G-Y(3-

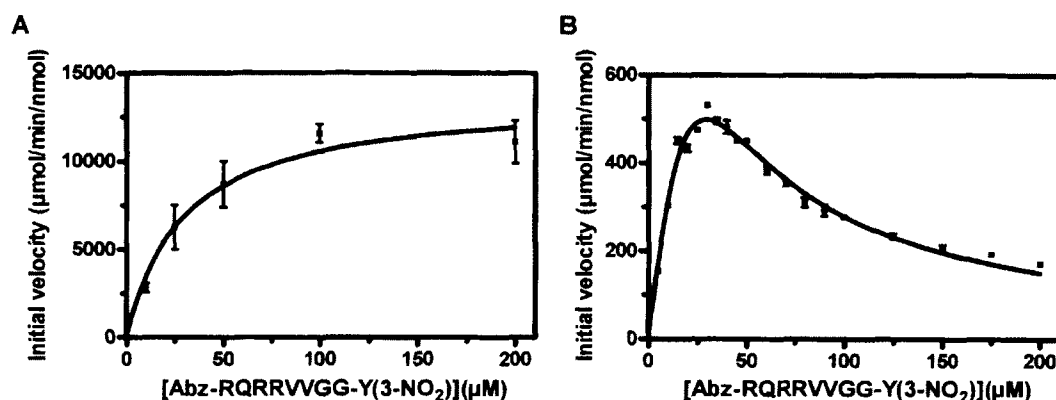


Figure 2.4

IQF peptides do not exhibit Michaelis–Menten kinetics with matriptase-2

The kinetic parameters of matriptase for the substrate Abz-RQRRVGG-Y(3-NO₂) were determined using the standard Michaelis–Menten equation. (B) For matriptase-2, an increasing concentration of substrate caused increased inhibition. Results are shown for Abz-RQRRVGG-Y(3-NO₂) and were fit to an equation describing substrate inhibition (Eqn 2.1). Measurements were performed in duplicate and represent the mean \pm SD of at least three independent experiments.

NO₂), Abz-RRAR↓VGG-Y(3-NO₂) and Abz-RQAR↓VGG-Y(3-NO₂) did not exhibit substrate inhibition for matriptase-2.

Table 2.3 presents all calculated kinetics parameters (k_{cat} , K_m and k_{cat}/K_m) for the TTSPs studied. Interestingly, under our conditions, all TTSPs required a basic amino acid (Arg) at the P4 position of the substrates to establish k_{cat}/K_m values. The presence of other types of amino acids at this position (Ala, Glu, Leu and Tyr; substrates 2–5, respectively) did not enable us to evaluate k_{cat}/K_m values because of a lack of detectable enzymatic activity. In addition, the k_{cat}/K_m values of the substrates with Glu at P4, P3, P2 or P1' (substrates 3, 7, 11 and 16) could not be determined, indicating that negatively charged amino acids in the substrate-binding pockets of TTSPs have a detrimental effect.

Of all the TTSPs studied, matriptase showed the most specificity for Abz-RQRRVGG-Y(3-NO₂) peptide (substrate 13) which yielded a k_{cat}/K_m value ($5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 36-fold higher than the reference substrate (RQAR↓VGG, substrate 1). The substitution of Gln with a basic amino acid (Arg, substrate 9) at position P3 resulted in a fivefold increase in k_{cat}/K_m , suggesting that P3 plays an important role in substrate recognition. P1' was more permissive, and Gln and Tyr residues at this position permitted the cleavage of substrates 17 and 18. Interestingly, substituting an amino acid smaller than Val at P1' (Ala, substrate 15) resulted in a threefold increase in k_{cat}/K_m . With matriptase-2, we noted that specific peptides caused

Table 2.3

IQF peptide hydrolysis by matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1. The hydrolysis of the IQF peptides (0–200 μM) was monitored and the constants were calculated from non-linear regressions of hyperbolic Michaelis–Menten rate equations. Relative activities (Rel. k_{cat}/K_m) of the IQF peptides are the k_{cat}/K_m values of the IQF peptides relative to that of the reference peptide (substrate 1). Enzymatic measurements were performed in duplicate and represent the means of at least three independent experiments. All errors are $\leq 20\%$. s.i., substrate inhibition.

Substrate	Sequence	Matriptase				Matriptase-2				Hepsin				DESC1			
		k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m
1	RQAR-VVGG P4	1.5	104	1.5×10^4	1.0	1.0	126	7.7×10^3	1	1.4	369	3.8×10^3	1.0	2.5	113	2.2×10^4	1.0
2	AQAR-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$\leq 10^3$	
3	EQAR-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
4	LQAR-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
5	YQAR-VVGG P3			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
6	RAAR-VVGG	0.3	159	2.1×10^3	0.2			$< 10^3$		0.5	220	2.6×10^3	0.7	0.7	25	3.0×10^4	1.3
7	REAR-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
8	RLAR-VVGG	0.3	88	3.6×10^3	0.3			$< 10^3$		0.6	290	2.2×10^3	0.6	1.1	42	2.6×10^4	1.2
9	RRAR-VVGG	0.9	12	7.7×10^4	5.3	0.3	3.3	9.6×10^4	12	0.5	72	7.3×10^3	1.9	1.4	11	1.3×10^5	5.8
10	RYAR-VVGG P2	0.6	137	4.5×10^3	0.3			$< 10^3$				$< 10^3$		1.0	55	1.9×10^4	0.9
11	RQER-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
12	RQLR-VVGG	0.5	124	4.0×10^3	0.3			i.s.		1.5	68	2.4×10^4	6.1	0.8	28	2.8×10^4	1.2
13	RQRR-VVGG	26	50	5.2×10^5	36			i.s.		1.4	70	2.0×10^4	5.3	3.6	31	1.2×10^5	5.2
14	RQYR-VVGG P1'	0.7	50	1.3×10^4	0.9			i.s.		1.1	109	1.0×10^4	2.7	0.8	58	1.3×10^4	0.6
15	RQAR-AVGG	5.5	128	4.3×10^4	3.0	0.3	18	1.6×10^4	2	0.5	191	2.7×10^3	0.7	3.2	76	4.3×10^4	1.9
16	RQAR-EVGG			$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$				$< 10^3$	
17	RQAR-QVGG	0.8	65	1.2×10^4	0.8			$< 10^3$				$< 10^3$		1.2	53	2.1×10^4	1.0
18	RQAR-YVGG	2.0	869	2.3×10^4	1.6			i.s.		0.5	175	2.6×10^3	0.7	0.7	46	1.5×10^4	0.7

significant substrate inhibition and we did not assign k_{cat}/K_m values to them (s.i. in Table 2.3).

Hepsin was the most permissive at P2, with Leu and Tyr (substrates 12 and 14) resulting in a three- to sixfold increase in k_{cat}/K_m values. Cleavage of substrate 13 was also efficient ($2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) but lower than for matriptase ($5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A basic amino acid (Arg, substrate 9) at P3 resulted in a twofold increase in k_{cat}/K_m . P1' was not permissive for Gln (substrate 17), but the Ala and Tyr substitutions (substrates 15 and 18) resulted in k_{cat}/K_m values comparable to that of the reference substrate.

Interestingly, DESC1 was the only enzyme that was quite permissive for the P3 position. In fact, the most suitable substrate for DESC1 had a basic amino acid (Arg) (substrate 9) at this position (sixfold increase in k_{cat}/K_m). The presence of a pair of basic residues (substrate 13) led to a fivefold increase in k_{cat}/K_m value. Overall, the permissiveness of DESC1 for P3, P2 and P1' was higher than for matriptase and hepsin. Ala, Leu or Tyr at P3 (substrates 6, 8 and 10) was tolerated and yielded k_{cat}/K_m values that were similar to that of the reference (substrate 1). Leu and Tyr (substrates 12 and 14) at P2, and Ala, Gln and Tyr (substrates 15, 17 and 18) at P1' also gave the same k_{cat}/K_m as the reference substrate.

TTSP cleavage of IQF peptides with physiological substrate-processing sites

To further analyze the capacity of TTSPs to recognize and cleave potential substrates, we used the known cleavage-site sequences of the matriptase substrates filaggrin [Abz-RKRRGSRG-Y(3-NO₂)], protease-activated receptor-2 [PAR-2; Abz-SKGRSLIG-Y(3-NO₂)], Trask [Abz-KQSRKFVP-Y(3-NO₂)] and proMSP-1 [Abz-SKLRVVG-Y(3-NO₂)] (Table 2.4). Because our results showed that Abz-RQRRVVG-Y(3-NO₂) was efficiently cleaved, we searched the Protein Information Resource database for potential substrates with this particular sequence and found that the α_E subunit of $\alpha_E\beta_7$ integrin might be a potential substrate, with cleavage occurring at RQRR↓ALEK. We verified whether Abz-RQRRALEK-Y(3-NO₂) could be efficiently cleaved by TTSPs. Table 2.4 shows that matriptase cleaved all the peptides tested, except proMSP-1. The cleavage efficiencies of filaggrin, Trask and the α_E subunit by matriptase were similar (k_{cat}/K_m values of $7.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $6.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively), whereas that of PAR-2 was slightly lower ($3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Matriptase-2 cleaved filaggrin, Trask and $\alpha_E\beta_7$ integrin peptides. Although

the highest efficiency was observed with filaggrin ($2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), Trask and the α_E subunit were also efficiently cleaved. Hepsin cleaved filaggrin ($3.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), α_E subunit sequences ($4.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), as well as proMSP-1 ($1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and Trask ($1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Interestingly, only hepsin cleaved proMSP-1 efficiently. DESC1 manifested less activity toward physiological substrate-processing sites. MS analysis for the five substrates cleaved by matriptase revealed that, as for Abz-RQRRVGG-Y(3-NO₂), substrates with pairs of arginines at P2 and P1 [Abz-RKRRGSRG-Y(3-NO₂), filaggrin and Abz-RQRRALEK-Y(3-NO₂), $\alpha_E\beta_7$ integrin] were cleaved at P1–P1' and at P2–P1.

2.4 Discussion

The initial step towards enzymatic proteolysis is the arrangement of the scissile peptide bond of the substrate in the catalytic pocket of the protease. The ability of serine proteases from the chymotrypsin family to recognize substrates is mainly governed by S1–S4 subsites of the enzyme-substrate binding pocket, which recognize and interact with the P1–P4 counterpart amino acids of the substrate (Rose and Cera, 2002). To identify the nature of these residues in TTSPs, we determined and compared the enzymatic properties of four TTSPs (matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1). We used IQF substrates to probe the nonprime and prime positions of the substrate that are critical to many enzyme families. Interestingly, until now, the preference of TTSPs for prime positions remained unknown.

The recombinant matriptase used in this study consisted solely of the activation and catalytic domains of the protease, whereas the other three TTSPs contained the complete extracellular domain. Although it is unlikely that the lack of the stem region of matriptase will impact on the overall enzymatic activity, these domains may be important for interactions with macromolecular substrates, inhibitors and other proteins (Lu *et al.*, 1997).

The TTSP inhibition profiles conformed to serine proteases in general, but the sensitivity of hepsin and matriptase, and the relative insensitivity of matriptase-2 and DESC1, to leupeptin are noteworthy. Moreover, when matriptase activity was tested in the presence of proteins of the serpin family, only AT III demonstrated robust inhibitory activity against the four TTSPs tested. However, matriptase-2, hepsin and DESC1 were also significantly inhibited in the presence of PAI-1 and α_2 -AP. These three serpins have Arg in the P1 position of their reactive center loops, suggesting that the presence of Arg at this position is essential for strong inhibition of TTSPs. The lack of inhibition of TTSPs by α_1 -AT and α_1 -ACT was

Table 2.4

Hydrolysis of the IQF peptides (0–200 μM) was monitored and the constants were calculated from nonlinear regressions of hyperbolic Michaelis–Menten rate equations. Relative activities ($\text{Rel. } k_{\text{cat}}/K_m$) are the k_{cat}/K_m values of the IQF peptides relative to that of the reference peptide (substrate 1). Enzymatic measurements were performed in duplicate and represent the means of at least three independent experiments. All errors are $\leq 20\%$. PAR-2, protease-activated receptor-2; proMSP-1, macrophage-stimulating protein 1 precursor.

Substrate	Sequence	Matriptase				Matriptase-2				Hepsin				DESC1			
		k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Rel. k_{cat}/K_m
Matriptase	RQAR-VVGG	1.5	104	1.5×10^4	1.0	1.0	126	7.7×10^3	1	1.4	369	3.8×10^3	1.0	2.5	113	2.2×10^4	1.0
Filaggrin	RKRR-GSRG	32	46	7.1×10^5	48	6.8	30	2.3×10^5	30	66	189	3.6×10^5	94	1.8	68	2.7×10^4	1.2
PAR-2	SKGR-SLIG	61	197	3.1×10^5	21	2.2	142	1.1×10^4	2	15	373	3.9×10^4	10	2.4	318	7.4×10^3	0.3
Trask	KQSR-KFVP	46	70	6.6×10^5	44	7.2	52	1.4×10^5	18	12	114	1.1×10^5	30			$< 10^3$	
pro-MSP-1	SKLR-VVGG			$< 10^3$				$< 10^3$		16	140	1.3×10^5	30			$< 10^3$	
$\alpha\text{E}\beta_7$	RQRR-ALEK	45	100	4.5×10^5	30	7.2	111	6.5×10^4	8	39	85	4.6×10^5	122	4.0	122	3.3×10^4	1.5

consistent with the P1-Arg subsite specificity (Table 2.2). These results are in agreement with reports suggesting a role for serpins in modulating TTSP activity (Szabo *et al.*, 2005) and also support data demonstrating that DESC1 is able to form stable complexes with PAI-1 (Hobson *et al.*, 2004).

Protease specificities are commonly studied with substrates containing fluorogenic or chromogenic reporter groups at their C-terminals such as with the PS-SCL method. This method has been widely used to determine the preferred cleavage motifs of serine and cysteine proteases. However, PS-SCLs are limited because cooperative interactions between residues in the substrate cannot be assessed. In fact, PS-SCLs are mixtures of substrates with one fixed position; all other positions are random. In this way, it is impossible to determine if there is a cooperative interaction between a fixed position and the surrounding amino acids. With IQF peptides, it is possible to determine this interaction because the exact constitution of the peptide is known. Also, PS-SCLs provide information on the preferred residues on the P side of the substrate, but not on P' positions. Substrates with extended P' positions, such as IQF peptides, are thus a practical alternative to study specificity. This technique has been used to probe the enzymatic specificities of proteases such as caspases (Stennicke *et al.*, 2000), cathepsins (Alves *et al.*, 2003; Ruzza *et al.*, 2006; Cezari *et al.*, 2002) and dengue virus NS3 protease (Niyomrattanakit *et al.*, 2006).

It has been shown, using PS-SCLs (Harris *et al.*, 2000), that matriptase prefers Arg/Lys at P4, non-basic amino acid at P3, Ser at P2, Arg at P1 and Ala at P1'. Our results demonstrate that basic amino acids are also favored in the P3 position, but also that a pair of arginines at P2 and P1 renders the substrate highly accessible for cleavage. Indeed, MS analysis of the cleavage products revealed that either of the two arginine residues in P2 or P1 can be processed, i.e. Abz-RQR↓R↓VVGG-Y(3-NO₂). Taken in a physiological context, such alternative processing may introduce increased diversity in the products generated and potentially affect biological activities. However, when pairs of arginine residues were present in positions P4–P3 of the IQF substrates, only the P1–P1' site was cleaved. The lack of cooperative interactions in PS-SCL peptides may explain why a preference for basic residues at P3 and P2 has not been observed in PS-SCLs.

We showed that hepsin had a distinct preference for Arg at P1, Leu/Tyr at P2 and Arg at P3 and P4. The small residue Val appeared to be favored at P1'. These results were similar to

those reported by Herter *et al.* (2005), with slight differences. Hepatocyte growth factor is a preferred hepsin substrate because of an 'optimal' KQLR-VVNG sequence, this would explain why RQLR-VVGG, which resembles this recognition sequence, was the best hepsin substrate in our study.

DESC1 specificity has not been extensively studied. Hobson *et al.* (2004) used *p*-nitroanilide substrates to show that DESC1 is most active on substrates containing Ala at P4 and P3, and Pro at P2, followed by substrates containing Phe and Gly at P3 and P2. Our results showed that DESC1 preferred Leu at P2, Arg/Ala/Leu at P3, Arg at P4 and Ala at P1' for efficient substrate cleavage. These differences may be caused by the bulkiness of the *p*-nitroanilide group at the C-terminal of the scissile bond in these substrates, which can influence cleavage efficiency.

As for matriptase-2, 4 of 18 IQF peptides based on the matriptase activation sequence [Abz-RQAR↓VVG-G-Y(3-NO₂)] (Table 2.3) did not exhibit Michaelis–Menten kinetics, but rather inhibited matriptase-2 activity at higher concentrations. Intriguingly, none of the substrates based on potential physiological sequences demonstrated substrate inhibition (Table 2.4).

Our results show that the use of IQF peptides provides information that can be used as a guide to identify potential TTSP substrates. This is exemplified by the efficient cleavage of a peptide based on a PIR database-identified protein [α_E subunit of $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$ integrin] containing the potential cleavage motif RQRR. Interestingly, this motif corresponds to an identified cleavage sequence (Shaw *et al.*, 1994). $\alpha_E\beta_7$ integrin is expressed in T cells and is involved in epithelial T-cell retention through binding to E-cadherin (Schlickum *et al.*, 2008). E-cadherin colocalizes with epithin, the mouse ortholog of matriptase, in thymic epithelium cells (Khang *et al.*, 2005), suggesting that matriptase may play a role in E-cadherin/ $\alpha_E\beta_7$ integrin interaction. Further research is needed to validate the α_E subunit as a potential TTSP substrate.

To gain additional insight into the potential cleavage capacity of individual TTSPs, we compared their ability to cleave sequences originating from physiological substrates (filaggrin, PAR-2, Trask and proMSP-1). Of note was our finding that matriptase exhibited robust activity toward all substrates except proMSP-1. Interestingly, proMSP-1 has been shown to be a physiological substrate for matriptase (Bhatt *et al.*, 2005). Although matriptase

(as well as other TTSPs) was unable to cleave the sequence corresponding to the processing site, incubating the MSP-1 precursor with purified matriptase in vitro revealed that the precursor was indeed cleaved (results not shown). However, hepsin, which demonstrated some proteolytic activity towards the fluorogenic proMSP-1 peptide, did not process the MSP-1 precursor in vitro (results not shown). These results suggest that the precursor may need to associate with its cognate protease via various domains, and/or that the conformation of the precursor is important for recognition and cleavage by the processing enzyme. Lastly, the filaggrin sequence was efficiently cleaved by all four TTSPs, whereas Trask was readily cleaved by matriptase-2.

TTSPs possess a common pattern of specificity, with varying preferences for amino acids at P3, P2 and P1'. Our results show that these enzymes cleave similar sequences, but with different efficiencies. The colocalization of TTSPs may thus lead to redundant cleavage of some substrates. In fact, both hepsin and matriptase-2 have been detected in kidney, liver and uterine tissues (Hooper *et al.*, 2003). Hepsin knockout mice manifest major hearing loss (Guipponi *et al.*, 2008), but do not demonstrate physiological changes in the tissues where hepsin is mainly expressed (Wu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000), suggesting that other enzymes may contribute to its physiological roles in such tissues. However, other mechanisms of enzymatic activity and modulation may exist at the transcriptional, translational and/or post-translational levels that could ultimately affect the overall contribution of a given protease to the proteomic profile of a cell.

Our study will be useful for identifying optimal and specific recognition sequences, which could help in the design of specific biomarkers and protease inhibitors. Indeed, the overexpression of TTSPs observed in many cancer states (Viloria *et al.*, 2007; Betsunoh *et al.*, 2007) and the cell-surface localization of these proteins make them interesting targets for therapeutic agents and for diagnostic purposes.

2.5 Experimental procedures

Materials

Pfu DNA polymerase was from Stratagene (La Jolla, CA, USA). Bovine trypsin was from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). All restriction enzymes and T4 DNA ligase were from New England Biolabs (Pickering, Canada). All Abz IQF peptides with the Tyr(3-NO₂) quenching

group (purity $\geq 98\%$ after RP-HPLC and homogeneity checked by mass spectrometry) were from GL Biochem (Shanghai, China). Aprotinin, leupeptin, AEBSF, soybean trypsin inhibitor, pepstatin, bestatin and E-64 were from Roche Diagnostics (Laval, Canada). EDTA, *ortho*-phenanthroline and heparin were from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). α_1 -AT, α_1 -ACT, AT III, PAI-1 and α_2 -AP were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The pMT/BiP/V5-His expression vector, *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells, and mouse anti-V5 mAb were from Invitrogen (Burlington, Canada). Sheep HRP-conjugated anti-mouse Ig was from GE Healthcare (Baie d'Urfé, Canada). Human matriptase cDNA was a generous gift from C.-Y. Lin (Georgetown University, Washington DC, USA). Human matriptase-2 cDNA was a generous gift from C. López-Ótin (Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain). Human hepsin cDNA was cloned from a human liver cDNA library from Ambion (Foster City, CA, USA). Human DESC1 cDNA was a generous gift from D. E. Schuller (Ohio State University, OH, USA).

Cell culture

S2 cells were grown in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen) containing 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU \cdot mL⁻¹ penicillin and 50 μ g \cdot mL⁻¹ streptomycin. Stable S2 cell lines were obtained by growing in 20 μ g \cdot mL⁻¹ blasticidin (Invitrogen).

Production of TTSPs

The production of matriptase 596–855 has been described previously (Viloria *et al.*, 2007). cDNAs corresponding to amino acids 78–811 of matriptase-2, 45–417 of hepsin and 44–423 of DESC1 were amplified by PCR and ligated into the pMT/BiP/V5-His vector. These constructs each contained a C-terminal V5-His tag for affinity purification using immobilized metal–chelate affinity chromatography. Before transfection, S2 cells were seeded in six-well plates and grown until they reached a density of $2\text{--}4 \times 10^6$ cells \cdot mL⁻¹. Cells were cotransfected with 19 μ g of recombinant DNA and 1 μ g of pCoBlast selection vector (Invitrogen) using calcium phosphate transfection kits (Invitrogen). The calcium phosphate solution was removed 16 h post transfection and fresh medium was added. Cells were grown for an additional 2 days. Blasticidin (20 μ g \cdot mL⁻¹) was then added to the medium, and the cells were incubated for a 2-week selection period. They were then inoculated into 1 L of selection medium and grown to a density of 3×10^6 cells \cdot mL⁻¹. Recombinant TTSP expression was induced by adding 500 μ M CuSO₄. Cells were removed by centrifugation at 6000 g. TTSPs

in the supernatants were loaded on HisTrap FF columns (GE Healthcare) and eluted using 500 mM imidazole. Fractions were analyzed by western blotting. Those containing TTSPs were pooled and dialyzed for 16 h at 4 °C against 50 mM Tris (pH 8.5), 10 % glycerol and 250 mM NaCl to remove the imidazole. The four purified TTSPs were active-site titered with the burst titrant 4-methylumbelliferyl-*p*-guanidino benzoate.

TTSP pH profiles

Matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 activities were determined by monitoring the release of AMC ($E_{x\lambda}$ 360 nm; $E_{m\lambda}$ 460 nm) from 50 μ M Boc-Gln-Ala-Arg-AMC over time using a FLX-800 TBE microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). TTSPs were incubated at 37 °C with the peptide in 100 mM MES containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA (pH 5–7), 100 mM Tris/HCl containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA (pH 7–9) and 100 mM CAPS containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA (pH 9–11). The rate of AMC released at the different pH values was calculated by comparing the maximum velocity observed for the specific buffer used (relative activity).

Inhibition assays

Purified and active site-titered (2 nM) matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 were incubated with various inhibitors (EDTA, pepstatin, bestatin, E-64, trypsin inhibitor, *o*-phenanthroline, AEBSE, aprotinin and leupeptin) in 100 mM Tris/HCl (pH 8.5) containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA at 37 °C. Residual enzyme activities were measured using 50 μ M Boc-Gln-Ala-Arg-AMC. To evaluate the inhibitory potencies of serpins, 2.5 nM matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 were preincubated for 10 min in 100 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA with 250 nM α_1 -AT, α_1 -ACT, AT III (preincubated with 50 μ g \cdot ml⁻¹ heparin), PAI-1 and α_2 -AP. TTSP inhibition efficiencies were evaluated by measuring residual activity using 50 μ M Boc-Gln-Ala-Arg-AMC.

TTSP substrate relative activities and cleavage site determination

The substrate preferences of trypsin, matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 (2 nM each) were analyzed using 50 μ M of each of the 18 IQF peptides in 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, containing 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA. The rate of release of fluorescence from the IQF peptides is reported as the maximum velocities observed (relative activity).

To determine the site at which cleavage of IQF peptides occurred, 400 μM IQF peptides were digested for 3 h at 37 °C in presence of 4 nM matriptase. Products of reaction were diluted to a final concentration of 1 μM in 1 % acetic acid and analyzed by ESI-MS on a Synapt MS system (Waters, Milford, MA, USA).

IQF peptide substrates studies

Hydrolysis of the IQF peptide substrates was measured at 37 °C using a FLX-800 TBE microplate reader. Fluorescence was monitored (Ex_λ 320 nm; Em_λ 420 nm) and the initial velocity was calculated from the linear portion of the progress curve. Enzymatic assays were performed in a final volume of 100 μL in 100 mM Tris/HCl (pH 8.5) containing 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ BSA. Enzyme concentrations ranged from 1 to 5 nM, depending on the enzyme used. Increasing concentrations of peptides (0–200 μM) were incubated with a constant concentration of enzyme, and the release of fluorescence was measured for 30 min to determine the K_m , V_{max} and k_{cat} values. The inner filter effect caused by the IQF peptides was corrected, as previously described (Liu *et al.*, 1999). Standard curves were obtained using the signal from the N-terminal Abz-containing cleavage fragment corresponding to the reference substrate (Abz-RQAR) and were converted to molar concentrations of hydrolyzed product. The data were fitted to the hyperbolic Michaelis–Menten rate equation $v_0 = V_{max}[S]/(K_m + [S])$ using GRAPHPAD PRISM 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and kinetic constants were calculated by nonlinear regression. The initial reaction rates (v_0) at a single enzyme concentration ($[E_0]$) are a function of the substrate concentration ($[S]$), the limiting velocity of the reaction (V_{max}), and the concentration of substrate that results in half-maximal velocity (K_m). In this case, $k_{cat} = V_{max}/[E_0]$.

IQF peptides did not show simple Michaelis–Menten kinetics under saturation conditions for matriptase-2. At high substrate concentrations, the initial velocity decreased as a function of increasing substrate concentration, indicating that there was some substrate inhibition. Initial reaction velocities for matriptase-2 were fitted to an equation (Eqn 2.1) describing substrate inhibition (Fersht, 1985) (a modified form of Michaelis–Menten equation in which K'_s is the binding constant for the second substrate molecule):

$$v_i = \frac{k_{kat}[E_0][S]}{[S] + K_M + [S]^2/K'_s} \quad (2.1)$$

However, this model did not provide reliable k_{cat} and K_m values for this enzyme. Only three k_{cat}/K_m values were determined with IQF peptides that did not exhibit substrate inhibition for matriptase-2.

2.6 Acknowledgements

We would like to thank Jean-Bernard Denault for reading the manuscript and for his valuable comments. RL is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

2.7 References

- Alves, M. F. M., L. Puzer, S. S. Cotrin, M. A. Juliano, L. Juliano, D. Brömme and A. K. Carmona. 2003. « S3 to S3' subsite specificity of recombinant human cathepsin K and development of selective internally quenched fluorescent substrates. » *Biochem J*, vol. 373, no Pt 3, p. 981–986.
- Avrahami, L., S. Maas, M. Pasmanik-Chor, L. Rainshtein, N. Magal, J. Smitt, J. van Marle, M. Shohat and L. Basel-Vanagaite. 2008. « Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis syndrome: further delineation of the phenotype. » *Clin Genet*, vol. 74, no 1, p. 47–53.
- Basel-Vanagaite, L., R. Attia, A. Ishida-Yamamoto, L. Rainshtein, D. B. Amitai, R. Lurie, M. Pasmanik-Chor, M. Indelman, A. Zvulunov, S. Saban, N. Magal, E. Sprecher and M. Shohat. 2007. « Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in ST14, encoding type II transmembrane serine protease matriptase. » *Am J Hum Genet*, vol. 80, no 3, p. 467–477.
- Benaud, C. M., M. Oberst, R. B. Dickson and C.-Y. Lin. 2002. « Deregulated activation of matriptase in breast cancer cells. » *Clin Exp Metastasis*, vol. 19, no 7, p. 639–649.
- Betsunoh, H., S. Mukai, Y. Akiyama, T. Fukushima, N. Minamiguchi, Y. Hasui, Y. Osada and H. Kataoka. 2007. « Clinical relevance of hepsin and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 expression in renal cell carcinoma. » *Cancer Sci*, vol. 98, no 4, p. 491–498.
- Bhatt, A. S., H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. S. Craik and M. M. Moasser. 2005. « Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases. » *Oncogene*, vol. 24, no 34, p. 5333–5343.

- Bhatt, A. S., A. Welm, C. J. Farady, M. Vásquez, K. Wilson and C. S. Craik. 2007. « Coordinate expression and functional profiling identify an extracellular proteolytic signaling pathway. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 14, p. 5771–5776.
- Calugaru, S. V., R. Swanson and S. T. Olson. 2001. « The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium. » *J Biol Chem*, vol. 276, no 35, p. 32 446–32 455.
- Cezari, M. H. S., L. Puzer, M. A. Juliano, A. K. Carmona and L. Juliano. 2002. « Cathepsin B carboxydipeptidase specificity analysis using internally quenched fluorescent peptides. » *Biochem J*, vol. 368, no Pt 1, p. 365–369.
- Désilets, A., F. Béliveau, G. Vandal, E.-O. McDuff, P. Lavigne and R. Leduc. 2008. « Mutation G827R in matrilysin causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease. » *J Biol Chem*, vol. 283, no 16, p. 10 535–10 542.
- Désilets, A., J.-M. Longpré, M.-E. Beaulieu and R. Leduc. 2006. « Inhibition of human matrilysin by eglin c variants. » *FEBS Lett*, vol. 580, no 9, p. 2227–2232.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman and Co., 80-88 p.
- Finberg, K. E., M. M. Heeney, D. R. Campagna, Y. Aydinok, H. A. Pearson, K. R. Hartman, M. M. Mayo, S. M. Samuel, J. J. Strouse, K. Markianos, N. C. Andrews and M. D. Fleming. 2008. « Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). » *Nat Genet*, vol. 40, no 5, p. 569–571.
- Guipponi, M., M.-Y. Toh, J. Tan, D. Park, K. Hanson, E. Ballana, D. Kwong, P. Z. F. Cannon, Q. Wu, A. Gout, M. Delorenzi, T. P. Speed, R. J. H. Smith, H. H. Dahl, M. Petersen, R. D. Teasdale, X. Estivill, W. J. Park and H. S. Scott. 2008. « An integrated genetic and functional analysis of the role of type II transmembrane serine proteases (Tmprsses) in hearing loss. » *Hum Mutat*, vol. 29, no 1, p. 130–141.
- Harris, J. L., B. J. Backes, F. Leonetti, S. Mahrus, J. A. Ellman and C. S. Craik. 2000. « Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 14, p. 7754–7759.
- Herter, S., D. E. Piper, W. Aaron, T. Gabriele, G. Cutler, P. Cao, A. S. Bhatt, Y. Choe, C. S. Craik, N. Walker, D. Meininger, T. Hoey and R. J. Austin. 2005. « Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. » *Biochem J*, vol. 390, no Pt 1, p. 125–136.
- Hobson, J. P., S. Netzel-Arnett, R. Szabo, S. M. Réhault, F. C. Church, D. K. Strickland, D. A. Lawrence, T. M. Antalis and T. H. Bugge. 2004. « Mouse Desc1 is located within a cluster of seven Desc1-like genes and encodes a type II transmembrane serine protease that forms serpin inhibitory complexes. » *J Biol Chem*, vol. 279, no 45, p. 46 981–46 994.

- Hooper, J. D., L. Campagnolo, G. Goodarzi, T. N. Truong, H. Stuhlmann and J. P. Quigley. 2003. « Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues. » *Biochem J*, vol. 373, no Pt 3, p. 689–702.
- Ito, A. S., R. D. Turchiello, I. Y. Hirata, M. H. Cezari, M. Meldal and L. Juliano. 1998. « Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid. » *Biospectroscopy*, vol. 4, no 6, p. 395–402.
- Kazama, Y., T. Hamamoto, D. C. Foster and W. Kisiel. 1995. « Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation. » *J Biol Chem*, vol. 270, no 1, p. 66–72.
- Kelly, K. A., S. R. Setlur, R. Ross, R. Anbazhagan, P. Waterman, M. A. Rubin and R. Weissleder. 2008. « Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent. » *Cancer Res*, vol. 68, no 7, p. 2286–2291.
- Khang, I., S. Sonn, J.-H. Park, K. Rhee, D. Park and K. Kim. 2005. « Expression of epithin in mouse preimplantation development: its functional role in compaction. » *Dev Biol*, vol. 281, no 1, p. 134–144.
- Kirchhofer, D., M. Peek, M. T. Lipari, K. Billeci, B. Fan and P. Moran. 2005. « Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. » *FEBS Lett*, vol. 579, no 9, p. 1945–1950.
- Klezovitch, O., J. Chevillet, J. Mirosevich, R. L. Roberts, R. J. Matusik and V. Vasioukhin. 2004. « Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. » *Cancer Cell*, vol. 6, no 2, p. 185–195.
- Lee, S. L., R. B. Dickson and C. Y. Lin. 2000. « Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. » *J Biol Chem*, vol. 275, no 47, p. 36 720–36 725.
- List, K., B. Currie, T. C. Scharschmidt, R. Szabo, J. Shireman, A. Molinolo, B. F. Cravatt, J. Segre and T. H. Bugge. 2007. « Autosomal ichthyosis with hypotrichosis syndrome displays low matriptase proteolytic activity and is phenocopied in ST14 hypomorphic mice. » *J Biol Chem*, vol. 282, no 50, p. 36 714–36 723.
- List, K., R. Szabo, A. Molinolo, V. Sriuranpong, V. Redeye, T. Murdock, B. Burke, B. S. Nielsen, J. S. Gutkind and T. H. Bugge. 2005. « Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. » *Genes Dev*, vol. 19, no 16, p. 1934–1950.

- List, K., R. Szabo, P. W. Wertz, J. Segre, C. C. Haudenschild, S.-Y. Kim and T. H. Bugge. 2003. « Loss of proteolytically processed flaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. » *J Cell Biol*, vol. 163, no 4, p. 901–910.
- Liu, Y., W. Kati, C. M. Chen, R. Tripathi, A. Molla and W. Kohlbrenner. 1999. « Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction. » *Anal Biochem*, vol. 267, no 2, p. 331–335.
- Lu, D., X. Yuan, X. Zheng and J. E. Sadler. 1997. « Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain. » *J Biol Chem*, vol. 272, no 50, p. 31 293–31 300.
- Moran, P., W. Li, B. Fan, R. Vij, C. Eigenbrot and D. Kirchhofer. 2006. « Pro-urokinase-type plasminogen activator is a substrate for hepsin. » *J Biol Chem*, vol. 281, no 41, p. 30 439–30 446.
- Netzel-Arnett, S., B. M. Currie, R. Szabo, C.-Y. Lin, L.-M. Chen, K. X. Chai, T. M. Antalis, T. H. Bugge and K. List. 2006. « Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. » *J Biol Chem*, vol. 281, no 44, p. 32 941–32 945.
- Niyomrattanakit, P., S. Yahorava, I. Mutule, F. Mutulis, R. Petrovska, P. Prusis, G. Katzenmeier and J. E. S. Wikberg. 2006. « Probing the substrate specificity of the dengue virus type 2 NS3 serine protease by using internally quenched fluorescent peptides. » *Biochem J*, vol. 397, no 1, p. 203–211.
- Parr, C., A. J. Sanders, G. Davies, T. Martin, J. Lane, M. D. Mason, R. E. Mansel and W. G. Jiang. 2007. « Matriptase-2 inhibits breast tumor growth and invasion and correlates with favorable prognosis for breast cancer patients. » *Clin Cancer Res*, vol. 13, no 12, p. 3568–3576.
- Ramsay, A. J., J. C. Reid, G. Velasco, J. P. Quigley and J. D. Hooper. 2008. « The type II transmembrane serine protease matriptase-2—identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. » *Front Biosci*, vol. 13, p. 569–579.
- Rose, T. and E. D. Cera. 2002. « Substrate recognition drives the evolution of serine proteases. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 22, p. 19 243–19 246.
- Ruzza, P., L. Quintieri, A. Osler, A. Calderan, B. Biondi, M. Floreani, A. Guiotto and G. Borin. 2006. « Fluorescent, internally quenched, peptides for exploring the pH-dependent substrate specificity of cathepsin B. » *J Pept Sci*, vol. 12, no 7, p. 455–461.
- Sanders, A. J., C. Parr, T. A. Martin, J. Lane, M. D. Mason and W. G. Jiang. 2008. « Genetic upregulation of matriptase-2 reduces the aggressiveness of prostate cancer cells in vitro and in vivo and affects FAK and paxillin localisation. » *J Cell Physiol*, vol. 216, no 3, p. 780–789.

- Schlickum, S., H. Sennefelder, M. Friedrich, G. Harms, M. J. Lohse, P. Kilshaw and M. P. Schön. 2008. « Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. » *Blood*, vol. 112, no 3, p. 619–625.
- Shaw, S. K., K. L. Cepek, E. A. Murphy, G. J. Russell, M. B. Brenner and C. M. Parker. 1994. « Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. » *J Biol Chem*, vol. 269, no 8, p. 6016–6025.
- Srikantan, V., M. Valladares, J. S. Rhim, J. W. Moul and S. Srivastava. 2002. « HEPSIN inhibits cell growth/invasion in prostate cancer cells. » *Cancer Res*, vol. 62, no 23, p. 6812–6816.
- Stennicke, H. R., M. Renatus, M. Meldal and G. S. Salvesen. 2000. « Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. » *Biochem J*, vol. 350 Pt 2, p. 563–568.
- Szabo, R. and T. H. Bugge. 2008. « Type II transmembrane serine proteases in development and disease. » *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, no 6-7, p. 1297–1316.
- Szabo, R., S. Netzel-Arnett, J. P. Hobson, T. M. Antalis and T. H. Bugge. 2005. « Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity. » *Biochem J*, vol. 390, no Pt 1, p. 231–242.
- Takeuchi, T., J. L. Harris, W. Huang, K. W. Yan, S. R. Coughlin and C. S. Craik. 2000. « Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. » *J Biol Chem*, vol. 275, no 34, p. 26 333–26 342.
- Velasco, G., S. Cal, V. Quesada, L. M. Sánchez and C. López-Otín. 2002. « Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 40, p. 37 637–37 646.
- Viloria, C. G., J. R. Peinado, A. Astudillo, O. García-Suárez, M. V. González, C. Suárez and S. Cal. 2007. « Human DESC1 serine protease confers tumorigenic properties to MDCK cells and it is upregulated in tumours of different origin. » *Br J Cancer*, vol. 97, no 2, p. 201–209.
- Wu, Q., D. Yu, J. Post, M. Halks-Miller, J. E. Sadler and J. Morser. 1998. « Generation and characterization of mice deficient in hepsin, a hepatic transmembrane serine protease. » *J Clin Invest*, vol. 101, no 2, p. 321–326.
- Yu, I. S., H. J. Chen, Y. S. Lee, P. H. Huang, S. R. Lin, T. W. Tsai and S. W. Lin. 2000. « Mice deficient in hepsin, a serine protease, exhibit normal embryogenesis and unchanged hepatocyte regeneration ability. » *Thromb Haemost*, vol. 84, no 5, p. 865–870.

ARTICLE II

Essential Role of Endocytosis of the Type II Transmembrane Serine Protease TMPRSS6 in Regulating Its Functionality

Auteurs de l'article : François Béliveau, Cédric Brulé, Antoine Désilets, Brandon Zimmerman, Stéphane A. Laporte, Christine L. Lavoie and Richard Leduc.

Statut de l'article : Publié dans *The Journal of Biological Chemistry* (2011), vol. 286, no 33, p. 29035–29043.

Avant-propos :

L'article « *Essential Role of Endocytosis of the Type II Transmembrane Serine Protease TMPRSS6 in Regulating Its Functionality* » paru dans *The Journal of Biological Chemistry* démontre que la matriptase-2 (TMPRSS6) possède un motif au niveau de son domaine cytoplasmique responsable de son internalisation à partir de la surface cellulaire. Cette propriété permet de contrôler son action protéolytique sur l'hémojuvéline et ainsi réguler l'expression de l'hepcidine, une hormone essentielle à l'homéostasie du fer. Pour cet article, j'ai contribué à l'élaboration et à l'exécution du travail expérimental ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

La sérine protéase transmembranaire de type II TMPRSS6 (matriptase-2) permet de contrôler l'homéostasie du fer en exerçant une action négative sur l'expression de l'hepcidine, une hormone importante au métabolisme du fer. À la membrane plasmique, TMPRSS6 clive son substrat cible, l'hémojuvéline (HJV), permettant ainsi de réguler en amont la voie de signalisation responsable de l'expression de l'hepcidine. À ce jour, la dynamique de l'expression à la surface cellulaire de la protéase n'a jamais été adressée. Nous rapportons dans cette étude que TMPRSS6 subit une internalisation constitutive dans des cellules HEK293 transfectées ainsi que dans deux lignées cellulaires hépatiques humaines, soit les HepG2 et les hépatocytes primaires, toutes deux exprimant TMPRSS6 de façon endogène. TMPRSS6 marqué à la surface cellulaire est internalisé via une voie dépendante de la dynamine puis détecté au niveau de vésicules positives pour la clathrine et pour AP-2. TMPRSS6 transite ensuite par des endosomes précoces avant de se retrouver aux lysosomes. L'internalisation de TMPRSS6 est dépendante de résidus spécifiques situés dans la région amino-terminale de son domaine cytoplasmique, car la mutagenèse dirigée de ces résidues bloque son internalisation et maintient l'enzyme à la surface cellulaire. Les cellules qui co-expriment l'un de ces mutants avec HJV produisent des niveaux significativement diminués d'hepcidine en comparaison à celles qui expriment TMPRSS6 de type sauvage. Cette diminution est due à une augmentation du clivage de HJV à la surface cellulaire provoquée par l'accumulation des mutants de TMPRSS6, incapable d'internaliser, à la surface. Nos résultats soulignent pour la première fois l'importance du trafic de TMPRSS6 à la membrane plasmique dans la régulation de l'expression de l'hepcidine, un événement qui est essentiel à l'homéostasie du fer.

**ESSENTIAL ROLE OF ENDOCYTOSIS OF THE TYPE II TRANSMEMBRANE SERINE
PROTEASE TMPRSS6 IN REGULATING ITS FUNCTIONALITY**

François Béliveau¹, Cédric Brulé¹, Antoine Désilets¹, Brandon Zimmerman², Stéphane A. Laporte², Christine L. Lavoie¹ and Richard Leduc^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, CANADA, J1H 5N4 and ²Department of Medicine and Pharmacology and Therapeutics, McGill University Health Center Research Institute, McGill University, Montreal, CANADA, H3A 1A1

Running title: Internalization of TMPRSS6

***Corresponding author:** Richard Leduc, Ph.D.; e-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

3.1 Abstract

The type II transmembrane serine protease TMPRSS6 (also known as matriptase-2) controls iron homeostasis through its negative regulation of expression of hepcidin, a key hormone involved in iron metabolism. Upstream of the hepcidin regulated signaling pathway, TMPRSS6 cleaves its target substrate hemojuvelin (HJV) at the plasma membrane but the dynamics of the protease's cell surface expression have not been addressed. Here we report that TMPRSS6 undergoes constitutive internalization in transfected HEK293 cells and in two human hepatic cell lines, HepG2 and primary hepatocytes, both of which express TMPRSS6 endogenously. Cell-surface labeled TMPRSS6 internalized and was detected in clathrin and AP-2 positive vesicles via a dynamin-dependent pathway. The endocytosed TMPRSS6 next transited in early endosomes and then to lysosomes. Internalization of TMPRSS6 is dependent on specific residues within its N-terminal, cytoplasmic domain as site-directed mutagenesis of these residues abrogated internalization and maintained the enzyme at the cell surface. Cells co-expressing these mutants and HJV produced significantly decreased levels of hepcidin compared to wild-type TMPRSS6 due to the sustained cleavage of HJV at the cell-surface by TMPRSS6 mutants. Our results underscore for the first time the importance of TMPRSS6 trafficking at the plasma membrane in the regulation of hepcidin expression, an event that is essential for iron homeostasis.

3.2 Introduction

The serine protease superfamily of hydrolytic enzymes is comprised of over 200 members (MEROPS database (Rawlings, Barrett and Bateman, 2010)), most of them secreted, soluble proteins. TMPRSS6 (matriptase-2), a member of a novel family of type II transmem-

brane serine proteases (TTSPs) that function at the cell-surface (Bugge, Antalis and Wu, 2009) was originally characterized as a protease mostly expressed in the liver (Ramsay *et al.*, 2008) and capable of processing proteins such as type I collagen, fibronectin and fibrinogen (Hooper *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2002). The protease is a mosaic protein comprised of multiple domains, including a 52-residue N-terminal cytoplasmic domain (Prasad *et al.*, 2009), a transmembrane domain that anchors the enzyme within membranes and an extracellular domain itself constituted of multiple regions including the catalytic region. Until now, no function had been associated to the enzyme's cytoplasmic tail. TMPRSS6 is synthesized as an inactive zymogen with the catalytic region being disulfide linked to the main chain following activation. Moreover, the enzyme undergoes cell-surface shedding, releasing a soluble and active form in the extracellular milieu (Stirnberg *et al.*, 2010). It exhibits many of the enzymatic specificities of other members of the TTSP family preferring Arginine residues in P4, P3 and P1 positions relative to the cleaved peptide bond (Velasco *et al.*, 2002; Béliveau, Désilets and Leduc, 2009).

Although TMPRSS6 has been associated with breast and prostate cancer (Parr *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2008), recent reports have demonstrated its direct involvement in iron homeostasis. Indeed, genetic analysis of kindred suffering from iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) identified sequence variants in the TMPRSS6 gene conclusively demonstrating that its loss is causative for this disease (Finberg *et al.*, 2008). Concomitantly, another group using chemically induced mouse models that showed progressive loss of body hair and microcytic anemia (Du *et al.*, 2008) found that the phenotype was caused by high levels of hepcidin, the major hormonal regulator of iron in mammals, this itself due to a splicing defect in the TMPRSS6 gene. Other nonsense mutations within the TMPRSS6 gene were also found in patients suffering from microcytic anemia and iron deficiency (Guillem *et al.*, 2008; Melis *et al.*, 2008). The involvement of TMPRSS6 in hepcidin regulation and iron homeostasis was initially discovered in a mouse mutant (mask), the phenotype of which resulted from a reduced absorption of dietary iron caused by high levels of hepcidin due to a splicing defect of TMPRSS6 (Du *et al.*, 2008). Mechanistically, TMPRSS6 controls iron homeostasis by repressing the expression of the HAMP gene, which encodes hepcidin, the major hormonal regulator of iron metabolism (Nemeth and Ganz, 2009). The link between TMPRSS6 and hepcidin involves the cleavage by TMPRSS6 of hemojuvelin (HJV) (Silvestri *et al.*, 2008), which acts as a bone morphogenetic protein (BMP) coreceptor (Babitt *et al.*,

2006), thereby affecting the BMP/SMAD signalling pathway and activation of the HAMP gene. Mutations present in IRIDA patients within specific TMPRSS6 extracellular domains affect either 1) translocation of the enzyme to the cell surface, which leads to increased intracellular retention resulting in the impairment of efficient HJV cleavage at the cell surface, or 2) the enzyme's capacity at being activated (Silvestri *et al.*, 2009).

Here we show that TMPRSS6 is constitutively internalized and that its endocytosis is dependent on motifs found within its cytoplasmic tail. Our results demonstrate that a member of the TTSP family undergoes dynamic trafficking at the cell surface thereby suggesting a way by which accessibility to its substrate can be controlled.

3.3 Experimental procedures

Cells, antibodies and reagents

HepG2 and HEK293 were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and primary human hepatocytes were from Zen-Bio (Chapel Hill, NC, USA). Cells were cultured in DMEM containing 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin (Wisent, St-Bruno, CAN). Serum-free 293 SFM II medium was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and primary hepatocyte plating and maintenance medium were from Zen-Bio. Cells were transfected using polyethyleneimine (PEI) (Polysciences, Warrington, PA, USA) as previously described (Ehrhardt *et al.*, 2006). Anti-V5 mAb was from Invitrogen, anti-HA (HA.11) mAb and pAb from Covance (Emeryville, CA, USA), Na⁺/K⁺-ATPase pAb, clathrin heavy chain (D3C6) and caveolin-1 (D46G3) rabbit mAb from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) mAb from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA, USA) and pAb (PA1-063A) from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), LAMP-2 mAb (H4B4) was from the University of Iowa (Iowa City, IA, USA) and pAb (ab37024) from Abcam (Cambridge, MA, USA), anti-actin mAb (A3853) and anti-HJV (HPA014472) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-TMPRSS6 pAb was developed in collaboration with 21st Century Biochemicals (Marlboro, MA, USA). The Tyramide signal amplification (TSA) kit with HRP-goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 tyramide was from Invitrogen. Boc-Gln-Ala-Arg-AMC was from Bachem Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA, USA). Amicon Ultra Centrifugal Filters (Ultracel 3K) with 3,000 MW cut off were from Millipore (Cork, Ireland). Poly-L-Lysine and Collagen I coated glass coverslips (BD BioCoat) were from BD Biosciences (Bedford, MA, USA). Lysosomal inhibitors (leupeptin, pepstatin, E-64) were from Roche Diagnostics

(Mannheim, Germany) and E-64d from Sigma-Aldrich. siRNA pools targeting TMPRSS6 (TMPRSS6 ON-TARGETplus SMARTpool) and non-targeting siRNA pool (ON-TARGETplus Non-targeting pool) were from Thermo Scientific Dharmacon (Lafayette, CO, USA).

Plasmid Constructions and Site-directed Mutagenesis

Human TMPRSS6 cDNA was obtained from C. Lopez-Otin (Universidad de Oviedo, Spain) and inserted in pcDNA6/V5 (Invitrogen). HA-tagged dominant-negative dynamin-1 (K44A) (HA-dynamin-1 K44A/pcDNA3.1) was obtained from Dr. Sandra Schmid (Scripps Research Institute, CA). TMPRSS6 mutants were generated using the QuikChange II XL mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described by the manufacturer. YFP-tagged β_2 -adaptin (pEYFP-N1) was described elsewhere (Fessart *et al.*, 2007). Plasmid encoding human HJV variant A was from OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA). Expression of all proteins was under the control of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter.

Biotinylation Assays

HEK293 cells were transfected with 1 μ g of TMPRSS6-V5 plasmid using 4 μ g PEI in 6-cm plates. After a 24-h transfection, biotinylation of HEK293 surface proteins was performed with Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated at 37 °C in complete DMEM for various time, washed, then left untreated or treated with biotin cleavage solution (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 50 mM sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MesNa) (pH 8.6)) for 2.5 h prior to lysis. Biotinylated proteins were precipitated with avidin and resulting samples were loaded on a 10 % SDS-PAGE gel then analyzed by immunoblotting using anti-V5 antibodies (TMPRSS6) and Na⁺/K⁺-ATPase antibodies.

Immunofluorescence

Cells were seeded on 12 mm or 22 mm coverslips (poly-lysine coated for HepG2 cells and Collagen I for primary human hepatocytes) placed in 6-well plates. When indicated, cells were transfected with 1 μ g of plasmid using 4 μ g PEI. After a 24-h transfection, cell surface TMPRSS6 was labeled with anti-V5 or anti-TMPRSS6 antibodies for 1 h at 4 °C in serum-free DMEM. Cells were then washed and incubated in complete DMEM at 37 °C for

various period of time. Protocol for cell preparation was described elsewhere (Brodeur *et al.*, 2009). Detection signal of endogenous TMPRSS6 in HepG2 and primary human hepatocytes was amplified with TSA kit.

Treatment with lysosomal inhibitors

Cells were incubated for 6 h at 37 °C in complete DMEM containing 1 mg · ml⁻¹ of leupeptin, 10 µg · ml⁻¹ of E64 (HEK293 cells) or E-64d (hepatocytes) and 70 µg · ml⁻¹ pepstatin as previously published (Brodeur *et al.*, 2009).

Expression of TMPRSS6 mutants

HEK293 cells were transfected with 1 µg plasmid using 4 µg PEI in 6-wells plates. Plasmids used were WT TMPRSS6-V5, catalytically dead mutant (S762A), penta-alanine mutants or single alanine mutants of the 2-11 region of the cytoplasmic tail of TMPRSS6. After 24-h transfection, cell media were replaced by serum-free 293 SFM II for another 24-h. Cells were then lysed and cell media collected and concentrated with 3,000 MWCO centrifugal filters (Amicon). Resulting samples were loaded on a 10 % SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-V5 antibody.

Proteolytic activity measurements

HEK293 cells were transfected with 1 µg plasmid using 4 µg PEI in 6-well plates. After 24-h transfection, the medium was replaced by serum-free 293 SFM II for 72 h. Enzymatic assays were then performed with serum-free medium in 100 mM Tris-HCl, pH 9, containing 500 µg · ml⁻¹ bovine serum albumin. Enzyme activity was monitored by measuring the release of fluorescence (excitation, 360 nm; emission, 441 nm) from Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 µM) for 20 min at 37 °C in a FLX-800 TBE microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Activity was normalized by cell lysate total protein (µg) and presented as fold over wild-type (WT).

Hemojuvelin processing by TMPRSS6

HEK293 cells were cotransfected with 1 µg HJV and 1 µg TMPRSS6-V5 plasmids using 8 µg PEI in 6-well plates. Plasmids used were WT TMPRSS6-V5 or single alanine mutants

of 2–11 region of the cytoplasmic tail. After 24-h transfection, cell media were replaced by serum-free 293 SFM II for another 24-h. Cells were then lysed and media collected and concentrated with 3,000 MWCO centrifugal filters (Amicon). Resulting samples were loaded on a 10 % SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-V5 and anti-HJV antibodies.

siRNA transfection

siRNAs were transfected using DharmaFECT 4 Transfection Reagents according to the manufacturer's instructions (Dharmacon).

Hepcidin quantification

Hepcidin-25 was assessed in concentrated cell media by a competitive ELISA method, using Hepcidin-25 – EAI commercial kit (Bachem, San Carlos, CA, USA).

3.4 Results

Cell-surface TMPRSS6 is internalized

Since regulation of HAMP involves cleavage of HJV by TMPRSS6, we reasoned that there could be a regulatory step necessary for controlling the levels of HJV, the presence of which is paramount to the downstream signaling and transcriptional activation of HAMP. To determine the dynamics of TMPRSS6 cell-surface expression and its trafficking path, we examined the endocytic/internalization capacity of both an epitope tagged form of TMPRSS6 heterologously expressed in HEK293 cells and the endogenous protein in HepG2 cells and in human primary hepatocytes. To examine whether TMPRSS6 is present at the plasma membrane and is internalized, we used a cell-surface biotinylation assay. HEK293 cells transiently transfected with a carboxy-terminal, extracellular V5-tagged TMPRSS6 (TMPRSS6-V5) construct were labeled with membrane impermeable biotin (sulfo-NHS-SS-biotin) and kept at 4 °C (0 min) to prevent internalization or incubated at 37 °C for various times (5, 10, 20, 30 and 60 min) to allow internalization (Fig. 3.1A). Cells were then kept at 4 °C to prevent further internalization, cell-surface biotin was cleaved with sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MesNa), a membrane impermeant reducing agent, and total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Figure 3.1A shows that TMPRSS6 migrates as a 125 kDa band, corresponding to the predicted molecular weight of the N-linked

glycosylated protease. We compared the biotinylation of the TMPRSS6 population to that of Na⁺/K⁺-ATPase, a protein that does not internalize in our conditions (Na⁺/K⁺-ATPase undergoes internalization only when HEK293 cells are stimulated, see Pierre, Belliard and Sottejeau (2011)). As expected, biotinylated Na⁺/K⁺-ATPase was not protected from MesNa cleavage indicating that this protein was not internalized. However, we found that after 5 minutes of incubation, a subset of biotinylated TMPRSS6 was protected from cleavage, which suggested internalization within intracellular compartments; further time points (10–60 min) led to the detection of increased levels of protected TMPRSS6.

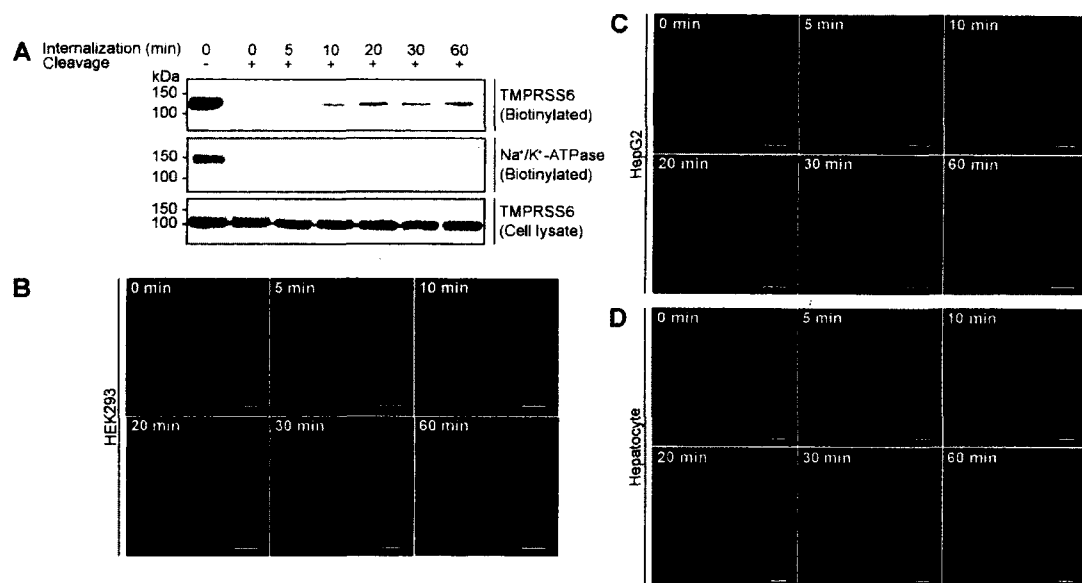


Figure 3.1
TMPRSS6 undergoes internalization

(A) HEK293 cells transfected with TMPRSS6-V5 were surface-biotinylated with sulfo-NHS-SS-biotin and incubated at 37 °C for the indicated time (internalization). Cells were left untreated (–) or treated (+) with MesNa (cleavage) for 2.5 h on ice. Biotinylated proteins were precipitated with avidin and samples were analyzed by immunoblotting with antibodies against V5 (upper panel) and Na⁺/K⁺-ATPase (middle panel). Total cell lysate was also analyzed to assess TMPRSS6 expression levels (lower panel) ($n = 3$). HEK293 cells transfected with TMPRSS6-V5 ($n = 3$) (B), untransfected HepG2 cells ($n = 3$) (C) and primary human hepatocytes (D) were cell-surface labeled with anti-V5 or anti-TMPRSS6 antibodies and incubated for different times (0–60 min) at 37 °C prior to processing for confocal fluorescence microscopy analysis. Anti-V5 and anti-TMPRSS6 immunofluorescence are displayed in green and Hoechst-stained nucleus in blue. Scale bar: 50 μm.

We next examined internalization of TMPRSS6 in transiently transfected HEK293 cells, in HepG2 cells and in human primary hepatocytes using confocal microscopy. To directly observe the internalization phenomenon, we first labeled TMPRSS6-V5 transiently expressed in HEK293 cells with a specific V5 monoclonal antibody at 4 °C to prevent any internalization. The antibody-tagged TMPRSS6-V5 expressing cells were then incubated

at 37 °C to allow internalization (Fig. 3.1B). At initial time points and for a 5 min period at 4 °C (Fig. 3.1B), TMPRSS6-V5 was present at the plasma membrane of transfected cells consistent with the accessibility to cleavage with MesNa after biotinylation (Fig. 3.1A). After 10 and 20 min at 37 °C, labeling was found in vesicular structures near the plasma membrane, with some fluorescence retained at the plasma membrane. Beginning at 30 min and especially at 60 min, the majority of the enzyme was found in large vesicles in the juxtannuclear region further demonstrating transport of the protein into the cytoplasm. This observed internalization could explain the partial protection from biotin cleavage starting at 10 minutes of incubation time and through to 60 minutes (Fig. 3.1A). To examine this phenomenon in cells endogenously expressing TMPRSS6, we first raised an antibody against a peptide sequence found within the enzyme's catalytic region (see supplemental Fig. 3.SF1A, which shows specificity of the antibody using blocking peptides) and used it to observe similar internalization dynamics in HepG2 cells and in primary human hepatocytes endogenously expressing TMPRSS6 (Fig. 3.1C and 3.1D). Collectively, these results demonstrate that cell-surface TMPRSS6 undergoes internalization.

Characterization of TMPRSS6 internalization pathway

Our observations on the internalization of TMPRSS6 prompted us to investigate the endocytic pathway by which this is mediated. Since dynamin-mediated endocytosis is a major form of endocytosis involved in internalization of cell-surface proteins such as receptors (Damke *et al.*, 1994), we first examined whether TMPRSS6 endocytosis was dynamin mediated. As shown in Figure 3.2A, the expression of a dominant-negative mutant form of dynamin-1 (K44A), which inhibits clathrin- and caveolin-mediated endocytosis (Conner and Schmid, 2003), abrogated internalization and maintained TMPRSS6 at the plasma membrane in HEK293 cells transiently expressing TMPRSS6-V5. Similar results were obtained in HepG2 cells. Indeed, Figure 3.2A clearly shows that in HepG2 cells not expressing dynamin-1 K44A, TMPRSS6 was internalized (box 1) whereas TMPRSS6 was maintained at the cell surface in dynamin-1 K44A expressing cells (box 2).

To more precisely define the compartments where cell-surface labeled TMPRSS6 is internalized, we carried out double labeling for TMPRSS6 and endocytic markers in HEK293 cells transiently expressing TMPRSS6-V5. After short internalization periods (5 min), TMPRSS6 partially colocalized with the clathrin-coated vesicle (CCV) markers β_2 -adaptin and

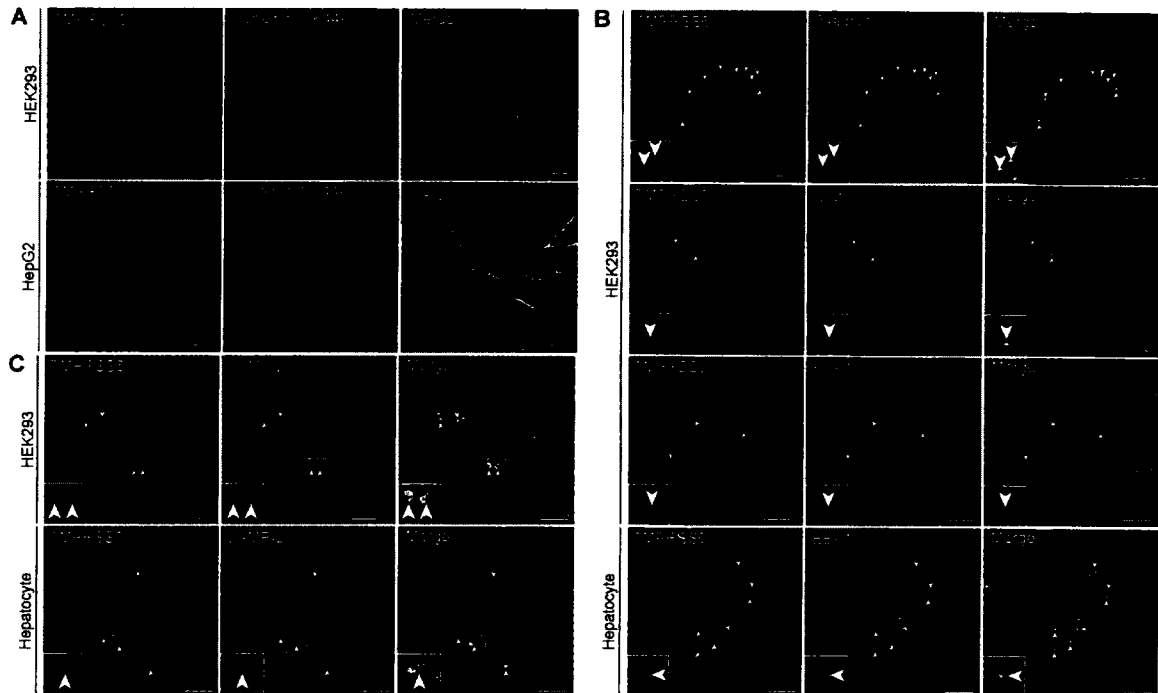


Figure 3.2
Characterization of TMPRSS6 internalization pathway

(A) HepG2 and HEK293 cells were transfected with HA-tagged dominant-negative dynamin-1 K44A in the presence (HEK293) or absence (HepG2) of TMPRSS6-V5. Cell-surface TMPRSS6 was labeled on ice with anti-V5 (HEK293) or anti-TMPRSS6 (HepG2) and incubated at 37 °C for 1 h. Cells were fixed, permeabilized and immunostained using anti-HA followed by fluorescent secondary antibodies. Box 1: dynamin-1 K44A untransfected cell; box 2, transfected cell ($n = 3$) (B) HEK293 cells transfected with TMPRSS6-V5 in the absence or presence of YFP-tagged β_2 -adaptin and primary human hepatocytes were co-stained for TMPRSS6 and different endocytosis markers. Cell-surface TMPRSS6 was labeled on ice with anti-V5 (HEK293) or anti-TMPRSS6 (hepatocytes) and incubated at 37 °C for 5 or 10 min. TMPRSS6 immunofluorescence is displayed in *green* and YFP, anti-clathrin or anti-EEA1 in *red* ($n = 3$). (C) Cell-surface TMPRSS6 of HEK293 cells transfected with TMPRSS6-V5 and primary human hepatocytes were labeled on ice with anti-V5 (HEK293) or anti-TMPRSS6 (hepatocytes) and incubated at 37 °C for 6 h in presence of lysosome protease inhibitors leupeptin ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), pepstatin ($70 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and E-64 (HEK293 cells) or E-64d (hepatocytes) ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) ($n = 3$). TMPRSS6 immunofluorescence is displayed in *green*, LAMP-2 in *red* and Hoechst-stained nucleus in *blue*. Yellow color and white arrowheads indicate colocalization. Scale bar: 50 μm .

clathrin in punctate structures along the plasma membrane (Fig. 3.2B). No colocalization was observed with caveolin-1 (supplemental Fig. 3.SF2). To determine the nature of the compartments to which TMPRSS6 next traffics, we carried out double labeling of TMPRSS6 and EEA1, a marker for early endosomes (Mu *et al.*, 1995). TMPRSS6 colocalized with EEA1 after a 10 min internalization period in transfected HEK293 cells and in primary human hepatocytes suggesting its transport to early endosomes (Fig. 3.2B).

In order to determine whether TMPRSS6 further transits to lysosomes, we next compared its localization with LAMP-2, a lysosomal marker. Figure 3.2C shows that after 6 hours

of internalization and in presence of lysosomal inhibitors, TMPRSS6 partially colocalized with LAMP-2-labeled structures both in transfected HEK293 cells and in primary human hepatocytes. Taken together, our results suggest that TMPRSS6 traffics to early endosomes via clathrin-coated vesicles in a dynamin-dependent manner, where it is then sorted to the lysosomes.

The cytoplasmic tail of TMPRSS6 is involved in its internalization

In order to better understand the molecular determinants involved in TMPRSS6 internalization, we initially Alanine-scanned the 52-residue N-terminus by constructing ten penta-Ala mutants that cover the entire cytoplasmic tail and expressing them in HEK293 cells (Fig. 3.3A). We also constructed a TMPRSS6 catalytically inactive mutant (S762A) whereby the catalytic serine of the protease was replaced with Ala to examine whether proteolytic activity plays a role in the internalization process.

Constructs for all eleven mutants were transfected in HEK293 cells and cells were labeled with V5 antibody. Cells were further incubated in complete DMEM for 30 minutes at 37 °C to allow internalization. Interestingly, two out of the eleven mutants (2–6A and 7–11A) failed to undergo intracellular sequestration and remained mostly at the cell surface whereas all other mutants behaved similarly to wild-type in their internalization capacity (Fig. 3.3B). Furthermore, the S762A mutant exhibited similar internalization properties to WT suggesting that enzyme's proteolytic activity is not involved in internalization. Immunoblotting analysis of cell lysates of these mutants reveals that they are equally expressed (Fig. 3.3C, upper panels). Cell-surface TMPRSS6 is known to undergo a complex maturation process that includes activation and subsequent shedding from the plasma membrane (Stirnberg *et al.*, 2010; Silvestri *et al.*, 2008, 2009; Altamura *et al.*, 2010; Ramsay *et al.*, 2009). Hence, multiple forms are generated, most of them the result of autocatalysis. Immunoblotting analysis of media originating from cells expressing wild-type and mutant TMPRSS6 (Fig. 3.3C, middle panels) reveals different shed forms detectable as fragments migrating at 90, 85, 75, 32 and 30 kDa. First, the larger 90 kDa form can originate from a cleavage within the enzyme's SEA domain, similar to that observed for matriptase (Oberst *et al.*, 2003) while the 75 and 85 kDa fragments would be the consequence of proteolysis at Arg⁴¹³ and Arg⁴⁴⁶ within the stem region leading to cell surface release (Stirnberg *et al.*, 2010). All these larger forms would not carry proteolytic activity because no cleavage has occurred at the activation peptide, an event

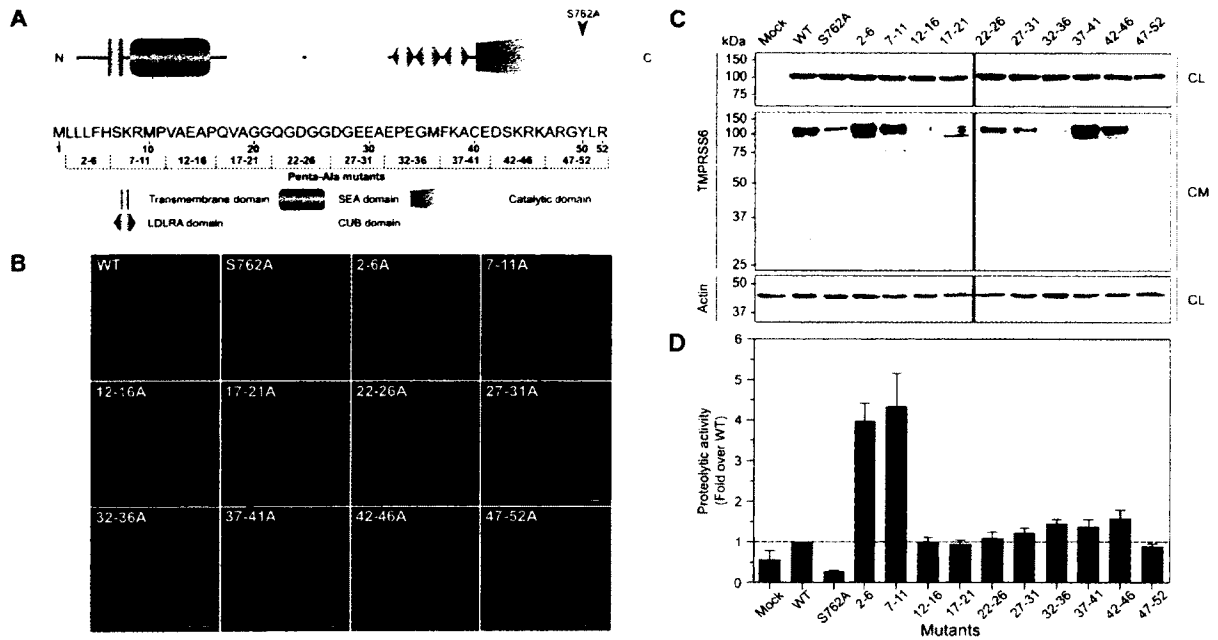


Figure 3.3
 TMPRSS6 cytoplasmic tail is involved in internalization

(A) Schematic representation of TMPRSS6 domains including its N-terminal (52 residues) cytoplasmic tail. A catalytically inactive mutant (S762A, black arrowhead) and ten 'penta-Alanine' mutants (5 contiguous Ala clusters) were generated as indicated. (B) HEK293 cells were grown on coverslips and transfected with WT TMPRSS6-V5, S762A or penta-alanine mutants as indicated. Cells were surface-labeled on ice with anti-V5 and fixed 30 minutes after incubation at 37 °C ($n = 3$). Anti-V5 immunofluorescence is displayed in *green* and Hoechst-stained nucleus in *blue*. Scale bar: 50 μ m. (C) HEK293 cells were transfected with WT TMPRSS6-V5, catalytically dead mutant (S762A) or penta-alanine mutants. Expression was detected by Western blotting with an anti-V5 antibody. Equal amount of cell lysate (CL) was loaded on SDS-PAGE gel (upper panel). Cell media (CM) was concentrated and loaded on a 10 % SDS-PAGE gel (middle panel). Cell lysate actin was blotted as loading control (lower panel) ($n = 3$). (D) Proteolytic activity was measured by cleaving the fluorogenic peptide Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 μ M) and monitoring fluorescence release in media of cells transfected with TMPRSS6 and alanine mutants. Activity was normalized by cell lysate total protein (μ g) and presented as fold over WT (mean \pm SD, $n = 3$).

required for activity. Indeed, it is cleavage at Arg⁵⁷⁶ within the conserved activation peptide which yields the 30 kDa active fragment and which converts the single-chain zymogen into the activated two-chain protease (Stirnberg *et al.*, 2010). Moreover, because TMPRSS6 cleaves after selective basic residues, the 32 kDa fragment can be the result of an alternative cleavage near the activation site (for example at Arg⁵⁵⁸). Compared to wild-type, mutants 2–6A and 7–11A exhibited increased cell-surface shedding as shown by the bands migrating at 90, 85, 75, 32, 30 kDa. Mutant 37–41A also had increased cell-surface shedding but only for the 90, 32 and 30 kDa bands. We detected significant increases in proteolytic activity (4 to 4.5 fold over WT) in the media of cells expressing mutants 2–6A and 7–11A (Fig. 3.3D) but, intriguingly, not with the 37–41A mutant. These results suggest that cleavages after Arg⁴¹³ and Arg⁴⁴⁶ (75 and

85 kDa bands respectively) may be required to obtain active shed forms. Another possibility for the lack of activity of the 37–41A mutant is that cleavage yielding the 32 and 30 kDa form does not occur at the precise site (Arg⁵⁷⁶) required for activation of the protease. Certainly, the higher proteolytic activity detected in the media of 2–6A and 7–11A mutants is consistent with immunoblotting data whereby impeding cell-surface internalization increases cell-surface shedding which is associated with higher proteolytic activity in cell media compared to WT and other mutants.

The results obtained with the 2–6A and 7–11A mutants suggested that specific, individual residues were involved in TMPRSS6 internalization. We therefore examined the effect of systematically replacing each of the first 10 residues of the protein (excluding the initiator Methionine) with Alanine. Figure 3.4A shows that selective amino acid substitutions lead to profound effects on the ability of TMPRSS6 to internalize. Indeed, confocal analysis reveals that five of the mutants (L2A, L3A, F5A, S7A and K8A) remained mostly at the cell-surface after a 30 minute incubation at 37 °C, whereas L4A, H6A, R9A, M10A and P11A exhibited normal internalization. Immunoblotting analysis (Fig. 3.4B) and proteolytic activity in cell media (Fig. 3.4C) show increased cell-surface shedding of L2A, L3A, F5A, S7A and K8A mutants that is associated with a higher proteolytic activity in the cell media compared to WT and other mutants.

Impairment of TMPRSS6 internalization affects cell-surface cleavage of HJV and hepcidin production

HJV is a cell-surface protein that is important for HAMP gene expression and TMPRSS6 plays a regulatory role in this process by cleaving HJV. To determine the functional impact of impairment of TMPRSS6 internalization on this process, we first analyzed the effect of sustained cell-surface expression of the protease and the various protease mutants on HJV cleavage. HEK293 cells were co-transfected with a HJV encoding plasmid together with empty vector (mock), WT or single alanine mutant TMPRSS6-V5 constructs (Fig. 3.5A). HJV cleavage by TMPRSS6 was analyzed by immunoblotting with HJV antibodies to detect cleaved soluble HJV (sHJV) in the cell media (Fig. 3.5A, middle panels). As reported previously, shed HJV migrates at 40 kDa due to proprotein convertase cleavage (Maxson, Enns and Zhang, 2009) while cleavage by TMPRSS6 yields a shorter, 36 kDa form. Indeed, in cells transfected with WT TMPRSS6-V5 or single alanine mutants, the major forms of sHJV in the conditioned medium

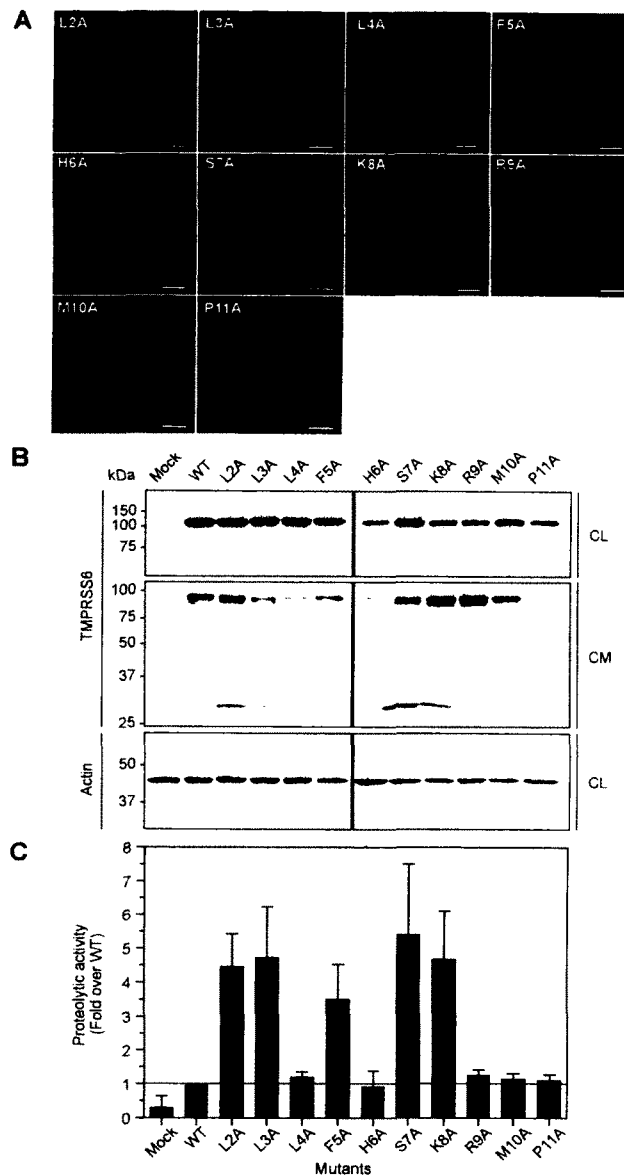


Figure 3.4

TMPRSS6 internalization depends on specific amino acid within 2–11 region of the cytoplasmic tail

(A) HEK293 cells were grown on coverslips and transfected with TMPRSS6-V5 2–11 region single alanine mutants. Cells were surface-labeled on ice with anti-V5 and fixed 30 minutes after incubation at 37 °C ($n = 3$). Anti-V5 immunofluorescence is displayed in *green* and Hoechst-stained nucleus in *blue*. Scale bar: 50 μ m. (B) HEK293 cells were transfected with TMPRSS6-V5 2–11 region single alanine mutants. Expression was detected by Western blotting with an anti-V5 antibody. Equal amount of cell lysate (CL) was loaded on SDS-PAGE gel (upper panel). Cell media (CM) was concentrated and loaded on a 10% SDS-PAGE gel (middle panel). Cell lysate actin was blotted as loading control (lower panel) ($n = 3$). (C) Proteolytic activity was measured by cleaving the fluorogenic peptide Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 μ M) and monitoring fluorescence release in media of cells transfected with TMPRSS6 and alanine mutants. Activity was normalized by cell lysate total protein (μ g) and presented as fold over WT (mean \pm SD, $n = 3$).

migrated at 36 kDa. Expression of all non internalized TMPRSS6 mutants (L2A, L3A, F5A, S7A and K8A) led to a increase in the intensity of the 36 kDa band in conditioned cell medium supporting the notion that sustained presence of the enzyme at the cell-surface leads to increased proteolysis of the substrate.

Since the sustained presence of TMPRSS6 at the plasma membrane produced higher levels of sHJV and hence decreased cell-surface levels of intact HJV, we examined if hepcidin levels were affected by this event. We measured the effect of expressing TMPRSS6 mutants in HepG2 cells, which endogenously produce and secrete hepcidin (Fein *et al.*, 2007). Figure 3.5B shows that a basal level of secreted hepcidin is detected in the conditioned media. When HJV is overexpressed, a significant increase in hepcidin levels was found but these levels returned to normal once wild-type TMPRSS6 was overexpressed thereby confirming its role as a negative regulator of hepcidin production (Fig. 3.5B). However, when the cell-surface sustained mutants (L2A, L3A, F5A, S7A and K8A) were expressed in these cells, hepcidin levels were significantly reduced when compared to WT. These reductions can be linked to the increased cell surface cleavage of HJV as shown in figure 3.5A. Using an alternative strategy by transfecting dynamin-1 K44A or siRNA to knock-down TMPRSS6 (see supplemental Fig. 3.SF1B for controls and efficacy of siRNA on TMPRSS6 expression in transfected cells) in HJV transfected HepG2 cells we show that modulating the cell-surface or overall cellular levels of TMPRSS6 in an endogenous model affected hepcidin levels (Fig. 3.5C). Maintaining TMPRSS6 at the surface with dynamin-1 K44A led to a significant decrease of hepcidin when compared to cells transfected only with HJV while knocking-down endogenous levels of TMPRSS6 partially restored the signaling capacity of the cell to produce hepcidin.

3.5 Discussion

TMPRSS6 is a cell-surface serine protease that plays a critical role in the regulation of iron homeostasis through its proteolytic processing of plasma membrane HJV (Maxson *et al.*, 2010). Normally, intact HJV associates with BMP to control hepcidin expression via the BMP receptor/Smad signaling pathway.

In this study, we show for the first time that TMPRSS6 undergoes internalization at the plasma membrane. We demonstrate using biotinylation and confocal microscopy analysis that the enzyme reaches the cell surface and undergoes endocytosis in early endosomes via clathrin-coated vesicles in a dynamin-dependent manner. Internalization was not only

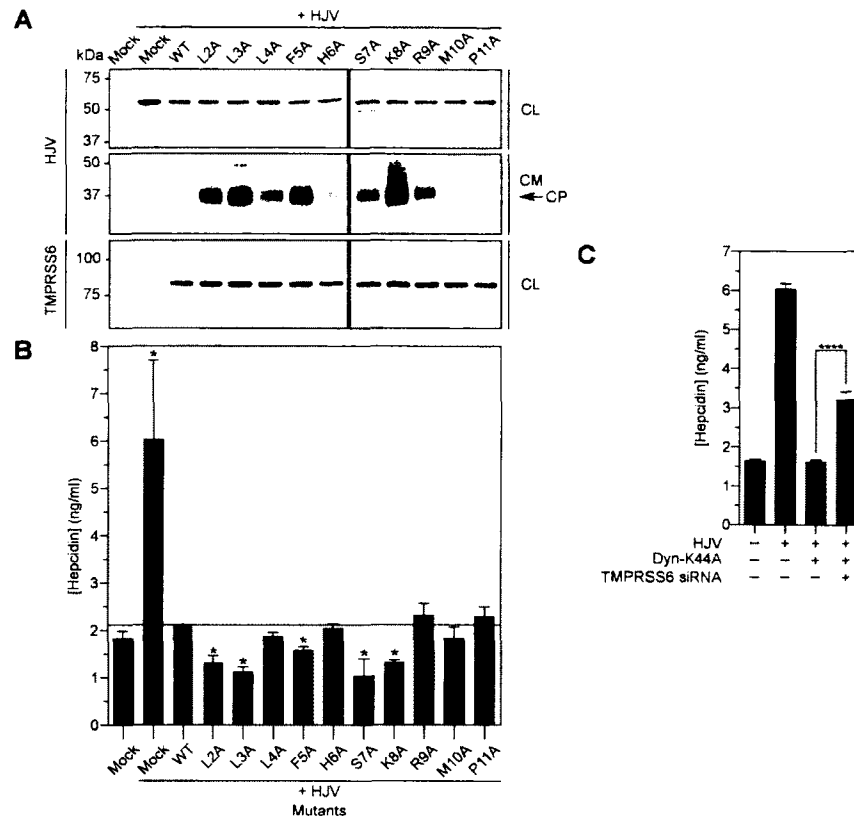


Figure 3.5

Inhibiting TMPRSS6 internalization affects cell surface cleavage of HJV and hepcidin production

(A) HEK293 cells were co-transfected with HJV and WT TMPRSS6-V5 or single alanine mutants. Equal amounts of cell lysate (CL, upper panel) and concentrated cell media (CM, middle panel) were loaded on a 10 % SDS-PAGE gels then blotted against HJV. Cell lysates (lower panel) were blotted as expression control ($n = 3$). CP signifies HJV cleavage product. (B) HepG2 cells were co-transfected with HJV and WT TMPRSS6-V5 or single alanine mutants. Medium was concentrated after 24 h accumulation in serum-free medium and hepcidin concentration ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) evaluated by ELISA (mean \pm SD, $n \geq 3$). * $P < 0.01$. (C) HepG2 cells were co-transfected with HJV in presence or not of dynamin-1 K44A (Dyn-K44A) and siRNA targeting TMPRSS6. Scrambled siRNA were used in absence of TMPRSS6 siRNA. Medium was concentrated after 24 h accumulation in serum-free medium and hepcidin concentration ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) evaluated by ELISA (mean \pm SD, $n \geq 3$). **** $P < 0.001$.

observed in transiently transfected HEK293 cells but also in the physiologically relevant HepG2 cells and in primary human hepatocytes that endogenously express TMPRSS6. At later time points, TMPRSS6 was detected in LAMP-2 labeled vesicles suggesting that the protease eventually transits to lysosomes where it may be degraded.

Internalization of cell-surface proteins is frequently mediated by motifs found within their cytoplasmic tail (Kozik *et al.*, 2010). Initially, we screened for important regions within the cytoplasmic tail of TMPRSS6 by using penta-alanine mutants and identified amino-terminal region 2–11 as essential for internalization. Interestingly, this region contains a

dileucine motif (L2 and L3), a determinant that is often found in cell-surface proteins that undergo internalization. These motifs found in membrane proteins have been shown to act as endocytic and/or constitutive sorting signals through interaction with the AP-2 adaptor protein (Bonifacino and Traub, 2003). Interestingly, however, the dileucine motif found in TMPRSS6 seems atypical from the canonical [D/E]XXXL[L/I] sequence observed in most trafficking proteins, as it lacks an upstream acidic residue. Our data are nonetheless consistent with the recent findings that dileucine motifs on their own can still act as internalization signals (Kozik *et al.*, 2010) and that many other trafficking proteins with such motifs also lack acidic residue at position -4, but instead rely on other hydrophilic residues downstream of the dileucines (*e.g.*, LLXXXS in TMPRSS6) (Bonifacino and Traub, 2003). Using single alanine mutation of the amino acids of the 2–11 region, we found that the L2 and L3 residues play a role in internalization but that three other determinants (F5, S7 and K8) are also involved in this process.

Internalization is a well-known regulatory process for G protein coupled receptors as well as for growth factor receptors such as tyrosine kinase receptors where it plays a role in desensitization and signaling (Posner and Laporte, 2010). However, internalization of membrane proteases and the consequences thereof has not been extensively studied. An example of a serine protease that undergoes internalization is furin, a type I transmembrane protein where routing is a dynamic event shown to be dependent on the phosphorylation state of its cytoplasmic tail (Jones *et al.*, 1995). Reports have also shown that MT1-MMP, an integral type I transmembrane metalloproteinase involved in cleaving ECM proteins, undergoes dynamin-dependent endocytosis using both clathrin-mediated and independent pathways (Remacle, Murphy and Roghi, 2003). Finally, very recent data reveal how another member of the TTSP family, matriptase, accumulates in intracellular structures (Friis *et al.*, 2011) bringing support to the notion that these proteins undergo dynamic trafficking.

Recently, it was determined that cell-surface shedding was the only known mechanism by which TMPRSS6 activity could be regulated (Silvestri *et al.*, 2009). Our results reveal that, in addition to shedding, internalization of TMPRSS6 can also act as a cellular mode of TMPRSS6 regulation with direct consequences on the processing of specific cell-surface substrates such as HJV. Identifying and understanding the molecular determinants and mechanisms controlling this event can lead to the potential modulation of internalization rates and hence, cell-surface levels of TMPRSS6. Modulation of the levels of TMPRSS6 at the cell surface could

conceivably lead to the eventual control of systemic iron levels. Interestingly, use of peptide aptamers that can bind the LLY internalization motif located in MT1-MMP's cytoplasmic tail has prevented its internalization causing accumulation at the cell surface (Wickramasinghe, Ferrigno and Roghi, 2010). Thus, one could envisage the modulation of TMPRSS6 cell-surface localization and proteolytic activity by targeting its cytoplasmic tail.

In this study, we reveal a novel mechanism for TMPRSS6 regulation through plasma membrane internalization and identified key residues within its cytoplasmic tail that are important in sequestering the enzyme within the cell. Further studies will be needed to fully understand the underlying mechanisms regulating TMPRSS6 trafficking and the extent to which such regulation has on iron homeostasis and in situations of iron imbalance.

3.6 Acknowledgements

B.Z. holds a Banting and Best CIHR studentship award. S.A.L. is a Canada Research Chair in Molecular Endocrinology and C.L.L. is a Canada Research Chair in Cellular Pharmacology. This work was supported by a grant to R.L. and C.L.L. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

3.7 References

- Altamura, S., F. D'Alessio, B. Selle and M. U. Muckenthaler. 2010. « A novel TMPRSS6 mutation that prevents protease auto-activation causes IRIDA. » *Biochem J*, vol. 431, no 3, p. 363–371.
- Babitt, J. L., F. W. Huang, D. M. Wrighting, Y. Xia, Y. Sidis, T. A. Samad, J. A. Campagna, R. T. Chung, A. L. Schneyer, C. J. Woolf, N. C. Andrews and H. Y. Lin. 2006. « Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. » *Nat Genet*, vol. 38, no 5, p. 531–539.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub. 2003. « Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. » *Annu Rev Biochem*, vol. 72, p. 395–447.
- Brodeur, J., H. Larkin, R. Boucher, C. Thériault, S. C. St-Louis, H. Gagnon and C. Lavoie. 2009. « Calnuc binds to LRP9 and affects its endosomal sorting. » *Traffic*, vol. 10, no 8, p. 1098–1114.
- Bugge, T. H., T. M. Antalis and Q. Wu. 2009. « Type II transmembrane serine proteases. » *J Biol Chem*, vol. 284, no 35, p. 23 177–23 181.

- Béliveau, F., A. Désilets and R. Leduc. 2009. « Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. » *FEBS J*, vol. 276, no 8, p. 2213–2226.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid. 2003. « Regulated portals of entry into the cell. » *Nature*, vol. 422, no 6927, p. 37–44.
- Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock and S. L. Schmid. 1994. « Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. » *J Cell Biol*, vol. 127, no 4, p. 915–934.
- Du, X., E. She, T. Gelbart, J. Truksa, P. Lee, Y. Xia, K. Khovananth, S. Mudd, N. Mann, E. M. Y. Moresco, E. Beutler and B. Beutler. 2008. « The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. » *Science*, vol. 320, no 5879, p. 1088–1092.
- Ehrhardt, C., M. Schmolke, A. Matzke, A. Knoblauch, C. Will, V. Wixler and S. Ludwig. 2006. « Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent ». *Signal Transduction*, vol. 6, no 3, p. 179–184.
- Fein, E., U. Merle, R. Ehehalt, T. Herrmann and H. Kulaksiz. 2007. « Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells. » *Peptides*, vol. 28, no 5, p. 951–957.
- Fessart, D., M. Simaan, B. Zimmerman, J. Comeau, F. F. Hamdan, P. W. Wiseman, M. Bouvier and S. A. Laporte. 2007. « Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex. » *J Cell Sci*, vol. 120, no Pt 10, p. 1723–1732.
- Finberg, K. E., M. M. Heeney, D. R. Campagna, Y. Aydinok, H. A. Pearson, K. R. Hartman, M. M. Mayo, S. M. Samuel, J. J. Strouse, K. Markianos, N. C. Andrews and M. D. Fleming. 2008. « Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). » *Nat Genet*, vol. 40, no 5, p. 569–571.
- Friis, S., S. Godiksen, J. Bornholdt, J. Selzer-Plon, H. B. Rasmussen, T. H. Bugge, C.-Y. Lin and L. K. Vogel. 2011. « Transport via the transcytotic pathway makes prostaticin available as a substrate for matriptase. » *J Biol Chem*, vol. 286, no 7, p. 5793–5802.
- Guillem, F., S. Lawson, C. Kannengiesser, M. Westerman, C. Beaumont and B. Grandchamp. 2008. « Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. » *Blood*, vol. 112, no 5, p. 2089–2091.
- Hooper, J. D., L. Campagnolo, G. Goodarzi, T. N. Truong, H. Stuhlmann and J. P. Quigley. 2003. « Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues. » *Biochem J*, vol. 373, no Pt 3, p. 689–702.
- Jones, B. G., L. Thomas, S. S. Molloy, C. D. Thulin, M. D. Fry, K. A. Walsh and G. Thomas. 1995. « Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. » *EMBO J*, vol. 14, no 23, p. 5869–5883.

- Kozik, P., R. W. Francis, M. N. J. Seaman and M. S. Robinson. 2010. «A screen for endocytic motifs.» *Traffic*, vol. 11, no 6, p. 843–855.
- Maxson, J. E., J. Chen, C. A. Enns and A.-S. Zhang. 2010. «Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression.» *J Biol Chem*, vol. 285, no 50, p. 39 021–39 028.
- Maxson, J. E., C. A. Enns and A.-S. Zhang. 2009. «Processing of hemojuvelin requires retrograde trafficking to the Golgi in HepG2 cells.» *Blood*, vol. 113, no 8, p. 1786–1793.
- Melis, M. A., M. Cau, R. Congiu, G. Sole, S. Barella, A. Cao, M. Westerman, M. Cazzola and R. Galanello. 2008. «A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron.» *Haematologica*, vol. 93, no 10, p. 1473–1479.
- Mu, F. T., J. M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R. G. Parton, P. L. Campbell, J. McCluskey, J. P. Yeo, E. P. Tock and B. H. Toh. 1995. «EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 22, p. 13 503–13 511.
- Nemeth, E. and T. Ganz. 2009. «The role of hepcidin in iron metabolism.» *Acta Haematol*, vol. 122, no 2-3, p. 78–86.
- Oberst, M. D., C. A. Williams, R. B. Dickson, M. D. Johnson and C.-Y. Lin. 2003. «The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor.» *J Biol Chem*, vol. 278, no 29, p. 26 773–26 779.
- Parr, C., A. J. Sanders, G. Davies, T. Martin, J. Lane, M. D. Mason, R. E. Mansel and W. G. Jiang. 2007. «Matriptase-2 inhibits breast tumor growth and invasion and correlates with favorable prognosis for breast cancer patients.» *Clin Cancer Res*, vol. 13, no 12, p. 3568–3576.
- Pierre, S. V., A. Belliard and Y. Sottejeau. 2011. «Modulation of Na(+)-K(+)-ATPase cell surface abundance through structural determinants on the α 1-subunit.» *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 300, no 1, p. C42–C48.
- Posner, B. I. and S. A. Laporte. 2010. «Cellular signalling: Peptide hormones and growth factors.» *Prog Brain Res*, vol. 181, p. 1–16.
- Prasad, T. S. K., R. Goel, K. Kandasamy, S. Keerthikumar, S. Kumar, S. Mathivanan, D. Telikicherla, R. Raju, B. Shafreen, A. Venugopal, L. Balakrishnan, A. Marimuthu, S. Banerjee, D. S. Somanathan, A. Sebastian, S. Rani, S. Ray, C. J. H. Kishore, S. Kanth, M. Ahmed, M. K. Kashyap, R. Mohmood, Y. L. Ramachandra, V. Krishna, B. A. Rahiman, S. Mohan, P. Ranganathan, S. Ramabadran, R. Chaerkady and A. Pandey. 2009. «Human

- Protein Reference Database–2009 update. » *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no Database issue, p. D767–D772.
- Ramsay, A. J., V. Quesada, M. Sanchez, C. Garabaya, M. P. Sardà, M. Baiget, A. Remacha, G. Velasco and C. López-Otín. 2009. « Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. » *Hum Mol Genet*, vol. 18, no 19, p. 3673–3683.
- Ramsay, A. J., J. C. Reid, G. Velasco, J. P. Quigley and J. D. Hooper. 2008. « The type II transmembrane serine protease matriptase-2—identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. » *Front Biosci*, vol. 13, p. 569–579.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett and A. Bateman. 2010. « MEROPS: the peptidase database. » *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no Database issue, p. D227–D233.
- Remacle, A., G. Murphy and C. Roghi. 2003. « Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. » *J Cell Sci*, vol. 116, no Pt 19, p. 3905–3916.
- Sanders, A. J., C. Parr, T. A. Martin, J. Lane, M. D. Mason and W. G. Jiang. 2008. « Genetic upregulation of matriptase-2 reduces the aggressiveness of prostate cancer cells in vitro and in vivo and affects FAK and paxillin localisation. » *J Cell Physiol*, vol. 216, no 3, p. 780–789.
- Silvestri, L., F. Guillem, A. Pagani, A. Nai, C. Oudin, M. Silva, F. Toutain, C. Kannengiesser, C. Beaumont, C. Camaschella and B. Grandchamp. 2009. « Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. » *Blood*, vol. 113, no 22, p. 5605–5608.
- Silvestri, L., A. Pagani, A. Nai, I. D. Domenico, J. Kaplan and C. Camaschella. 2008. « The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. » *Cell Metab*, vol. 8, no 6, p. 502–511.
- Stirnberg, M., E. Maurer, A. Horstmeyer, S. Kolp, S. Frank, T. Bald, K. Arenz, A. Janzer, K. Prager, P. Wunderlich, J. Walter and M. Gütschow. 2010. « Proteolytic processing of the serine protease matriptase-2: identification of the cleavage sites required for its autocatalytic release from the cell surface. » *Biochem J*, vol. 430, no 1, p. 87–95.
- Velasco, G., S. Cal, V. Quesada, L. M. Sánchez and C. López-Otín. 2002. « Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 40, p. 37 637–37 646.
- Wickramasinghe, R. D., P. K. Ferrigno and C. Roghi. 2010. « Peptide aptamers as new tools to modulate clathrin-mediated internalisation—inhibition of MT1-MMP internalisation. » *BMC Cell Biol*, vol. 11, p. 58.

3.8 Supplemental figures



Figure 3.SF1

Specificity of TMPRSS6 antibody and siRNA pools

(A) HepG2 cells were grown on coverslips and surface-labeled on ice with anti-TMPRSS6 (– blocking peptide) or with anti-TMPRSS6 preincubated with blocking peptide (+ blocking peptide) prior to fixation. Anti-TMPRSS6 immunofluorescence is displayed in *green* and Hoechst-stained nucleus in *blue*. Scale bar: 50 μ M. (B) HepG2 cells were co-transfected with WT TMPRSS6-V5 and non-targeting siRNA (scrambled) or TMPRSS6 siRNA pools. Expression was detected by Western blotting with an anti-V5 antibody. Equal amount of cell lysate (CL) was loaded on a 10 % SDS-PAGE gel. Cell lysate actin was blotted as loading control.

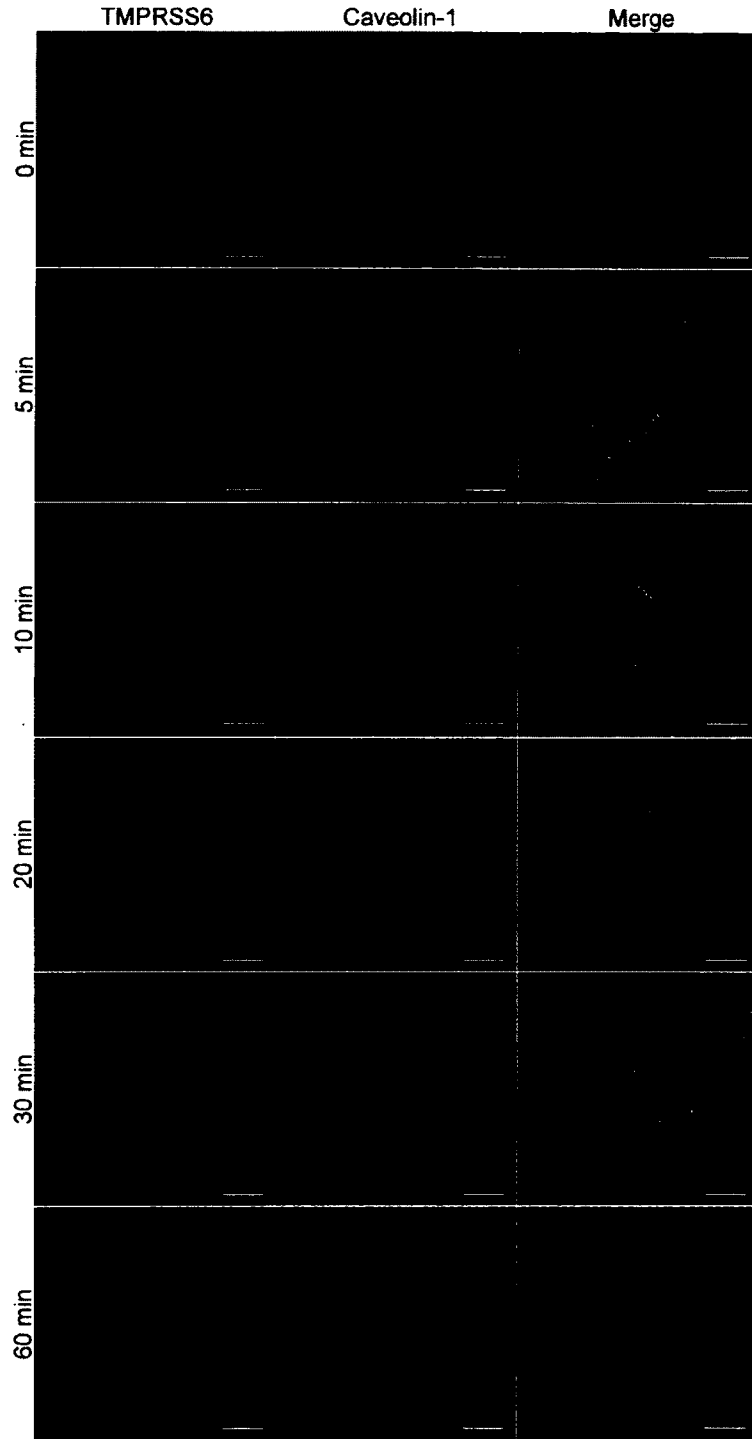


Figure 3.SF2
 TMPRSS6 does not colocalize with caveolin-1

HEK293 were grown on coverslips and transfected with WT TMPRSS6-V5. Cell-surface TMPRSS6 was labeled 1 h on ice with anti-V5 and cells were immediately fixed (0 min) or fixed after an incubation of 5, 10, 20, 30 or 60 min at 37 °C in complete medium. Cells were permeabilized and caveolin-1 was labeled with a specific antibody ($n = 2$). TMPRSS6-V5 was labeled with Alexa 488-coupled secondary antibody (*green*) and caveolin-1 with Alexa 594 (*red*). Scale bar: 50 μ M.

DISCUSSION

Le fer est impliqué dans une multitude de fonctions comme le transport d'oxygène et la catalyse des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou de synthèse d'ADN. Sa régulation est essentielle, car il peut être également toxique en raison de sa capacité à réagir avec l'oxygène et à catalyser la production de formes radicalaires. Pour cette raison, l'organisme possède différents mécanismes nécessaires à sa régulation.

L'un des principaux mécanismes assurant son contrôle implique sa disponibilité dans la circulation sanguine. La présence du fer dans le système vasculaire est principalement contrôlée par le transporteur ferroportine (FPN), qui régule son entrée en provenance de la digestion au niveau de l'intestin, son recyclage à partir de la dégradation des érythrocytes au niveau des macrophages et sa sortie des réserves contenues dans les hépatocytes (Andrews et Schmidt, 2007).

Le contrôle de ces transporteurs est assuré par une hormone peptidique produite par les hépatocytes, l'hepcidine. Cette hormone, en se liant aux ferroportines, provoque leur internalisation puis leur dégradation. La diminution de la quantité de ferroportine par l'hepcidine fait de ce dernier un régulateur négatif de la quantité de fer en circulation.

Cette hormone est, elle aussi, soumise à un processus de régulation. Récemment, la matriptase-2 a été identifiée comme étant un régulateur de son expression au niveau des hépatocytes. Cette protéase à sérine transmembranaire permet de contrôler l'expression du gène de l'hepcidine en clivant l'hémojuvéline à la surface cellulaire.

Étant donné le rôle important de cet enzyme dans le processus d'homéostasie du fer et son implication dans de nombreux cas d'anémie réfractaire au fer (IRIDA), sa spécificité enzymatique a été étudiée ainsi que sa régulation fonctionnelle.

4.1 Spécificité enzymatique de la matriptase-2 par rapport à d'autres TTSP

La matriptase-2 ainsi que les autres membres de la famille des TTSP possèdent des caractéristiques communes dont un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire ainsi qu'une région extracellulaire possédant différents domaines dont un domaine catalytique dans sa portion carboxyterminale.

Dans le cas de la matriptase-2, l'étude de son domaine catalytique est intéressant car une meilleure connaissance de sa spécificité pourrait permettre de développer des inhibiteurs contre elle. Le développement de tels inhibiteurs pourrait avoir des utilités dans le traitement de maladie comme l'hémochromatose qui provoque une surcharge en fer (Pietrangelo, 2010).

L'inhibition de la matriptase-2 pourrait diminuer le clivage de l'hémojuvéline et ainsi favoriser l'expression de l'hepcidine, ce qui permettrait de diminuer les quantités de fer dans le sang.

Étant donné que les différentes TTSP possèdent une forte identité de séquence au niveau de leur domaine catalytique (~40 %), la spécificité de la matriptase-2 a été comparée avec celle de son plus proche homologue, la matriptase, ainsi qu'à deux autres TTSP de sous-familles différentes, l'hepsine et DESC1.

4.1.1 Spécificité envers les substrats

Afin de comparer la spécificité enzymatique des différentes TTSP, des formes recombinantes de celles-ci ont été exprimées et purifiées (voir figure 2.1). Les propriétés enzymatiques de la matriptase, de la matriptase-2, de l'hepsine et de DESC1 ont été comparées en utilisant une série d'octapeptide-substrats à fluorescence séquestrée, aussi nommé « *internally quenched fluorogenic peptides* » (IQF). Pour ces différents substrats, la fluorescence est attribuable au groupement *o*-aminobenzoyle (Abz) situé en position aminoterminal et la séquestration de ce signal est attribuable à la 3-nitro-tyrosine en position carboxyterminale. Le clivage de ce peptide permet la séparation du fluorophore de la partie séquestrante, ce qui permet la détection de la fluorescence.

La séquence des 18 peptides IQF utilisés est basée sur la région P4 à P4' de la séquence d'activation de la matriptase (RQAR-VVGG). Chez ces peptides, la position P1 a été fixée à Arg alors que les positions P4, P3, P2 et P1' ont été substituées par des acides aminés ayant des propriétés physico-chimiques différentes : non-polaire (Ala, Leu), aromatique (Tyr), acide (Glu) et basique (Arg).

L'analyse de l'activité relative des différents enzymes à une concentration fixée de substrat (50 μ M) a permis d'obtenir un portrait d'ensemble de leur spécificité (figure 2.3). Ces résultats permettent d'observer que la matriptase-2 semble la moins permissive alors que la matriptase est la plus restrictive, l'hepsine et DESC1 se situant entre les deux. Pour confirmer que les clivages se produisent aux positions prédites (entre P1 et P1'), le site de clivage de tous les peptides clivés a été confirmé par spectrométrie de masse (résultats non publiés).

Afin de mieux évaluer la spécificité des TTSP, les paramètres cinétiques de la matriptase, matriptase-2, hepsine et DESC1 ont été déterminés en utilisant le modèle cinétique de Michaelis-Menten (tableau 2.3). Une première analyse permet d'observer que la matriptase-2, à la différence des autres, ne présente pas pour tous les substrats utilisés une cinétique de Michaelis-Menten, mais présente une inhibition par le substrat lorsque la concentration en substrat augmente (figure 2.4). L'inhibition par le substrat est un phénomène observable chez environ 20 % des enzymes. Au niveau des protéases, elle touche entre autres la trypsine et la carboxypeptidase (Reed, Lieb et Nijhout, 2010). Dans ce type d'inhibition, l'enzyme

possède deux sites de liaison pour son substrat : un site catalytique qui permet d'obtenir le produit et un site non-catalytique (allostérique) qui permet de diminuer sa vitesse de formation (Reed, Lieb et Nijhout, 2010). L'inhibition par le substrat peut parfois posséder une fonction biologique importante. À titre d'exemple, l'inhibition par le substrat de la tyrosine hydroxylase résulte en une synthèse stable de la dopamine en dépit des importantes fluctuations en tyrosine provenant de l'alimentation et celle de l'acétylcholinestérase améliore le signal neuronal et permet une terminaison rapide du signal (Reed, Lieb et Nijhout, 2010). Dans le cas de la matriptase-2, il serait intéressant d'observer si une concentration élevée en hémoujuvéline peut provoquer une inhibition par le substrat, ce qui permettrait de réguler le clivage de l'hémoujuvéline par la matriptase-2.

Pour la matriptase, des résultats antérieurs utilisant l'approche PS-SCL (*Positional scanning synthetic combinatorial peptide libraries*) (Harris *et al.*, 2000) ont démontré une préférence pour Arg/Lys en P4, un acide aminé non-basique en P3, une Ser en P2, une Arg en P1 et une Ala en P1'. Nos résultats démontrent qu'un acide aminé basique est favorisé en position P3, mais aussi qu'une paire d'arginines en P2 et P1 rend le substrat fortement accessible au clivage. De plus, la séquence d'activation (RQAR-VVGG) de la matriptase ne constitue pas l'une de ses séquences de clivage optimales. Étant donné que l'activation de la matriptase est un processus autocatalytique, une telle séquence, non optimale, pourrait permettre de restreindre son activation.

Pour l'hepsine, les résultats obtenus démontrent qu'elle possède une préférence distincte pour une Leu/Tyr en P2 et une Arg en P3 et P4. En position P1', le petit acide aminé Val est favorisé. Ces résultats sont comparables à ceux publiés auparavant par Herter *et al.* (2005).

L'étude de la spécificité de DESC1 a révélé une préférence pour une Leu en position P2, une Arg/Ala/Leu en P3, une Arg en P4 et une Ala en P1'. Ces résultats sont différents de ceux publiés par Hobson *et al.* (2004), qui, en utilisant des substrats *p*-nitroanilides, ont démontré que DESC1 est plus active sur des substrats contenant Ala en P4 et P3, Pro en P2, suivi par des substrats contenant Phe et Gly en P3 et P2 respectivement. Ces différences peuvent être causées par l'encombrement du groupe *p*-nitroanilide en position carboxyterminal du site de clivage dans ces substrats, ce qui pourrait influencer l'efficacité de clivage.

4.1.2 Profils d'inhibition

Afin de mieux analyser les propriétés enzymatiques des TTSP, leur profil d'inhibition a été déterminé. Pour ce faire, le pouvoir d'inhibition de divers inhibiteurs de protéase a été évalué sur les TTSP purifiées. Le pouvoir d'inhibiteurs physiologiques de protéases à sérine, les serpinines, a aussi été évalué. Ces inhibiteurs sont pour la majorité sécrétés et exercent leur action dans la région extracellulaire. Les serpinines extracellulaires régulent entre autres la

cascade protéolytique responsable de la coagulation du sang (antithrombine III), la réponse inflammatoire (α_1 -antitrypsine et α_1 -antichymotrypsine) et le remodelage tissulaire (PAI-1). Des complexes de la matriptase avec l'antithrombine III (ATIII), l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT) et l' α_2 -antiplasmine (α_2 -AP) ont été observés dans le lait humain (Tseng *et al.*, 2008) et la localisation de la matriptase-2 et de l'hepsine au niveau des hépatocytes, lieu de synthèse principal de l' α_1 -antichymotrypsine (α_1 -ACT), l' α_1 -AT, l' α_2 -AP, d'ATIII et de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) (Lomas *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 2001; Stephens, Siddiqui et Hirs, 1987; Serrano *et al.*, 2009; Williams, 1989), en font des candidats susceptibles d'être inhibés par ces inhibiteurs. De plus, DESC1 forme des complexes d'inhibition avec les serpinines PAI-1 et PCI (*protein C inhibitor*) (Hobson *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données suggère que les protéases de la famille des TTSP peuvent être des cibles physiologiques pour les serpinines.

Les profils d'inhibition des TTSP étudiées correspondent à ceux des protéases à sérine en général (tableau 2.1). Cependant, il est à remarquer que dans les conditions utilisées, la matriptase-2 ainsi que DESC1 présentent une faible sensibilité envers la leupeptine alors que la matriptase et l'hepsine sont plus fortement inhibés. Des études ont démontré que la matriptase-2 (Velasco *et al.*, 2002) et DESC1 (Hobson *et al.*, 2004) peuvent être inhibés par la leupeptine, mais à des concentrations beaucoup plus fortes (80 μ M et 50 μ M respectivement) que celle utilisée dans nos essais (1 μ M). Ces différences peuvent être expliquées par une affinité plus grande de la leupeptine pour la matriptase et l'hepsine par rapport à la matriptase-2 et DESC1.

En présence d'inhibiteurs de la famille des serpinines (tableau 2.2), seulement ATIII a démontré une activité d'inhibition robuste. Cependant, la matriptase-2 ainsi que l'hepsine et DESC1 sont aussi fortement inhibées en présence de PAI-1 et de α_2 -AP. Ces trois serpinines possèdent une Arg en position P1 de leur boucle réactive, ce qui suggère que cet acide aminé à cette position est essentiel à une inhibition forte des TTSP. L'absence d'inhibition des TTSP par α_1 -AT et α_1 -ACT est conforme à la spécificité P1-Arg. Cependant, les résultats d'inhibition de la matriptase par l' α_1 -AT et α_2 -AP diffèrent de ceux observés dans le lait humain (Tseng *et al.*, 2008). En effet, dans le lait humain, la matriptase a été retrouvée à l'intérieur de complexes avec l' α_1 -AT et l' α_2 -AP alors que nos résultats présentent aucune inhibition pour l' α_1 -AT et une très faible pour l' α_2 -AP. L'utilisation dans nos essais d'une forme recombinante de la matriptase comprenant seulement le domaine catalytique pourrait expliquer cette différence, car les autres domaines de l'enzyme pourraient avoir un impact sur la reconnaissance de la serpinine pour la matriptase. L'ensemble de ces résultats sont aussi en accord avec les publications qui suggèrent un rôle d'inhibition de l'activité des TTSP par les serpinines (Szabo *et al.*, 2005) et supportent aussi les données qui démontrent que DESC1 est dans la possibilité de former des complexes stables avec PAI-1 (Hobson *et al.*, 2004).

4.2 Régulation fonctionnelle de la matriptase-2

La matriptase-2 est une protéase à sérine présente à la surface cellulaire qui joue un rôle critique dans l'homéostasie du fer par sa capacité à cliver l'hémojuvéline à la membrane plasmique (Maxson *et al.*, 2010). Normalement, l'hémojuvéline intacte s'associe avec le BMP pour contrôler l'expression d'hepcidine via une signalisation passant par les récepteurs BMPR couplés aux SMADs.

Étant donné l'importance de la matriptase-2 à la surface cellulaire, des mécanismes de contrôle sont susceptibles d'exister afin de réguler efficacement sa présence à cet endroit. Un premier mécanisme a préalablement été identifié, soit celui de son relargage à partir de la surface cellulaire. Ce relargage semble être autocatalytique, car la présence d'un domaine catalytique fonctionnel est nécessaire pour son clivage au niveau du deuxième domaine CUB, ce qui permet de la libérer de la surface cellulaire (Stirnberg *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous avons exploré la possibilité que le domaine cytoplasmique de la matriptase-2 soit impliqué dans un nouveau mécanisme qui régule sa présence à la surface cellulaire par l'internalisation.

4.2.1 Internalisation de la matriptase-2 à partir de la surface cellulaire

En utilisant une approche de biotinylation des protéines de surface sur des cellules HEK293 surexprimant la matriptase-2, nous avons observé qu'une proportion de la matriptase-2 biotinylée à la surface était protégée contre le clivage de la biotine par un agent réducteur, le sodium 2-mercaptoéthanesulfonate (MesNa) (figure 3.1A). Cette observation suggère que la protection de la matriptase-2 pourrait être causée par son entrée à l'intérieur de la cellule, ce qui lui permettrait de ne pas être exposée au MesNa.

Cette hypothèse a été vérifiée en regardant dans différents modèles cellulaires si la matriptase-2 marquée à la surface cellulaire pouvait se retrouver à l'intérieur de la cellule. En utilisant un modèle de surexpression dans des cellules HEK293 et deux modèles d'expression endogène de la matriptase-2 ; les cellules d'origines hépatiques, les HepG2 et les hépatocytes primaires humains ; nous avons observé la formation de vésicules contenant la matriptase-2 à l'intérieur de la cellule (figure 3.1B–D). Cette observation permet de confirmer que la matriptase-2 est internalisée à partir de la surface cellulaire.

Nous démontrons donc, pour la première fois, que la matriptase-2 est internalisée à partir de la surface cellulaire. L'internalisation est un mécanisme bien connu de régulation des récepteurs couplés aux protéines G en jouant un rôle important dans leur désensibilisation et dans leur signalisation (Posner et Laporte, 2010). Cependant, l'internalisation de protéases ancrées à la membrane et ses conséquences n'ont pas été étudiées en profondeur. Un exemple

de ce type de protéase est la MT1-MMP (*Membrane type 1 matrix metalloproteinase*), une métalloprotéase transmembranaire de type I qui est impliquée dans la clivage de protéines de la matrice extracellulaire (Osenkowski, Toth et Fridman, 2004). Finalement, il a été démontré récemment qu'un autre membre des protéases à sérine transmembranaires de type II, la matriptase, s'accumule dans des structures intracellulaires (Friis *et al.*, 2011), renforçant ainsi la notion que ces protéines subissent un trafic dynamique.

4.2.2 Caractérisation de la voie d'internalisation de la matriptase-2

Il existe une multitude de voies d'endocytose possibles (figure 4.1). Étant donné que l'endocytose médiée par la dynamine est fréquemment impliquée dans l'internalisation de protéines de surface (Kumari, Mg et Mayor, 2010), nous avons vérifié la possibilité de son implication dans l'endocytose de la matriptase-2. En utilisant un mutant dominant-négatif de la dynamine-1 (dynamine-1 K44A) qui abroge son activité (Damke *et al.*, 1994), nous avons démontré qu'en cotransfectant ce mutant avec la matriptase-2 dans des cellules HEK293, l'internalisation de la protéase est bloquée (figure 3.2A). En utilisant un modèle cellulaire qui exprime de façon endogène la matriptase-2 (HepG2), lorsque le mutant K44A de la dynamine est exprimé, l'internalisation de la matriptase-2 est aussi bloquée. Ces résultats démontrent que la dynamine-1 est impliquée dans l'internalisation de la matriptase-2.

L'endocytose médiée par la dynamine-1 peut se faire par la formation de vésicules recouvertes de clathrines, de cavéolines ou de façon indépendante de ces deux protéines (Kumari, Mg et Mayor, 2010). Afin d'identifier lequel de ces types de vésicules était impliqué dans l'endocytose de la matriptase-2, nous avons étudié sa localisation en microscopie confocale avec des marqueurs identifiant la clathrine ou la cavéoline. Ces résultats ont permis d'observer une colocalisation de la matriptase-2 avec la clathrine (figure 3.2B) mais pas avec la cavéoline (figure 3.SF2). La formation des vésicules de clathrines nécessite la présence de protéine adaptatrice comme la β_2 -adaptine. Les résultats de microscopie confocale ont permis d'observer une colocalisation de la matriptase-2 avec cette protéine (figure 3.2B). La figure 4.2 représente la formation des vésicules d'internalisation de la matriptase-2.

Afin de déterminer la nature des compartiments cellulaires dans lesquels la matriptase-2 transite par la suite, nous avons fait un double marquage de la matriptase-2 avec un marqueur d'endosome précoce, la protéine EEA1 (*Early endosome antigen 1*) (figure 3.2B). Les résultats obtenus nous ont permis de colocaliser la matriptase-2 avec EEA1 autant chez les cellules HEK293 transfectées que chez les hépatocytes primaires humains, ce qui suggère que la matriptase-2 transite par les endosomes précoces.

Pour terminer l'étude de la voie d'internalisation de la matriptase-2, nous avons observé en utilisant un marqueur des lysosomes, la protéine lysosomale LAMP-2 (*Lysosomal-associated membrane protein 2*), que la matriptase-2 colocalise avec ce marqueur après 6

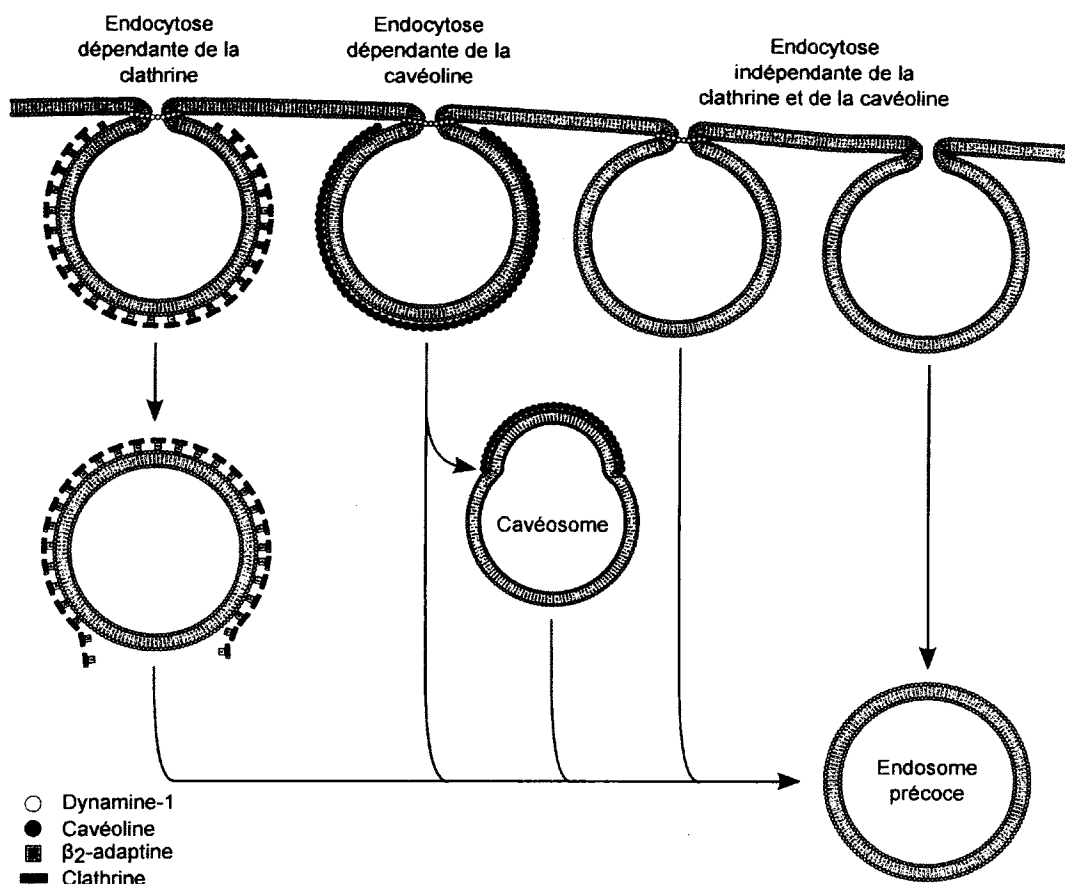


FIGURE 4.1
Principales voies d'endocytose

Plusieurs voies existent afin d'assurer l'internalisation de protéines à partir de la membrane plasmique.

heures d'internalisation autant chez des cellules HEK293 transfectées que chez les hépatocytes primaires humains (figure 3.2C).

Pris ensemble, nos résultats suggèrent que la matriptase-2 transite par les endosomes précoces via des vésicules de clathrines d'une façon dépendante de la dynamine-1. Au final, la matriptase-2 se retrouve aux lysosomes où elle est dégradée (figure 4.3).

D'autres protéases utilisant des voies d'internalisation comparables à celle de la matriptase-2 ont aussi été identifiées. Par exemple, MT1-MMP subit une endocytose dépendante de la dynamine qui utilise des voies nécessitant la clathrine et la cavéoline (Remacle, Murphy et Roghi, 2003).

4.2.3 Déterminants impliqués dans l'internalisation

Afin d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans l'internalisation de la matriptase-2, nous avons construit des mutants penta-alanines couvrant la queue cytoplas-

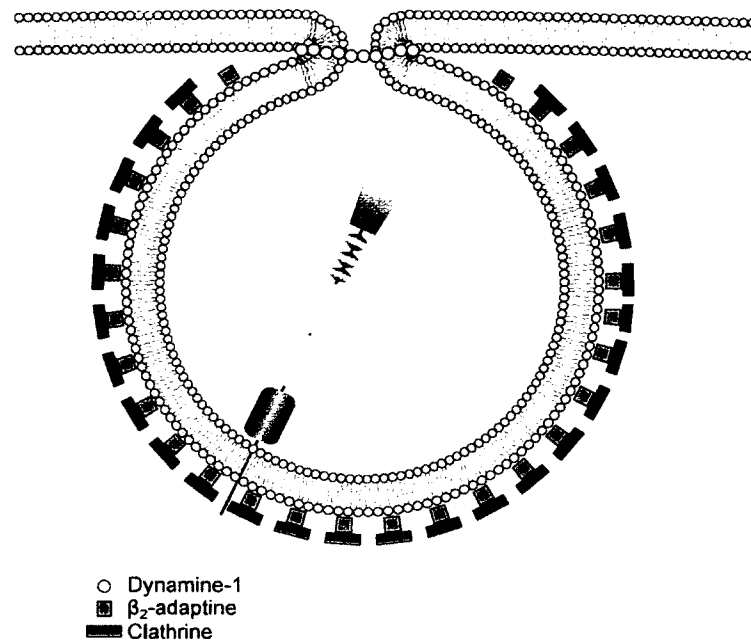


FIGURE 4.2

Formation des vésicules d'internalisation de la matriptase-2

L'internalisation de la matriptase-2 s'effectue à l'intérieur de vésicules à clathrine et nécessite la dynamine-1 ainsi que la protéine adaptatrice β_2 -adaptine.

mique entière (52 acides aminés) (figure 3.3A). En exprimant ces différents mutants dans des cellules HEK293 et en observant leur internalisation par microscopie confocale (figure 3.3B), nous observons que deux mutants (2–6 et 7–11) empêchent la matriptase-2 d'internaliser. De plus, ces mêmes mutants sont davantage relargués de la surface cellulaire, ce qui permet d'observer une recrudescence d'activité catalytique associée à cet enzyme dans le milieu (figure 3.3C–D). Ces mutants laissent suggérer que la région 2–11 contient des déterminants essentiels à l'internalisation et lorsque ceux-ci ne sont pas présent, l'enzyme s'accumule à la surface cellulaire, ce qui favorise son relargage.

L'analyse de la région 2–11 à l'aide de mutants alanines pour chacun des acides aminés a permis d'identifier ceux indispensables à l'internalisation de la matriptase-2 (figure 3.4). En prenant la même approche que celle utilisée pour les mutants penta-alanines, cinq des dix acides aminés (L2A, L3A, F5A, S7A et K8A) de cette région sont impliqués dans l'internalisation, car lorsqu'ils sont mutés, l'internalisation est bloquée. Chez la matriptase-2 murine, l'absence de trois de ces acides aminés essentiels (Leu², Leu³ et Phe⁵) (Annexe A, figure A.1A) font en sorte qu'elle est incapable d'internaliser (Annexe A, figure A.1B). Cette différence majeure laisse croire que la capacité d'internalisation de la matriptase-2 n'est pas présente chez toutes les espèces.

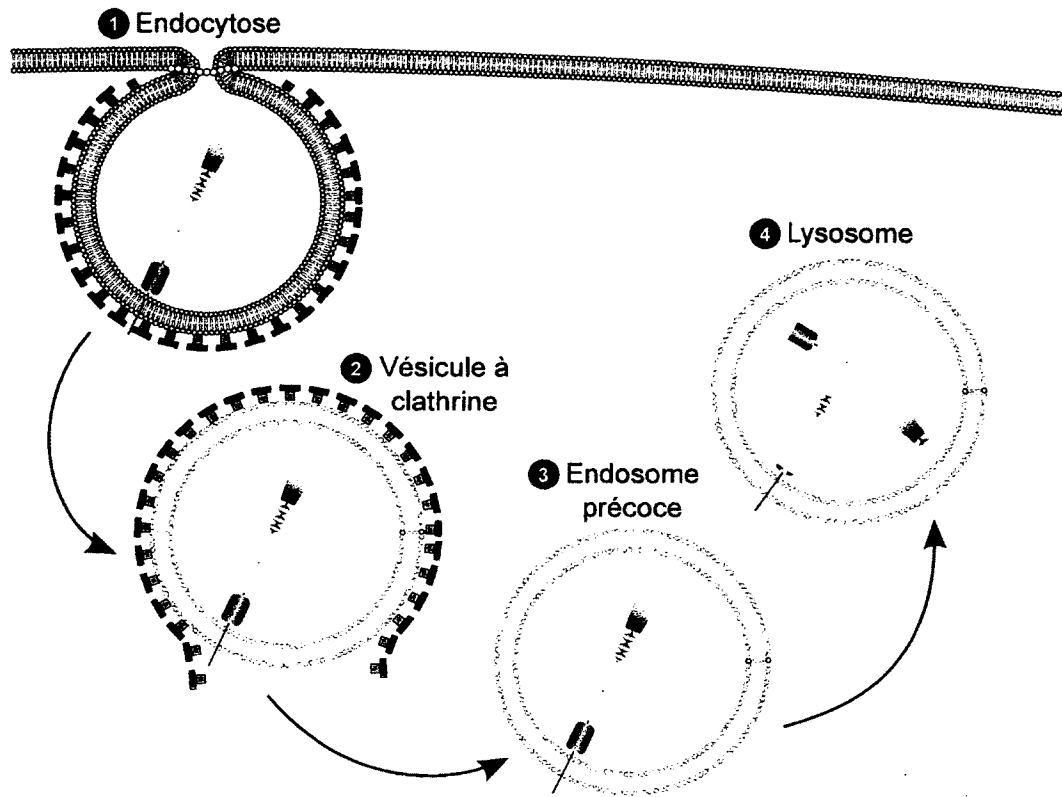


FIGURE 4.3

Différentes étapes du processus d'internalisation de la matriptase-2

La matriptase-2 est internalisée à partir de la surface cellulaire (1) et se retrouve à l'intérieur de vésicules à clathrine (2). La matriptase-2 transite ensuite par des endosomes précoces (3) avant de se retrouver au niveau des lysosomes où elle sera dégradée (4).

Il est intéressant d'observer que la queue cytoplasmique de la matriptase-2 possède un motif dileucine (Leu² et Leu³). Ces motifs sont souvent des déterminants trouvés chez les protéines présentes à la surface cellulaire et qui sont internalisées. Ils ont été identifiés comme signal d'endocytose en passant par l'interaction avec la protéine adaptatrice AP-2 (Bonifacino et Traub, 2003). Cependant, le motif dileucine trouvé chez la matriptase-2 semble atypique par rapport à la séquence canonique (D/E)XXXL(L/I) par l'absence du résidu acide. Cependant, nos résultats sont compatibles avec les découvertes récentes qui démontrent que les motifs dileucines seuls peuvent agir comme signal d'internalisation (Kozik *et al.*, 2010). Plusieurs protéines avec un tel motif présentent aussi une absence du résidu acide en position -4, mais utilisent un autre résidu hydrophile en aval du motif dileucine (LLXXXS pour la matriptase-2) (Bonifacino et Traub, 2003).

Parmi les acides aminés nécessaires à l'internalisation, Ser⁷ possède le potentiel d'être phosphorylée. Dans ce cas, son état de phosphorylation pourrait influencer sa capacité d'internalisation. Par exemple, la furine, une protéase à sérine transmembranaire de type I, possède une queue cytoplasmique dont l'état de phosphorylation joue un rôle important dans sa localisation cellulaire (Jones *et al.*, 1995). Ser⁷ fait partie d'un motif de phosphorylation

potentiel par la protéine kinase C (figure 1.14) et la matriptase-2 possède au moins une sérine phosphorylée (Annexe A, figure A.2), ce qui laisse croire que cet acide aminé a de forte chance d'être phosphorylé. Il serait intéressant de vérifier son état de phosphorylation et, dans ce cas, si cet état peut influencer sa capacité d'internalisation.

4.2.4 Impact de la perte d'internalisation de la matriptase-2 sur sa fonction

La présence de la matriptase-2 à la surface cellulaire est essentielle à sa fonction catalytique sur l'hémojuvéline, ce qui permet d'assurer la régulation de l'expression de l'hepcidine. Nous avons montré, en cotransfectant des cellules HEK293 avec les mutants alanines individuels et l'hémojuvéline, que la matriptase-2 non-internalisée clive davantage l'hémojuvéline à la surface cellulaire (figure 3.5A). Cette augmentation de clivage a aussi pour effet d'abaisser la quantité d'hepcidine exprimée (figure 3.5B). Les mêmes effets sur l'hepcidine sont aussi observables lorsque l'internalisation de la matriptase-2 est bloquée dans un modèle cellulaire d'expression endogène (figure 3.5C).

4.3 Spécificité enzymatique et internalisation de la matriptase-2 dans la régulation de sa fonction

L'identification des différences qui distinguent la spécificité de la matriptase-2 des autres TTSP permet un meilleur ciblage pour le développement d'inhibiteurs spécifiques pour cet enzyme. L'utilisation de tels inhibiteurs permettrait de restreindre le clivage de l'hémojuvéline et ainsi favoriser l'expression de l'hepcidine, ce qui aura pour conséquence de diminuer les quantités de fer en circulation dans l'organisme (figure 4.4). Une telle diminution serait favorable au traitement de surcharge en fer causée par certaines maladies comme l'hémochromatose. Dans cette maladie, une mutation du gène HFE empêche la protéine pour laquelle il code de s'associer à TfR2, une action nécessaire au déclenchement de l'expression de l'hepcidine (figure 4.4) (Babitt et Lin, 2011). En inhibant la matriptase-2, la hausse d'expression occasionnée permettrait de compenser la perte provenant de la mutation de HFE pour ainsi rétablir les niveaux normaux de fer.

La possibilité de moduler la présence de la matriptase-2 à la surface cellulaire constituerait une seconde alternative pour rétablir les niveaux de fer à la normale (figure 4.4). En effet, la possibilité de stimuler l'internalisation de la matriptase-2 favoriserait l'expression de l'hepcidine en diminuant le clivage de l'hémojuvéline à la surface cellulaire. De plus, la capacité à diminuer la vitesse d'internalisation favoriserait une diminution de l'expression de l'hepcidine et pourrait ainsi servir au traitement de patients souffrant d'une anémie de type IRIDA possédant une mutation de la matriptase-2 la rendant moins active.

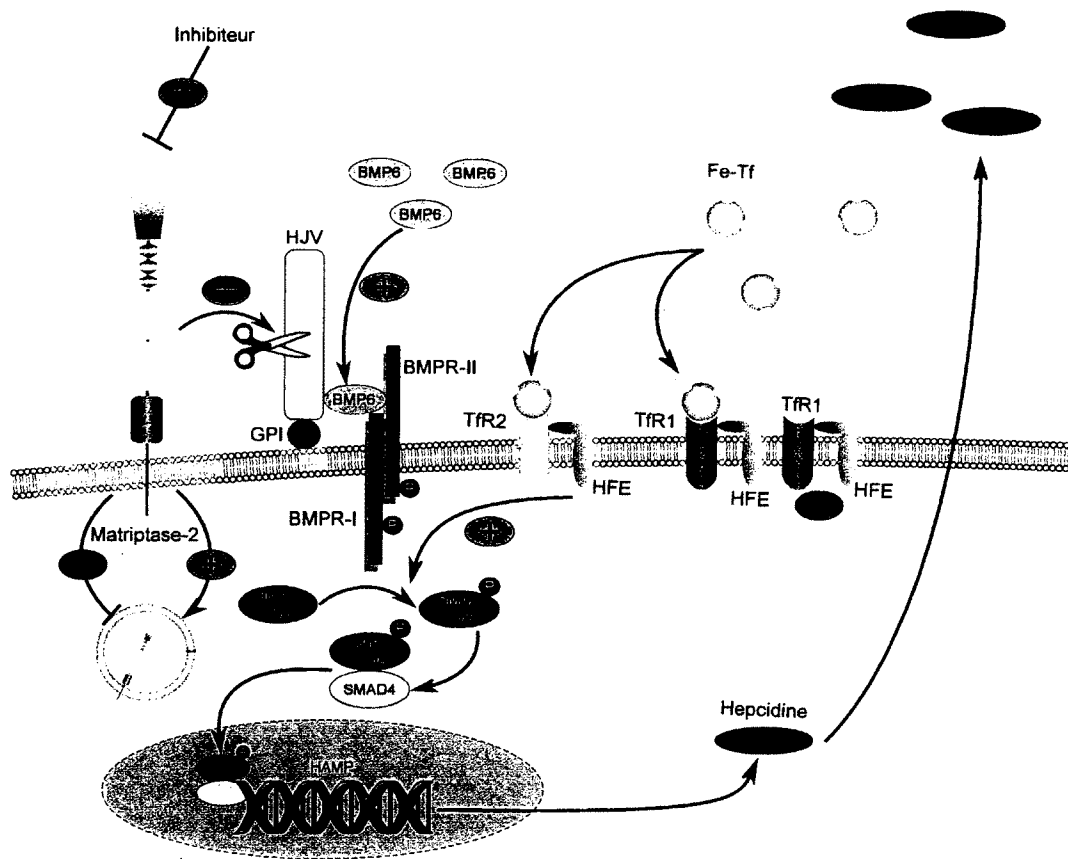


FIGURE 4.4

Modulation de la matriptase-2 dans le contrôle des niveaux d'hépcidine

La transcription de BMP6 est activée par une augmentation du fer intracellulaire au niveau des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. Le co-récepteur du BMP spécifique aux hépatocytes, l'hémojuvéline (HJV), se lie aux récepteurs I et II du BMP (BMPRI-II) en présence du ligand BMP6. La formation de ce complexe à la membrane plasmique des hépatocytes active la phosphorylation de SMAD1/5/8 et favorise son interaction avec SMAD4. Le complexe SMAD est transloqué vers le noyau et active la transcription du gène HAMP qui code pour l'hépcidine. La matriptase-2, à la surface cellulaire, peut cliver HJV et ainsi prévenir la formation du complexe HJV/BMP6/BMPRI, agissant ainsi comme régulateur négatif de la voie d'expression de l'hépcidine. La présence de la matriptase-2 à la surface cellulaire peut être régulée par un relargage de la surface cellulaire ou par l'internalisation. La transcription de l'hépcidine peut aussi être activée par l'interaction de HFE avec Tfr2 par un mécanisme non encore totalement élucidé. Les complexes HFE-Tfr1 présents à la surface cellulaire permettent de monitorer la saturation en fer de la transferrine (Fe-Tf). À une faible saturation en fer de la transferrine, HFE est séquestré par Tfr1 et lorsque qu'elle augmente, HFE est délogé de Tfr1 et peut alors interagir avec Tfr2. Afin de contrôler les niveaux d'hépcidine, la modulation de l'action catalytique de la matriptase-2 à la surface cellulaire constitue une approche thérapeutique potentielle (régions en évidence). L'utilisation d'inhibiteurs de la matriptase-2 ainsi que la capacité à favoriser son internalisation permettraient de favoriser l'expression de l'hépcidine alors que son blocage favoriserait une réduction. (+) représente les actions favorisant l'expression de l'hépcidine et (-) celles avec des effets régulateurs négatifs.

CONCLUSION

Les résultats présentés dans cette thèse ont mis en évidence la spécificité enzymatique de la matriptase-2 ainsi qu'un nouveau mécanisme permettant sa régulation fonctionnelle.

En premier lieu, nous avons établi la spécificité de la matriptase-2 à l'aide de substrats IQF tout en la comparant à trois autres protéases à sérine transmembranaires de type II, la matriptase, l'hepsine et DESC1. Les résultats obtenus démontrent que la matriptase-2 est celle qui présente la spécificité la plus large et est aussi la seule qui présente une inhibition par le substrat pour certains d'entre eux.

Nous avons aussi démontré que la matriptase-2 présente à la surface cellulaire subit une internalisation constitutive. Elle est internalisée dans des vésicules contenant de la clathrine et AP-2 via un processus dépendant de la dynamine. La matriptase-2 endocytée transite par la suite dans les endosomes précoces puis les lysosomes. L'internalisation de la matriptase-2 est dépendante de certains résidus spécifiques contenus dans la région aminotermine de son domaine cytoplasmique, car la mutagenèse dirigée de ces résidus empêche l'internalisation et retient l'enzyme à la surface cellulaire. Les cellules qui coexpriment ces mutants et l'hémojuvéline produisent des niveaux d'hepcidine fortement diminués comparé à la matriptase-2 de type sauvage, car l'hémojuvéline est davantage clivée à la surface cellulaire par les mutants de la matriptase-2.

Nos résultats démontrent que la matriptase-2 possède une préférence de substrats distincte des trois autres membres de la famille des TTSP et soulignent pour la première fois l'importance du trafic de la matriptase-2 à la membrane plasmique dans la régulation de l'expression de l'hepcidine, un événement essentiel à l'homéostasie du fer.

REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes ont contribué à l'aboutissement de ce travail et dont l'implication et le soutien méritent d'être soulignés.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Dr. Richard Leduc, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Richard a toujours apporté son soutien à la réalisation de ce travail tant en proposant de nombreuses idées qu'en poussant ses étudiants à devenir de meilleur chercheur. Merci d'avoir mis à ma disposition tout le meilleur nécessaire à l'accomplissement de ce travail ainsi que pour tes conseils et ton souci de la rigueur dans le travail.

Je tiens aussi à remercier mon collègue Antoine Désilets pour l'apport de ces idées et sa collaboration précieuse à la réalisation de ce travail. Merci pour tous tes conseils et ton amitié.

Je remercie aussi tous mes collègues présents et passés pour leur collaboration dans mes démarches scientifiques ainsi que pour leur amitié. Merci Jean-Michel, Brian, Philip, Nicolas, Cédric, Xavier, Élie, Éloïc, Christophe, Hajar, Kelly et Patrice pour avoir agrémenté ces années de travail.

Je tiens aussi à remercier la Dre. Manuela Santos du département de médecine de l'Université de Montréal, le Dr. Simon Labbé du département de biochimie ainsi que le Dr. Jean-Bernard Denault du département de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke pour avoir accepté de participer à la correction de cette thèse.

Je remercie aussi mon frère, Éric, sans qui je n'aurais probablement jamais découvert Sherbrooke, pour son soutien et son amitié au cours de ces années.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, J., T. Fukuzawa et S. Hirose. 2002. « Cleavage of Ig-Hepta at a "SEA" module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 26, p. 23 391–23 398.
- Afar, D. E., I. Vivanco, R. S. Hubert, J. Kuo, E. Chen, D. C. Saffran, A. B. Raitano et A. Jakobovits. 2001. « Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. » *Cancer Res*, vol. 61, no 4, p. 1686–1692.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science; Third Edition.
- Amsellem, S., J. Gburek, G. Hamard, R. Nielsen, T. E. Willnow, O. Devuyt, E. Nexo, P. J. Verroust, E. I. Christensen et R. Kozyraki. 2010. « Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. » *J Am Soc Nephrol*, vol. 21, no 11, p. 1859–1867.
- Andreasen, D., G. Vuagniaux, N. Fowler-Jaeger, E. Hummler et B. C. Rossier. 2006. « Activation of epithelial sodium channels by mouse channel activating proteases (mCAP) expressed in *Xenopus* oocytes requires catalytic activity of mCAP3 and mCAP2 but not mCAP1. » *J Am Soc Nephrol*, vol. 17, no 4, p. 968–976.
- Andrews, N. C. et P. J. Schmidt. 2007. « Iron homeostasis. » *Annu Rev Physiol*, vol. 69, p. 69–85.
- Andrews, S. C. 2010. « The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. » *Biochim Biophys Acta*, vol. 1800, no 8, p. 691–705.
- Andriopoulos, B., E. Corradini, Y. Xia, S. A. Faasse, S. Chen, L. Grgurevic, M. D. Knutson, A. Pietrangelo, S. Vukicevic, H. Y. Lin et J. L. Babitt. 2009. « BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. » *Nat Genet*, vol. 41, no 4, p. 482–487.
- Anfinsen, C. B. 1973. « Principles that govern the folding of protein chains. » *Science*, vol. 181, no 96, p. 223–230.
- Babitt, J. L., F. W. Huang, D. M. Wrighting, Y. Xia, Y. Sidis, T. A. Samad, J. A. Campagna, R. T. Chung, A. L. Schneyer, C. J. Woolf, N. C. Andrews et H. Y. Lin. 2006. « Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. » *Nat Genet*, vol. 38, no 5, p. 531–539.
- Babitt, J. L. et H. Y. Lin. 2011. « The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. » *Semin Liver Dis*, vol. 31, no 3, p. 280–292.
- Beckmann, G. et P. Bork. 1993. « An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. » *Trends Biochem Sci*, vol. 18, no 2, p. 40–41.
- Bergmann, N., S. Bonhommeau, K. M. Lange, S. M. Greil, S. Eisebitt, F. de Groot, M. Chergui et E. F. Aziz. 2010. « On the enzymatic activity of catalase: an iron L-edge X-ray absorption study of the active centre. » *Phys Chem Chem Phys*, vol. 12, no 18, p. 4827–4832.
- Bertram, S., I. Glowacka, I. Steffen, A. Köhl et S. Pöhlmann. 2010. « Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. » *Rev Med Virol*, vol. 20, no 5, p. 298–310.

- Bhanot, P., M. Brink, C. H. Samos, J. C. Hsieh, Y. Wang, J. P. Macke, D. Andrew, J. Nathans et R. Nusse. 1996. « A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. » *Nature*, vol. 382, no 6588, p. 225–230.
- Bocheva, G., A. Rattenholl, C. Kempkes, T. Goerge, C.-Y. Lin, M. R. D'Andrea, S. Ständer et M. Steinhoff. 2009. « Role of matriptase and proteinase-activated receptor-2 in non-melanoma skin cancer. » *J Invest Dermatol*, vol. 129, no 7, p. 1816–1823.
- Bonifacino, J. S. et L. M. Traub. 2003. « Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. » *Annu Rev Biochem*, vol. 72, p. 395–447.
- Bork, P. et G. Beckmann. 1993. « The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. » *J Mol Biol*, vol. 231, no 2, p. 539–545.
- Bork, P. et L. Patthy. 1995. « The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. » *Protein Sci*, vol. 4, no 7, p. 1421–1425.
- Bryant, M. K., C. L. Schardl, U. Hesse et B. Scott. 2009. « Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus *Epichloë festucae*. » *BMC Evol Biol*, vol. 9, p. 168.
- Bugge, T. H., T. M. Antalis et Q. Wu. 2009. « Type II transmembrane serine proteases. » *J Biol Chem*, vol. 284, no 35, p. 23 177–23 181.
- Böttcher, E., T. Matrosovich, M. Beyerle, H.-D. Klenk, W. Garten et M. Matrosovich. 2006. « Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. » *J Virol*, vol. 80, no 19, p. 9896–9898.
- Cam, J. A. et G. Bu. 2006. « Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. » *Mol Neurodegener*, vol. 1, p. 8.
- Camaschella, C. et L. Silvestri. 2008. « New and old players in the hepcidin pathway. » *Haematologica*, vol. 93, no 10, p. 1441–1444.
- Camaschella, C. et L. Silvestri. 2011. « Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders. » *ScientificWorldJournal*, vol. 11, p. 1357–1366.
- Chepelev, N. L. et W. G. Willmore. 2011. « Regulation of iron pathways in response to hypoxia. » *Free Radic Biol Med*, vol. 50, no 6, p. 645–666.
- Choi, S.-Y., S. Bertram, I. Glowacka, Y. W. Park et S. Pöhlmann. 2009. « Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. » *Trends Mol Med*, vol. 15, no 7, p. 303–312.
- Chokki, M., H. Eguchi, I. Hamamura, H. Mitsuhashi et T. Kamimura. 2005. « Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells. » *FEBS J*, vol. 272, no 24, p. 6387–6399.
- Consortium, U. 2012. « Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). » *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no Database issue, p. D71–D75.
- Copeland, R. A. 2000. *Enzymes - A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. A. J. Wiley & Sons; Second Edition.

- Crichton, R. R. et M. Charlotheaux-Wauters. 1987. « Iron transport and storage. » *Eur J Biochem*, vol. 164, no 3, p. 485–506.
- Cui, Y., Q. Wu et Y. Zhou. 2009. « Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms. » *Kidney Int*, vol. 76, no 11, p. 1137–1141.
- Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock et S. L. Schmid. 1994. « Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. » *J Cell Biol*, vol. 127, no 4, p. 915–934.
- Domenico, I. D., D. M. Ward et J. Kaplan. 2008. « Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. » *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, no 1, p. 72–81.
- Donaldson, S. H., A. Hirsh, D. C. Li, G. Holloway, J. Chao, R. C. Boucher et S. E. Gabriel. 2002. « Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 10, p. 8338–8345.
- Drag, M. et G. S. Salvesen. 2010. « Emerging principles in protease-based drug discovery. » *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, no 9, p. 690–701.
- Du, X., E. She, T. Gelbart, J. Truksa, P. Lee, Y. Xia, K. Khovananth, S. Mudd, N. Mann, E. M. Y. Moresco, E. Beutler et B. Beutler. 2008. « The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. » *Science*, vol. 320, no 5879, p. 1088–1092.
- Désilets, A., F. Béliveau, G. Vandal, F.-O. McDuff, P. Lavigne et R. Leduc. 2008. « Mutation G827R in matriptase causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease. » *J Biol Chem*, vol. 283, no 16, p. 10 535–10 542.
- Evnin, L. B., J. R. Vásquez et C. S. Craik. 1990. « Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no 17, p. 6659–6663.
- Falzacappa, M. V. V., M. V. Spasic, R. Kessler, J. Stolte, M. W. Hentze et M. U. Muckenthaler. 2007. « STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. » *Blood*, vol. 109, no 1, p. 353–358.
- Fasquelle, L., H. S. Scott, M. Lenoir, J. Wang, G. Rebillard, S. Gaboyard, S. Venteo, F. François, A.-L. Mausset-Bonnefont, S. E. Antonarakis, E. Neidhart, C. Chabbert, J.-L. Puel, M. Guipponi et B. Delprat. 2011. « Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. » *J Biol Chem*, vol. 286, no 19, p. 17 383–17 397.
- Finberg, K. E., M. M. Heeney, D. R. Campagna, Y. Aydinok, H. A. Pearson, K. R. Hartman, M. M. Mayo, S. M. Samuel, J. J. Strouse, K. Markianos, N. C. Andrews et M. D. Fleming. 2008. « Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). » *Nat Genet*, vol. 40, no 5, p. 569–571.
- Folgueras, A. R., F. M. de Lara, A. M. Pendás, C. Garabaya, F. Rodríguez, A. Astudillo, T. Bernal, R. Cabanillas, C. López-Otín et G. Velasco. 2008. « Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. » *Blood*, vol. 112, no 6, p. 2539–2545.
- Friedl, P. et S. Alexander. 2011. « Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. » *Cell*, vol. 147, no 5, p. 992–1009.

- Friedman, A., P. Arosio, D. Finazzi, D. Kozirowski et J. Galazka-Friedman. 2011. « Ferritin as an important player in neurodegeneration. » *Parkinsonism Relat Disord*, vol. 17, no 6, p. 423–430.
- Friis, S., S. Godiksen, J. Bornholdt, J. Selzer-Plon, H. B. Rasmussen, T. H. Bugge, C.-Y. Lin et L. K. Vogel. 2011. « Transport via the transcytotic pathway makes prostatic acid phosphatase available as a substrate for matrix metalloproteinase. » *J Biol Chem*, vol. 286, no 7, p. 5793–5802.
- Funk, M. O., R. T. Carroll, J. F. Thompson, R. H. Sands et W. R. Dunham. 1990. « Role of iron in lipoxygenase catalysis ». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no 13, p. 5375–5376.
- Ganz, T. 2006. « Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. » *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p. 29–35, 507.
- Ganz, T. et E. Nemeth. 2011. « The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. » *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 2011, p. 538–542.
- Giraud, C. G. et H. J. F. Maccioni. 2003. « Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. » *Mol Biol Cell*, vol. 14, no 9, p. 3753–3766.
- Graham, R.-M., A.-C.-G. Chua, C.-E. Herbison, J.-K. Olynyk et D. Trinder. 2007. « Liver iron transport. » *World J Gastroenterol*, vol. 13, no 35, p. 4725–4736.
- Guipponi, M., S. E. Antonarakis et H. S. Scott. 2008. « TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. » *Front Biosci*, vol. 13, p. 1557–1567.
- Guipponi, M., G. Vuagniaux, M. Wattenhofer, K. Shibuya, M. Vazquez, L. Dougherty, N. Scamuffa, E. Guida, M. Okui, C. Rossier, M. Hancock, K. Buchet, A. Reymond, E. Hummler, P. L. Marzella, J. Kudoh, N. Shimizu, H. S. Scott, S. E. Antonarakis et B. C. Rossier. 2002. « The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. » *Hum Mol Genet*, vol. 11, no 23, p. 2829–2836.
- Harris, J. L., B. J. Backes, F. Leonetti, S. Mahrus, J. A. Ellman et C. S. Craik. 2000. « Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 14, p. 7754–7759.
- Hedstrom, L. 2002. « Serine protease mechanism and specificity. » *Chem Rev*, vol. 102, no 12, p. 4501–4524.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy et C. Camaschella. 2010. « Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. » *Cell*, vol. 142, no 1, p. 24–38.
- Herter, S., D. E. Piper, W. Aaron, T. Gabriele, G. Cutler, P. Cao, A. S. Bhatt, Y. Choe, C. S. Craik, N. Walker, D. Meininger, T. Hoey et R. J. Austin. 2005. « Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. » *Biochem J*, vol. 390, no Pt 1, p. 125–136.
- Hobson, J. P., S. Netzel-Arnett, R. Szabo, S. M. Réhault, F. C. Church, D. K. Strickland, D. A. Lawrence, T. M. Antalis et T. H. Bugge. 2004. « Mouse DESC1 is located within a cluster of seven DESC1-like genes and encodes a type II transmembrane serine protease that forms serpin inhibitory complexes. » *J Biol Chem*, vol. 279, no 45, p. 46981–46994.

- Holt, S. K., E. M. Kwon, D. W. Lin, E. A. Ostrander et J. L. Stanford. 2010. « Association of hepsin gene variants with prostate cancer risk and prognosis. » *Prostate*, vol. 70, no 9, p. 1012–1019.
- Hooper, J. D., J. A. Clements, J. P. Quigley et T. M. Antalis. 2001. « Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. » *J Biol Chem*, vol. 276, no 2, p. 857–860.
- Horn, I. R., B. M. van den Berg, S. K. Moestrup, H. Pannekoek et A. J. van Zonneveld. 1998. « Plasminogen activator inhibitor 1 contains a cryptic high affinity receptor binding site that is exposed upon complex formation with tissue-type plasminogen activator. » *Thromb Haemost*, vol. 80, no 5, p. 822–828.
- Hung, S. H. et L. Hedstrom. 1998. « Converting trypsin to elastase: substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. » *Protein Eng*, vol. 11, no 8, p. 669–673.
- Hwang, P. M., C. Li, M. Morra, J. Lillywhite, D. R. Muhandiram, F. Gertler, C. Terhorst, L. E. Kay, T. Pawson, J. D. Forman-Kay et S.-C. Li. 2002. « A "three-pronged" binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome. » *EMBO J*, vol. 21, no 3, p. 314–323.
- Häcker, H.-G., M. T. Sisay et M. Gütschow. 2011. « Allosteric modulation of caspases. » *Pharmacol Ther*, vol. 132, no 2, p. 180–195.
- Ishmael, F. T., M. T. Norcum, S. J. Benkovic et J. S. Bond. 2001. « Multimeric structure of the secreted meprin A metalloproteinase and characterization of the functional protomer. » *J Biol Chem*, vol. 276, no 25, p. 23 207–23 211.
- Jiang, J., S. Wu, W. Wang, S. Chen, J. Peng, X. Zhang et Q. Wu. 2011. « Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin. » *J Biol Chem*, vol. 286, no 12, p. 10 066–10 072.
- Jin, J.-S., D.-S. Hsieh, S.-H. Loh, A. Chen, C.-W. Yao et C.-Y. Yen. 2006a. « Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. » *Mod Pathol*, vol. 19, no 3, p. 447–452.
- Jin, X., M. Yagi, N. Akiyama, T. Hirosaki, S. Higashi, C.-Y. Lin, R. B. Dickson, H. Kitamura et K. Miyazaki. 2006b. « Matriptase activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis. » *Cancer Sci*, vol. 97, no 12, p. 1327–1334.
- Jones, B. G., L. Thomas, S. S. Molloy, C. D. Thulin, M. D. Fry, K. A. Walsh et G. Thomas. 1995. « Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. » *EMBO J*, vol. 14, no 23, p. 5869–5883.
- Kato, M., T. Hashimoto, T. Shimomura, H. Kataoka, H. Ohi et N. Kitamura. 2012. « Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 inhibits protease activity and proteolytic activation of human airway trypsin-like protease. » *J Biochem*, vol. 151, no 2, p. 179–187.
- Kim, T. S., C. Heinlein, R. C. Hackman et P. S. Nelson. 2006. « Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease. » *Mol Cell Biol*, vol. 26, no 3, p. 965–975.
- Kirchhofer, D., M. Peek, M. T. Lipari, K. Billeci, B. Fan et P. Moran. 2005. « Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. » *FEBS Lett*, vol. 579, no 9, p. 1945–1950.

- Knappe, S., F. Wu, M. R. Masikat, J. Morser et Q. Wu. 2003. « Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin: design and characterization of a soluble corin. » *J Biol Chem*, vol. 278, no 52, p. 52 363–52 370.
- Kozik, P., R. W. Francis, M. N. J. Seaman et M. S. Robinson. 2010. « A screen for endocytic motifs. » *Traffic*, vol. 11, no 6, p. 843–855.
- Kumari, S., S. Mg et S. Mayor. 2010. « Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. » *Cell Res*, vol. 20, no 3, p. 256–275.
- Kunitz, M. 1939. « Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase. » *J Gen Physiol*, vol. 22, no 4, p. 429–446.
- Köbel, M., S. E. Kalloger, N. Boyd, S. McKinney, E. Mehl, C. Palmer, S. Leung, N. J. Bowen, D. N. Ionescu, A. Rajput, L. M. Prentice, D. Miller, J. Santos, K. Swenerton, C. B. Gilks et D. Huntsman. 2008. « Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. » *PLoS Med*, vol. 5, no 12, p. e232.
- Lang, J. C. et D. E. Schuller. 2001. « Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck. » *Br J Cancer*, vol. 84, no 2, p. 237–243.
- Laskowski, R. A., F. Gerick et J. M. Thornton. 2009. « The structural basis of allosteric regulation in proteins. » *FEBS Lett*, vol. 583, no 11, p. 1692–1698.
- Law, R. H. P., Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, C. G. Langendorf, R. N. Pike, P. I. Bird et J. C. Whisstock. 2006. « An overview of the serpin superfamily. » *Genome Biol*, vol. 7, no 5, p. 216.
- Lee, M.-S., I.-C. Tseng, Y. Wang, K. ichi Kiyomiya, M. D. Johnson, R. B. Dickson et C.-Y. Lin. 2007. « Autoactivation of matriptase in vitro: requirement for biomembrane and LDL receptor domain. » *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 293, no 1, p. C95–105.
- Lee, S. L., R. B. Dickson et C. Y. Lin. 2000. « Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. » *J Biol Chem*, vol. 275, no 47, p. 36 720–36 725.
- Leytus, S. P., K. R. Loeb, F. S. Hagen, K. Kurachi et E. W. Davie. 1988. « A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. » *Biochemistry*, vol. 27, no 3, p. 1067–1074.
- Lin, C. Y., J. Anders, M. Johnson et R. B. Dickson. 1999. « Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. » *J Biol Chem*, vol. 274, no 26, p. 18 237–18 242.
- Lin, K., S. Wang, M. A. Julius, J. Kitajewski, M. Moos et F. P. Luyten. 1997. « The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no 21, p. 11 196–11 200.
- List, K. 2009. « Matriptase: a culprit in cancer? » *Future Oncol*, vol. 5, no 1, p. 97–104.
- Logan, C. Y. et R. Nusse. 2004. « The Wnt signaling pathway in development and disease. » *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 20, p. 781–810.

- Lomas, D. A., D. L. Evans, J. T. Finch et R. W. Carrell. 1992. « The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. » *Nature*, vol. 357, no 6379, p. 605–607.
- López-Otín, C. et J. S. Bond. 2008. « Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. » *J Biol Chem*, vol. 283, no 45, p. 30 433–30 437.
- Mackenzie, B. et M. D. Garrick. 2005. « Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. » *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 289, no 6, p. G981–G986.
- Madala, P. K., J. D. A. Tyndall, T. Nall et D. P. Fairlie. 2010. « Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. » *Chem Rev*, vol. 110, no 6, p. PR1–P31.
- Marangoni, A. G. 2003. *Enzyme Kinetics : A Modern Approach*. A John Wiley & Sons.
- Martínez, V. G., S. K. Moestrup, U. Holmskov, J. Mollenhauer et F. Lozano. 2011. « The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. » *Pharmacol Rev*, vol. 63, no 4, p. 967–1000.
- Maxson, J. E., J. Chen, C. A. Enns et A.-S. Zhang. 2010. « Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. » *J Biol Chem*, vol. 285, no 50, p. 39 021–39 028.
- Mi, T., J. C. Merlin, S. Deverasetty, M. R. Gryk, T. J. Bill, A. W. Brooks, L. Y. Lee, V. Rathnayake, C. A. Ross, D. P. Sargeant, C. L. Strong, P. Watts, S. Rajasekaran et M. R. Schiller. 2012. « Minomotif Miner 3.0: database expansion and significantly improved reduction of false-positive predictions from consensus sequences. » *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no Database issue, p. D252–D260.
- Moran, P., W. Li, B. Fan, R. Vij, C. Eigenbrot et D. Kirchhofer. 2006. « Pro-urokinase-type plasminogen activator is a substrate for hepsin. » *J Biol Chem*, vol. 281, no 41, p. 30 439–30 446.
- Morgan, K., F. Licastro, L. Tilley, A. Ritchie, L. Morgan, S. Pedrini et N. Kalsheker. 2001. « Polymorphism in the alpha(1)-antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concentrations. » *Hum Genet*, vol. 109, no 3, p. 303–310.
- Muckenthaler, M. U. 2008. « Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. » *Cell Metab*, vol. 8, no 1, p. 1–3.
- Nanami, M., T. Ookawara, Y. Otaki, K. Ito, R. Moriguchi, K. Miyagawa, Y. Hasuike, M. Izumi, H. Eguchi, K. Suzuki et T. Nakanishi. 2005. « Tumor necrosis factor-alpha-induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. » *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, no 12, p. 2495–2501.
- Neitzel, J. J. 2010. « Enzyme Catalysis : The Serine Proteases ». *Nature Education*, vol. 3, no (9) :21, p. 2010.
- Nemeth, E., M. S. Tuttle, J. Powelson, M. B. Vaughn, A. Donovan, D. M. Ward, T. Ganz et J. Kaplan. 2004. « Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. » *Science*, vol. 306, no 5704, p. 2090–2093.

- Netzel-Arnett, S., J. D. Hooper, R. Szabo, E. L. Madison, J. P. Quigley, T. H. Bugge et T. M. Antalis. 2003. « Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. » *Cancer Metastasis Rev*, vol. 22, no 2-3, p. 237–258.
- Neurath, H. 1984. « Evolution of proteolytic enzymes. » *Science*, vol. 224, no 4647, p. 350–357.
- Nicolas, G., M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn et S. Vaulont. 2001. « Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 15, p. 8780–8785.
- Nicolas, G., M. Bennoun, A. Porteu, S. Mativet, C. Beaumont, B. Grandchamp, M. Sirito, M. Sawadogo, A. Kahn et S. Vaulont. 2002a. « Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 7, p. 4596–4601.
- Nicolas, G., C. Chauvet, L. Viatte, J. L. Danan, X. Bigard, I. Devaux, C. Beaumont, A. Kahn et S. Vaulont. 2002b. « The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. » *J Clin Invest*, vol. 110, no 7, p. 1037–1044.
- Odet, F., A. Verot et B. L. Magueresse-Battistoni. 2006. « The mouse testis is the source of various serine proteases and serine proteinase inhibitors (SERPINs): Serine proteases and SERPINs identified in Leydig cells are under gonadotropin regulation. » *Endocrinology*, vol. 147, no 9, p. 4374–4383.
- Ohgami, R. S., D. R. Campagna, E. L. Greer, B. Antiochos, A. McDonald, J. Chen, J. J. Sharp, Y. Fujiwara, J. E. Barker et M. D. Fleming. 2005. « Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. » *Nat Genet*, vol. 37, no 11, p. 1264–1269.
- Osenkowski, P., M. Toth et R. Fridman. 2004. « Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). » *J Cell Physiol*, vol. 200, no 1, p. 2–10.
- Ovaere, P., S. Lippens, P. Vandenabeele et W. Declercq. 2009. « The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. » *Trends Biochem Sci*, vol. 34, no 9, p. 453–463.
- Overall, C. M., E. M. Tam, R. Kappelhoff, A. Connor, T. Ewart, C. J. Morrison, X. Puente, C. López-Otín et A. Seth. 2004. « Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. » *Biol Chem*, vol. 385, no 6, p. 493–504.
- Page, M. J. et E. D. Cera. 2008. « Serine peptidases: classification, structure and function. » *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, no 7-8, p. 1220–1236.
- Parkyn, C. J., E. G. M. Vermeulen, R. C. Mootoosamy, C. Sunyach, C. Jacobsen, C. Oxvig, S. Moestrup, Q. Liu, G. Bu, A. Jen et R. J. Morris. 2008. « LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. » *J Cell Sci*, vol. 121, no Pt 6, p. 773–783.
- Parr, C., A. J. Sanders, G. Davies, T. Martin, J. Lane, M. D. Mason, R. E. Mansel et W. G. Jiang. 2007. « Matriptase-2 inhibits breast tumor growth and invasion and correlates with favorable prognosis for breast cancer patients. » *Clin Cancer Res*, vol. 13, no 12, p. 3568–3576.
- Pelmont, J. 1995. *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presses universitaires de Grenoble.

- Petrak, J. et D. Vyoral. 2005. « Hephaestin—a ferroxidase of cellular iron export. » *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 37, no 6, p. 1173–1178.
- Pietrangelo, A. 2010. « Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. » *Gastroenterology*, vol. 139, no 2, p. 393–408, 408.e1–2.
- Polgár, L. 2005. « The catalytic triad of serine peptidases. » *Cell Mol Life Sci*, vol. 62, no 19-20, p. 2161–2172.
- Posner, B. I. et S. A. Laporte. 2010. « Cellular signalling: Peptide hormones and growth factors. » *Prog Brain Res*, vol. 181, p. 1–16.
- Qiu, D., K. Owen, K. Gray, R. Bass et V. Ellis. 2007. « Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. » *Biochem Soc Trans*, vol. 35, no Pt 3, p. 583–587.
- Ramsay, A. J., V. Quesada, M. Sanchez, C. Garabaya, M. P. Sardà, M. Baiget, A. Remacha, G. Velasco et C. López-Otín. 2009. « Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. » *Hum Mol Genet*, vol. 18, no 19, p. 3673–3683.
- Rawlings, N. D. et A. J. Barrett. 1993. « Evolutionary families of peptidases. » *Biochem J*, vol. 290 (Pt 1), p. 205–218.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton et A. J. Barrett. 2006. « MEROPS: the peptidase database. » *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no Database issue, p. D270–D272.
- Reed, M. C., A. Lieb et H. F. Nijhout. 2010. « The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. » *Bioessays*, vol. 32, no 5, p. 422–429.
- Remacle, A., G. Murphy et C. Roghi. 2003. « Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. » *J Cell Sci*, vol. 116, no Pt 19, p. 3905–3916.
- Roetto, A., G. Papanikolaou, M. Politou, F. Alberti, D. Girelli, J. Christakis, D. Loukopoulos et C. Camaschella. 2003. « Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. » *Nat Genet*, vol. 33, no 1, p. 21–22.
- Sanders, A. J., C. Parr, T. A. Martin, J. Lane, M. D. Mason et W. G. Jiang. 2008. « Genetic upregulation of matriptase-2 reduces the aggressiveness of prostate cancer cells in vitro and in vivo and affects FAK and paxillin localisation. » *J Cell Physiol*, vol. 216, no 3, p. 780–789.
- Sanders, A. J., S. L. Webb, C. Parr, M. D. Mason et W. G. Jiang. 2010. « The type II transmembrane serine protease, matriptase-2: Possible links to cancer? » *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 10, no 1, p. 64–69.
- Sawasaki, T., K. Shigemasa, L. Gu, J. B. Beard et T. J. O'Brien. 2004. « The transmembrane protease serine (TMPRSS3/TADG-12) D variant: a potential candidate for diagnosis and therapeutic intervention in ovarian cancer. » *Tumour Biol*, vol. 25, no 3, p. 141–148.
- Schechter, I. et A. Berger. 1967. « On the size of the active site in proteases. I. Papain. » *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 27, no 2, p. 157–162.

- Scott, H. S., J. Kudoh, M. Wattenhofer, K. Shibuya, A. Berry, R. Chrast, M. Guipponi, J. Wang, K. Kawasaki, S. Asakawa, S. Minoshima, F. Younus, S. Q. Mehdi, U. Radhakrishna, M. P. Pappasavvas, C. Gehrig, C. Rossier, M. Korostishevsky, A. Gal, N. Shimizu, B. Bonne-Tamir et S. E. Antonarakis. 2001. « Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. » *Nat Genet*, vol. 27, no 1, p. 59–63.
- Sedghizadeh, P. P., S. R. Mallery, S. J. Thompson, L. Kresty, F. M. Beck, E. K. Parkinson, J. Biancamano et J. C. Lang. 2006. « Expression of the serine protease DESC1 correlates directly with normal keratinocyte differentiation and inversely with head and neck squamous cell carcinoma progression. » *Head Neck*, vol. 28, no 5, p. 432–440.
- Serrano, R., J. Barrenetxe, J. Orbe, J. A. Rodríguez, N. Gallardo, C. Martínez, A. Andrés et J. A. Páramo. 2009. « Tissue-specific PAI-1 gene expression and glycosylation pattern in insulin-resistant old rats. » *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 297, no 5, p. R1563–R1569.
- Silvestri, L., F. Guillem, A. Pagani, A. Nai, C. Oudin, M. Silva, F. Toutain, C. Kannengiesser, C. Beaumont, C. Camaschella et B. Grandchamp. 2009. « Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. » *Blood*, vol. 113, no 22, p. 5605–5608.
- Silvestri, L., A. Pagani, A. Nai, I. D. Domenico, J. Kaplan et C. Camaschella. 2008. « The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. » *Cell Metab*, vol. 8, no 6, p. 502–511.
- Stallmach, R. et S. M. Gloor. 2008. « Neurobin/TMPRSS11c, a novel type II transmembrane serine protease that cleaves fibroblast growth factor-2 in vitro. » *Biochem J*, vol. 412, no 1, p. 81–91.
- Stephens, A. W., A. Siddiqui et C. H. Hirs. 1987. « Expression of functionally active human antithrombin III. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, no 11, p. 3886–3890.
- Stirnberg, M., E. Maurer, A. Horstmeyer, S. Kolp, S. Frank, T. Bald, K. Arenz, A. Janzer, K. Prager, P. Wunderlich, J. Walter et M. Gütschow. 2010. « Proteolytic processing of the serine protease matriptase-2: identification of the cleavage sites required for its autocatalytic release from the cell surface. » *Biochem J*, vol. 430, no 1, p. 87–95.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker et J. B. Hogenesch. 2004. « A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 16, p. 6062–6067.
- Szabo, R. et T. H. Bugge. 2008. « Type II transmembrane serine proteases in development and disease. » *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, no 6-7, p. 1297–1316.
- Szabo, R. et T. H. Bugge. 2011. « Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. » *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 27, p. 213–235.
- Szabo, R., J. P. Hobson, K. List, A. Molinolo, C.-Y. Lin et T. H. Bugge. 2008. « Potent inhibition and global co-localization implicate the transmembrane Kunitz-type serine protease inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 in the regulation of epithelial matriptase activity. » *J Biol Chem*, vol. 283, no 43, p. 29 495–29 504.

- Szabo, R., S. Netzel-Arnett, J. P. Hobson, T. M. Antalis et T. H. Bugge. 2005. « Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity. » *Biochem J*, vol. 390, no Pt 1, p. 231–242.
- Szabo, R., Q. Wu, R. B. Dickson, S. Netzel-Arnett, T. M. Antalis et T. H. Bugge. 2003. « Type II transmembrane serine proteases. » *Thromb Haemost*, vol. 90, no 2, p. 185–193.
- Takeuchi, T., J. L. Harris, W. Huang, K. W. Yan, S. R. Coughlin et C. S. Craik. 2000. « Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. » *J Biol Chem*, vol. 275, no 34, p. 26 333–26 342.
- Talini, G., S. Branciamore et E. Gallori. 2011. « Ribozymes: Flexible molecular devices at work. » *Biochimie*, vol. 93, no 11, p. 1998–2005.
- Tanimoto, H., K. Shigemasa, X. Tian, L. Gu, J. B. Beard, T. Sawasaki et T. J. O'Brien. 2005. « Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer. » *Br J Cancer*, vol. 92, no 2, p. 278–283.
- Tripathi, M., S. Nandana, H. Yamashita, R. Ganesan, D. Kirchhofer et V. Quaranta. 2008. « Laminin-332 is a substrate for hepsin, a protease associated with prostate cancer progression. » *J Biol Chem*, vol. 283, no 45, p. 30 576–30 584.
- Tsai, W.-C., C.-H. Chu, C.-P. Yu, L.-F. Sheu, A. Chen, H. Chiang et J.-S. Jin. 2008. « Matriptase and survivin expression associated with tumor progression and malignant potential in breast cancer of Chinese women: tissue microarray analysis of immunostaining scores with clinicopathological parameters. » *Dis Markers*, vol. 24, no 2, p. 89–99.
- Tseng, I.-C., F.-P. Chou, S.-F. Su, M. Oberst, N. Madayiputhiya, M.-S. Lee, J.-K. Wang, D. E. Sloane, M. Johnson et C.-Y. Lin. 2008. « Purification from human milk of matriptase complexes with secreted serpins: mechanism for inhibition of matriptase other than HAI-1. » *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 295, no 2, p. C423–C431.
- Uhland, K. 2006. « Matriptase and its putative role in cancer. » *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, no 24, p. 2968–2978.
- Velasco, G., S. Cal, V. Quesada, L. M. Sanchez et C. Lopez-Otin. 2002. « Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. » *J Biol Chem*, vol. 277, no 40, p. 37 637–37 646.
- Wallrapp, C., S. Hähnel, F. Müller-Pillasch, B. Burghardt, T. Iwamura, M. Ruthenbürger, M. M. Lerch, G. Adler et T. M. Gress. 2000. « A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. » *Cancer Res*, vol. 60, no 10, p. 2602–2606.
- Wang, J. et K. Pantopoulos. 2011. « Regulation of cellular iron metabolism. » *Biochem J*, vol. 434, no 3, p. 365–381.
- Wang, R.-H., C. Li, X. Xu, Y. Zheng, C. Xiao, P. Zerfas, S. Cooperman, M. Eckhaus, T. Rouault, L. Mishra et C.-X. Deng. 2005. « A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. » *Cell Metab*, vol. 2, no 6, p. 399–409.
- Webb, E. C. 1992. *Enzyme nomenclature 1992 : recommendations of the NCIUBMB on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press.

- Webb, S. L., A. J. Sanders, M. D. Mason et W. G. Jiang. 2011. « Type II transmembrane serine protease (TTSP) deregulation in cancer. » *Front Biosci*, vol. 16, p. 539–552.
- Williams, E. C. 1989. « Plasma alpha 2-antiplasmin activity. Role in the evaluation and management of fibrinolytic states and other bleeding disorders. » *Arch Intern Med*, vol. 149, no 8, p. 1769–1772.
- Wilson, S., B. Greer, J. Hooper, A. Zijlstra, B. Walker, J. Quigley et S. Hawthorne. 2005. « The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. » *Biochem J*, vol. 388, no Pt 3, p. 967–972.
- Wreschner, D. H., M. A. McGuckin, S. J. Williams, A. Baruch, M. Yoeli, R. Ziv, L. Okun, J. Zaretsky, N. Smorodinsky, I. Keydar, P. Neophytou, M. Stacey, H.-H. Lin et S. Gordon. 2002. « Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. » *Protein Sci*, vol. 11, no 3, p. 698–706.
- Yan, W., F. Wu, J. Morser et Q. Wu. 2000. « Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 15, p. 8525–8529.
- Zhang, A.-S., S. A. Anderson, J. Wang, F. Yang, K. DeMaster, R. Ahmed, C. P. Nizzi, R. S. Eisenstein, H. Tsukamoto et C. A. Enns. 2011. « Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. » *Blood*, vol. 117, no 5, p. 1687–1699.

ANNEXE A

A.1 Internalisation de la matriptase-2 humaine et murine

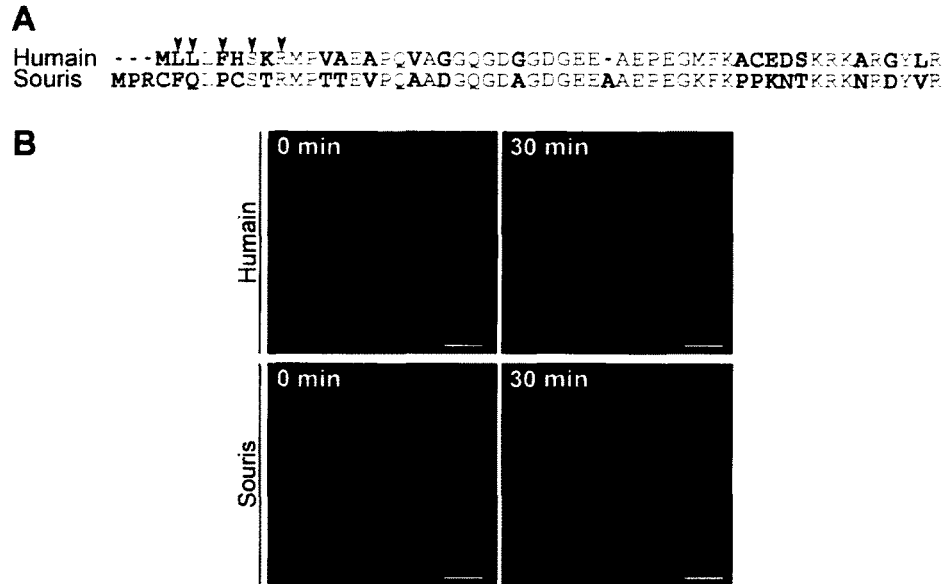


Figure A.1

La matriptase-2 murine n'est pas internalisée

(A) Alignement des séquences humaine et murine de la matriptase-2. Les flèches indiquent les acides aminés impliqués dans l'internalisation de la forme humaine et les caractères rouges, les acides aminés conservés. (B) Microscopie confocale de cellules HEK293 transfectées avec la matriptase-2/V5 humaine ou murine. La matriptase-2 a été marquée à la surface sur glace avec un anticorps contre V5 et fixée immédiatement (0 min) ou après 30 minutes d'incubation à 37 °C. L'immunofluorescence correspondant à l'anti-V5 est représentée en *vert* alors que les noyaux colorés au Hoechst sont représentés en *bleu*. Échelle : 50 µm.

A.2 Phosphorylation de la matriptase-2

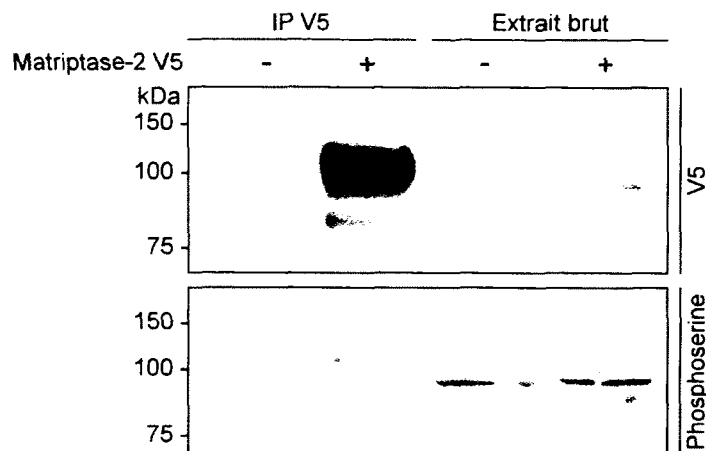


Figure A.2

La matriptase-2 est constitutivement phosphorylée

Des cellules HEK293 ont été transitoirement transfectées avec pcDNA6/V5 (-) ou avec un plasmide codant pour la matriptase-2/V5 (+). 24 heures après la transfection, les cellules ont été lysées et la matriptase-2 a été immunoprécipitée en utilisant un anticorps contre V5 (IP V5). Les protéines immunoprécipitées ont été chargées sur gel SDS-PAGE 10 % puis la présence de la matriptase-2 a été vérifiée par immunobuvardage en utilisant un anticorps contre V5 (panneau du haut) et sa forme phosphorylée a été détectée en utilisant un anticorps contre les phosphosérines (panneau du bas). L'extrait brut a été chargé sur gel afin de vérifier l'efficacité de transfection.

ANNEXE B

B.1 Liste des publications

BÉLIVEAU, F., BRULÉ, C., DÉSILETS, A., ZIMMERMAN, B., LAPORTE, S. A., LAVOIE, C. L., LEDUC, R. (2011) Essential role of endocytosis of the type II transmembrane serine protease TMPRSS6 in regulating its functionality, *J. Biol. Chem* 286 : 29035-43–26.

BÉLIVEAU, F., DÉSILETS, A., LEDUC, R. (2009) Probing the substrate specificity of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J.* 276 : 2213–26.

DÉSILETS, A., BÉLIVEAU, F., VANDAL, G., McDUFF, F-O., LAVIGNE, P., LEDUC, R. (2008) Mutation G827R in matriptase causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease. *J. Biol. Chem* 283 : 10535–42.

B.2 Liste des communications

BÉLIVEAU, F., BRULÉ, C., DÉSILETS, A., ZIMMERMAN, B., LAPORTE, S. A., LAVOIE, C. L., LEDUC, R. Essential role of endocytosis of the type II transmembrane serine protease TMPRSS6 in regulating its functionality, 7^e congrès général de l'International Proteolysis Society (IPS), 16–20 octobre 2011, San Diego, Californie, États-Unis.

BÉLIVEAU, F., BRULÉ, C., DÉSILETS, A., ZIMMERMAN, B., LAPORTE, S. A., LAVOIE, C. L., LEDUC, R. TMPRSS6 : Cible thérapeutique potentielle pour les traitements de désordres en fer ? 1^{ère} journée scientifique du Réseau Québécois de Recherche sur les Médicaments (RQRM), 3 juin 2011, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

BÉLIVEAU, F., DÉSILETS, A., LEDUC, R. Biosynthetic regulation of matriptase-2 by its cytoplasmic domain, 6^e congrès général de l'International Proteolysis Society (IPS), 26–30 octobre 2009, Surfers Paradise, Queensland, Australie.

BÉLIVEAU, F., DÉSILETS, A., FRAPPIER, V., LEDUC, R. Caractérisation biochimique des mutants de la matriptase-2 associées à l'anémie de type IRIDA, 1^{ère} édition de la Journée Phare, 29 janvier 2009, Sherbrooke, Québec, Canada.

BÉLIVEAU, F., DÉSILETS, A., LEDUC, R. Purification and enzymatic characterization of matriptase, hepsin and DESC1 reveals significant differences in substrate specificity, 5^e congrès général de l'International Proteolysis Society (IPS), 20–24 octobre 2007, Patras, Grèce

DÉSILETS, A., BÉLIVEAU, F., VANDAL, G., McDUFF, F-O., LAVIGNE, P., LEDUC, R. Mutation G827R in matriptase causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease, 5^e congrès général de l'International Proteolysis Society (IPS), 20–24 octobre 2004, Patras, Grèce.